



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS**

ÉRICA DE OLIVEIRA VERAS DA LUZ

***Socratea exorrhiza*: potencial bioativo e teores de fenóis e flavonoides**

BOA VISTA, RR  
2012

ÉRICA DE OLIVEIRA VERAS DA LUZ

***Socratea exorrhiza*: potencial bioativo e teores de fenóis e flavonoides**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Bioprospecção.

ORIENTADORA:  
Professora Dra. Adriana Flach

CO-ORIENTADOR:  
Professor Dr. Marcos José Salgado Vital

BOA VISTA, RR  
2012

ÉRICA DE OLIVEIRA VERAS DA LUZ

***Socratea exorrhiza*: potencial bioativo e teores de fenóis e flavonoides**

Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais (PRONAT) da Universidade Federal de Roraima. Área de concentração: Bioprospecção. Defendida em 21 de agosto de 2012 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

---

Dra. Patrícia Valente da Silva  
Centro de Biotecnologia - UFRGS

---

Dr. Luiz Antônio Mendonça Alves da Costa  
Departamento de Química/Centro de Ciência e Tecnologia – UFRR

---

Dr. Habel Nasser Rocha da Costa  
Departamento de Química/Centro de Ciência e Tecnologia – UFRR

Aos meus pais Ângela e Delman,  
fonte de amor, carinho e proteção.

Ao Kelson, minha cara metade.

Ao meu sogro Zezinho Martins (*in  
memorian*)

Aos meus filhos Lucas e Amanda,  
que são a melhor parte de mim.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Deus, obrigada por todas as situações que me foram enviadas como desafios, tristezas e alegrias, momentos bons e ruins. De tudo se tira uma lição e eu aprendi, que mais do que nunca precisamos uns dos outros, porque ninguém faz nada sozinho...

“...é com um mutirão de boa vontade que o saber se constrói!”  
(Delman Veras)

A esse mutirão formado por:

Lucas e Amanda, meus filhos; Delman e Ângela Veras, meus pais; Kelson da Luz, meu marido, Andel e Delman Neto, meus irmãos, Letícia Veras, sobrinha. Família linda, minha base, meu tudo!

Danúbia Carvalho, Danúzia Carvalho, Manoel Hozana. Três guerreiros vitoriosos. Minhas fontes de inspiração e superação.

Dra. Adriana Flach, orientadora. Pessoa de notável talento e competência, que tem o meu respeito e admiração!

Dr. Marcos Vital, co-orientador. Profissional cujas qualidades dispensam comentários. Amigo, conhecedor do meu potencial e limitações. Tem um jeito mágico de simplificar situações e um jeito firme de criticar. O senhor me faz acreditar que tudo é possível!

Etyene Janine Gonzales, bolsista de iniciação científica, ANJO.

Rede Bionorte/CNPq, pelo financiamento da pesquisa;

Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais (PRONAT);

Laboratório de Pesquisa em Palmeiras (LabPalm), INPA/AM, na pessoa da sua coordenadora Dra. Ires de Paula Miranda, pela gentil contribuição na identificação da espécie botânica estudada;

Laboratório Central de Roraima (LACEN), na pessoa da Kátia pela doação dos micro-organismos;

Professores: Dra. Albanita de Jesus, Dra. Silvana Fortes, Dra. Lucília Pacobahyba, Pablo Almenzaga, José Frutuoso, Vânia Lezan, Roseane Santiago, Gardênia Cabral e Luiz Antônio Alves da Costa. Uma dica dali, uma sugestão daqui; um abraço, a torcida, uma crítica, um aplauso. Vocês têm o meu carinho!

Colegas de curso Andréia Alencar (Levendréia), Suelen Belo (Suelenase), Karuliny Maia (Karu-legu), Priscila Azarak (Pri, a encantadora de sapos), Izabele (Andirobell)

Julian Quitiaquez (Julian passarinho), Lorenza (LorenFlôr) e Vaneza (Van hot). Entre sonhos, sorrisos e tristezas, nos conhecemos. Ajustamos o passo, aprendemos a respeitar as diferenças e admirar as qualidades uns dos outros. Força na peruca! O título de Mestre é nosso por merecimento!

Semiramys, Jafet, Maryana, Mayara, Dina, Eduardo Brito, Layla, Andréia Nascimento, Leonardo Hatman, Edmar, Will, Jordano, Lorryne, Heloísa, novos talentos da Biologia.

Gilmar Prado, Jonierisson, Márcia, Edneide, Sueli, Luciana, Iolete Maciel, Josimara Passos, Iolanda, novos talentos da Química. Entre brincadeiras e tensões do dia-a-dia, nos ajudamos mutuamente e estabelecemos verdadeiros laços de amizade.

Reginaldo Carvalho, Eduardo Marreiros, Adônis Cavalcante, Ana Célia, Nelson José, Jaci Caetano, Joel Cordeiro, Edmilson (ADM). Colegas de trabalho.

Elisângela Ponchet, Débora Dinelly e Andréa Sant'ana, amigas do coração. Sinônimos de apoio e incentivo.

Débora Maia, Fabrícia Rocha e Marta Gardênia, amigas de uma vida inteira e para todas as horas. Amo vocês!

Agradeço imensamente!

Obrigada!

## RESUMO

*Socratea exorrhiza* (Mart.) H. Wendland é conhecida popularmente como paxiuba. Esta Arecaceae ocorre naturalmente na região amazônica. É muito utilizada por caboclos e índios de Roraima, porém pouco estudada quanto ao perfil químico e biológico. Neste trabalho investigou-se o potencial bioativo dos extratos da parte externa e interna da raiz e do broto da raiz de *S. exorrhiza*, mediante testes de atividade citotóxica (*Artemia salina* Laech), antioxidante (DPPH) e antimicrobiana contra as bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 7002) e a levedura *Candida albicans* ATCC18804. Dos extratos mais ativos determinaram-se os teores de fenólicos e flavonóides por espectrofotometria. O processo de extração foi a quente em sistema de Soxhlet, usando solventes orgânicos de polaridades crescentes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol). Os resultados mostraram que os extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz destacaram – se nos testes de atividade citotóxica e antioxidante, sendo o do broto da raiz (DL<sub>50</sub> 473 e IC<sub>50</sub> 24,03 µg/mL) o mais ativo para os dois testes. A ação positiva desses extratos nas atividades biológicas pode estar relacionada à presença de flavonoides evidenciada pelo elevado teor encontrado (76,8% e 64,66%, respectivamente). Os extratos metanólicos da parte externa da raiz e do broto da raiz apresentaram alto poder inibitório frente à levedura *C. albicans* (halos de 18 e 25 mm) respectivamente. Todos os extratos do broto da raiz apresentaram ação inibitória moderada contra o crescimento das bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. mirabilis* com halos que variaram entre 10 e 17 mm, sendo que o extrato metanólico do broto da raiz obteve alto poder inibitório no crescimento de *P. mirabilis* (halo 22 mm). A ação positiva dos extratos da parte externa da raiz e do broto da raiz contra bactérias Gram-negativas corrobora com o conhecimento tradicional, que preconiza a utilização das raízes de *S. exorrhiza* na medicina popular para o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, o que torna ainda maior o valor dos resultados obtidos. Outro dado importante obtido com trabalho é o novo registro de ocorrência de *S. exorrhiza* para o estado de Roraima. Os resultados aqui apresentados são inéditos e importantes na ampliação do conhecimento sobre esta palmeira, estimulando a continuidade de estudos mais aprofundados.

Palavras-chave: Extratos vegetais. Atividade biológica. Arecaceae. Roraima. Amazônia.

## ABSTRACT

*Socratea exorrhiza* (Mart.) H. Wendland is popularly known as paxiuba. This Arecaceae occurs naturally in the rain forest. It is widely used by the locals and the native Indians of Roraima, however it is not as studied as in regards to its biological and chemical profile. In this work, it was investigated that the extracts of the bioactive potential of the outer and inner parts of the root and of the sprout from the root of *S. exorrhiza*, by cytotoxic activity tests (*Artemia salina* Laech), antioxidant (DPPH) and antimicrobial against bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 7002) and with *Candida albicans* yeast ATCC18804. Among the most active extracts were determined the levels of phenolics and flavonoids by spectrophotometry method. The extraction process was heat by the Soxhlet method, using organic solvents of increasing polarity (hexane, chloroform, ethyl acetate and methanolic). extracts of the outer part of the root and the sprout from the root stood out on the cytotoxic activity and the antioxidant tests, being the sprout from the root (DL<sub>50</sub> 473 and IC<sub>50</sub> 24,03 µg/mL) the most active of the two tests. The positive Action of these two extracts on the biological activities can be related to the presence of flavonoids evidenced by the high content found on the of the outer part of the root extracts 76,8% and sprout from the root 64,66%. The methanolic extracts of the outer part of the root and the sprout from the root demonstrated high inhibitory power before the *C. albicans* yeast (halos of 18 and 25 mm) respectively. All the sprouts from the root extracts presented moderate inhibitory action against the growth of the Gram-negative *E. coli* and *P. mirabilis* bacteria with halos that varied between 10 and 17mm, and the methanolic extracts sprout from the root obtained high inhibitory power on the growth of *P. mirabilis* (halo 22 mm). The extracts' positive action of the outer part of the root and the sprout from the root against Gram-negative bacteria collaborates with the traditional knowledge that advocates the use of the *S. exorrhiza* roots in popular medicine for the sexually transmitted diseases (STD), which makes even higher the values of the results with these extracts. Another important finding in this work is the new record of occurrence of *S. exorrhiza* for the state of Roraima. The data herein presented is new and important in advancing knowledge about this palm tree, stimulating the continuity of deeper studies.

Key-words: Plant extracts. Biological activity. Arecaceae. Roraima. Amazon.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estruturas moleculares: a) ácido acetil-salicílico b) salicin c) morfina.....	20
Figura 2 -	Estrutura de dois constituintes químicos encontrados em extratos da raiz e do talo da folha do açaí.....	31
Figura 3 -	Conjunto de raízes escoras de <i>Socratea exorrhiza</i> , formando um cone na base.....	32
Figura 4 -	Raiz de um indivíduo jovem da palmeira <i>S. exorrhiza</i> (paxiuba) às margens de um igarapé na Fazenda Águas da Serra/Confiança II/ Cantá/Roraima.....	33
Figura 5 -	Mapa da distribuição geográfica de <i>Socratea exorrhiza</i> no Brasil.....	34
Figura 6 -	A) aspecto da folha (costelas) e caule de <i>Socratea. exorrhiza</i> . B) detalhe da folha, notar borda dentada.....	35
Figura 7 -	Frutos maduros de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	35
Figura 8 -	Brotos das raízes de <i>Socratea exorrhiza</i> . O detalhe mostra o aspecto amarelado da gema.....	36
Figura 9 -	Vista geral da mata onde foram realizadas as coletas da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> . Fazenda Águas da Serra/ Confiança II/ Cantá/ Roraima.....	37
Figura 10 -	Balanço hídrico das regiões brasileiras. Mapa da quantidade de chuva acumulada no mês de maio de 2011.....	39
Figura 11 -	Formações vegetais naturais de Roraima. Município do Cantá circundado de em amarelo.....	40
Figura 12 -	Representação esquemática da experimentação da pesquisa.....	43
Figura 13 -	Exsicatas de <i>Socratea exorrhiza</i> depositadas no herbário do Centro de Estudos da Biodiversidade CBIO/UFRR. A) Base; B) Meio; C) Ápice.....	44
Figura 14 -	Sequência de preparação das amostras: A) higienização; B e C) separação das partes da raiz; D) pesagem das amostras; E) secagem em estufa e F) amostra em polvilho pronta para extração.....	45
Figura 15 -	Sequência da produção dos extratos: A) inserção da amostra em cartucho de papel filtro; B) sistema de extração; C) soluções	

	obtidas após extração; D) secagem com sulfato de sódio e filtragem das soluções; E) concentração dos extratos por evaporador rotativo; F) extratos armazenados em dessecador.....	46
Figura 16 -	Soluções estoque utilizadas no teste de citotoxicidade de extratos da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	48
Figura 17 -	Esquema representativo da técnica do teste de citotoxicidade de extratos da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> contra <i>Artemia salina</i> .....	49
Figura 18 -	Sistema montado para eclosão dos ovos de <i>Artemia salina</i> .....	50
Figura 19 -	Equação para determinar o percentual de atividade antioxidante (%AA).....	53
Figura 20 -	Aspecto dos extratos quanto à coloração. A) extratos hexânicos, B) extratos clorofórmicos, C) extratos de acetato de etila e D) extratos metanólicos da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	63
Figura 21 -	A) aspecto leitoso do extrato acetato de etila do broto da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> ; B) extratos concentrados da raiz de <i>S. exorrhiza</i> .....	63
Figura 22 -	Placa de ccd mostrando manchas amareladas em fundo púrpuro. Ação da atividade antioxidante dos extratos da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> após reação com DPPH.....	66
Figura 23 -	A) amostra após reação com DPPH (faixa de variação da concentração = 16,80 µg/mL a 80,0 µg/mL); B) Controle em triplicata.....	66
Figura 24 -	Curva de calibração para obtenção do IC <sub>50</sub> da atividade antioxidante do extrato acetato de etila do broto da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	67
Figura 25 -	Curva de calibração para obtenção do IC <sub>50</sub> da atividade antioxidante do extrato acetato de etila da parte externa da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	68
Figura 26 -	Gráfico da capacidade antioxidante dos extratos da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	69
Figura 27 -	Halos de inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> . Resultado da ação dos extratos hexânicos, clorofórmicos,	

	acetato de etila e metanólicos da parte externa da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	74
Figura 28 -	Halos de inibição do crescimento de <i>Candida albicans</i> . Resultado da ação do extrato metanólico do broto da Raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	76
Figura 29 -	Gráfico da suscetibilidade dos micro-organismos testados com extratos da raiz e do broto de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	77
Figura 30 -	Número de espécies microbianas sensíveis à ação dos extratos da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> . Cada cor representa um micro-organismo testado.....	77
Figura 31 -	Ácido gálico.....	80
Figura 32 -	Curva de calibração do ácido gálico.....	82
Figura 33 -	Quercetina.....	84
Figura 34 -	Curva de calibração de quercetina.....	85
Figura 35 -	Pinocembrina.....	86
Figura 36 -	Curva de calibração de pinocembrina.....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Partes da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> , solventes e código de identificação dos extratos.....	47
Tabela 2 -	Concentrações das soluções estoque utilizadas no teste de atividade antioxidante.....	51
Tabela 3 -	Preparação das soluções contendo amostra, branco e controle para o teste de atividade antioxidante, pelo sequestro do radical livre DPPH.....	52
Tabela 4 -	Micro-organismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.....	53
Tabela 5 -	Percentual de rendimento dos extratos hexânicos, clorofórmicos, acetato de etila e metanólicos de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	62
Tabela 6 -	Média e desvio padrão da mortalidade das larvas de <i>Artemia salina</i> nos extratos de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	64
Tabela 7 -	Atividade antioxidante (AA%) e IC <sub>50</sub> (µg/mL) dos extratos metanólicos, clorofórmicos e acetato de etila das partes das raízes de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	67
Tabela 8 -	Valores de IC <sub>50</sub> dos extratos da raiz <i>Socratea. exorrhiza</i> . Teste de atividade antioxidante.....	68
Tabela 9 -	Teste de atividade antimicrobiana. Média ± Desvio padrão dos halos de inibição (mm).....	71
Tabela 10 -	Resultado geral do teste para verificação da Concentração Mínima Inibitória de extratos da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> . Técnica de difusão em poço.....	79
Tabela 11 -	Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos extratos da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	79
Tabela 12 -	Absorbâncias e concentrações das soluções de ácido gálico, após reação com Folin-Ciocalteu no processo de quantificação de fenóis totais nos extratos acetato de etila da raiz e do broto da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	81
Tabela 13 -	Concentrações e absorbâncias das soluções estoque dos extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	81

Tabela 14 -	Teor de fenóis (mg EAG/g extrato) presentes nos extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	82
Tabela 15 -	Absorbâncias e concentrações das soluções de quercetina, após reação com cloreto de alumínio, no processo de quantificação de flavonas e flavonóis nos extratos acetato de etila da raiz e do broto da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	84
Tabela 16 -	Concentrações e absorbâncias das soluções estoque dos extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	85
Tabela 17 -	Teor de flavonas e flavonóis (mg EQT/g extrato) presentes nos extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	86
Tabela 18 -	Absorbâncias e concentrações das soluções de pinocembrina, após reação com 2,4-dinitrofenilidrazina (DNP), no processo de quantificação de flavanonas e diidroflavonóis nos extratos acetato de etila da raiz e do broto da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> ..	87
Tabela 19 -	Concentrações e absorbâncias das soluções estoque dos extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	87
Tabela 20 -	Teor de flavanonas e diidroflavonóis (mg EPN/g extrato) presentes nos extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	88
Tabela 21	Teor de flavonoides totais presentes nos extratos acetato de etila da parte externa da raiz (EAPER) e do broto da raiz (EABRT) de <i>Socratea exorrhiza</i> .....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
ABTS	Sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)
ABS	Absorbância
ATCC	American Type Culture Collection
BRT	Broto da raiz
CBIO	Centro de Estudos da Biodiversidade
CE <sub>50</sub>	Concentração eficiente a 50%
CPRM	Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais
DL <sub>50</sub>	Dose letal capaz de matar 50% da população amostrada
DNP	2,4-dinitrofenil-hidrazina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazina
EAG	Equivalente de ácido gálico
EPN	Equivalente de pinocembrina
EQT	Equivalente de quercetina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
HCN	Ácido cianídrico
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% da população amostrada
INCRA	Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
KOH	Hidróxido de potássio
LABPALM	Laboratório de Pesquisa em Palmeira
MIC	Concentração Mínima Inibitória
PER	Parte externa da raiz
PIR	Parte interna da raiz
ppm	Partes por milhão; 1 ppm = 1mg/L
SIPAM	Sistema de Proteção da Amazônia
UFC	Unidade Formadora de Colônia
ZCIT	Zona de Convergência Intertropical

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	16
1.1	USO DAS PLANTAS COMO FONTE DE SAÚDE.....	16
1.2	DIVERSIDADE QUÍMICA DAS PLANTAS.....	19
1.3	ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	21
1.3.1	Atividade citotóxica.....	22
1.3.2	Atividade antioxidante.....	23
1.3.3	Atividade antimicrobiana.....	25
1.3.3.1	<i>Escherichia coli</i> .....	27
1.3.3.2	<i>Proteus mirabilis</i> .....	28
1.3.3.3	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
1.3.3.4	<i>Candida albicans</i> .....	29
1.4	FAMÍLIA ARECACEAE.....	29
1.5	<i>Socratea exorrhiza</i> : DESCRIÇÃO BOTÂNICA, USO E IMPORTÂNCIA.....	32
1.5.1	Características gerais de <i>S. exorrhiza</i> .....	34
1.6	LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO....	37
1.6.1	Relevo e características pedológicas.....	38
1.6.2	Clima.....	38
1.6.3	Vegetação.....	40
2	<b>OBJETIVOS.....</b>	42
2.1	OBJETIVO GERAL.....	42
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	43
3.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA ESTUDADA.....	43
3.2	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	44
3.3	PRODUÇÕES DOS EXTRATOS.....	45
3.4	TESTES DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	47
3.4.1	Soluções estoque.....	47
3.4.1.1	Preparação das soluções estoque de cada extrato.....	47
3.4.2	Teste de Citotoxicidade.....	48
3.4.2.1	Bioensaio.....	50
3.4.3	Atividade antioxidante.....	51
3.4.3.1	Preparação das amostras.....	51
3.4.3.2	Análise qualitativa da atividade antioxidante.....	52
3.4.3.3	Análise quantitativa da atividade antioxidante.....	52
3.4.4	Atividade antimicrobiana.....	53
3.4.4.1	Micro-organismos.....	53
3.4.4.2	Padronização dos inóculos.....	54
3.4.4.3	Técnica de difusão em disco.....	54
3.4.4.4	Técnica de difusão em poço.....	55
3.4.4.5	Incubação das placas inoculadas.....	55

3.4.4.6	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	56
3.5.	QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS E FLAVONOIDES.....	56
3.5.1	Determinação do teor de fenólicos .....	56
3.5.1.1	Doseamento das amostras.....	56
3.5.1.2	Curva de calibração com ácido gálico.....	57
3.5.2	Determinação do teor de flavonoides.....	57
3.5.2.1	Teor de flavonas e flavonóis.....	58
3.5.2.1.1	Teste de doseamento das amostras.....	58
3.5.2.1.2	Curva de calibração de quercetina.....	58
3.5.2.2	Teor de flavanonas e diidroflavonóis.....	59
3.5.2.2.1	Preparação do reagente DNP.....	59
3.5.2.2.2	Doseamento das amostras.....	59
3.5.2.2.3	Curva de calibração de pinocembrina.....	59
3.6	Estatística.....	60
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	61
4.1	CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS DA RAIZ DE <i>S. exorrhiza</i> ....	61
4.2	ATIVIDADE DE CITOTOXICA.....	64
4.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	65
4.3.1	Análise qualitativa da atividade antioxidante.....	65
4.3.2	Análise quantitativa da atividade antioxidante.....	66
4.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	70
4.4.1	Atividade antimicrobiana dos extratos brutos da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> contra o crescimento de bactérias Gran-negativas.....	71
4.4.2	Atividade antimicrobiana dos extratos brutos da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> contra o crescimento da bactéria Gran-positiva <i>Staphylococcus aureus</i> .....	73
4.4.3	Atividade antimicrobiana dos extratos brutos da raiz de <i>Socratea exorrhiza</i> contra o crescimento da levedura <i>Candida albicans</i> .....	75
4.4.4	Espectro de ação dos extratos.....	77
4.4.5	Concentração Mínima Inibitória.....	78
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS E FLAVONÓIDES.....	80
4.5.1	Teor de fenóis.....	80
4.5.2	Teor de flavonoides.....	83
4.5.2.1	Flavonas e flavonóis.....	83
4.5.2.2	Flavanonas e diidroflavonóis.....	86
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	91
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas, fonte de saúde desde o início das civilizações, ainda hoje constituem a base de tratamento e cura de doenças para muitas populações de diferentes culturas e classes sociais ao redor do mundo. Mas, para a utilização das plantas de modo eficaz e seguro, é preciso conhecer suas propriedades, características e principais indicações.

No Brasil a pesquisa visando obtenção de fármacos e fitoterápicos é uma vocação natural, considerando sua riqueza e diversidade biológica, além do valioso legado advindo do etnoconhecimento, especialmente de comunidades da Amazônia Legal Brasileira.

Inserido neste contexto amazônico, o estado de Roraima com todas as suas potencialidades, destaca-se sobremaneira pelas suas diferentes fitofisionomias, diversidade dos recursos hídricos e, sobretudo, pela riqueza de sua fauna e flora, caracterizando - se como um celeiro biodiverso de plantas e princípios ativos à espera de exploração científica, pois apesar de toda importância atribuída às plantas, em Roraima, o estudo e o uso de princípios ativos ainda caminham em passos lentos, justificando assim todo e qualquer esforço que possa fomentar a pesquisa no campo da bioprospecção.

Partindo dessa premissa, o presente trabalho contribuiu com o estudo biológico e químico de extratos da raiz de *Socratea exorrhiza* (Mart.) H. Wedland, palmeira conhecida popularmente como paxiuba, pertencente à família Arecaceae, abundante na região amazônica e muito utilizada por caboclos e índios do estado de Roraima.

Neste trabalho, foi investigado o potencial bioativo dos extratos da raiz de *S. exorrhiza*, mediante testes que avaliaram a atividade citotóxica, antioxidante e antimicrobiana. Os extratos mais ativos foram selecionados, determinando – se nestes o teor de fenóis e flavonoides.

### 1.1 USO DAS PLANTAS COMO FONTE DE SAÚDE

Os produtos de origem vegetal formam a base da medicina tradicional que existe há milhares de anos. As plantas são fontes de compostos bioativos que a humanidade tem usado ao longo da história, independente do conhecimento dos seus componentes químicos ou dos processos que desencadeiam seus efeitos

(MACIAS et al., 2007). Tal uso remonta aos primórdios das civilizações, quando os vegetais eram utilizados não só como fonte alimentícia, mas também em práticas médicas, sob a forma de chás por infusão, decocção ou maceração, bem como sucos, tinturas, banhos, cataplasmas e unguentos (LORENZI; MATOS, 2008).

De posse desse legado, é consenso entre pesquisadores que o uso de vegetais na medicina tradicional é um dos pontos de partida para a descoberta de compostos bioativos que podem originar novos fármacos, na forma pura ou alterada quimicamente (ZAMPINI et al., 2009; MBOSSO et al., 2010; ZANETTI et al., 2010; OLIVERO-VERBEL et al., 2010). Calcula-se que nos últimos 25 anos, 77,8% dos agentes anticancerígenos testados e aprovados foram derivados de produtos naturais (NOGUEIRA; SERQUEIRA; SOARES, 2010).

A partir do século XIX, com o desenvolvimento da química combinatória, da robótica, bioinformática e da biologia molecular entre outras ciências, as drogas sintéticas passaram a ser mais valorizadas que os métodos naturais na fabricação de novos compostos. A fitoterapia foi colocada em segundo plano em nome do “progresso científico” (LI; VEDERAS, 2009).

Porém, diante da urgente necessidade de um uso sustentável dos recursos do planeta, correndo risco de sua própria extinção, cientistas, empresários e governos, renderam-se mais uma vez ao conhecimento tradicional, reconhecendo sua eficácia em uma perspectiva que leva em conta a preservação do meio ambiente e dos recursos naturais. O conhecimento tradicional, com saberes acumulados de diversas gerações voltou a ser valorizado (BRASIL, 2010).

O uso popular de produtos vegetais tem tanta importância que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a integrar a medicina tradicional aos programas de saúde pública de países em desenvolvimento (SOSNOWSKA; BALSLEV, 2009). Desde 1978, a Organização Mundial de Saúde reconhece oficialmente o uso de fitoterápicos.

No Brasil, a política de uso de plantas medicinais teve início em 1981 e recentemente, o Decreto nº 5.813/2006 instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais (BRASIL, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde, seja por motivo de pobreza ou precariedade no sistema de saúde, entre 65 a 80% da população mundial buscam as plantas medicinais para fins terapêuticos.

O avanço nos estudos que envolvem produtos obtidos a partir de organismos vivos ou parte deles deve-se ao advento da Biotecnologia. Segundo o relatório da

Convenção para a Diversidade Biológica, biotecnologia significa qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica (SANT'ANA, 2002).

A aplicação da biotecnologia nos permite melhorar, expandir e acelerar significativamente o estudo e o uso da biodiversidade e seus produtos, conciliando a integração entre a conservação da diversidade biológica e o desenvolvimento sócio-econômico-sustentável (ROCA et al., 2004).

O mercado mundial de fitomedicamentos é milionário e pode constituir uma nova forma de aproveitamento da flora, de maneira a contribuir para o desenvolvimento econômico sustentado do Brasil. A produção de medicamentos de plantas da nossa biodiversidade é praticamente inexistente (JOLY et al., 2011).

Um dos fatores fundamentais para se atingir o desejado desenvolvimento biotecnológico no setor farmacêutico está atrelado à formulação de uma política de saúde oficial que fomente o desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional bem como a exploração dos recursos naturais. Respeitando os direitos das populações indígenas e comunidades tradicionais tanto sobre os recursos genéticos existentes em seus territórios, como sobre os conhecimentos que detém, de modo que a distribuição dos benefícios provenientes da exploração destes recursos possibilite o acesso equitativo de seus cidadãos a medicamentos apropriados para o tratamento de suas enfermidades (FUNARI; FERRO, 2005).

Assim sendo, a prospecção ética da biodiversidade, visando agregar ciência e tecnologia a seus produtos, passa a ser de importância estratégica para os países em desenvolvimento, sendo um instrumento tanto para a descoberta de alternativas para o tratamento de doenças típicas destes países, como para estimular o crescimento de suas economias (MIGUEL; MIGUEL, 2004). Neste sentido, a publicação da primeira edição do Formulário Nacional de Fitoterápicos, que integra a Farmacopeia Brasileira, apresenta-se com imenso valor. A obra traz 83 monografias de medicamentos, como infusões, xaropes e pomada. A expectativa é que o uso e a produção de fitoterápicos no país ganhem impulso, já que o formulário define padrões únicos para a fabricação dos medicamentos de parâmetros exigidos (BRASIL, 2012).

Isto significa notável oportunidade de conhecimento e valorização dos recursos naturais e, portanto, de desenvolvimento econômico nas regiões ricas em

biodiversidade, como é o caso da Amazônia. Nesta região que apresenta reconhecida diversidade biológica e uma rica herança indígena quanto à utilização da flora, apenas uma pequena fração de suas plantas nativas foi devidamente estudada (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

## 1.2 DIVERSIDADE QUÍMICA DAS PLANTAS

As plantas são os organismos vivos complexos mais antigos. A alta diversidade biológica observada no Reino Plantae é presumivelmente produto da co-evolução entre estes organismos e seus parasitas. Tal diversidade refere-se não somente ao número de espécies e morfologia, mas também à diversidade de compostos produzidos em seu metabolismo secundário (MACIAS et al., 2007; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Os metabólitos secundários são substâncias que não estão envolvidas nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução, mas derivam do metabolismo primário que realiza processos essenciais à manutenção da vida do organismo (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Os produtos obtidos a partir do metabolismo secundário das plantas constituem o que os químicos chamam de produtos naturais. Estes compostos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação de sua espécie no ecossistema em que está inserido (SANTOS; POZETTI; VARANDA, 2006).

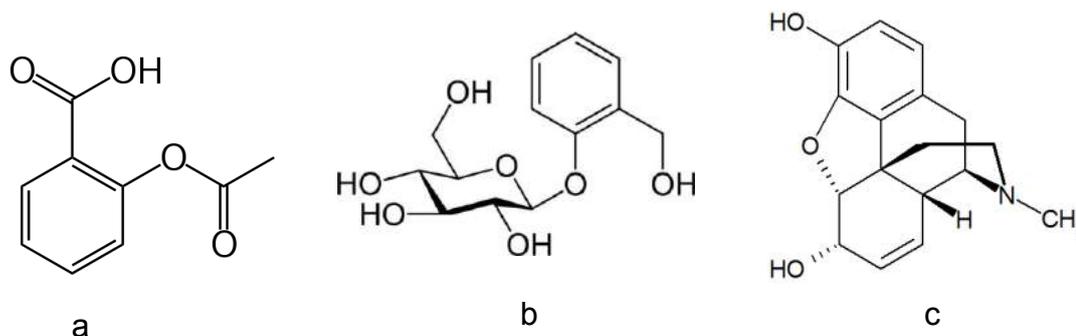
Esses compostos agem como mecanismo de defesa da planta contra o ataque de bactérias, fungos, protozoários, insetos e outros animais que querem utilizá-la como pasto (CARVALHO, 2004), atração de polinizadores, defesa contra herbivoria, patógenos, radiações ultravioleta e estresse abiótico entre outros, (VERPOORTE; MARASCHIN, 2001) ou ainda para interação planta-planta na competição por água e luz (HARBORNE, 1998).

De acordo com Carvalho (2004) conhece-se cerca de 10.000 metabólitos secundários e supõe-se que esse número ultrapasse 100.000, distribuídos principalmente em três grandes grupos: terpenos, fenóis e alcaloides.

Historicamente, importantes compostos foram isolados a partir de extratos vegetais e são utilizados como medicamentos. Alguns exemplos mais conhecidos

têm suas estruturas moleculares demonstradas na figura 1 (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Figura 1– Estruturas moleculares: a) ácido acetil-salicílico b) salicin c) morfina.



Fonte: Dias; Urban; Roessner (2012).

A diversidade molecular das plantas constitui um desafio para o pesquisador que pretende isolar e determinar a estrutura de princípios ativos, uma vez que um extrato vegetal bruto constitui uma matriz muito complexa contendo centenas ou milhares de metabólitos (YUNES; CALIXTO, 2001; RODRIGUES; SALATINO, 2006).

Em busca de novas moléculas bioativas, um número significativo de espécies de plantas já foi estudado quanto às propriedades farmacológicas, entretanto, se levarmos em conta a existência das cerca de 300.000 espécies de plantas conhecidas, muito trabalho ainda tem para ser feito, pois, na maioria das plantas, somente uma das partes, como folha, raiz ou caule, ou somente um tipo de preparação como óleo essencial ou extrato bruto foram estudados (DUARTE et al., 2005).

Por isso, uma eficiente detecção e rápida caracterização dos compostos novos têm papel fundamental na pesquisa de produtos naturais biologicamente ativos. Hoje com o avanço de técnicas analíticas, sobretudo das técnicas hífenadas, a elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com níveis de sensibilidade e seletividade, tem sido muito mais fácil (PINTO et al., 2002).

A utilização de técnicas hífenadas é de grande valia, pois fornece numerosas informações estruturais dos metabólitos antes mesmo do seu isolamento. A

hifenação de métodos eficientes de separação com detector espectrométrico constitui a principal ferramenta utilizada no estudo de plantas medicinais, onde a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida ocupam posições de destaque entre os métodos de separação (RODRIGUES; SALATINO, 2006).

No entanto, os trabalhos em fitoquímica apresentam um caráter multidisciplinar, focalizando não só as análises químicas, mas também as atividades biológicas. O enfoque biológico pode se traduzir numa possível aplicação farmacológica, facilitando a obtenção de financiamentos à pesquisa de outras fontes não - governamentais (PINTO et al., 2002).

### 1.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

De acordo com a Resolução RDC Nº 55 DE 16/12/2010 – que dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos, produtos biológicos e outras providências - atividade biológica é a habilidade específica ou capacidade do produto atingir um efeito biológico definido (BRASIL, 2011).

A avaliação da atividade biológica inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas e de frações ou extratos da droga vegetal. A necessidade de constatar e verificar a atividade biológica de uma planta e dos produtos dela derivados se justifica sob dois pontos de vista:

i) o primeiro considera a necessidade de comprovação de uma determinada atividade farmacológica ou toxicológica já atribuída à planta pelo conhecimento popular;

ii) o segundo diz respeito ao estabelecimento de estratégias de desenvolvimento tecnológico, no qual a validação do processo tecnológico exige a conservação da composição química e sobretudo, da atividade farmacológica a ser explorada (KLEIN et al., 2009). O conhecimento dos aspectos de atividade biológica do vegetal é requisito essencial para a transformação da planta medicinal no produto fitoterápico (TOLEDO et al., 2003).

Diversos ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na busca de substâncias bioativas têm frequentemente sido incorporado às pesquisas de bioprospecção em muitos laboratórios de produtos naturais (CECHINEL-FILHO et al., 1998; SIQUEIRA et al.,

1998). Dentre estes ensaios biológicos encontram-se os testes de citotoxicidade com *Artemia salina* Laech, testes de atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

### 1.3.1 Atividade citotóxica

Um método simples, barato e eficiente de determinação de toxicidade aguda de substâncias é o ensaio com *A. salina* (SIQUEIRA et al., 1998), um microcrustáceo da ordem Anostraca comercializado em lojas de aquários como alimento vivo para peixes (LIMA, 2009).

Nos ensaios com *A. salina*, determina-se a DL<sub>50</sub> (dose letal) ou CL<sub>50</sub>, a concentração letal capaz de matar 50% da população total de animais. As amostras são consideradas ativas quando CL<sub>50</sub> < 1000 µg/mL (MEYER et al., 1982).

Sistematicamente este bioensaio tem sido utilizado 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 (MCLAUGHLIN; SAIZARBITORIA; ANDERSON, 1995).

Trabalhos envolvendo atividade citotóxica frente *A. salina* com espécies de Arecaceae são escassos. Um dos poucos encontrados na literatura tem como autoras Galotta e Boaventura (2005). Estas pesquisadoras testaram extratos da raiz e do talo da folha de açai (*E. precatória*) obtendo bons resultados.

Com outras espécies de plantas, porém, é comum encontrar trabalhos que usaram o teste com *A. salina* como bioensaio prévio na investigação de plantas com potencial antitumoral ou que apresentam relatos de toxicidade pelo conhecimento tradicional.

Um exemplo recente é o de Amarante et al. (2011) que realizaram estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *A. salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*), uma planta aquática de amplo uso na medicina tradicional amazônica. As atividades biológicas concentraram-se na fração diclorometânica que apresentou alta toxicidade contra *A. salina* (DL<sub>50</sub><31µg/mL) e alta atividade antiplasmódica (IC<sub>50</sub><10 µg/mL).

Brasileiro et al. (2006) avaliaram a ação citotóxica de trinta e três extratos brutos de um total de trinta e duas espécies de plantas medicinais da cidade de

Governador Valadares (MG). Destes, dez extratos etanólicos apresentaram toxicidade frente a larvas de *A. salina*. Os resultados obtidos da CL<sub>50</sub> para os compostos variaram entre 23,10 ppm a 885,37 ppm, demonstrando atividade citotóxica de plantas brasileiras.

Talvez a dificuldade encontrada no levantamento bibliográfico para testes com *A. salina* de plantas brasileiras e principalmente amazônicas esteja relacionada à falta de publicação em revistas especializadas. Na realização deste trabalho foram encontradas muitas dissertações e teses direcionadas à investigação da toxicidade de plantas nativas do Brasil, porém poucos artigos abordando o assunto foram publicados.

### 1.3.2 Atividade antioxidante

Os estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante (AA) têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas (ALVES et al., 2010).

Essa busca resultou no desenvolvimento de diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (SANCHES-MORENO, 2002).

Dentre os testes utilizados, citam-se aqueles conhecidos pelas siglas TRAP (*Total Radical - Trapping Antioxidant Parameter*), ORAC (*Oxygen-Radical Absorbancy Capacity*), FRAP (*Ferric-Reducing Ability of Plasma*) e TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). TRAP e ORAC são métodos cuja determinação analítica envolve reações de transferência de átomos de hidrogênio, já FRAP e TEAC são métodos por transferência de elétrons (VASCONCELOS et al., 2007).

De acordo com Aruoma (2003), estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC e TRAP), poder de redução do metal (FRAP e TEAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose) e captura do radical orgânico 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH).

O método de sequestro do radical livre DPPH é considerado do ponto de vista metodológico um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonoides e terpenos (RUFINO et al., 2007).

Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R), o DPPH é reduzido formando difenilpicrilidrazina, de cor amarela e essa reação pode ser monitorada pelo decréscimo da absorvância. A partir dos resultados obtidos, a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres remanescentes no meio de reação, pode ser determinada. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), também chamada de concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) e maior será a atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Biglari, Alkarkhi, Easa (2009) analisaram partes comestíveis de tamareiras (*Phoenix dactylifera* L. - Arecaceae) do Irã quanto à atividade antioxidante, utilizando a capacidade antioxidante do método TEAC e captura do radical livre ABTS [(Sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)]. Seus resultados demonstraram que as tamareiras do Irã apresentam potencial como alimento funcional antioxidante. Além destes estudos, estes autores analisaram compostos antioxidantes na palmeira *P. dactylifera* e mostraram que o armazenamento a 18 °C pode melhorar o nível de antioxidantes por um período de até seis meses.

Nos estudos de Lee et al. (2003), os extratos de *A. catechu* apresentaram maior atividade antioxidante que o resveratrol em todos os experimentos, sugerindo que os extratos destas plantas pode prevenir o dano oxidativo em células normais, provavelmente por suas características antioxidantes.

Cai et al. (2004) estudaram os compostos fenólicos e atividade antioxidante de 112 plantas da medicina tradicional chinesa associadas como anti-cancerígenas. Dentre as plantas estudadas estava presente a palmeira *A. catechu* cujos valores de atividade antioxidante de extratos aquosos e metanólicos da semente obtiveram valores iguais a 2.674  $\mu\text{mol}$  equivalente trolox/100g(peso seco) e 1.997,3  $\mu\text{mol}$  equivalente trolox/100g (peso seco), respectivamente.

Faten (2009) analisou a capacidade antioxidante e o teor de fenólicos totais do extrato das frutas da palmeira *Hyphaene thebaica* L., bem como o efeito da viabilidade de uso do extrato na leucemia mieloide aguda. Os resultados mostraram

atividade antioxidante (AA) de 21% ( $IC_{50}=800 \mu\text{g/mL}$ ) no método do ferro quelante, AA de 50% ( $IC_{50} = 1000 \mu\text{g/mL}$ ) no método de captura do radical DPPH.

No teste de viabilidade, os resultados mostraram que metade da concentração máxima de inibição ( $IC_{50}$ ) de extrato apresentou um valor de  $3 \mu\text{g/mL}$ , indicando os frutos desta palmeira como importante fonte de compostos fenólicos com propriedades antioxidante e anti-cancerígena. *H. thebaica* também foi estudada quanto à atividade antioxidante por Amal, Khalil e El-Beltagi (2010), onde os resultados indicaram alto poder de sequestro do DPPH.

Uma análise dos componentes da água-de-coco (*Cocos nucifera* L.) de duas variedades da fruta (verde e amarelo) por hidrodestilação e extração com solvente, mostrou a presença de alcoóis, cetonas, tióis, ácidos carboxílicos, fenóis, ésteres e significativa atividade antioxidante usando o método DPPH (FONSECA et al., 2009).

### 1.3.3 Atividade antimicrobiana

Os testes de avaliação antimicrobiana, também chamados de testes de suscetibilidade, são padronizados pela NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) e desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos (NASCIMENTO et al., 2007).

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de micro-organismos resistentes e de infecções oportunistas fatais associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA et al., 2001). Outro ponto a ser ressaltado é a utilização desse estudo como primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes químicos naturais, sendo de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil detentor de uma mega biodiversidade (OSTROSKI et al., 2008).

Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na luta contra a resistência e o surgimento de micro-organismos patogênicos (MICHELIN et al., 2005; LEITÃO et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2007).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o

crescimento do micro-organismo testado. Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem o método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição em caldo (OSTROSKI et al., 2008).

Os ensaios de difusão são métodos quantitativos, nos quais o efeito pode ser graduado. A amostra, aplicada em meio de cultura sólido e inoculado com o micro-organismo, difunde-se. A partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, que significa uma zona de inibição de crescimento do micro-organismo inoculado (SILVEIRA et al., 2009).

Diferentes tipos de reservatórios podem ser empregados incluindo discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e poços feitos no meio de cultura. A substância ou extrato a ser testado é colocado em contato com o meio de cultura inoculado, a maneira como se processa esse contato define os diferentes métodos de difusão, dentre eles, método do disco difusão, método dos cilindros e método de poços (PINTO et al., 2003). Estes mesmos autores abordam o método de diluição em caldo.

Os ensaios de diluição são aqueles nos quais os extratos ou substâncias a serem testadas são adicionados a um meio de cultura líquido, previamente inoculado com o micro-organismo teste. Após incubação, o crescimento do micro-organismo é determinado pela leitura visual direta ou turbidimétrica pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (OSTROSKI et al., 2008).

Os micro-organismos são classificados em procarióticos, células que não possuem envoltório nuclear (bactérias) e eucarióticos, células com núcleo verdadeiro, com um complexo envoltório nuclear (protozoários e fungos) (ROBERTIS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

As bactérias possuem, circundando sua célula, uma estrutura denominada de parede celular, que contém peptidoglicano que é exclusivo de células procarióticas, cuja função é sustentar a membrana plasmática subjacente, que está a uma pressão osmótica interna. A natureza dessa estrutura é muito importante uma vez que ela permite que a bactéria seja caracterizada conforme sua capacidade de absorver o corante de Gram, sendo Gram-positiva coloração azulada e Gram-negativa coloração vermelha (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008).

Nas bactérias Gram-positivas, a parede celular consiste de várias camadas de peptidoglicano, formando uma espessa e rígida estrutura. De acordo com Rang

et al. (2007), essa estrutura está relativamente organizada de forma simples, caracterizando-se como uma camada polimerizada, o que influencia a penetração de compostos carregados positivamente.

As paredes celulares de bactérias Gram-negativas possuem apenas uma camada de peptidoglicano e uma membrana externa, porém é uma estrutura muito mais complexa, o que dificulta a penetração de substâncias por essa membrana externa, razão pela qual alguns antibióticos são menos ativos contra bactérias Gram-negativas que contra bactérias Gram-positivas (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008).

De acordo com Costa (2010), devido à falta de saneamento básico e condições precárias de moradias, associado ao clima quente, grande parte da população que vive em Roraima vivencia um aumento na incidência de patologias infecciosas, causadas principalmente por bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*. (T. Escherich), bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (Rosembach) e por fungos do gênero *Candida*, especialmente *Candida albicans* (Berkhout).

Dados do Laboratório Central de Roraima (LACEN – RR) mostram que entre os anos de 2004 e 2006, as bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram apontadas como principais agentes etiológicos de infecções do trato urinário, oculares e hospitalares correspondendo a 80% e 90% dos diagnósticos respectivamente, levando inclusive pacientes a óbito.

#### 1.3.3.1 *Escherichia coli*

Bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família das enterobacteriaceae. Habita o intestino de animais endotérmicos, cuja presença pode indicar aspectos relativos à qualidade da água e de alimentos. Entre os coliformes, a contagem de *E. coli* é considerada uma das melhores técnicas para estimar o grau de poluição fecal (YÁÑEZ et al., 2006).

Nos humanos, linhagens patogênicas de *E. coli* têm sido identificadas como causa primária de infecções no trato urinário, meningite neonatal, septicemia nosocomial e enterites. A resistência desse micro-organismo aos antimicrobianos

conhecidos tem se mostrado tanto na medicina humana quanto veterinária, restringindo as opções terapêuticas disponíveis (VON BAUM; MARRE, 2005).

### 1.3.3.2 *Proteus mirabilis*

Bactéria Gram-negativa também pertencente à família das enterobacteriaceae. Depois de *E. coli*, *P. mirabilis* é um dos mais freqüentes agentes etiológicos associados com infecções do trato urinário particularmente em pacientes imunossuprimidos. Esta bactéria faz parte da microbiota normal do trato intestinal de mamíferos e já foi isolada de seres humanos, cães, macacos, porcos, ovelhas e gado (FERNÁNDEZ-DELGADO et al., 2007).

É amplamente distribuída no ambiente, ocorrendo em água e solos poluídos, onde desempenha um papel importante na decomposição da matéria orgânica de origem animal. Este micro-organismo tem sido descrito como um patógeno oportunista nas infecções do tracto respiratório e de feridas, queimaduras, pele, olhos, ouvidos, nariz e garganta, bem como em gastroenterite resultante da o consumo de alimentos contaminados (FERNÁNDEZ-DELGADO et al., 2007).

### 1.3.3.3 *Staphylococcus aureus*

São micro-organismos esféricos Gram-positivos que se organizam crescendo em disposição de cachos e constituem, sem dúvida alguma, no patógeno humano mais importante entre os estafilococos. São encontrados no ambiente externo e nas narinas anteriores de 20-40% dos adultos, outros locais de colonização incluem as pregas cutâneas intertriginosas, o períneo, as axilas e a vagina (KONEMAN et al., 2008).

Possuem grande facilidade de se desenvolver em substratos como secreções nasais e alimentos com pouca umidade. São grandes produtores de toxinas, o que contribui para a patogenicidade da bactéria, aumentando a habilidade de invadir o corpo e danificar tecidos (FURNALETO et al., 2005).

Apesar desse micro-organismo constituir frequentemente parte da microbiota humana normal, ele pode produzir infecções oportunistas significativas, quando em

condições apropriadas, como lesões cutâneas, presença de corpos estranhos como próteses, suturas etc., portadores de doenças crônicas, como neoplasias malignas, cardiopatias e administração profilática ou terapêutica de antimicrobianos (KONEMAN et al., 2008).

#### 1.3.3.4 *Candida albicans*

A levedura *C. albicans* também encontra-se nas estatísticas do LACEN. No período de 2004 a 2006, evidenciou-se que o principal agente causador de infecções cutâneo-mucosas de origem fúngica foi a referida levedura.

*C. albicans*, é uma levedura assexuada, diploide, pleomórfica, endógena do trato oral e urogenital de humanos e outros animais de sangue quente, sendo considerada como patógeno oportunista. Aproximadamente 40 a 60% da população adulta abrigam *C. albicans*. As infecções são geralmente de origem endógena, mas a transmissão paciente a paciente também pode ocorrer (ZHANG et al., 2002).

Os sintomas produzidos pelas infecções causadas por este micro-organismo são altamente diversificados e incluem vulvovaginites, dermatites, cistites, febres, disfunções hepáticas e confusão mental, os quais podem ocorrer isoladamente ou em conjunto (GOMPERTZ; CORNEJO, 1998).

#### 1.4 FAMÍLIA ARECACEAE

As espécies de Arecaceae (Palmae) representam uma das maiores famílias de plantas do Brasil e pela forma e aspecto, a mais característica da flora tropical. As palmeiras são plantas monocotiledôneas e representadas por cerca de 2.700 espécies, reunidas em mais de 240 gêneros dentro da família Arecaceae (APG III, 2009; LORENZI, 2010).

Apresentam grande importância econômica e são exploradas comercialmente na produção de óleo, amido, palmito, cera e fibras, bem como na indústria alimentícia com a produção de sorvetes, doces, sucos e óleo. O óleo obtido dos frutos das palmeiras é utilizado como biodiesel e na produção de cosméticos. No artesanato, as fibras da paxiuba são usadas para fabricar bolsas e cestos; na construção civil as partes mais utilizadas são as palhas e caules (MIRANDA et al.,

2001; LORENZI, 2010).

Do ponto de vista químico, as espécies de Arecaceae geralmente não apresentam na sua composição o ácido cianídrico (HCN), ou seja, não são cianogênicas. Os alcaloides, ocasionalmente pirimidínicos e prontocianidínicos podem estar presentes ou não. Os flavonóides são raros, mas quando presentes são derivados do kaempferol, quercetina, tricina e luteolina. Saponinas e sapogeninas estão ocasionalmente presentes. Éteres metílicos de triterpenos já foram isolados dos frutos de algumas espécies de palmeiras (LEWIS; ZONA, 2000; SILVEIRA et al., 2005).

Na composição química das sementes da palmeira real australiana, *Archontophoenix alexandrae* (H. Wendl. Drude), Vallilo et al., (2004) detectaram quantidades significativas de ácidos palmítico, oléico e linoléico, além de  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e alto teor de fibras alimentares.

Nos trabalhos de Rocha e Silva (2005), por exemplo, as espécies de açai (*Euterpe oleraceae* (Mart.) e marajá (*Bactris acantocarpa* var. *intermedia* A.J. Hend) foram citadas por seu potencial medicinal.

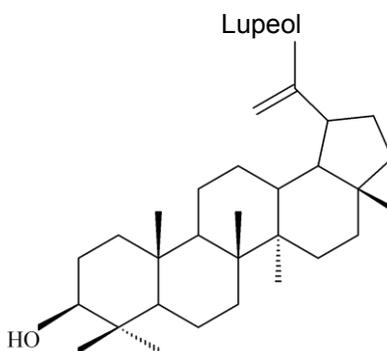
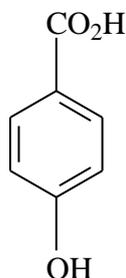
Quinze ácidos graxos foram obtidos a partir de extratos do mesocarpo da palmeira *Oenocarpus bataua* (Mart.) conhecida vulgarmente como patuá, patoá ou patauá, com destaque para o oléico (72,7%) e o palmítico (18,1%) que foram considerados ácidos predominantes. Em menor quantidade foram encontrados ácidos cisvacênico com 2,3%, linoléico a 1,9%, esteárico com 1,7%, palmitoléico (0,9%) e alfa-linolênico com 0,8% (MONTUFAR et al., 2010).

Nos estudos de Rodrigues e Salatino (2006), a distribuição de hidrocarbonetos das ceras epicuticulares apresentou padrão *n-alcenos* em quatro espécies de palmeiras do gênero *Allagoptera* (Nees), conhecidas popularmente como coquinho da praia e guriri.

Galotta e Boaventura (2005) ao estudarem os constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açai (*Euterpe precatória* Mart.) identificaram uma substância fenólica, cinco ésteres, cinco triterpenos e dois açúcares. A seguir encontram-se as estruturas do Ácido *p*-Hidroxibenzóico e do Lupeol, dois constituintes químicos encontrados nos extratos da raiz e do talo da folha do açai (figura 2).

Figura 2 – Estrutura de dois constituintes químicos encontrados em extratos da raiz e do talo da folha do açai.

Ácido *p*-Hidroxibenzóico



Fonte: Galotta; Boaventura (2005).

Extratos da palmeira *Areca catechu* (L.) conhecida popularmente como betel, estudada por Choi et al. (1999) e Lee e Choi (1999) apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Propionibacterium acnes*. Os últimos autores comentam ainda que os extratos etanólicos desta mesma espécie tiveram ação positiva na inibição do crescimento de agentes fúngicos. *A. catechu* foi também mencionada, quanto às suas propriedades medicinais, por Di Stasi e Hiruma-Lima (2002) no livro “Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica”.

Ferreira, Castro e Bridi (2008) revelaram que extratos das bagas maduras da palmeira *Serenoa repens* (W. Bartram) Small conhecida como Saw palmetto ou simplesmente serenoa, têm sido amplamente utilizados no tratamento terapêutico para disfunção urinária, devido à hiperplasia prostática benigna. Estes resultados corroboram com os estudos de Suzuki et al. (2009).

Miranda et al. (2001) descreve que das folhas da palmeira *Iriartea setigera* (Mart.) H. Wendland (paxiubinha) obtém-se um pó que é utilizado para matar piolhos, e as raízes do açai (*Euterpe precatória* var. *precatória* Martius) são usadas medicinalmente para dores musculares e picadas de cobras. Além destas, estes autores mencionam outras espécies de Arecaceae com valor medicinal: *Astrocaryum jauari* Mart. (jauari), *A. vulgari* Mart. (tucumã ou tucum bravo), *Attalea phalerata* Mart. (urucuri), *Bactris acanthocarpa* Mart. (marajá) e *B. gasipaes* Kunth (pupunha).

Luz (2001), ao realizar um levantamento sobre as plantas medicinais de uso popular em Boa Vista (capital roraimense) registrou duas espécies de Arecaceae

utilizadas como medicinais, *Coccus nucifera* L. (coco) e *E. precatoria* (açai), a primeira é indicada para tratamentos de diarreia e malária e a segunda para anemia.

### 1.5 *Socratea exorrhiza*: DESCRIÇÃO BOTÂNICA, USO E IMPORTÂNCIA

*S. exorrhiza* é uma palmeira monóica, de médio porte, caule solitário, provido de palmito desenvolvido no topo e um cone aberto de raízes escoras espinescentes na base. Geralmente os acúleos apresentam 10 a 18 cm de diâmetro (figura 3).

Figura 3 - Conjunto de raízes escoras de *Socratea exorrhiza* formando um cone na base.



De acordo com APGIII (2009), *S. exorrhiza* está taxonomicamente classificada em: Reino Plantae; Divisão Magnoliophyta; Classe Liliopsidas; Ordem Arecales; Família Arecaceae; Gênero *Socratea*; Espécie *Socratea exorrhiza*.

Segundo Forzza et al. (2010), o gênero *Socratea* abrange um grupo de cinco espécies, das quais apenas duas ocorrem no Brasil, *S. Salazarii* H. E. Moore e *S.*

*exorrhiza*. Encontra-se distribuída por toda região Amazônica, América Central e do Sul, habitando terrenos alagados, mal drenados, sempre próximos de rios e igarapés (figura 4). Raras vezes são encontradas em terra firme.

Figura 4 – Raiz de um indivíduo jovem da palmeira *S. exorrhiza* (paxiuba) às margens de um igarapé na Fazenda Águas da Serra/Confiança II/ Cantá/Roraima.



Os registros quanto à ocorrência desta espécie para Roraima não condizem com a realidade. De acordo com Miranda et al. (2001), no Brasil a espécie *S. exorrhiza* ocorre somente nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão e Pará, sem mencionar o estado de Roraima.

Lorenzi (2010) também não faz registro no texto para o estado de Roraima como um dos Estados onde ocorre esta palmeira. Contudo, no mapa da distribuição geográfica desta espécie ilustrado no livro de Lorenzi (2010) é possível visualizar pontos indicando a ocorrência de paxiuba somente na região sul do estado de Roraima e pela quantidade de pontos, interpreta-se que ocorra em baixa frequência (figura 5).

Contrapondo estas duas obras (MIRANDA et al, 2001; LORENZI, 2010), consideradas como referências sobre o estudo sistemático e ecológico de Arecaceae no Brasil, registramos neste trabalho ocorrência da espécie *S. exorrhiza* para o estado de Roraima não só na região sul como também na região leste, mas especificamente na área da Confiança II, no município de Cantá.

Figura 5 – Mapa da distribuição geográfica de *Socratea exorrhiza* no Brasil.



Fonte: Lorenzi (2010).

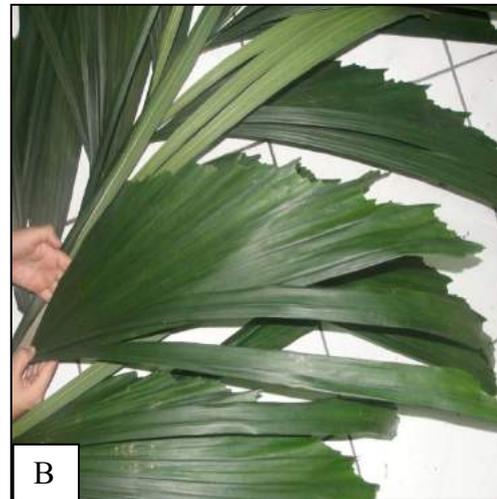
### 1.5.1 Características gerais de *Socratea exorrhiza*

As características gerais da espécie *S. exorrhiza* descritas com base nas informações contidas em Miranda et al. (2001) e Lorenzi et al. (2010).

As folhas são pinadas, sendo as pinas (folíolos) regularmente distribuídas, assimetricamente deltoides ou elípticas, com a margem proximal inteira, na maior parte do seu comprimento, a distal inteira em cerca de 1/3 do seu comprimento e a restante grosseiramente dentada (figura 6A).

As folhas possuem ainda, numerosas elevações (costelas) irradiando a partir da base; a lâmina mantém-se inteira ou partida longitudinalmente entre as costelas, em segmentos estreitos dispostos em diferentes planos, conferindo às folhas aparência plumosa (figura 6B).

Figura 6 – A) aspecto da folha (formato de costelas) e caule de *Socratea exorrhiza* B) detalhe da folha, notar borda dentada.



Os frutos de *S. exorrhiza* são elipsoides ou ovoides, de coloração amarelada quando maduros (figura 7). A frutificação se dá nos meses de maio a julho. O epicarpo se parte irregularmente na maturação. O mesocarpo é branco e carnoso, o que o torna apreciável para animais silvestres, os principais responsáveis pela dispersão das sementes.

Figura 7 – Frutos maduros de *Socratea exorrhiza*.



No Amazonas, a infusão das raízes de *S. exorrhiza* é empregada como banho restaurador (MILLIKEN et al. 1986). Os índios *Mayongong* que vivem a noroeste de Roraima usam o exsudado pegajoso das raízes como um constituinte do curare, para envenenar suas flechas (PLOTKIN; BALICK, 1984; HENDERSON; SCARIOT, 1993). De acordo com Duke e Vasquez (1994), os índios *Wayãpi* e *Palikur* usam emplastos do caule ralado para cicatrizar o umbigo de crianças recém-nascidas.

Milliken et al. (1986) relatam que há registros de que algumas partes não específicas da paxiuba são consideradas abortivas e que os índios da tribo *Palikur* da Guiana francesa consideram o fruto tóxico, enquanto que a decocção da casca do caule é consumida como remédio para febre. Henderson e Scariot (1993), porém, afirma que a decocção dos frutos é bebida pelos índios *Chácobo* da Bolívia como remédio para febre.

Vilhena, Lins e Luna (1984) afirmam em seus estudos que as raízes de *S. exorrhiza* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis. Também são utilizadas na cura da hepatite e leshimaniose (DELGADO; SIFUENTES, 1995; DEWALT et al., 1999).

Miranda et al. (2001) mencionam que segundo relatos populares, os brotos (figura 8) das raízes têm uma substância líquida que ao passar na pele acalma a dor de picadas de formigas conga – *Paraponera spp.* e *Euponera spp.*

Figura 8 – Brotos das raízes de *Socratea exorrhiza*. O detalhe mostra o aspecto amarelado da gema.



Apesar dos registros etnobotânicos utilizando medicinalmente partes desta planta, sob a forma de infusão, decocção, maceração e banhos mágicos, estudos fitoquímicos ou de bioprospecção são escassos, sendo este um dos motivos para realização deste trabalho.

## 1.6 LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo está localizada dentro da fazenda Águas da Serra, de propriedade particular, situada na vicinal 2, região da Confiança II. Suas coordenadas de referência são: Latitude Norte N 02°22.131' e Longitude Oeste 060° 33.171'. Apresenta-se em terreno acidentado, próximo à encosta da serra Bonita (figura 9).

Figura 9 – Vista geral da mata onde foram realizadas as coletas da raiz de *Socratea exorrhiza*. Fazenda Águas da Serra/ Confiança II/ Cantá/ Roraima.



Foto: R. C. Caleffi.

A região da Confiança - Cantá/RR (Gleba Barauana) faz parte de um projeto de assentamento coordenado pelo INCRA, arrecada com base no artigo 28 da Lei nº 6.383/76, através da Portaria/INCRA/DF/ nº 06/82, incorporados ao Patrimônio da União em 04/03/82 através da matrícula nº 56, fls, Livro 2-A do CRI local.

Esta área apresenta uma extensão total de 1.289.310 há e divide-se em Confiança I, II e III. Localiza-se no centro-leste do estado de Roraima, distando

aproximadamente 120 Km da capital Boa Vista. Limita-se ao norte com igarapé Cachorro e rio Cujubim, ao sul com a Gleba BR-210-II, à leste com o rio Tacutú e área indígena Wai-Wai e a oeste com o rio Branco (BRASIL, 1982) .

### **1.6.1 Relevo e características pedológicas**

A região do Cantá apresenta uma grande variação na sua topografia principalmente na parte norte, onde aparecem terrenos que vão desde o plano ao montanhoso, sendo que a região sul é constituída em sua quase totalidade por um suave ondulado (BRASIL, 1975).

Os solos que predominam na região são o Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico, solos Concrecionários Lateríticos Indiscriminados Distróficos e Podzólico Vermelho-Amarelo (BRASIL, 1975). Devido à forte concentração de chuvas nos períodos de maio e agosto, os solos nesta área apresentam déficit hídrico prolongado, geralmente de 4 a 6 meses (EMBRAPA, 2005).

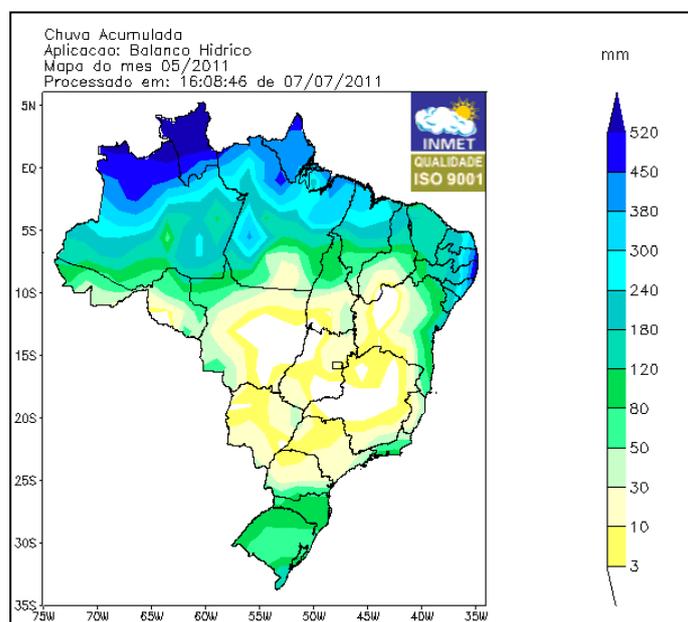
### **1.6.2 Clima**

Segundo a classificação de Köppen, o clima é do tipo Aw. Domínio de clima tropical chuvoso com uma estação seca bem definida (BARBOSA, 1997). A amplitude térmica entre as médias do mês mais quente e do mês mais frio é inferior a 5°C (EMBRAPA, 2005).

A precipitação pluvial é de 1.795-2.385 mm/ano, em que os meses de maio, junho e julho somam mais de 55% do total de precipitação, sendo que maio é o mês de maior precipitação, com intervalo pluviométrico de 292-552 mm/mês (MOURÃO JR. et al., 2003).

Estes dados corroboram com os do balanço hídrico divulgado pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2011), onde a quantidade de chuva acumulada para a região do Cantá no mês de maio de 2011 foi de 520 mm (figura 10).

Figura 10 – Balanço hídrico das regiões brasileiras. Mapa da quantidade de chuva acumulada no mês de maio de 2011.



Fonte: INMET (2011).

Pelo Programa Hidros, mantido pela Agência Nacional de Águas, a média pluviométrica no mês de maio de 2011 foi aproximadamente 530 mm, totalizando 27 dias de chuva para a região do Cantá. Vale ressaltar que o período chuvoso para o estado de Roraima foi considerado atípico no ano de 2011, com médias pluviométricas muito acima do normal, onde os municípios mais prejudicados pelas chuvas além de Boa Vista foram Cantá, Caracaraí e Uiramutã, de acordo com dados da Defesa Civil.

A quantidade de chuvas para este período, marcado por inundações e alagamentos, levou o governador a declarar situação de anormalidade caracterizada como Estado de Calamidade Pública em Roraima, por meio do Decreto N° 12.816-E, de 5 de junho de 2011.

De acordo com SIPAM (2011), as causas para anormalidade climática no Estado neste período estavam relacionadas com o Atlântico tropical, onde a bacia norte apresentou valores entre 1,0 e 1,5°C acima do normal, enquanto que na bacia sul foi encontrado anomalias entre 0,5 e 1,0°C. Esta condição manteve a Zona de Convergência Intertropical (ZCIT) na região do Atlântico com dupla banda de nebulosidade, ao norte e ao sul do equador, onde no setor mais ao norte este

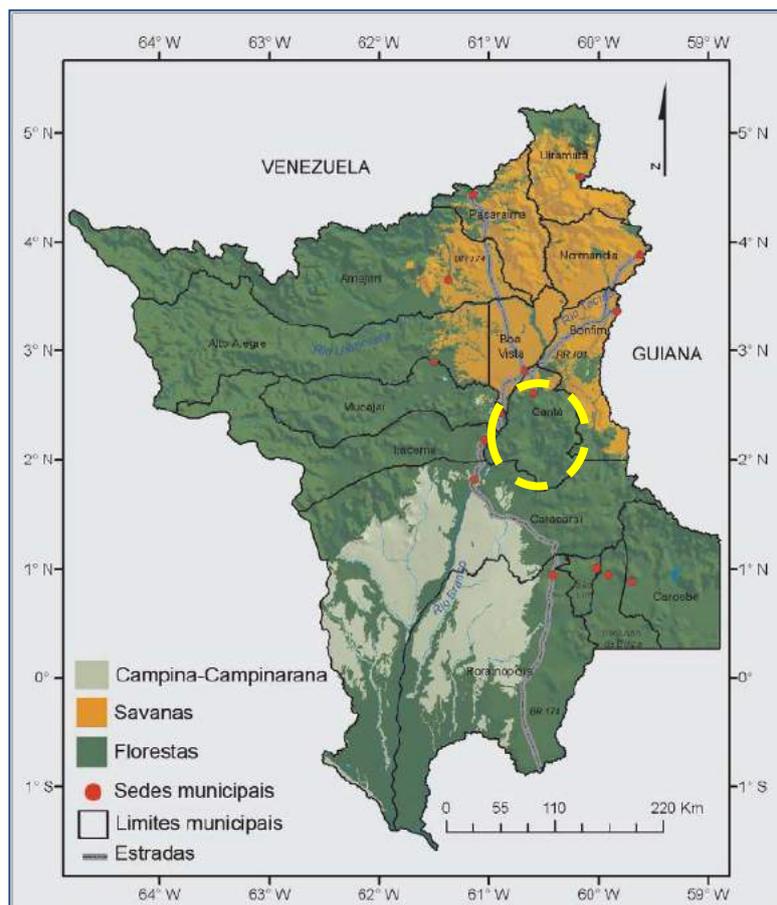
sistema meteorológico apresentou-se mais intenso favorecendo elevados volumes de chuva, principalmente, no estado de Roraima.

### 1.6.3 Vegetação

Segundo Brasil (1975), a vegetação da área correspondente ao Município de Cantá é classificada como Floresta Tropical Densa Submontana com relevo ondulado.

Do ponto de vista geral a fitofisionomia do município do Cantá abrange formações florestais naturais e áreas de contato com a savana, conforme é possível observar na figura 11, sendo que na região da Confiança II a predominância é de floresta estacional semidecídua com presença de palmeiras.

Figura 11 – Formações vegetais naturais de Roraima. Município do Cantá circundado em amarelo.



Fonte: Barbosa; Bacelar-Lima (2008).

De acordo com Xaud et al. (2005), as florestas de contato, florestas estacionais, florestas de palmeiras e florestas semidecíduais, encontram-se geralmente em regiões onde a expansão da fronteira agropecuária tem ocorrido de forma mais acelerada e isto é observado à medida que vai se estabelecendo uma ocupação humana baseada em assentamentos e projetos de colonização, como é o caso da região da Confiança no município de Cantá.

Esta ocupação quase sempre vem acompanhada de destruição dos recursos da floresta para dar espaço às roças e pastos, o que preocupa e justifica ainda mais a execução deste trabalho, considerando que *S. exorrhiza* é um importante recurso vegetal não madeireiro para as populações indígenas e tradicionais do estado de Roraima.

## 2 OBJETIVOS

Diante da potencialidade de uso da palmeira *S. exorrhiza* e à ausência de dados quanto ao perfil químico e biológico de suas raízes, folhas e frutos, foram propostos neste trabalho os seguintes objetivos:

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Conhecer o potencial bioativo e o teor de fenólicos e flavonoides em extratos da raiz de *S. exorrhiza*.

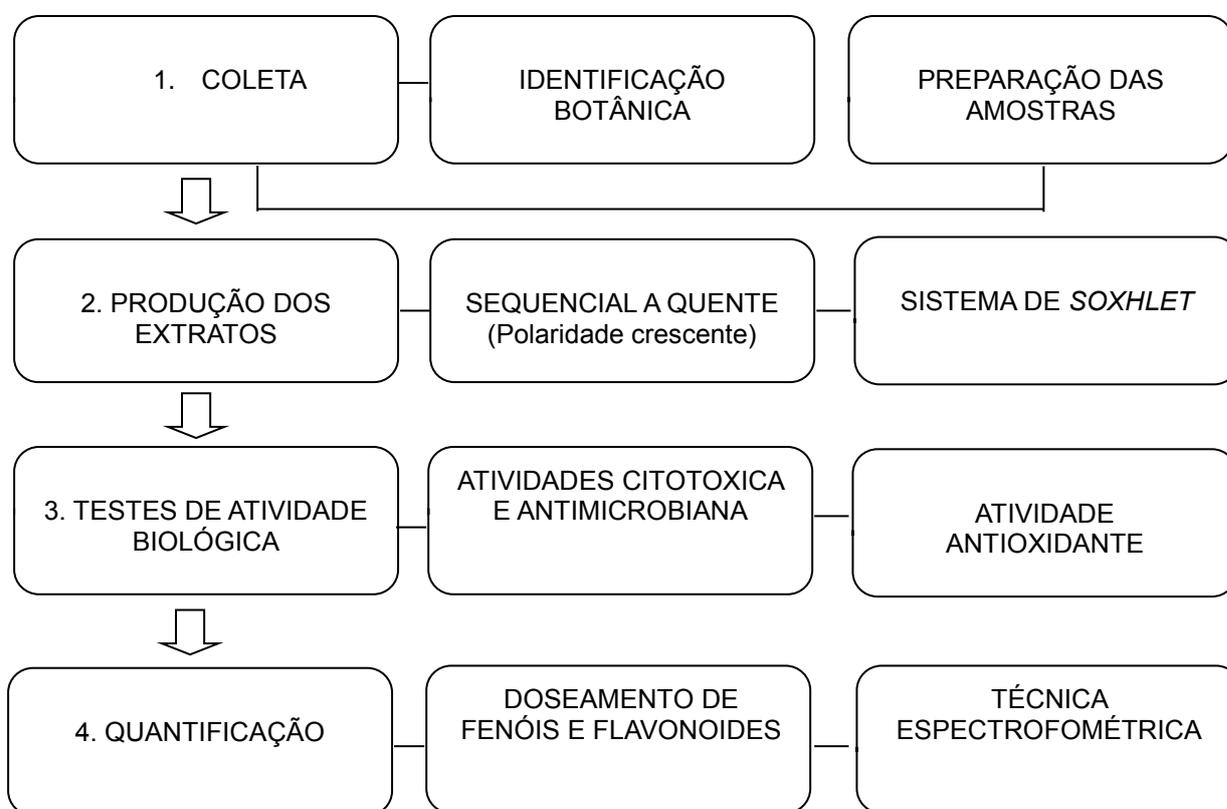
### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a atividade citotóxica, antimicrobiana e antioxidante dos extratos da raiz de *S. exorrhiza*;
- Determinar o teor de fenólicos e flavonoides nos extratos;
- Comparar qualitativamente a atividade biológica entre as partes das raízes.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A experimentação foi efetuada em quatro etapas ordenadas e interdependentes, a saber: 1) coleta e identificação do material botânico; 2) produção dos extratos; 3) testes de atividades biológicas 4) quantificação de fenóis e flavonoides (figura 12).

Figura 12 – Representação esquemática da experimentação da pesquisa.



#### 3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA ESTUDADA

Usando canivete e facão, foram coletados aproximadamente 6 kg de raízes e 50 g de brotos das raízes *S. exorrhiza*. Folhas e frutos foram coletados mediante escalada na palmeira e uso de podão. Com esse material confeccionaram-se dois conjuntos de exsiccatas contendo ápice, meio e base. Um dos conjuntos foi depositado no Herbário do Centro de Estudos da Biodiversidade CBIO/UFRR sob os registros de n<sup>o</sup> **3013 a** (ápice), **3013 b** (meio) e **3013 c** (base). Ver figura 13.

Figura 13 – Exsicatas de *Socratea exorrhiza* depositadas no herbário do Centro de Estudos da Biodiversidade CBIO/UFRR. A) Base; B) Meio; C) Ápice.



A outra duplicata e fotografias digitais da palmeira registradas em campo foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Palmeiras (LABPALM), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA-AM), para confirmar a identificação da espécie estudada. Esta duplicata foi introduzida no herbário do INPA/AM como doação.

### 3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

No Laboratório de Biotecnologia e Química Fina do Departamento de Química da UFRR, as amostras das raízes foram submetidas à higienização. Com escova retiraram-se resíduos de solo e outras sujidades.

Após este procedimento, com auxílio de uma faca, os acúleos foram raspados e a parte externa da raiz (casca) foi separada da parte interna (lenho). As amostras foram pesadas separadamente em balança eletrônica (marca Toledo, modelo 9094C/5) e acondicionadas em bandejas de alumínio, identificadas conforme o conteúdo que recebeu, sendo o código PER (parte externa da raiz), PIR (parte interna da raiz) e BRT (broto da raiz).

As bandejas contendo as amostras foram colocadas em estufa de circulação forçada de ar (marca ADAMO) a 40°C para secagem do material. Realizou-se o monitoramento da secagem das amostras pesando-se o material diariamente até a

constatação de que não houve mais variação da sua massa.

As amostras PER e PIR foram submetidas à trituração em moinho de facas (marca UNIMAQ, modelo C560395) e posteriormente pulverizadas em liquidificador industrial. A amostra BRT foi moída utilizando-se graal e pistilo. A figura 14 mostra um resumo da sequência de preparação das amostras.

Figura 14 – Sequência de preparação das amostras: A) higienização; B e C) separação das partes da raiz; D) pesagem das amostras; E) secagem em estufa e F) amostra em polvilho pronta para extração.



### 3.3 PRODUÇÕES DOS EXTRATOS

Foram obtidos extratos sequenciais, a quente, de todas as amostras. O procedimento iniciou-se com pesagem, em balança marca BEL – ENGINEERING, de uma massa definida das amostras secas e pulverizadas, sendo 8,77 g de broto (BRT), 7,97 g da parte interna da raiz (PIR) e 15,29 g da parte externa da raiz (PER).

Estas amostras foram acondicionadas em cartuchos de papel filtro confeccionados manualmente. Sendo um cartucho para cada amostra.

Os cartuchos foram inseridos no corpo de um extrator *Soxhlet* e as amostras submetidas à extração sequencial a quente com solventes de polaridades crescentes, nesta ordem: 1º hexano, 2º clorofórmio, 3º acetato de etila e 4º metanol. O tempo de extração com cada solvente foi de 24 horas a uma temperatura média

de 50°C. Findado o tempo de cada extração, as soluções, separadamente, foram coletadas em Erlenmeyer, onde adicionou-se sulfato de sódio para retirada de água. As soluções foram filtradas em funil de vidro vedado com algodão.

Na sequência foram transferidas para um balão de fundo redondo e submetidas à concentração por evaporador rotativo a 120 rotações por minuto (rpm) a 40°C. A figura 15 mostra um resumo da sequência do processo de produção dos extratos.

Figura 15 – Sequência da produção dos extratos: A) inserção da amostra em cartucho de papel filtro; B) sistema de extração; C) soluções obtidas após extração; D) secagem com sulfato de sódio e filtragem das soluções; E) concentração dos extratos por evaporador rotativo; F) extratos armazenados em dessecador.



Os extratos concentrados foram transferidos para frascos de vidros limpos e secos, previamente pesados e etiquetados com os códigos das amostras (tabela 1).

Consequente, as amostras foram colocadas no interior da capela de exaustão, por um período de 24 horas, para evaporação de resquícios de solvente e depois armazenadas em dessecador da marca AGATEC, sob pressão de -760mmHg, contendo como agente dessecante sílica ativada a 100 °C em estufa de circulação forçada de ar, até a sua utilização. O rendimento dos extratos foi verificado a partir de regra de três simples.

Tabela 1 – Partes da raiz de *Socratea exorrhiza*, solventes e código de identificação dos extratos.

Partes da planta	Solventes	Código dos extratos (amostra)
	Polaridade crescente	
Parte externa da raiz (PER)	Hexano	EHPER
	Clorofórmio	ECPER
	Acetato de etila	EAPER
	Metanol	EMPER
Parte interna da raiz (PIR)	Hexano	EHPIR
	Clorofórmio	ECPIR
	Acetato de etila	EAPIR
	Metanol	EMPIR
Broto da raiz (BRT)	Hexano	EBBRT
	Clorofórmio	ECBRT
	Acetato de etila	EABRT
	Metanol	EMBRT

E = extrato; A = acetato de etila; M = metanol; C = clorofórmio; PER = parte externa da raiz; PIR = parte interna da raiz; BRT = broto da raiz.

### 3.4 TESTES DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Para verificar o potencial biológico dos extratos foram realizados testes de citotoxicidade por *A. salina*, atividade antioxidante através do sequestro do radical livre DPPH e atividade antimicrobiana, utilizando-se três bactérias e uma levedura. Os micro-organismos, certificados pela *American Type Culture Collection* (ATCC) foram todos gentilmente doados pelo Laboratório Central de Roraima (LACEN).

#### 3.4.1 Soluções estoque

Para os testes de atividade citotóxica e antioxidante preparou-se uma única solução estoque de cada amostra, ou seja, a solução estoque utilizada na realização do teste de citotoxicidade foi a mesma utilizada no teste de atividade antioxidante.

##### 3.4.1.1 Preparação da solução estoque de cada amostra

Inicialmente pesaram-se massas dos extratos que variaram de no mínimo 40 mg e no máximo 90 mg. Essa variação da massa deu-se em decorrência da

dificuldade de pesar uma massa definida, devido às características de consistência de cada extrato.

As amostras foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL (figura 16), onde adicionaram-se os solventes correspondentes ao teste de solubilização. Um aparelho de ultrassom auxiliou na solubilização das amostras.

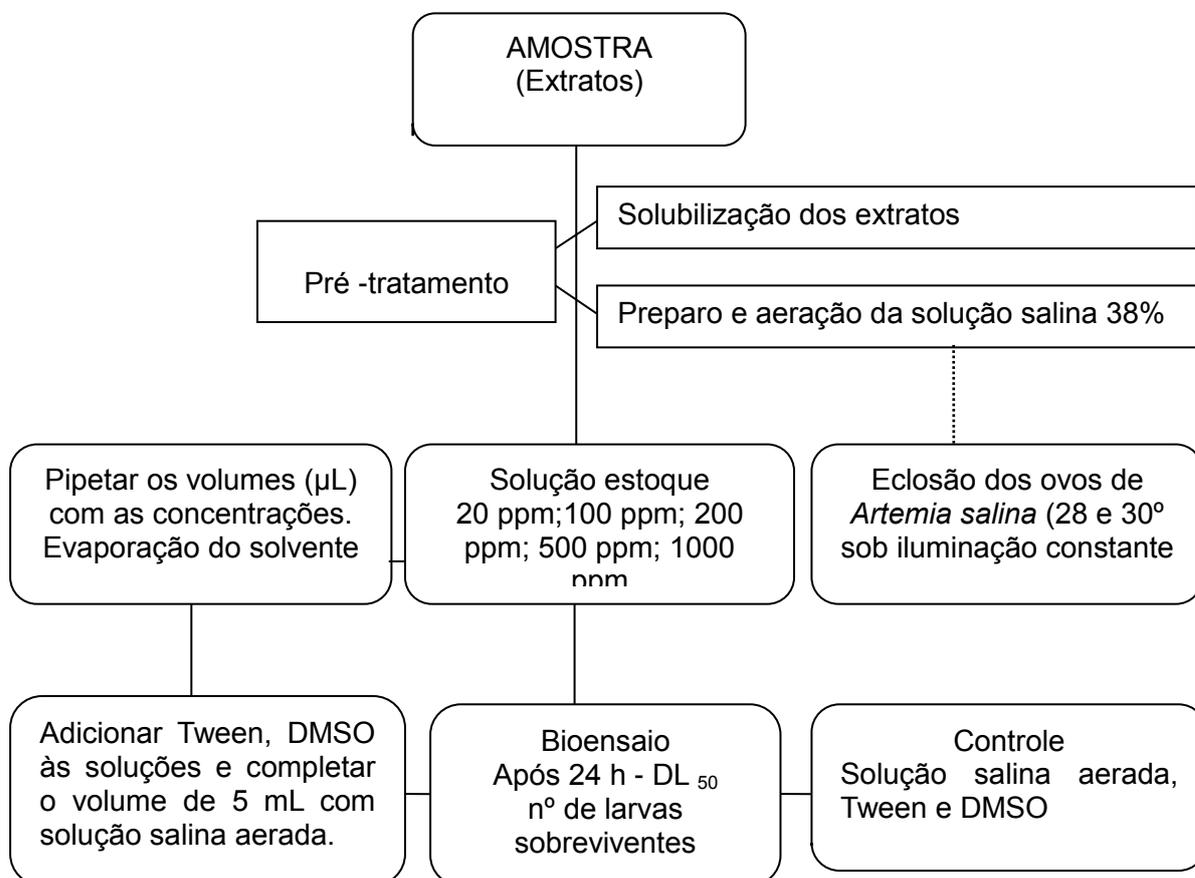
Figura 16 – Soluções estoque de extratos da raiz de *Socratea exorrhiza* utilizadas nos testes de atividade citotóxica e antioxidante.



### 3.4.2 Teste de Citotoxicidade

O teste foi realizado de acordo Meyer (1982) com algumas modificações, utilizando-se ovos do microcrustáceo *A. salina* (Maramar<sup>®</sup>), adquiridos comercialmente. A figura 17 representa esquematicamente o resumo da aplicação da técnica.

Figura 17 – Esquema representativo da técnica do teste de citotoxicidade de extratos da raiz de *Socratea exorrhiza* contra *Artemia salina*.



A partir das soluções estoque, por meio de pipetador automático, pipetou-se de cada solução, volumes previamente calculados para cada amostra, visando obter concentrações de 20 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 500 ppm e 1000 ppm na solução teste.

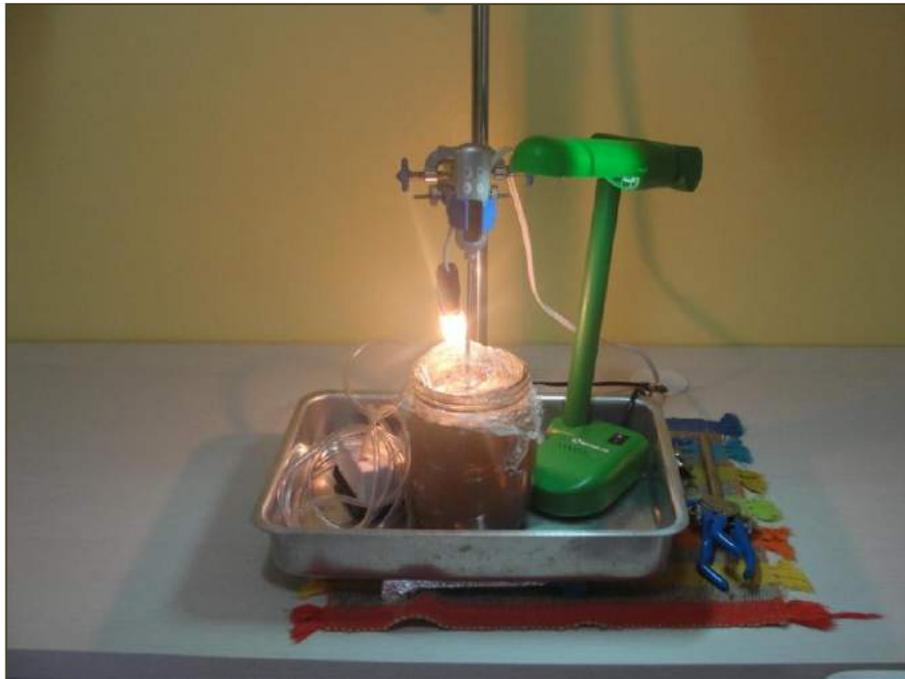
Em seguida, as soluções foram colocadas em repouso no interior da capela por 24 horas para evaporação do solvente e por uma hora em dessecador para remover os traços de solvente por ventura existentes. A estas amostras foram adicionados 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 2 mL de uma solução a 6% do surfactante Tween 80 para auxiliar na solubilização dos extratos.

As amostras foram colocadas em um aparelho de ultra-som para ajudar na solubilização. As que apresentaram dificuldades em se dissolver ficaram no ultra-som por 40 minutos. A qualidade da solubilização consistiu na observação da transparência das soluções, sem precipitação.

### 3.4.2.1 Bioensaio

Os ovos de *A. salina* foram colocados para eclodir em solução salina a 38% em um recipiente mantido sob iluminação artificial e aeração por meio de uma bomba de aquário, com temperatura entre 28 e 30°C por 24 horas (figura 18).

Figura 18 - Sistema montado para eclosão dos ovos de *Artemia salina*.



Após eclosão dos ovos adicionaram-se 10 larvas de *A. salina* em tubos de ensaio contendo os extratos das amostras em diferentes concentrações, onde foram acrescentados 50  $\mu$ L de DMSO e 2 mL de solução surfactante Tween 80 a 6%, completando o volume final para 5 mL com solução salina aerada.

Este sistema foi incubado em temperatura ambiente por 24 horas, sendo os tubos de ensaios mantidos sob iluminação. Após o período de 24 horas de incubação contou-se o número de larvas sobreviventes em cada tubo. O controle foi realizado em tubos de ensaio contendo solução salina a 38%, DMSO e Tween 80, nas mesmas proporções, onde foram depositadas 10 larvas de *A. salina*.

A taxa (%) de mortalidade foi determinada mediante a razão entre o número de indivíduos mortos ou com inibição de movimentos sobre o número total de larvas

colocadas nos tubos de ensaios. Com base no parâmetro de Meyer *et al.* (1982), considerou-se ativas as amostras, cuja dose capaz de matar 50% das larvas ( $DL_{50}$ ), foi inferior a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . A  $DL_{50}$  foi calculada por regressão linear, utilizando o programa Microcal Origin6.

### 3.4.3 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos da raiz de paxiuba foi avaliada qualitativamente e quantitativamente pelo método de sequestro do radical livre 1,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Para essa prática preparou-se solução metanólica de 0,1 mM do radical livre DPPH de acordo com a metodologia aplicada nos trabalhos de Mensor *et al.* (2001). Foi realizada primeiramente análise qualitativa e em seguida análises quantitativas da capacidade antioxidante das amostras (GÓMEZ-CARAVACA *et al.*, 2006; BATRUSAITYTE; VENSKUTONIS; CEKSTERYTE, 2007).

#### 3.4.3.1 Preparação das amostras

Uma massa dos extratos brutos foi solubilizada em 50 mL de metanol obtendo-se soluções estoques de concentração final diferente para cada amostra. Das soluções estoque retiraram-se alíquotas de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL e 5 mL. Estes volumes foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL e diluídos em metanol, obtendo-se cinco pontos de diluições em triplicatas (tabela 2).

Tabela 2 – Concentrações das soluções estoque utilizadas no teste de atividade antioxidante

Amostras	[ ] solução estoque ( $\mu\text{g/mL}$ )
ECPER	270
EAPER	174,8
EMPER	396
ECPIR	350
EAPIR	237
EMPIR	110
EABRT	168
EMBRT	420

E = extrato; A = acetato de etila; M = metanol; C = clorofórmio; PER = parte externa da raiz; PIR = parte interna da raiz; BRT = broto da raiz

### 3.4.3.2 Análise qualitativa da atividade antioxidante

A análise qualitativa foi realizada como triagem para os extratos com potencial antioxidante. Os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), onde foram aplicados 12 spots, sendo cada spot equivalente a 10  $\mu$ L da solução estoque de cada amostra. Após secar, as placas foram borrifadas com solução metanólica 0,1 mMol de DPPH no escuro, observando o aparecimento de manchas amarelas em fundo de cor púrpura.

### 3.4.3.3 Análise quantitativa da atividade antioxidante

Os testes foram realizados em tubos de ensaio com volume final de 5 mL, onde foram misturados 3,5 mL de solução dos extratos, nas concentrações dispostas na tabela 3, com 1,5 mL da solução de DPPH. Após o tempo de incubação de por 30 minutos, foram lidas as absorbâncias de cada ponto a 515 nm em espectrofotômetro da marca Shimadzu, disponível no Laboratório de Biotecnologia e Química Fina/Departamento de Química/UFRR.

Para obtenção do branco misturaram-se 3,5 mL de solução do extrato, mais 1,5 mL de metanol. O controle positivo foi preparado com 1,5 mL de solução de DPPH acrescido de 3,5 mL de metanol (tabela 3).

Tabela 3 – Preparação das soluções contendo amostra, branco e controle para o teste de atividade antioxidante pelo seqüestro do radical livre DPPH.

AMOSTRA	BRANCO	CONTROLE
3,5 mL de solução dos extratos + 1,5 mL de DPPH.	3,5 mL de solução dos extratos + 1,5 mL de metanol.	3,5 mL de metanol + 1,5 mL de DPPH

Fonte: Mensor et al. (2001)

A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi determinada através da equação representada na figura 19, de acordo com Mensor et al. (2001).

Figura 19 – Equação para determinar o percentual de atividade antioxidante (%AA).

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

Fonte: Mensor et al. (2001)

Os resultados de cada amostra foram expressos em IC<sub>50</sub> e calculados por regressão linear, por meio do programa estatístico Microcal Origin6 e plotados em gráfico onde a abscissa representou a concentração do extrato testado (variável independente) e a ordenada o percentual de inibição de DPPH (variável dependente).

#### 3.4.4 Atividade antimicrobiana

O teste foi realizado pelo método de difusão em ágar, seguindo as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS 2009) com modificações (NASCIMENTO, 2007; OSTROSKY et al., 2008). As técnicas utilizadas foram: difusão em disco e difusão em poço.

##### 3.4.4.1 Micro-organismos

Foram utilizadas cepas puras de uma espécie de bactéria Gram-positiva, duas espécies de bactérias Gram-negativas e uma espécie de levedura (tabela 4).

Tabela 4 – Micro-organismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.

Micro-organismo	Nome	Certificação
Bactéria (Gram-positiva)	<i>Staphylococcus aureus</i> Rosembach (1884)	ATCC 6538
Bactérias (Gram-negativas)	<i>Escherichia coli</i> T. Escherich (1885) <i>Proteus mirabilis</i> Hauser (1885)	ATCC 25922 ATCC 7002
Levedura	<i>Candida albicans</i> Berkhout (1923)	ATCC 18804

Os micro-organismos foram repicados em placas de Petri contendo aproximadamente 15 mL de meio de cultura específico, sendo Sabouraud-Dextrose-Ágar (Himedia<sup>®</sup>) para levedura e Ágar Mueller-Hinton (Bibrás Diagnósticos<sup>®</sup>) para as bactérias.

As placas com os inóculos bacterianos foram armazenadas a uma temperatura de 37°C por um período de 24 horas em incubadora B.O.D 411, marca Nova Ética<sup>®</sup>, disponível no Laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais - PRONAT.

A levedura foi incubada em estufa microbiológica marca Eletrolab<sup>®</sup>, a temperatura de 23,5 °C em um intervalo de tempo de 48 horas (AYRES et al., 2008).

#### *3.4.4.2 Padronização dos inóculos*

Os inóculos foram obtidos a partir de culturas dos micro-organismos incubados conforme descrito no item 4.4.4.1, preparando-se suspensões padronizadas com concentrações equivalentes a 10<sup>8</sup> UFC/mL, correspondendo a 0,5 da escala de McFarland.

#### *3.4.4.3 Técnica de difusão em disco*

Inicialmente 30 mg de cada extrato foi transferido para frascos de vidro estéreis e solubilizados com 1,0 mL de DMSO, obtendo uma solução com concentração de 30 mg/mL.

Sobre discos de papel-filtro de 6,0 mm diâmetro, estéreis foram aplicados 20 µL desta concentração, o que resultou em aproximadamente 600 µg de massa impregnada por disco.

Os discos impregnados com os extratos foram colocados sobre a superfície das placas de Petri inoculadas com a suspensão dos micro-organismos testes. As placas, em triplicata, foram identificadas com o nome do micro-organismo teste e código dos extratos.

#### 3.4.4.4 Técnica de difusão em poço

Esta técnica foi conduzida de acordo com Silveira et al. (2009). Placas de Petri contendo aproximadamente 15 mL meio preparadas antecipadamente foram retiradas da geladeira até atingir a temperatura ambiente.

Nestas placas foram produzidos poços de 6,0 mm de diâmetro utilizando a base de ponteiros estéreis. Com um *swab* estéril, o inóculo bacteriano com turvação 0,5 da escala de MacFarland foi distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar, ficando em repouso em temperatura ambiente por aproximadamente três minutos.

Com auxílio de um pipetador automático, dispensou-se em cada poço devidamente identificado, 20 µL do controle positivo solução de Cloranfenicol (Sigma<sup>®</sup>) com concentração de 0,6 mg/ml para as bactérias e Nistatina (Neo química<sup>®</sup>) a 0,6 mg/ml para a levedura, 20 µL do controle negativo (DMSO) e 20 µL da solução de cada amostra do extrato com concentração inicial de 30 mg/mL. A distribuição dos poços na superfície da placa de Petri seguiu o mesmo padrão da técnica de difusão em disco.

#### 3.4.4.5 Incubação das placas inoculadas

Depois de receberem os discos impregnados com a massa dos extratos (técnica de difusão em disco) e o volume com a concentração dos extratos (técnica de difusão em poço), as placas foram incubadas a uma temperatura de 37 °C em incubadora B.O.D 411D, marca Nova Ética<sup>®</sup>, para as bactérias e a 23,5 °C estufa microbiológica Eletrolab<sup>®</sup>, para a levedura *C. albicans* (AYRES et al., 2008).

Após 24 h procedeu-se a leitura das placas inoculadas. A leitura do teste realizado com a levedura deu-se após 48 h. Os diâmetros das zonas de inibição foram mensurados em milímetros com auxílio de uma régua milimetrada, considerando atividade inibitória fraca para os extratos que produziram halos menores que 10 mm. Para halos de 10 a 17 mm, considerou-se atividade inibitória moderada; alto poder de inibição foi considerado para os extratos que produziram halos maiores que 17 mm.

#### 3.4.4.6 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A concentração mínima inibitória foi determinada a partir da concentração inicial de 30 mg/mL dos extratos que obtiveram poder inibitório considerados moderado e forte nos testes de atividade antimicrobiana. Os extratos foram diluídos em DMSO, originando concentrações de 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL e 1 mg/mL.

Destas concentrações foram retiradas alíquotas de 20 µL e aplicadas em poços produzidos na superfície da placa de Petri contendo meio de cultura previamente inoculado com o micro-organismo teste. As concentrações das suspensões dos inóculos corresponderam à escala 0,5 de McFarland ( $10^8$  UFC/mL).

Como controle positivo aplicaram-se 20µL de solução de cloranfenicol (Sigma<sup>®</sup>) com concentração de 0,6 mg/ml para as bactérias e 20µL de solução de concentração 0,6mg/mL de Nistatina (Neo química<sup>®</sup>) para a levedura. Como controle negativo dispensou-se nos poços 20 µL de DMSO.

### 3.5 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS E FLAVONOIDES

Com os extratos ativos, ou seja, aqueles que apresentaram resultados positivos nos ensaios de atividade biológica foram realizados testes de quantificação de fenólicos e flavonoides, por meio de técnicas espectrofotométricas (BERETTA et al., 2005; BERTONCELJ et al., 2007; FERREIRA et al., 2009; SOCHA et al., 2009).

#### 3.5.1 Determinações do teor de fenólicos

O teor de fenólicos foi determinado por método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (1927) e ácido gálico como padrão.

##### 3.5.1.1 Doseamento das amostras

Em um balão volumétrico de 5 mL misturou-se uma alíquota de 0,5 mL de solução estoque de extrato a 0,4 mg/mL com 0,3 mL do reagente Folin-Ciocalteu e mais 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (15%), completando – se o

volume final de 5 mL com metanol. A mistura foi incubada no escuro por duas horas (2 h) e em seguida, as absorvâncias foram lidas a 798 nm.

O branco constituiu-se da substituição da alíquota da solução das amostras de extrato por metanol, que foi misturado com 0,3 mL do reagente Folin-Ciocalteu e mais 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (15%), completando o volume de 5 mL com metanol.

A concentração de fenólicos totais foi calculada com base na curva de calibração obtida com ácido gálico. As análises ocorreram em triplicata e os resultados foram expressos em miligrama EAG (equivalente de ácido gálico) por grama de extrato (mg EAG/g extrato).

#### *3.5.1.2 Curva de calibração com ácido gálico*

A curva de calibração foi construída a partir de uma solução estoque de ácido gálico com concentração igual a 0,13 mg/mL. Desta solução foram pipetadas alíquotas de diferentes volumes (25, 50, 100, 150, 200 e 300 µL) com em balões volumétricos de 5 mL, onde foram adicionados 0,3 mL do reagente Folin-Ciocalteu e mais 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (15%).

Completo-se o volume de 5 mL com água destilada. Os balões contendo as misturas foram incubados no escuro por duas horas (2h) e em seguida as absorvâncias foram lidas a 798 nm. O teor de ácido gálico foi calculado por regressão linear, utilizando o programa estatístico Microcal Origin6. Os valores foram plotados em gráfico cartesiano onde a abscissa (eixo x) representou as concentrações de ácido gálico e a ordenada (eixo y), as absorvâncias.

#### **3.5.2 Determinação do teor de flavonoides**

O teor de flavonoides foi determinado por meio do somatório dos resultados de dois métodos espectrofotométricos. Um deles utilizando como reagente cloreto de alumínio, para determinar flavonas e flavonóis e o outro usando o reagente 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNP), para determinar flavanonas e diidroflavonóis (TYLKOWSKI et al., 2010).

### 3.5.2.1 Teor de flavonas e flavonóis

A determinação das flavonas e flavonóis foi realizada através da metodologia de complexação com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), utilizando como padrão quercetina.

#### 3.5.2.1.1 Teste de doseamento das amostras

Foram misturados 2 mL de solução estoque dos extratos a 0,4 mg/mL com 3 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado a 5%. A mistura ficou em repouso por 30 minutos e em seguida as absorbâncias foram lidas em comprimento de onda de 437 nm.

O branco foi preparado com 2 mL de solução estoque de extrato a 0,4 mg/mL e 3 mL de metanol (TYLKOWSKI et al., 2010). As análises ocorreram em triplicata e os resultados foram expressos em miligrama (mg) de quercetina por grama (g) de extrato.

#### 3.5.2.1.2 Curva de calibração de quercetina

A curva de calibração foi construída a partir de uma solução estoque de quercetina a 0,1 mg/mL. Desta solução foram pipetadas alíquotas de diferentes volumes (40, 60, 120, 140 e 160  $\mu\text{L}$ ) em balões volumétricos de 5 mL, onde adicionaram-se 3 mL de cloreto de alumínio a 5%, completando-se o volume final de 5 mL com metanol.

Para cada ponto da curva de calibração, preparou-se um branco com os volumes da solução de quercetina utilizados na construção da curva, completando-se o volume final de 5 mL com metanol.

O teor de quercetina foi calculado por regressão linear, utilizando o programa estatístico Microcal Origin6. Os valores foram plotados em gráfico cartesiano onde a abscissa (eixo x) representou as concentrações de quercetina e a ordenada (eixo y), as absorbâncias.

### 3.5.2.2 Teor de flavanonas e diidroflavonóis

O teor de flavanonas e diidroflavonóis foi determinado de acordo com Tylkowski et al. (2010).

#### 3.5.2.2.1 Preparação do reagente DNP

Previamente, preparou-se o reagente 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNP), colocando-o para secar em estufa de circulação de ar a 60 °C, por três horas (3 h). Em seguida, o reagente anidro (0,5 g) foi dissolvido em 1,0 mL de ácido sulfúrico a 96% e transferido para um balão volumétrico de 50 mL, onde completou-se o volume com metanol.

#### 3.5.2.2.2 Doseamento das amostras

Misturou-se 1,0 mL de solução estoque de extrato a 0,4 mg/mL com 0,4 mL de DNP, preparado previamente. Esta solução foi aquecida em banho-maria por 50 minutos a uma temperatura de 50°C.

Após resfriamento, acrescentaram-se 1,4 mL de hidróxido de potássio (KOH) a 10% metanol/água (7:3), totalizando um volume de 2,2 mL. Uma alíquota de 0,15 mL desta solução foi diluída com 5 mL de metanol, centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm e em seguida as absorbâncias foram lidas a 493 nm. As análises ocorreram em triplicata e os resultados foram expressos em miligrama (mg) de pinocembrina por grama (g) de extrato. As concentrações de flavonas e diidroflavonóis foram calculadas com base na curva de calibração de pinocembrina.

#### 3.5.2.2.3 Curva de calibração de pinocembrina

Para a curva de calibração foram utilizados 0,4 mL de uma solução estoque de pinocembrina a 1mg/mL e misturados a 0,8 mL da solução de DNP, preparada previamente. A solução foi mantida em estufa por 50 minutos a 50 °C, após

resfriamento, acrescentaram-se 2,8 mL de uma solução em metanol/água (7:3) de KOH (10%).

Desta mistura foram pipetadas cinco alíquotas (25, 75, 100, 150 e 200  $\mu$ L), sendo cada uma depositada em um balão volumétrico de 5 mL e diluída com metanol até o volume final. As absorvâncias destas soluções foram lidas em comprimento de onda de 493 nm.

O branco foi preparado adicionando-se 0,4 mL de metanol a 0,8 mL de DNP. Em seguida, a solução foi mantida em banho-maria por 50 °C por 50 minutos. Deixou-se esfriar. A esta solução foram acrescentados 2,8 mL de KOH (10%). Desta mistura retirou-se 0,15 mL e diluiu-se com metanol até o volume de 5 mL.

O teor de pinocembrina foi calculado por regressão linear, utilizando o programa estatístico Microcal Origin6. Os valores foram plotados em gráfico cartesiano onde a abscissa (eixo x) representou as concentrações de pinocembrina e a ordenada (eixo y), as absorvâncias.

### 3.6 ESTATÍSTICA

As análises dos testes de citotoxicidade, antimicrobiano e antioxidante foram realizadas em triplicata e os dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados das médias e dos desvios padrão foram calculados por meio do programa BioEstat5.0. Os valores de  $DL_{50}$  e  $IC_{50}$  foram calculados por regressão linear, por meio do programa estatístico Microcal Origin6. e plotados em gráfico.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados sobre a investigação química e potencial biológico de *S. exorrhiza* fazem parte da continuidade de estudo de (VERAS, 2004). Naquela pesquisa constatou-se que as publicações envolvendo estudos com espécies de *Arecaceae*, família da qual pertence a *S. exorrhiza*, eram escassas, principalmente quanto ao perfil químico ou farmacológico.

Hoje, passados aproximadamente 12 anos, esse quadro não mudou muito. Exaustivas pesquisas foram feitas na literatura e nenhum trabalho referente ao perfil químico ou atividade biológica com extratos de alguma parte de *S. exorrhiza* foi encontrado, classificando os resultados deste trabalho como inéditos.

A espécie coletada foi identificada como *Socratea exorrhiza* (Mart.) H. Wedland, conhecida popularmente como paxiuba. Por ser fortemente baseada em nomes vernaculares, a verdadeira identidade de uma planta recomendada para uso fitoterápico pode variar enormemente de região para região (LORENZI; MATOS, 2008). Por isso, qualquer planta escolhida para estudo químico deve ser seguramente identificada (MATOS, 1997).

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS DA RAIZ DE *Socratea exorrhiza*

Foram analisados doze (12) extratos obtidos com solventes de polaridades crescentes, produzidos com uma massa inicial de material seco e pulverizado (tabela 5).

Extratos são preparações concentradas de diversas consistências possíveis, obtidos a partir de matérias primas vegetais secas ou frescas, que passam ou não por tratamentos (inativação enzimática, moagem, etc.), produzidos por processos envolvendo pelo menos um solvente (CARVALHO, 2004, BRASIL, 2010).

O órgão vegetal seja ele, folha, flor, raiz ou casca, quando recém-colhido apresenta elevado teor de umidade e substratos que concorrem para que a ação enzimática seja aumentada. A secagem, em virtude da evaporação de água contida nas células e nos tecidos das plantas, reduz o peso do material. Por essa razão promove aumento percentual de princípios ativos em relação ao peso da amostra (BRASIL, 2003).

Tabela 5 – Percentual de rendimento dos extratos hexânicos, clorofórmicos, acetato de etila e metanólicos de *Socratea exorrhiza*.

<b>Extratos</b>	<b>Massa inicial das amostras – secas e em pó (g)</b>	<b>Massa total dos extratos concentrados (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
EHPER		0,1082	0,71%
ECPER		0,1035	0,68%
EAPER	15,29	0,3639	2,38%
EMPER		0,4563	2,98%
EHPIR		0,0827	1,04%
ECPIR		0,0744	0,93%
EAPIR	7,97	0,1879	2,36%
EMPIR		1,3060	16,38%
EHBRT		0,1459	1,66%
ECBRT	8,77	0,1015	1,16%
EABRT		0,3132	3,57 %
EMBRT		2,3041	26,27%

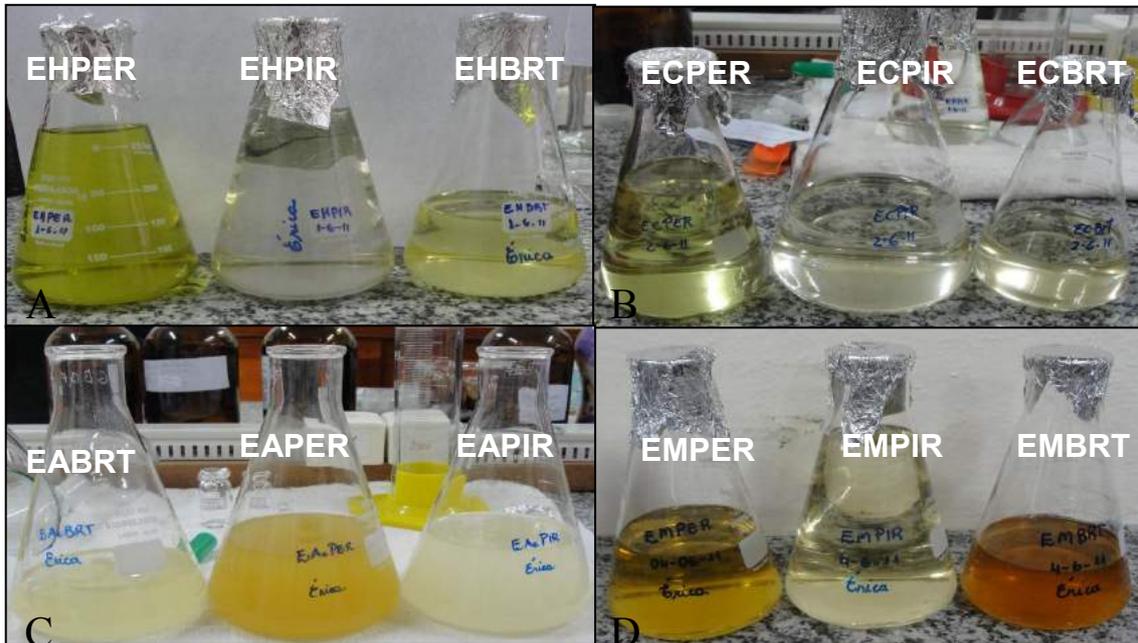
E = extrato; A = acetato de etila; M = metanol; C = clorofórmio; PER = parte externa da raiz; PIR = parte interna da raiz; BRT = broto da raiz.

Observando os resultados em relação ao rendimento dos extratos, constatou-se que a maior fração de substâncias extraídas deu-se com o solvente metanol para as três partes da planta, ficando o extrato metanólico do broto (EMBRT) com um percentual de 26,27%. O menor índice se deu para o clorofórmio com 0,68% no extrato da parte externa da raiz (PER).

As amostras submetidas à extração apresentaram coloração que variou do transparente ao amarelo intenso no caso dos extratos hexânicos, passando pelo amarelo fraco verificado nos extratos clorofórmicos, ao marrom, observado nos extratos metanólicos (figura 20).

A parte externa da raiz apresentou cores mais fortes em contraste com os extratos da parte interna que se apresentaram com aspecto incolor. Os extratos obtidos com acetato de etila apresentaram inicialmente aspecto leitoso (figura 21 A) e depois de concentrados apresentaram coloração marrom.

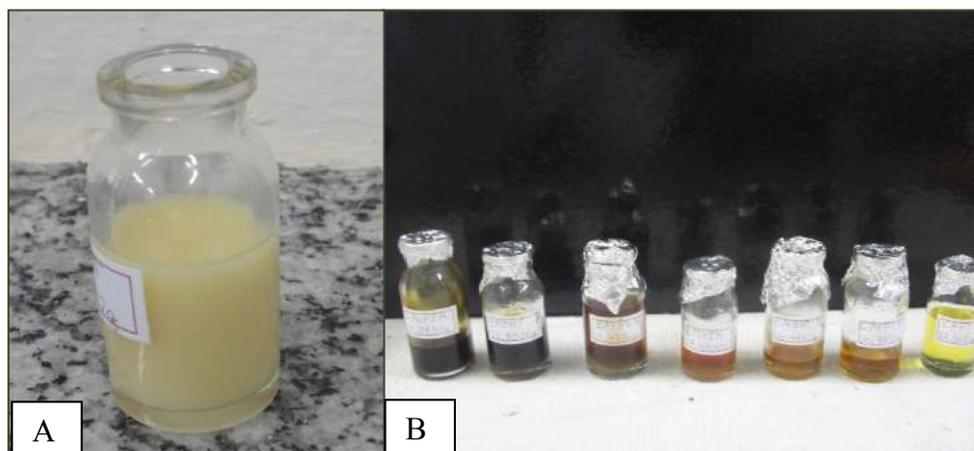
Figura 20 – Aspecto dos extratos quanto à coloração. A) extratos hexânicos, B) extratos clorofórmicos, C) extratos de acetato de etila e D) extratos metanólicos da raiz de *Socratea exorrhiza*.



E = extrato; A = acetato de etila; M = metanol; C = clorofórmio; PER = parte externa da raiz; PIR = parte interna da raiz; BRT = broto da raiz.

Todos os extratos após o processo de concentração ficaram com uma coloração mais escurecida (figura 21B) e consistências diferentes para cada um, variando do seco endurecido ao granulado e pastoso. A coloração dos extratos pode estar associada à presença de substâncias fenólicas. Fenóis e flavonoides contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais. Muitos destes são importantes economicamente, devido à utilização como flavorizantes e corantes de alimentos (CARVALHO, GOSMANN, SCHENKEL, 2004).

Figura 21 - A) aspecto leitoso do extrato acetato de etila do broto da raiz de *Socratea exorrhiza*; B) extratos concentrados da raiz de *S. exorrhiza*.



## 4.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Meyer et al. (1982) estabeleceram uma relação de grau de toxicidade e dose letal média (CL<sub>50</sub>), sobre a larva de *A. salina*, na qual considera-se que quando são verificados valores acima de 1000 µg/mL, estes são considerados atóxicos.

Neste trabalho, com exceção de EABRT e EAPER, os extratos foram considerados atóxicos, obtendo o IC<sub>50</sub>>1000 µg/mL (tabela 6).

Somente os extratos EABRT e EAPER apresentaram concentrações significativas com valores de IC<sub>50</sub> = 473µg/mL e 604µg/mL, respectivamente, mostrando-se tóxicos.

Tabela 6 – Média e desvio padrão da mortalidade das larvas de *Artemia salina* nos extratos de *Socratea exorrhiza*.

[ ] PPM	EHPER	EHPIR	EHBRT	ECPER	ECPIR	ECBRT
20	3,3±1,15	1,0±1,00	1,0±1,0	0,7±1,15	0,0±0,00	0,7±1,15
100	0,3±0,58	0,3±0,58	3,0±1,0	0,7±1,15	1,0±1,0	0,0±0,00
200	0,0±0,00	0,7±0,58	0,7±1,15	0,0±0,00	0,7±1,15	1,33±1,15
500	0,0±0,00	1,0±1,00	0,0±0,00	0,3±0,58	0,0±0,00	0,0±0,00
1000	0,0±0,00	0,3±0,58	0,0±0,00	0,7±1,15	0,0±0,00	0,7±1,15
IC <sub>50</sub>	> 1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
[ ] ppm	EAPER	EAPIR	EABRT	EMPER	EMPIR	EMBRT
20	0,0±0,00	0,0±0,00	0,3±0,58	0,3±0,6	2,7±0,58	0,0±0,00
100	0,67±1,15	0,0±0,00	1,7±1,15	0,0±0,00	1,67±1,15	0,0±0,00
200	1,0±0,00	0,33±0,58	4,7±0,58	0,0±0,00	0,3±0,58	0,0±0,00
500	4,0±3,46	0,67±1,15	5,7*±2,52	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
1000	8,7 <sup>a</sup> ±0,58	5,0* ±3,46	10* ±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
IC <sub>50</sub>	604	>1000	473	>1000	>1000	>1000

E = extrato; A = acetato de etila; M = metanol; C = clorofórmio; PER = parte externa da raiz; PIR = parte interna da raiz; BRT = broto da raiz.

Ensaio com extratos brutos ou frações de alguma parte de *S. exorrhiza* frente *A. salina* não foram encontrados na literatura, dificultando assim a discussão desta temática em nível de gênero e espécie.

Tentando buscar correlação em nível de família, um dos poucos trabalhos encontrados foi o de Galotta et al. (2008). Em seus resultados estas autoras observaram que o extrato etanólico da raiz do açai (*E. precatória*) apresentou-se atóxico com IC<sub>50</sub>=1010µg/mL, porém quando particionado com n-butanol, mostrou-

se ativo com  $IC_{50}=481\mu\text{g/mL}$ . Ainda, no mesmo trabalho, as autoras atestaram que os extratos etanólicos do talo da folha fracionados com clorofórmio/metanol (1:1) são muito tóxicos, apresentando  $IC_{50}=271\mu\text{g/mL}$ .

O resultado obtido do extrato EABRT ( $IC_{50} = 473\mu\text{g/mL}$ ) aproxima-se do extrato n-butanólico da raiz do açaí ( $IC_{50}=481\mu\text{g/mL}$ ) de Galotta, et al., (2008) apresentando uma atividade tóxica moderada. Porém, diverge quando comparado aos extratos de acetato de etila do talo da folha do açaí que não apresentaram atividade tóxica ( $DL_{50}>1000\mu\text{g/mL}$ ).

Os extratos de acetato de etila em geral carregam compostos como flavonoides e cumarinas simples (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2006). As cumarinas despertam interesse de pesquisadores, pois diversos estudos já foram realizados evidenciando suas propriedades bioativas (CZELUSNIAK et al., 2012).

O bioensaio com larvas de *A. salina* pode ser utilizado para determinar toxicidade de produtos naturais e sintéticos, considerando que estas larvas apresentam sensibilidade a substâncias tóxicas (MCLAUGHLIN; SAIZARBITORIA; ANDERSON, 1995).

Inúmeros constituintes bioativos têm sido obtidos de extratos vegetais de plantas conhecidas como antitumorais, utilizando-se o teste de toxicidade na monitoração de estudos fitoquímicos (NOLDIN et al., 2003).

McLaughlin et. al. (1998) relatam que esse ensaio tem boa correlação com atividade citotóxica em alguns tumores que acometem humanos e tem sido realizado como testes preliminares *in vitro* na rotina de muitos laboratórios especializados em estudos contra o câncer.

### 4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada qualitativa e quantitativamente e os resultados são apresentados a seguir.

#### 4.3.1 Análise qualitativa da atividade antioxidante

A análise qualitativa foi realizada por cromatografia em camada delgada - CCD, de acordo com Giordano et al., (2008). Em uma placa de CCD foram

marcados 12 *spots*, sendo cada *spot* equivalente à aplicação de 10  $\mu$ L de cada extrato.

A placa foi borrifada com solução de DPPH e após 30 minutos no escuro à temperatura ambiente observaram-se manchas amarelas ou esbranquiçadas em todos os *spots*, decorrentes da redução do DPPH. De fundo notou-se uma coloração arroxeada. Este resultado foi considerado positivo, indicando atividade antioxidante para todos os extratos (figura 22).

Figura 22 – Placa de CCD mostrando manchas amareladas em fundo púrpuro. Ação da atividade antioxidante dos extratos da raiz de *Socratea exorrhiza* após reação com DPPH.



#### 4.3.2 Análise quantitativa da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método de sequestro do radical livre DPPH. Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de cor amarela (figura 23). Os resultados da atividade antioxidante dos extratos podem ser visualizados na tabela 7.

Figura 23 – A) amostra após reação com DPPH (faixa de variação da concentração = 16,80  $\mu$ g/mL a 80,0  $\mu$ g/mL); B) controle em triplicata.

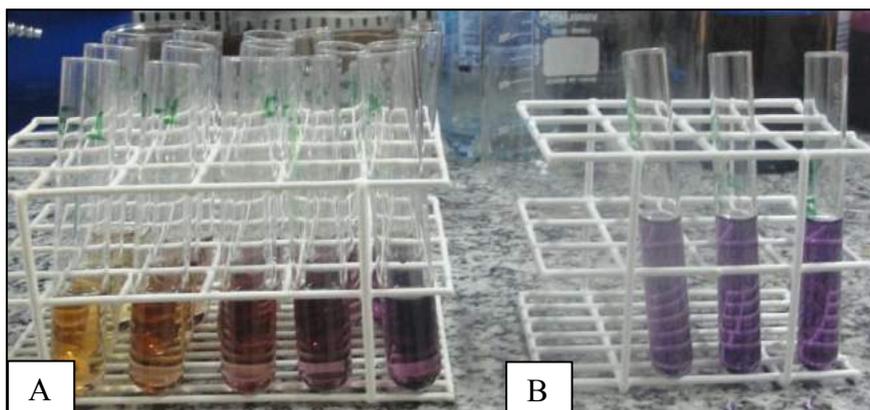


Tabela 7 – Atividade antioxidante (AA%) e IC<sub>50</sub> (µg/mL) dos extratos metanólicos, clorofórmicos e acetato de etila das partes das raízes de *Socratea exorrhiza*.

Amostra	Concentração (µg/mL)	AA%	Amostra	Concentração (µg/mL)	AA%
EAPER	22,8	22,18	EMPER	39,60	31,23
	45,6	46,63		79,20	46,65
	69,4	59,74		118,8	61,34
	91,2	71,01		158,4	73,9
	114,0	81,86		198,0	83,27
EAPIR	23,7	26,19	EMPIR	110,0	28,0
	47,4	39,33		220,0	45,0
	71,1	45,05		330,0	57,5
	94,8	57,43		440,0	67,4
	118,5	64,57		550,0	76,2
EABRT	16,80	41,52	EMBRT	42,0	29,17
	33,60	60,29		84,0	37,63
	48,0	77,62		126,0	55,08
	64,0	91,16		168,0	67,31
	80,0	95,67		210,0	78,0
ECPIR	35,0	25,64	ECPER	26,5	24,30
	70,0	36,14		53,0	34,02
	105,0	42,51		79,5	41,68
	140,0	49,05		106,0	48,59
	175,0	53,18		132,5	52,89

E = extrato; A = acetato de etila; M = metanol; C = clorofórmio; PER = parte externa da raiz; PIR = parte interna da raiz; BRT = broto da raiz.

Os resultados demonstrados na tabela 7 permitiram construir uma curva de calibração para cada ensaio, onde relacionaram-se o percentual de atividade antioxidante e as concentrações das diluições finais. Como exemplos seguem as curvas de calibração de EABRT e EAPER (figuras 24 e 25).

Figura 24: Curva de calibração para obtenção do IC<sub>50</sub> da atividade antioxidante do extrato acetato de etila do broto da raiz de *Socratea exorrhiza*.

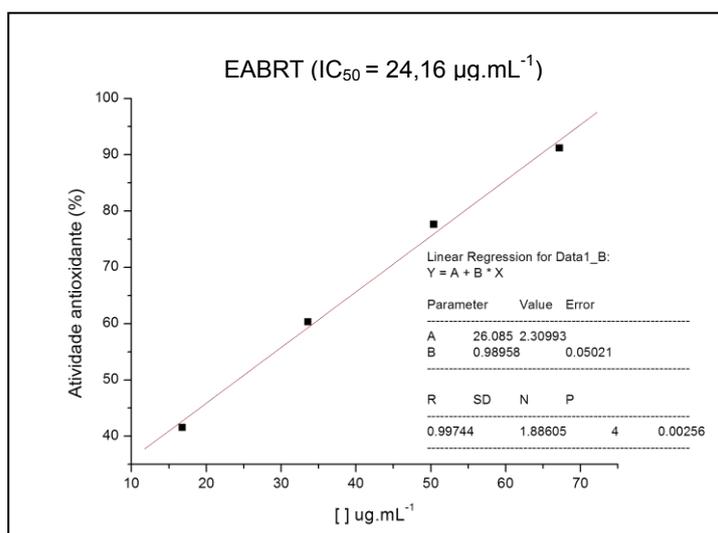
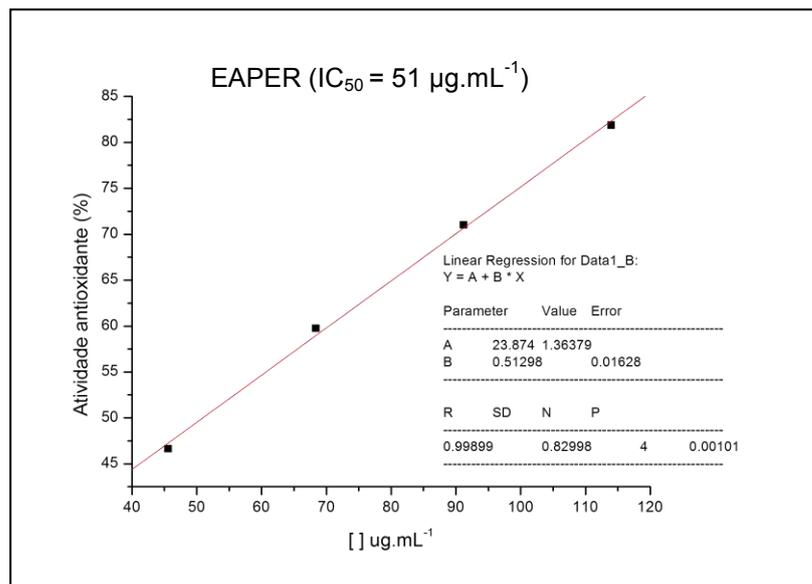


Figura 25: Curva de calibração para obtenção do  $IC_{50}$  da atividade antioxidante do extrato acetato de etila da parte externa da raiz de *Socratea exorrhiza*.



Com os gráficos da curva de calibração obteve-se a equação da reta, por meio da qual determinou-se o parâmetro  $IC_{50}$  das amostras dos extratos (tabela 8).

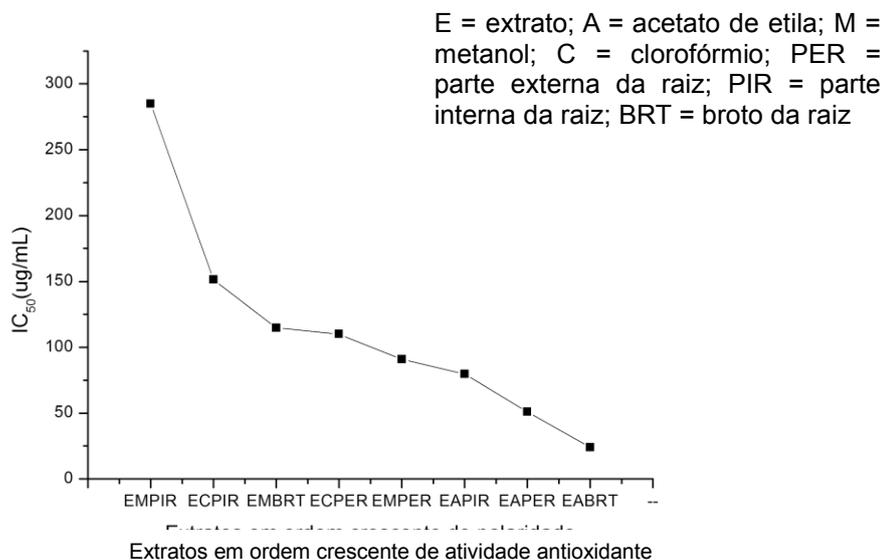
Tabela 8: Valores de  $IC_{50}$  dos extratos da raiz *Socratea exorrhiza*. Teste de atividade antioxidante.

Extratos	Valores $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
ECPER	110,00
EAPER	50,92
EMPER	90,82
ECPIR	151,40
EAPIR	79,80
EMPIR	285,40
EABRT	24,03
EMBRT	114,70

E = extrato; A = acetato de etila; M = metanol; C = cloróformio; PER = parte externa da raiz; PIR = parte interna da raiz; BRT = broto da raiz

Observando a tabela 8 verificou-se que os resultados de  $IC_{50}$  dos extratos variaram de 24,03 a 285,4  $\mu\text{g/mL}$ , sendo o menor valor registrado para EABRT ( $IC_{50} = 24,03 \mu\text{g/mL}$ ) considerado o mais ativo, enquanto que o maior valor foi obtido com o extrato EMPIR ( $IC_{50} = 285,4 \mu\text{g/mL}$ ), sendo considerado o menos ativo (figura 26).

Figura 26 – Gráfico da capacidade antioxidante dos extratos da raiz de *Socratea exorrhiza*.



A atividade redutora dos extratos observada em ordem decrescente foi: EMPIR > ECPIR > EMBRT > ECPER > EMPER > EAPIR > EAPER > EABRT.

Observou-se que todos os extratos, exceto os de acetato de etila, apresentaram valores de IC<sub>50</sub> muito elevados, resultando em fraca ação antioxidante. De acordo com Serra (2011) quanto menor o valor de IC<sub>50</sub> maior é a capacidade da amostra em análise de neutralizar os radicais livres.

Comparando os resultados aqui apresentados com Sousa et al. (2007), notou-se que o valor de IC<sub>50</sub> para o extrato AEBRT mostrou-se compatível aos controles positivos rotina (IC<sub>50</sub> = 27,80 µg/mL) e ácido gálico (IC<sub>50</sub> = 24,27 µg/mL). Estes autores estudaram a atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, sendo uma delas *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore (Arecaceae), conhecida comumente como carnaúba.

A parte testada de *C. prunifera* também foi a raiz, popularmente utilizada na forma de elixir, para tratamento de sífilis e afecções cutâneas. Nestes estudos, Sousa et al, (2007) concluíram que todas as espécies analisadas apresentavam atividade sequestradora do radical DPPH, contudo o extrato de *C. prunifera* foi o menos ativo para três diferentes concentrações por apresentarem valores de IC<sub>50</sub> muito maiores que os controles positivos rotina e ácido gálico.

Os valores de IC<sub>50</sub> de EABRT (24,03 µg/mL) e EAPER (50,92 µg/mL) assemelham-se com os resultados de Gallota et al. (2008), que investigaram a atividade antioxidante de raízes e pecíolos do açaí (*E. precatória* Mart), usando beta-

caroteno em placas de CCD e DPPH. Neste trabalho todos os extratos foram positivos para a atividade antioxidante, sendo considerados pelas autoras como de alta potência, onde o extrato etanólico da raiz obteve  $IC_{50} = 43,54 \mu\text{g/mL}$  e o extrato etanólico dos pecíolos o  $IC_{50}$  resultou em  $24,74 \mu\text{g/mL}$ .

De modo geral a família Arecaceae vem sendo lentamente estudada quanto à atividade antioxidante. Nesta temática destaca-se o coco (*Cocos nucifera*). Dados obtidos nos estudos de Fonseca et al. (2009) demonstraram resultados significativos da capacidade antioxidante do óleo dos frutos de duas espécies de coco, onde os valores de  $IC_{50}$  foram  $0,19$  e  $0,24 \mu\text{g/mL}$ , apresentando  $79,04\%$  e  $83,5\%$  de DPPH consumido pela amostra, respectivamente.

Os dados de Galotta, et.al. (2008) apresentaram menores concentrações entre os estudados para os flavonoides isolados do açaí, como, a quercetina ( $IC_{50}=3,73 \pm 1,31 \mu\text{g/mL}$ ), catequina ( $IC_{50}=5,15 \pm 2,42 \mu\text{g/mL}$ ) e a fração do extrato etanólico do talo da folha do açaí ( $IC_{50}= 3,33 \pm 4.11 \mu\text{g/mL}$ ). A potência do açaí como um forte antioxidante associa-se aos flavonoides presentes.

Comparando os dados com a literatura observou-se que os extratos da raiz de *S. exorrhiza* apresentaram atividade antioxidante moderada, destacando-se os extratos acetato de etila como os melhores inibidores de radical livre até o momento. Não foram realizados testes de atividade antioxidante com os extratos hexânicos e clorofórmico do broto, devido à quantidade insuficiente de massa bruta das amostras.

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados destes estudos demonstraram ação antimicrobiana positiva para a maioria dos extratos testados, registrando-se halos de inibição que variaram de  $07$  a  $25 \text{ mm}$  de diâmetro (tabela 9).

Segundo Simões (2007), pesquisas vinculadas às atividades antimicrobianas de espécies vegetais, utilizadas na medicina tradicional, proporcionam excelentes oportunidades para o desenvolvimento de novos produtos medicinais, além de constituir uma alternativa para os problemas relacionados à resistência microbiana.

Tabela 9 – Teste de atividade antimicrobiana. Média  $\pm$  Desvio padrão dos halos de inibição (mm).

Extratos [30mg/mL]	Micro-organismos (halos de inibição em mm)							
	<i>E. coli</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	<i>Disco</i>	<i>Poço</i>	<i>disco</i>	<i>poço</i>	<i>disco</i>	<i>poço</i>	<i>disco</i>	<i>poço</i>
EHPER	10 $\pm$ 1,0	7,0 $\pm$ 0,0	7,0 $\pm$ 0,0	11 $\pm$ 1,0	16 $\pm$ 1,0	18 $\pm$ 1,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
ECPER	8,0 $\pm$ 0,0	11 $\pm$ 1,0	0,0 $\pm$ 0,0	9,0 $\pm$ 0,0	13 $\pm$ 2,3	17 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
EAPER	9,0 $\pm$ 0,0	13 $\pm$ 1,0	10 $\pm$ 0,0	15 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	7,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
EMPER	0,0 $\pm$ 0,0	7,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	9,0 $\pm$ 0,0	8,0 $\pm$ 0,0	11 $\pm$ 0,0	10 $\pm$ 1,0	18 $\pm$ 0,0
EHPIR	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	10 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
ECPIR	7,0 $\pm$ 0,0	12 $\pm$ 1,0	0,0 $\pm$ 0,0	7,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
EAPIR	0,0 $\pm$ 0,0	11 $\pm$ 0,5	10 $\pm$ 0,0	16 $\pm$ 1,0	10 $\pm$ 0,0	12 $\pm$ 1,0	7,0 $\pm$ 0,0	10 $\pm$ 0,0
EMPIR	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
EBRT	8,0 $\pm$ 0,0	10 $\pm$ 1,0	10 $\pm$ 0,0	13 $\pm$ 1,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
ECBRT	8,0 $\pm$ 0,0	13 $\pm$ 0,0	7,0 $\pm$ 0,0	11 $\pm$ 0,0	9,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
EABRT	7,0 $\pm$ 0,0	12 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	7,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
EMBRT	7,0 $\pm$ 0,0	13 $\pm$ 1,0	17 $\pm$ 1,0	22 $\pm$ 1,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	13 $\pm$ 1,0	25 $\pm$ 0,0
CP	15 $\pm$ 0,0	15 $\pm$ 0,0	12 $\pm$ 1,0	14 $\pm$ 1,0	15 $\pm$ 0,0	25 $\pm$ 0,0	10 $\pm$ 1,0	15 $\pm$ 1,0
CN	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

CP (controle positivo); CN (controle negativo); E = extrato; H = hexano; A = acetato de etila; M = metanol; C = clorofórmio; PER = parte externa da raiz; PIR = parte interna da raiz; BRT = broto da raiz

#### 4.4.1 Atividade antimicrobiana dos extratos brutos da raiz de *Socratea exorrhiza* contra o crescimento de bactérias Gram-negativas.

Observando os dados apresentados na tabela 9, nota-se que os extratos da parte externa da raiz (PER) e os extratos do broto da raiz (BRT) foram ativos na inibição do crescimento das bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. mirabilis*.

Contra a multiplicação das referidas bactérias destacaram-se os extratos de acetato de etila da parte externa da raiz (EAPER), que apresentaram ação inibitória moderada na Técnica de Difusão em Poço, obtendo halo de 13 mm de comprimento contra o crescimento de *E. coli* e de 15 mm contra *P. mirabilis*; e o extrato metanólico do broto da raiz (EMBRT) que produziu halo com forte poder de inibição na Técnica de Difusão em Poço (halo = 22 mm) contra o crescimento de *P. mirabilis* e ação moderada na Técnica de Difusão em Disco (halo = 17 mm) para esta bactéria.

As bactérias gram-negativas são intrinsecamente consideradas resistentes aos antibióticos comumente utilizados na medicina moderna. Maia (2008) comenta que a resistência intrínseca das bactérias Gram-negativas aos agentes antimicrobianos está relacionada com a parede celular, que é mais complexa estrutural e quimicamente, além da presença da membrana externa, do espaço periplasmático e do mecanismo de bomba de efluxo, que contribuem para esta particularidade.

De acordo com Trabulsi et al. (1999), a parede celular das bactérias Gram-negativas é formada por uma fina camada de peptidoglicano e por uma membrana externa constituída por dupla camada lipídica, sendo uma camada interna composta de fosfolipídeos e uma externa contendo lipolissacarídeos e proteínas, caracterizando uma barreira adicional à entrada de algumas substâncias.

Diante do exposto, os resultados aqui apresentados revelam a importância do potencial antimicrobiano dos extratos da raiz de *S. exorrhiza* frente às bactérias Gram-negativas, uma vez que, geralmente, conforme tem-se acompanhado na literatura, na maioria dos ensaios com extratos de plantas, estes micro-organismos mostram-se resistentes à ação inibitória das substâncias testadas e confirmam os resultados obtidos por Silva et al. (2002) e por Veras (2004), onde os extratos da raiz de paxiuba tiveram forte ação inibitória contra o crescimento de *E. coli* com formação de halo de 25 mm de comprimento.

Veras (2004) também testou extratos da raiz de outras palmeiras nativas de Roraima (*O. bacaba* e *O. bataua*) e verificou que os extratos apresentaram ação inibitória moderada contra o crescimento de *E. coli*.

Nos estudos de Silveira et al.(2005) a atividade antimicrobiana dos frutos das palmeiras *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera* foi evidenciada e os melhores percentuais de inibição foram para as cepas Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*.

As manifestações clínicas das infecções causadas por *E. coli* dependem do local da infecção, do tipo da cepa e do sítio de ação, sendo a infecção do trato urinário e as diarreias as doenças mais comuns causadas por esta bactéria (SCHAECHTER et al., 2002; SERQUEIRA et al., 2009).

Quando as defesas normais do hospedeiro não estão adequadas, a *E. coli* pode atingir a corrente sanguínea e provocar sepse. Esta bactéria é também uma das principais causadoras de meningites em lactentes (TRABULSI et al., 1999).

O gênero *Proteus* é encontrado regularmente no intestino humano, sendo *P. mirabilis* a espécie mais comum. As infecções causadas por estas bactérias ocorrem principalmente nas vias urinárias (MIMS et al., 1999).

Uma característica comum nas bactérias do gênero *Proteus* é a resistência natural às polimixinas, um grupo de antibiótico bastante ativo contra as demais enterobactérias e outros micro-organismos Gram-negativos (KONEMAM et al., 2001).

Lembrando que, com exceção das doenças fúngicas e virais, duas principais doenças sexualmente transmissíveis são causadas por bactérias Gran-negativas. Uma delas é a Sífilis, que tem como agente causador o *Treponema Pallidum*, bactéria Gran-negativa do grupo das espiroquetas; a outra doença é a Gonorreia ou Blenorreia, causada pela bactéria também Gran-negativa, em forma de coco, *Neisseria gonorrhoeae*.

As informações sobre a resistência das bactérias Gram-negativas a antibióticos tradicionais e a compostos oriundos de extratos de plantas tornam ainda maior o valor dos resultados aqui obtidos (inibição dos micro-organismos Gram-negativos, devido ação dos extratos da raiz da paxiuba) e este valor aumenta ainda mais quando nos reportamos ao conhecimento tradicional, onde um dos usos com preparados de raízes de paxiuba era no tratamento de infecções sexualmente transmissíveis (VILHENA, LINS; LUNA, 1984).

#### **4.4.2 Atividade antimicrobiana dos extratos brutos da raiz de *Socratea exorrhiza* contra o crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*.**

Conforme a tabela 9, os extratos hexânico e clorofórmico da parte externa da raiz, considerados de baixa polaridade, destacaram-se contra o crescimento da bactéria *S. aureus*, pela Técnica de Difusão em Poço.

A ação do extrato hexânico produziu halo de inibição de 18 mm de diâmetro, visualmente classificado como alto poder inibitório, enquanto que extrato clorofórmico apresentou ação moderada contra o crescimento deste micro-organismo, com halo de 17 mm (figura 27). Tanto o extrato hexânico como o extrato clorofórmico da parte externa da raiz apresentou ação moderada na inibição do crescimento de *S. aureus* na Técnica de Difusão em Disco.

Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Caetano et al. (2002). Estes autores realizaram pesquisa de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular, entre as plantas estudadas estava a palmeira *Orbignya martiana* (babaçu), onde o extrato com concentração de 30 mg/ml inibiu o crescimento de sete cepas de *S. aureus*, com halos de 14 a 18 mm de diâmetro.

Figura 27 – Halos de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*. Ação dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico da parte externa da raiz de *Socratea exorrhiza*.



CP (controle positivo); CN (controle negativo); E = extrato; H = hexano; A = acetato de etila; M = metanol; C = clorofórmio; PER = parte externa da raiz.

Silveira et al. (2005) testaram a capacidade antimicrobiana de extratos dos frutos das palmeiras *Syagrus oleracea* (guariroba) e *Mauritia vinifera* (buriti) e notaram que o poder inibitório aumentava com a diminuição da polaridade dos extratos, ocorrendo uma exceção apenas no teste realizado com *S. aureus*, onde o extrato etanólico obteve percentual de inibição microbiana superior à partição em acetato de etila.

Ainda observando a tabela 9, o extrato metanólico da parte externa da raiz apresentou ação moderada contra *S. aureus*, com halo de 11 mm de diâmetro pela Técnica de Difusão em Poço. Já o extrato de acetato de etila mostrou-se ineficiente na inibição do crescimento de *S. aureus*.

Com relação aos extratos da parte interna da raiz e do broto da raiz, não houve ação inibitória significativa frente à *S. aureus*. Visualmente, apenas o extrato acetato de etila apresentou ação moderada contra este micro-organismo pelas técnicas de difusão em disco (10 mm) e de difusão em poço (12 mm).

O controle positivo produziu halo de 25 mm e com o controle negativo não houve formação de halos.

A ação positiva dos extratos hexânico, clorofórmio, acetato de etila e metanólicos da parte externa da raiz contra o crescimento de *S. aureus* apresentou diferença estatística significativa negativa em relação ao controle positivo cloranfenicol, ou seja, o poder de inibição dos extratos foi significativamente inferior ao poder de inibição do controle. A ação do extrato hexânico da parte externa da raiz não se diferenciou estatisticamente do extrato clorofórmico, ambos inibiram o crescimento da bactéria *S. aureus*.

Mohamed, Khalil e El-Beltagi (2010), testaram as propriedades antimicrobianas de extratos da palmeira *Hyphaene thebaica* L (palmeira africana), onde os resultados apontaram atividade positiva tanto contra bactérias Gram-negativas como contra Gram-positivas.

As bactérias Gram-positivas demonstraram marcante habilidade de adaptação desde que a penicilina foi usada pela primeira vez. A rápida resistência desses micro-organismos a novos fármacos ou a antibióticos convencionais tem preocupado cientistas do mundo todo, uma vez que são necessários vários anos de estudo para descoberta de novos medicamentos com ação eficaz contra doenças causadas por estas bactérias (SHIOTA et al., 1999; BISPO et al., 2007).

Mediante esta preocupação, todo e qualquer esforço é válido quanto ao desenvolvimento de pesquisas que objetivam experimentar novas substâncias com potencial ação antimicrobiana.

Diferentes autores têm reportado que a relação entre a sensibilidade microbiana aos extratos e a estrutura celular das bactérias não está bem esclarecida e não possuem regra geral para tais interações. Porém é proposto que a ação inibitória mais eficiente ou menos eficiente dos extratos sobre as bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas podem estar associadas às peculiaridades da composição dos extratos agindo sobre a composição celular dos micro-organismos (DEANS; RITCHIE, 1987, DORMAN; DEANS, 2000).

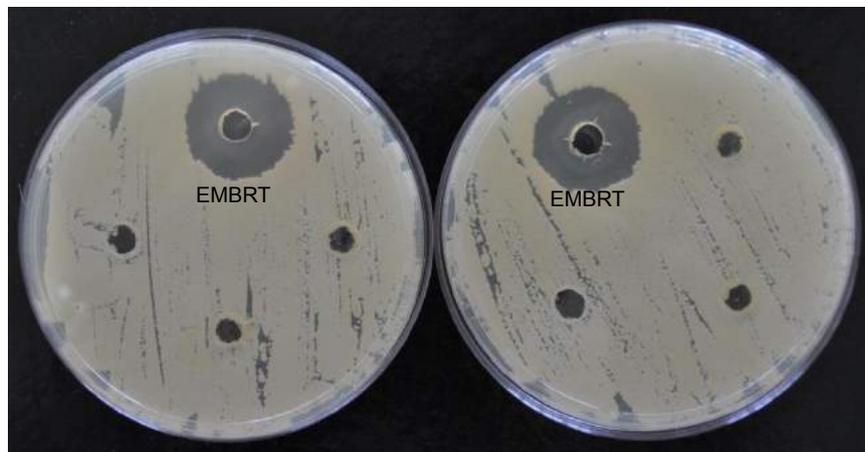
#### **4.4.3 Atividade antimicrobiana dos extratos brutos da raiz de *Socratea exorrhiza* contra o crescimento da levedura *Candida albicans*.**

Conforme os dados apresentados na tabela 9, observa-se que apenas os extratos metanólicos da parte externa da raiz e do broto da raiz foram ativos, com

alto poder de inibição, contra o crescimento da levedura *C. albicans*, com formação de halos de inibição de 18 e 25 mm de diâmetro, respectivamente (figura 28).

Estatisticamente o extrato metanólico do broto apresentou diferenças significativas positivas em relação ao controle e ao extrato metanólico da parte externa da raiz, mostrando eficiência na inibição do crescimento de *C. albicans* superior ao do controle Nistatina. Pode-se afirmar com este resultado que o maior poder de inibição de *C. albicans* está relacionado com alta polaridade dos extratos metanólicos.

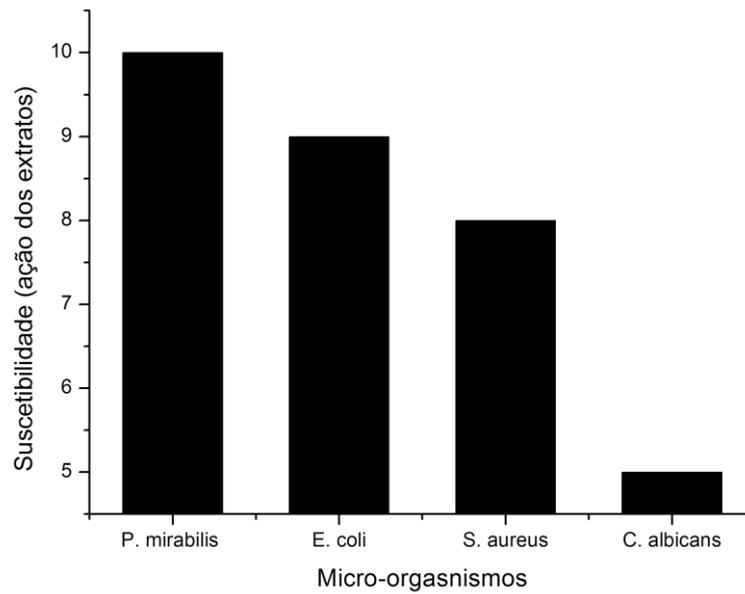
Figura 28 – Halos de inibição do crescimento de *Candida albicans*. Resultado da ação do extrato metanólico do broto da raiz de *Socratea exorrhiza* (EMBRT).



Nos estudos de Mohamed, Khalil e El-Beltagi (2010), o extrato metanólico de *H. thebaica* apresentou forte atividade antifúngica. O mesmo aconteceu com EMBRT que produziu halo de 25 mm frente à *C. albicans*.

Apesar do resultado positivo do extrato metanólico na inibição de *C. albicans*, esta levedura foi o micro-organismo mais resistente frente à ação dos extratos da raiz de *S. exorrhiza*, enquanto as bactérias Gram-negativas foram sensíveis à ação moderada da maioria dos extratos (figura 29).

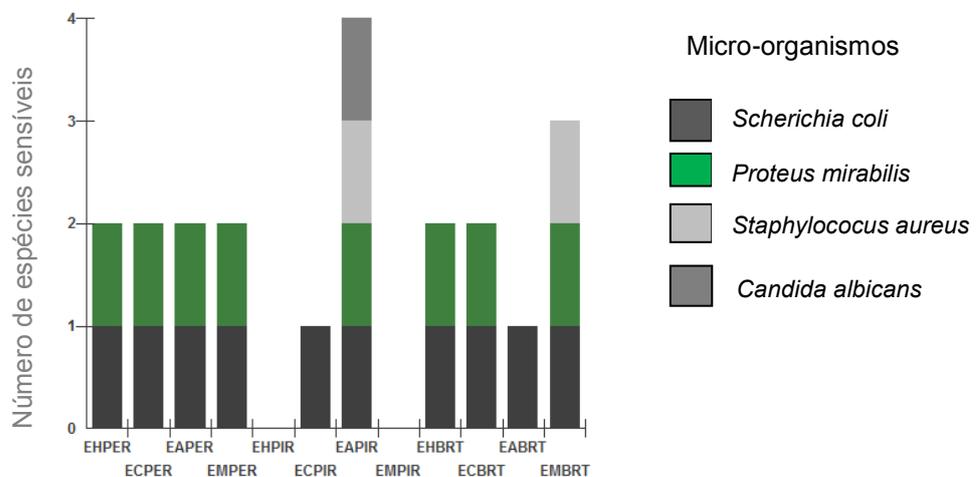
Figura 29 – Gráfico da suscetibilidade dos micro-organismos testados com extratos da raiz e do broto de *Socratea exorrhiza*.



#### 4.4.4 Espectro de ação dos extratos

A abrangência de ação dos extratos testados está representada na figura 30. Para esta análise considerou-se somente os extratos com atividade antimicrobiana moderada ou com alto poder de inibição na técnica de difusão em poço.

Figura 30 – Número de espécies microbianas sensíveis à ação dos extratos da raiz de *Socratea exorrhiza*.



CP (controle positivo); CN (controle negativo); E = extrato; H = hexano; A = acetato de etila; M = metanol; C = clorofórmio; PER = parte externa da raiz.

Analisando a figura 30 verifica-se que o extrato acetato de etila da PIR destacou-se quanto ao número de espécies microbianas sensíveis à sua ação, apresentando halos (> 10 mm e < 18 mm) na técnica de difusão em poço para as quatro espécies de micro-organismos testados; seguido pelo extrato metanólico BRT cuja ação dos constituintes inibiu o crescimento das duas espécies Gram-negativas e da levedura, com halos considerados de alto poder inibitório em *P. mirabilis* (22 mm) e em *C. albicans* (25 mm).

Os extratos (hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico) da parte externa da raiz (PER) apresentaram uniformidade na ação inibitória do crescimento dos micro-organismos, ou seja, cada extrato inibiu o crescimento de dois micro-organismos, sendo que os extratos EHPER e EMPER apresentaram atividade com alto poder inibitório (halo > 18 mm) contra *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente. Os extratos EHPIR, ECPIR e EMPIR foram considerados ineficientes na inibição do crescimento das cepas testadas.

Mais uma vez ressaltamos a falta de estudos de atividade biológica ou farmacológica de alguma parte de *S. exorrhiza*, dificultando a comparação dos resultados deste estudo em nível de gênero e espécie. Um trabalho pioneiro envolvendo a atividade antimicrobiana com a raiz e frutos da paxiuba foi realizado por Silva et al. (2002) e dando continuidade ao estudo com essa planta, Veras (2004) encontrou resultados semelhantes aos apresentados nesta pesquisa.

#### **4.4.5 Concentração Mínima Inibitória**

A concentração mínima inibitória foi determinada a partir da concentração inicial de 30 mg/mL dos extratos que obtiveram poder inibitório considerados moderado e forte nos testes de atividade antimicrobiana. Os extratos foram diluídos em DMSO, originando concentrações de 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL e 1 mg/mL.

Para este ensaio a técnica utilizada foi a de difusão em poço. Os resultados estão apresentados nas tabelas 10 e 11, que pela análise verifica-se que dos nove extratos testados, quatro apresentaram MIC moderada na concentração de 20 mg/ml contra *P. mirabilis*, *S. aureus* e *C. albicans*, com halos que variaram de 10 a 17 mm.

Tabela 10 – Resultado geral do teste para verificação da Concentração Mínima Inibitória de extratos da raiz de *Socratea exorrhiza* pela técnica de difusão em poço.

Extrato	Micro-organismos (halos em mm)															
	<i>E.coli</i>				<i>P. mirabilis</i>				<i>S. aureus</i>				<i>C. cândida</i>			
	[ ]mg/mL				[ ]mg/mL				[ ]mg/mL				[ ]mg/mL			
	20	10	5	1	20	10	5	1	20	10	5	1	20	10	5	1
EHPER	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0
ECPER	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
EAPER	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EMPER	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	9	0	0
EHBRT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ECBRT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EABRT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EMBRT	0	0	0	0	15	11	0	0	0	0	0	0	17	12	0	0
EAPIR	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

E = extrato; H = hexano; C = clorofórmio; A = acetato de etila; M = metanol; PER = parte externa da raiz; PIR = parte interna da raiz; BRT = broto da raiz.

Tabela 11 – Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos extratos da raiz de *Socratea exorrhiza*.

Extratos	MIC mg/mL – halo mm $\pm$ DP*	Micro-organismo
EHPER	20 – 12 $\pm$ 3,5	<i>S. aureus</i>
ECPER	10 – 10 $\pm$ 4,2	<i>S. aureus</i>
EAPER	**	-
EMPER	10 – 9 $\pm$ 0,2	<i>C.albicans</i>
EHPER	**	-
ECPIR	**	-
EAPIR	20 – 12 $\pm$ 2,1	<i>P. mirabilis</i>
EMPIR	**	-
EHBRT	**	-
ECBRT	**	-
EABRT	**	-
EMBRT	10 – 11 $\pm$ 2,0/10 – 12 $\pm$ 1,3	<i>P. mirabilis/C. albicans</i>
Controle positivo	10 -13/10 – 10 $\pm$ 0,3	<i>P. mirabilis ; S. aueus/ C. albicans</i>
Controle negativo	0	-

\*\* MIC = 30 mg/mL (concentração inicial testada na atividade antimicrobiana, cujos tamanhos dos são apresentados na tabela 9). E = extrato; H = hexano; C = clorofórmio; A = acetato de etila; M = metanol; PER = parte externa da raiz; PIR = parte interna da raiz; BRT = broto da raiz; \*DP= desvio padrão.

Como observa-se na tabela 11 os extratos clorofórmico e metanólico da parte externa da raiz tiveram ação inibitória na concentração de 10 mg/mL, sendo ECPER contra o crescimento de *S. aureus*, EMPER contra o crescimento de *C. albicans*.

Na concentração de 10 mg/mL o extrato metanólico do broto da raiz (EMBRT) foi ativo moderadamente contra *P. mirabilis* e *C. candida*, produzindo halos de 11 e 12 mm, respectivamente, aproximando-se da MIC dos controles.

O extrato hexânico da parte externa da raiz (EHPER) e o extrato de acetato de etila da parte interna da raiz (EAPIR) tiveram ação inibitória moderada na concentração de 20 mg/mL.

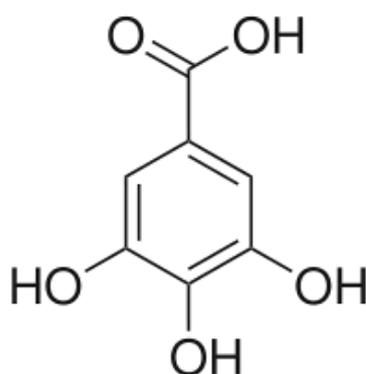
#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS E FLAVONOIDES

O teor de fenólicos e flavonoides foram determinados no extrato acetato de etila da parte externa da raiz (EAPER) e do broto da raiz (EABRT) mediante resultado positivo nos testes de atividade citotóxica e antioxidante.

##### 4.5.1 Teor de fenóis

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por método espectrofotométrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, que desencadeia a oxidação dos fenolatos, reduzindo os ácidos presentes na amostra a um complexo de cor azul. Para este ensaio utilizou-se como padrão o ácido gálico (figura 31).

Figura 31 – Ácido gálico



O ensaio foi realizado em triplicata, primeiramente, com soluções de diferentes concentrações de ácido gálico, após reação com Folin-Ciocalteu. As

absorbâncias destas soluções foram lidas a 798 nm. Os resultados deste ensaio encontram-se na tabela 12.

Tabela 12 – Absorbâncias e concentrações das soluções de ácido gálico, após reação com Folin-Ciocalteu no processo de quantificação de fenóis totais nos extratos acetato de etila da raiz e do broto da raiz de *Socratea exorrhiza*.

Volume pipetado (µL)	[ ] mg/mL	Absorbância (798 nm)			Absorbância (Média ± DP)
25	0,0007	0,068	0,086	0,075	0,076 ± 0,009
50	0,0013	0,157	0,161	0,146	0,155 ± 0,008
100	0,0026	0,292	0,305	0,303	0,300 ± 0,007
150	0,0039	0,474	0,470	0,490	0,478 ± 0,011
200	0,0052	0,652	0,648	0,649	0,650 ± 0,002
300	0,0078	0,952	0,959	0,938	0,950 ± 0,011

DP (Desvio padrão da média).

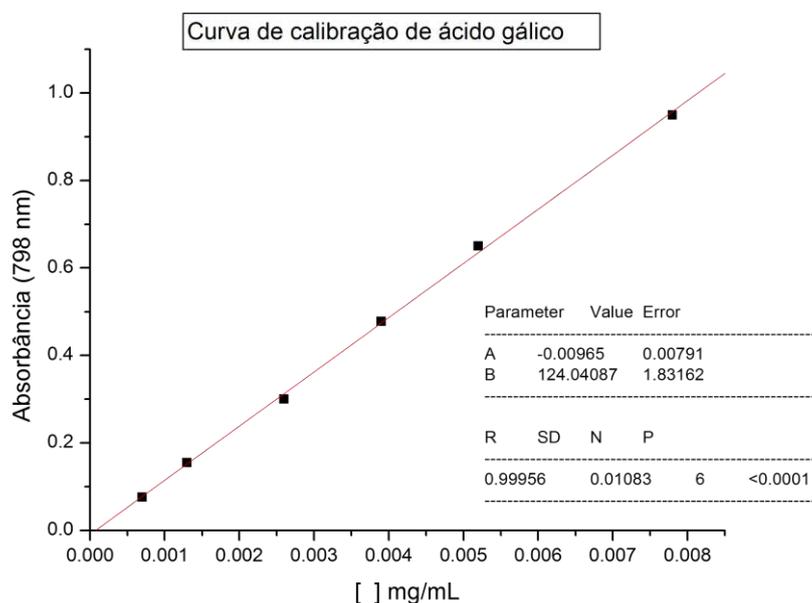
Em seguida o ensaio foi realizado com as soluções estoque (0,4 mg/mL) dos extratos da parte externa da raiz (EAPER) e do broto da raiz (EABRT) de *S. exorrhiza*. As absorbâncias foram lidas a 798 nm. Os resultados deste ensaio são apresentados na tabela 13.

Tabela 13 – Concentrações e absorbâncias das soluções estoque dos extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz de *Socratea exorrhiza*.

Amostra	[ ] solução estoque mg/mL	Absorbâncias 798 nm			Absorbância (Média ± DP)
EAPER	0,4	0,316	0,318	0,310	0,314 ± 0,004
EABRT	0,4	0,339	0,356	0,368	0,354 ± 0,146

As concentrações de fenóis totais nas amostras EAPER e EABRT, expressas em miligrama equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de extrato (g extrato), foram obtidas pela equação da reta, originada pela curva de calibração do ácido gálico (figura 32).

Figura 32 – Curva de calibração do ácido gálico



Os resultados das concentrações de fenóis nas amostras EAPER e EABRT, expressos em miligramas de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato (mg EAG/g extrato) são apresentados na tabela 14.

Tabela 14 – Teor de fenóis (mg EAG/g extrato) presentes nos extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz de *Socratea exorrhiza*.

Amostra	[ ] de fenóis (mg EAG*/g extrato)	Teor (%)
EAPER	65,0	6,5
EABRT	72,5	7,7

(\*) EAG = equivalente de ácido gálico

Observando os dados da tabela 13 verifica-se que a quantidade de fenóis totais presentes na amostra EABRT (72,5 mg EAG/ g extrato) é um pouco superior à quantidade destes compostos na amostra EAPER (65 mg EAG/ g extrato). Não há na literatura registros referentes ao teor de fenóis totais em extratos ou frações de alguma parte de *S. exorrhiza* e poucos são os trabalhos com outras espécies de *Arecaceae* envolvendo estas substâncias.

Souza et al. (2007) estudaram fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, sendo uma delas a palmeira carnaúba (*C. prunifera*), que obteve uma concentração de 250 mg EAG/ g extrato, ou seja, mais que o triplo das concentrações de EAPER e EABRT. Neste mesmo trabalho, o teor de fenóis totais presente na raiz de carnaúba apresentou correlação positiva com o IC<sub>50</sub> da atividade antioxidante desse extrato.

Nos estudos de Peres et al. (2011) os maiores teores de fenóis totais foram encontrados nas amostras provenientes da fração acetato de etila da casca da palmeira bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) que apresentou concentração de 304,32µg EAG/mg de extrato; os maiores potenciais antioxidantes foram observados nos extratos brutos e nas frações acetato de etila das amostras, corroborando com os resultados relacionados aos extratos EAPER e EABRT no teste de atividade antioxidante.

Evidências científicas permitem afirmar que a propriedade antioxidante dos vegetais se deve principalmente a seus compostos fenólicos. Estas substâncias contribuem para o sabor, odor e coloração de diversas plantas. De interesse farmacológico, tem sido apontada a atividade antimicrobiana e antiviral (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004).

#### **4.5.2 Teor de flavonoides**

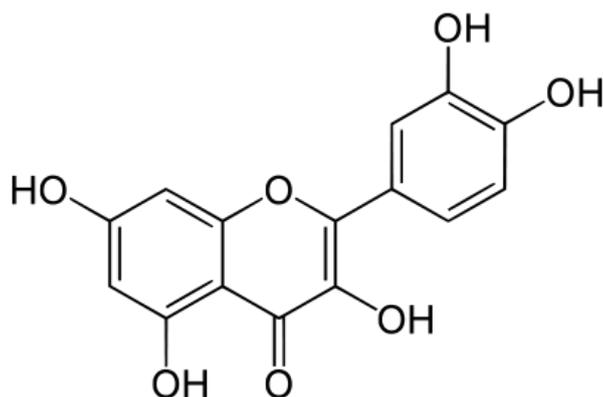
O teor de flavonoides totais foi determinado por meio do somatório dos resultados de dois métodos espectrofotométricos. Um deles utilizou como reagente cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), para determinar flavonas e flavonóis e o outro usando o reagente 2,4-dinitrofeniliidrazina (DNP), para determinar flavononas e diidroflavonóis (TYLKOWSKI et al., 2010).

##### **4.5.2.1 Flavonas e flavonóis**

O teor de flavonas e flavonóis foi determinado por método espectrofotométrico utilizando AlCl<sub>3</sub> que reage com as flavonas e flavonóis formando complexos estáveis com o cátion alumínio, a carbonila e a hidroxilas no flavonóide, produzindo mudança

de coloração do extrato (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006). Para este ensaio utilizou-se como padrão de referência a quercetina (figura 33).

Figura 33 – Quercetina



Os resultados deste ensaio encontram-se na tabela 15.

Tabela 15 – Absorbâncias e concentrações das soluções de quercetina, após reação com cloreto de alumínio, no processo de quantificação de flavonas e flavonóis nos extratos acetato de etila da raiz e do broto da raiz de *Socratea exorrhiza*.

Volume pipetado (µL)	[ ] mg/mL	Absorbância (798 nm)			Absorbância (Média ± DP)
40	0,0008	0,064	0,065	0,063	0,064 ± 0,001
60	0,0012	0,109	0,109	0,104	0,107 ± 0,003
120	0,0024	0,220	0,222	0,230	0,224 ± 0,005
140	0,0028	0,274	0,271	0,274	0,273 ± 0,001
160	0,0032	0,319	0,318	0,309	0,315 ± 0,005

DP (Desvio padrão da média).

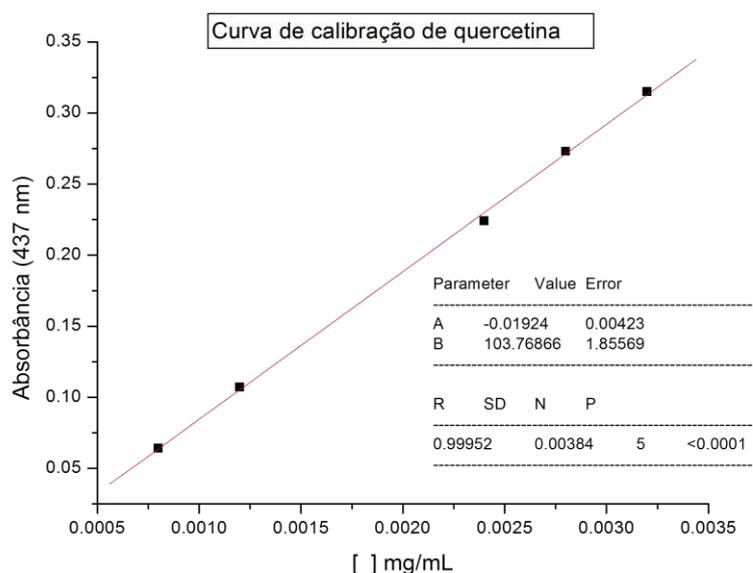
Em seguida o ensaio foi realizado com as soluções estoque (0,4 mg/mL) dos extratos da parte externa da raiz (EAPER) e do broto da raiz (EABRT) de *S. exorrhiza*. As absorbâncias foram lidas a 437 nm. Os resultados deste ensaio são apresentados na tabela 16.

Tabela 16 – Concentrações e absorvâncias das soluções estoque dos extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz de *Socratea exorrhiza*.

Amostra	[ ] solução estoque	Absorvâncias			Absorvância (Média ± DP )
	mg/mL	437 nm			
EAPER	0,4	0,119	0,122	0,120	0,120 ± 0,001
EABRT	0,4	0,251	0,249	0,248	0,249 ± 0,001

As concentrações de flavonas e flavonóis nas amostras EAPER e EABRT foram obtidas pela equação da reta, originada pela curva de calibração de quercetina (figura 34).

Figura 34 – Curva de calibração de quercetina



Os resultados das concentrações de flavonas e flavonóis nas amostras EAPER e EABRT, expressos em miligramas EQT (equivalentes de quercetina) por grama de extrato (mg EQT/g extrato) são apresentados na tabela 17.

Tabela 17 – Teor de flavonas e flavonóis (mg EQT/g extrato) presentes nos extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz de *Socratea exorrhiza*.

Amostra	[ ] de fenóis totais (mg EQT/g extrato)	Teor (%)
EAPER	8,38	0,8
EABRT	26,63	2,6

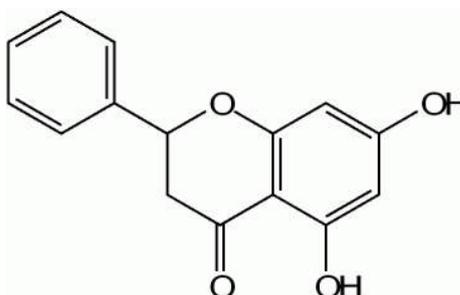
EQT = equivalente de quercetina

Observando os dados da tabela 16 verificou-se que a quantidade de flavonas e flavonóis presentes nas amostras EAPER (8,38 mg EQT/g extrato) e EABRT (mg EQT/g extrato) diferem significativamente entre si, porém expressam valores baixos.

#### 4.5.2.2 Flavononas e diidroflavonóis

O teor de flavanonas e diidroflavonóis foi determinado por método espectrofotométrico utilizando o reagente 2,4-dinitrofenil-idrazina (DNP) que reage com as carbonilas de cetonas e aldeídos formando 2,4-dinitrofenil-idrazona de cor vermelha (CHANG et al., 2002). Para este ensaio utilizou-se como padrão de referência a pinocembrina (figura 35).

Figura 35 – Pinocembrina



O ensaio foi realizado em triplicata. Primeiramente, com soluções de diferentes concentrações de pinocembrina, após reação com DNP. As absorvâncias destas soluções foram lidas a 493 nm. Os resultados deste ensaio encontram-se na tabela 18.

Tabela 18 – Absorbâncias e concentrações das soluções de pinocembrina, após reação com 2,4-dinitrofenil-idrazina (DNP), no processo de quantificação de flavanonas e diidroflavonóis nos extratos acetato de etila da raiz e do broto da raiz de *Socratea exorrhiza*.

Volume pipetado ( $\mu\text{L}$ )	[ ] mg/mL	Absorbância (798 nm)			Absorbância (Média $\pm$ DP )
25	0,0005	0,063	0,069	0,068	0,066 $\pm$ 0,003
75	0,0015	0,227	0,228	0,225	0,226 $\pm$ 0,001
100	0,0020	0,300	0,305	0,301	0,302 $\pm$ 0,002
150	0,0030	0,454	0,440	0,440	0,444 $\pm$ 0,008
200	0,0040	0,565	0,574	0,612	0,583 $\pm$ 0,024

DP (Desvio padrão da média).

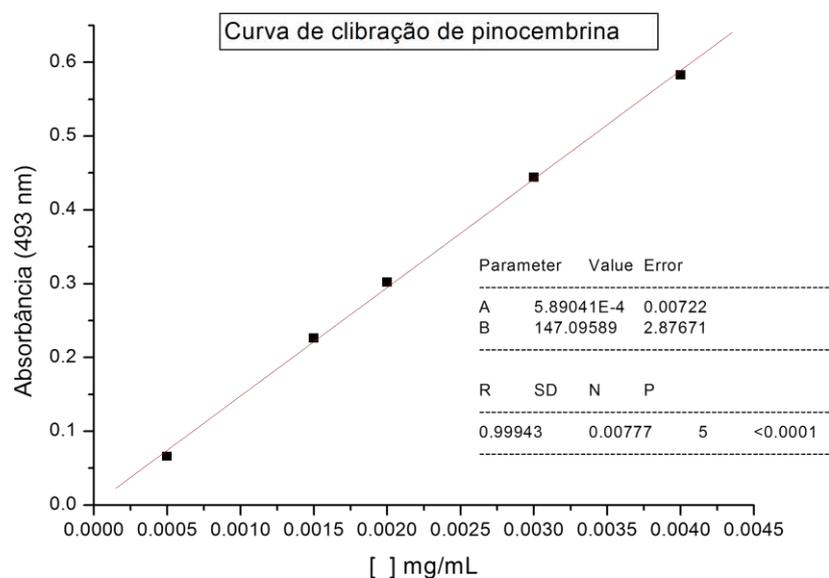
Em seguida o ensaio foi realizado com as soluções estoque (0,4 mg/mL) dos extratos da parte externa da raiz (EAPER) e do broto da raiz (EABRT) de *S. exorrhiza*. As absorbâncias foram lidas a 493 nm. Os resultados deste ensaio são apresentados na tabela 19.

Tabela 19 – Concentrações e absorbâncias das soluções estoque dos extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz de *Socratea exorrhiza*.

Amostra	[ ] solução estoque mg/mL	Absorbâncias 493 nm			Absorbância (Média $\pm$ DP )
EAPER	0,4	0,460	0,520	0,442	0,474 $\pm$ 0,040
EABRT	0,4	0,352	0,428	0,364	0,381 $\pm$ 0,040

As concentrações de flavanonas e diidroflavonóis nas amostras EAPER e EABRT foram obtidas pela equação da reta, originada pela curva de calibração de pinocembrina (figura 36), mediante dados apresentados na tabela 18.

Figura 36 – Curva de calibração de pinocebrina



Os resultados das concentrações de flavanonas e diidroflavonóis nas amostras EAPER e EABRT, expressos em miligramas EPN (equivalentes de pinocebrina) por grama de extrato (mg EPN/g extrato) são apresentados na tabela 20.

Tabela 20 – Teor de flavanonas e diidroflavonóis (mg EPN/g extrato) presentes nos extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz de *Socratea exorrhiza*.

Amostra	[ ] de flav+diidroflav. (mg EPN/g extrato)	Teor (%)
EAPER	762,0	76
EABRT	619,0	62

EPN = equivalente de pinocebrina; flav = flavononas; diidroflav = diidroflavonóis

Somando-se os valores do teor de flavonas e flavonóis (tabela 17) com os valores do teor de flavononas e diidroflavonóis (Tabela 20), obteve-se a quantidade de flavonoides totais presentes nos extratos de acetato de etila da parte externa da raiz (EAPER) e do broto da raiz (EABRT). Os valores são demonstrados na tabela 21.

Tabela 21 – Teor de flavonoides totais presentes nos extratos acetato de etila da parte externa da raiz (EAPER) e do broto da raiz (EABRT) de *Socratea exorrhiza*.

Amostra	[ ] flavonoides (mg/g extrato)	Teor (%)
EAPER	762,8	76,8
EABRT	645,6	64,66

Analisando os resultados obtidos neste trabalho pode-se afirmar que os teores de flavononas e diidroflavonóis foram muito mais elevados que os teores de flavonas e flavonóis, demonstrando a importância da realização dos dois métodos na quantificação de flavonoides totais.

Os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. A eles são atribuídas diversas funções na planta, a saber: i) proteção dos vegetais contra incidência de raios ultra-violeta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; ii) atração de animais com finalidade de polinização; iii) antioxidantes; iv) agentes alelopáticos e v) inibidores de enzimas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

O emprego terapêutico de plantas contendo flavonoides é vasto, porém ainda empírico. Pesquisas sugerem que alguns flavonoides são responsáveis por ação antitumoral considerável, além de agir como antivirais, anti-hemorragicos, hormonais, antimicrobianos e antioxidantes (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). O resultado positivo dos extratos acetato de etila nas atividades biológicas podem estar associados ao elevado teor de flavonoides presentes nas amostras.

A abundância relativa em quase todo o reino vegetal e a especificidade em algumas espécies aliada à sua relativa facilidade de identificação e estabilidade conferem aos flavonoides importante função como marcador taxonômico (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

Silva (2007) ao realizar uma revisão sobre a importância de flavonoides na taxonomia de monocotiledôneas informa que o kaempferol e a quercetina são encontrados em todas as famílias de monocotiledôneas, de modo que não podem ser utilizados como marcadores da família Arecaceae, ao contrário das flavonas sulfatadas que são encontradas principalmente nesta família.

Koolen et al. (2012) revelam em estudos com a raiz do buriti (*Mauritia flexuosa*) que juntamente com os triterpenos foram encontradas classes de compostos flavonoides como quercetina e rutina (AFANASEVA et al., 2001, NOLDER; SCHOTZ, 2002 GALOTTA et al., 2008).

Além das funções acima mencionadas, estes compostos acumulam-se nas plantas com a menor influência das variáveis ambientais (HARBORNE; WILLIAMS, 2000), o que pode explicar o elevado teor encontrado nos extratos acetato de etila da parte externa e do broto da raiz de *S. exorrhiza* neste trabalho, levando em consideração as condições climáticas do período de coleta.

## 6 CONCLUSÕES

Esta pesquisa evidenciou novo registro de ocorrência de *S. exorrhiza* para o estado de Roraima. Quanto ao rendimento dos extratos, o maior percentual de substâncias carregadas deu-se com os extratos obtidos com os solventes mais polares para as três partes da raiz de *S. exorrhiza*, sendo que os extratos acetato de etila da parte externa da raiz e do broto da raiz destacaram – se nos testes de atividade tóxica e antioxidante, considerando o extrato de acetato de etila do broto da raiz, o mais ativo para os dois testes.

O extrato acetato de etila da parte interna da raiz foi o mais eficiente no teste de atividade antimicrobiana, apresentando inibição moderada contra todos os micro-organismos testados, enquanto que os extratos hexânico e metanólico também da parte interna da raiz foram considerados ineficientes. Os extratos metanólicos da parte externa e do broto da raiz apresentaram alto poder inibitório contra o crescimento da levedura *C. albicans*. A ação positiva dos extratos da parte externa da raiz e do broto da raiz contra bactérias Gram-negativas corrobora com o conhecimento tradicional, que preconiza a utilização das raízes de *S. exorrhiza* na medicina popular para o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, o que torna ainda maior o valor dos resultados obtidos com estes extratos.

A bactéria Gram-negativa *P. mirabilis* foi a mais susceptível à ação dos extratos, seguida da *E. coli*, também Gram-negativa; enquanto que a levedura *C. albicans* foi o micro-organismo mais resistente. O extrato metanólico do broto da raiz de *S. exorrhiza* foi o que apresentou melhor eficiência na inibição de *P. mirabilis* e *C. albicans* com carga mínima de 10 mg/mL. Os extratos acetato de etila da parte externa e do broto da raiz apresentaram baixo teor de fenólicos totais. Os teores de flavanonas e diidroflavonóis foram muito mais elevados que os teores de flavonas e flavonóis, demonstrando a importância da realização dos dois métodos espectrofométricos na quantificação de flavonoides totais.

Não foram encontrados na literatura estudos relacionados ao potencial bioativo e teor de fenólicos e flavonoides totais envolvendo alguma parte de *S. exorrhiza*, classificando os resultados aqui apresentados como inéditos e importantes na ampliação do conhecimento sobre esta palmeira muito utilizada por caboclos e índios da região amazônica.

## REFERÊNCIAS

- AFANASEVA, I. B. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 61, [s. n.], p. 677-684, 2001.
- ALVES, C. Q. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 2202-2210, out. 2010.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, [s.l.], v.161, n. 1, p.105-121, 2009.
- AMAL, A. M.; ASHRAF, A. K.; EL-BELTAGI, H.E.S. Antioxidant and antimicrobial properties of kaff maryam (*Anastatica hierochuntica*) and doum palm (*Hyphaene thebaica*) **Grasas y Aceites**, [s.l.], v. 61. n. 1, p. 65-75, Jan./mar. 2010.
- AMARANTE, C. B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 41, n. 3, p. 431–434, 2011.
- ARUOMA, O. I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, [s. l.], v. 9, n. 20, p. 523-524, 2003.
- AYRES, M. C. C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, [s. l.], v.17, p.141-148, 2008.
- BARBOSA, R. I. Distribuição de chuvas em Roraima. In: **Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima**. Barbosa, R. I. (Org.). Manaus: INPA, 1997.
- BARBOSA, R. I.; LIMA, C. G. B. Notas sobre a diversidade de plantas e fitofisionomias em Roraima através do banco de dados do herbário INPA. **Amazônia: ciência & desenvolvimento**, Belém, v. 4, n. 7, jul./dez. 2008.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira Farmacognosia**, [s. l.], v.17, [s. n.], p.141-148, 2000.

BATRUSAITYTE, V. et al. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 101, [s. n.], p. 502-514, 2007.

BERETTA, G. et al. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of 26 spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 533, [s. n.], p.185-191, 2005.

BERTONCELJ, J. et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, [s. l.], v.105, [s. n.], p.822-828, 2007.

BIGLARI, F; ALKARKHI, A. F. M.; EASA, A. M. Cluster analysis of antioxidant compounds in dates (*Phoenix dactylifera*): Effect of long-term cold storage. **Food Chemistry**, [s. l.], v.112, n. 2009, p.998–1001, jun. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. **Agro Indústria Tropical**. Fortaleza – CE, jul./set., 2009.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. **Agro Indústria Tropical**. Fortaleza – CE, jan./mar. 2010.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), Coordenação Fundiária de Roraima, Projeto Fundiário Roraima, 1982. 31f. **Relatório Técnico**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº- 55 de 16 de dezembro de 2010**. Brasília: Anvisa, 2011.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório de Atividades 2011**. Brasília: Anvisa, 2012.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Projeto RADAMBRASIL**. Folha NA.20. Boa Vista e parte das folhas NA.21 Tumucumaque, NB.20 Roraima e NB.21; geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro, 1975. 428p.

BRASILEIRO, B. G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district, **Journal Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 42, [s. n.], p.195-202, 2006.

CAETANO, N. et al. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. **Revista Brasileira Farmacognosia**, [s. l.], v. 12, n.supl., p. 132-135, 2002.

CAI, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer **Life Sciences**, [s. l.] v. 74, n. 2004, p. 2157–2184, set. 2004.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, São Paulo: Tecmedd, 2004.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. SIMÕES, C. M.O. et al. (Org.) 5. ed. Florianópolis: Universitária, 2004.

CHANG, C – C. et al. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s. l.], v. 10, n. 3, p.178-182, mai. 2002.

CHECHINEL FILHO, N. et al. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* (alcachofra). **QUÍMICA NOVA**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

CHECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **QUÍMICA NOVA**, [s. l.], v. 21, n. 1, p.99-105, 1998.

CHOI, S. M.; et al. Screening of 5 alpha-reductase inhibition and comedolytic effects from natural products. **Yakhak-Hoeji**, [s. l.], v. 3, n. 43, p.342-350, 1999.

COSTA, E. M. M. de B., et al. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis* In vitro antimicrobial activity of plant extracts against *Enterococcus faecalis* **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.] v. 46, n. 3, p. 175-180, jun. 2010.

DELGADO, H.S.; SIFUENTES, T.C. **Plantas medicinales del Jardín Botánico IMETIPSS**. Iquitos: Instituto Peruano de Seguridad Social/Instituto de Medicina Tradicional, 1995. 85p.

DEWALT, S.J.; BOURDY, G.; MICHEL, L.R.C. de; QUENEVO, C. Ethnobotany of the Tacana: quantitative inventories of two permanent plots of northwestern Bolívia. **Economic Botany**, [s. l.], v. 53, n. 3, p.237-260, 1999.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESNNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, [s. l.], v.2, [s. n.], abr. 2012.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Mediciniais na Amazônia e Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002.

DUARTE M.C.T. et al. Anti-*Candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], [s.v], n.97, p.305-311, 2005.

DUKE, J.A.; VASQUEZ, R. **Amazonian ethnobotanical dictionary**. London: Boca Raton/Ann Arbor/CRC, 1994. 215p.

EMBRAPA. XAUD, H. A. M. et al. [Orgs.]. Potencial Madeireiro de Florestas Naturais do Campo Experimental Confiança (Embrapa Roraima), Município do Cantá, Roraima. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2005, 16p. (**Documentos 1**).

FATEN, M. A. E. Antioxidant and anticancer activities of doum fruit African extract (*Hyphaene thebaica*) **Journal of Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 3, n. 10, p. 197-201, out. 2009.

FERNÁNDEZ-DELGADO, M.; et. al. Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of venezuelan oysters **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v.49, n.6. p.355-359, nov./dez. 2007.

FERREIRA, G.; CASTRO, M. S.; BRIDI, R. Estudo exploratório da utilização de saw palmetto no tratamento da hiperplasia benigna da próstata por urologistas de Porto Alegre. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 18, n. 2, p.222-225, abr./jun. 2008.

FERREIRA, I. C. F. R. et al. Antioxidant activity of portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 114, [s. n.], p.1438-1443, 2009.

FONSECA, A. M. et al. Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. [s. l.], v. 19, n. 1, p.193-198, jan./mar. 2009.

FORZZA, R. C. et. al. (Org.) Instituto de pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil** [online]. Rio de Janeiro, v.1, [s. n.], 2010. 871 p.

FUNARI, C. S.; FERRO, O. V. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 15, n. 2, p.178-182, abr./jun. 2005.

FURNALETO, L. et al. Incidência e determinação do perfil da sensibilidade de cepas *Staphylococcus aureus* isolados da microbiota natural das fossas nasais e orofaringe de acadêmicos do curso de enfermagem. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, [s. l.], v. 23, n. 1, p.7-10, 2005.

GALOTTA, A. L. Q. de A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). **Química Nova**, [s. l.], v. 28, n. 4, p.610-613, 2005.

GALOTTA, A. L. Q. de A.; et al. Antioxidant and cytotoxic activities of 'açaí' (*Euterpe precatoria* Mart). **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.1427-1430, ago. 2008.

GIORDANO, R. B. et al. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (amaryllidaceae). **Química Nova**, [s. l.], v. 31, n. 8, p.2042-2046, nov. 2008.

GÓMEZ-CARAVACA, A.M. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, [s. n.], p.1220-1234, abr. 2006.

GOMPERTZ, O. F.; CORNEJO, L. Z. Criptococos e outras leveduras. In: ZAITZ, C.; et al. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1998.

HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological biochemistry**. 4. ed. London: Academic, 1993.

HARBORNE, B. J.; WILLIAMS, A. C. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 55, [s. n.], p. 481-504, 2000.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

HENDERSON, A.; SCARIOT, A. A flórua da reserve Ducke I: Palmae (Arecaceae). **Acta Amazônica**, [s. l.], v. 23, n. 4, p.349-369, 1993.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. **Boletim Agroclimático**. Maio, 2011. Disponível em < <http://www.inmet.gov.br/portal/boletimagroclimático> > Acesso em: 12 mar. 2012.

JOLY, C. A. et al. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista da USP**, São Paulo, [s. v.], n. 89, mar./maio. 2011.

KLEIN, T.; et al. Fitoterápicos: um mercado promissor **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [s. l.], v. 30, n. 3, p.241-248, 2009

KONEMAN, E. W. et al. **Koneman diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Tradução e revisão técnica: Eiler Fritsch. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOOLEN, H. H. F. et al. Triterpenes and flavonoids from the roots of *Mauritia fl exuosa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 22, n. 1, p.189-192, jan./fev. 2012.

LEE, K. K.; CHOI, J. D. The effects of *Areca catechu* L. extract on anti-inflammation and antimelanogenesis. **International Journal of Cosmetic Science**, [s. l.], v. 4, n. 21, p.275-284, 1999.

LEE, S. F. et al. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity **Life Sciences**, [s. l.], v. 73, n. 2, p.167–179, jan. 2003.

LEITÃO, S.G.; et al. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.] v. 16, [s. n.], p.6 -11, 2006.

LEWIS, C. E.; ZONA, S. A survey of cyanogenesis in palms (Arecaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.] v. 28, [s. n.], p.219-228, 2000.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, [s. l.], v. 325, n. 5937, p.161-165, jul. 2009.

LIMA, J. M. et al. Phytochemical Prospecting of *Sonchus oleraceus* and its toxicity to *Artemia salina*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 1, p. 7-11, 2009.

LORENZI, H. **Flora Brasileira: Arecaceae (palmeiras)**. São Paulo: Nova Odessa, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J.A., **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2.ed. São Paulo: Nova Odessa, 2008.

LUZ, F. J. F. Plantas medicinais de uso popular em Boa vista, Roraima, Brasil. **Horticultura Brasileira**, [s. l.] v. 19, n. 1, p.88-96, mar. 2001.

MACÍAS, F.A.; et al. Allelopathy: a natural alternative for weed Control. **Pest Management Science**, London, v. 63, n. 4, p.327-348, 2007.

MACLAUGHLIN, J. L.; SAIZARBITORIA, T. C.; ANDERSON, J. E. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales, **Revista de La Sociedad Venezolana de Química**, [s. l.], v. 18, n. 4, p.13-18, out./dez.1995.

MCLAUGHLIN JL, ROGERS LL, ANDERSON JE. **The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals**, Drug Information Journal, [s. l.], v. 32, [s. n.], p. 513-524, 1998

MAIA, C. N. Análise fitoquímica e atividade antibacteriana “*in vitro*” de extratos de plantas do Cerrado. 2008. 68p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros-MG.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: UFC, 1997.

MBOSSO, E. J. T.; et al. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Camerron. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 128, [s. n.], p.476-481, 2010.

MENSOR, L. et al. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, [s. l.] v. 15, [s. n.], p.127–130. fev. 2001.

MEYER, B. N.; et al. Brime shrimp a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal Medicinal Plants Research**, [s. l.], v. 45, [s. n.], p.45-31, 1982.

MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 15, [s. n.], p.316-320, 2005.

MIGUEL M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

MILLIKEN, W.; ALBERT, B. The use of medicinal plants by the Yanomami Indians of Brazil. **Economic Botany**, [s. l.], [s. v.], [s. n.], 1996.

MILLIKEN, W.; et al. **The ethnobotany of the Waimiri Atoari indians of Brazil**. Kew: Royal Botanic Garden, 1986.

MIRANDA, I. P. A.; et al. **Frutos de Palmeiras da Amazônia**. Manaus: INPA, 2001.

MOHAMED, A.; ASHRAF, A. K.; EL-BELTAGI. Antioxidant and antimicrobial properties of kaff maryam (*Anastatica hierochuntica*) and doum palm (*Hyphaene thebaica*) **Grasas y Aceites**, [s. l.], v. 61. n. 1, p. 65-75, Jan./ mar. 2010.

MONTÚFAR, R.; et al. *Oenocarpus bataua* Mart. (Arecaceae): Rediscovering a Source of High Oleic Vegetable Oil from Amazonia. **Journal of the America Oil Chemists' Society**, [s. l.], v. 87, [s. n.], p.167-172, nov. 2010.

MOURÃO JR. et al. Precipitação pluviométrica em áreas de transição savana-mata de Roraima: campos experimentais Serra da Prata e Confiança. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2003. 7p. (**Comunicado Técnico**).

NASCIMENTO, P. F. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 17, n. 1, p.108-113, 2007.

NOGUEIRA, R.C; CERQUEIRA, H.F; SOARES, M.B.P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [s. l.], v. 20, n. 2, p.1-13, 2010.

NOLDER, M.; SCHOTZ, K. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. **Planta Médica**, [s. l.], v. 68, [s. n.], p.577-580, 2002.

OLIVERO-VERBEL, J. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 568-574, ago./set. 2010.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v.18, n.2, p.301-307, 2008.

PENNA, A. et al. Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal. **Food Additive Contamination**, [s. l.], v.21, n.8, p.749-755, 2001.

PINTO, P. A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, [s. l.], v. 25, n. 1, p.45-61, 2002.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

PLOTKIN, M.J.; BALICK, M. Medicinal uses of South American palms. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 10, [s. n.], p.157-179, 1984.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RANILLA, L. G. et al. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource Technology**, [s. l.], v.101, n. 2010, p. 4676-4689, 2010.

ROBERTS, J. E.; SPEEDIE, M. R.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

ROCA, W.; et al. Tendências en el desarrollo de capacidades biotecnológicas e institucionales para el aprovechamiento de La biodiversidade en los países de la Comunidad Andina. **Relatório**. 270p. Peru, 2004.

ROCHA, A. E. S.; SILVA, M. F. F. Aspectos fitossociológicos, florísticos e etnobotânicos das palmeiras (Arecaceae) de floresta secundária no município de Bragança, PA, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, [s. l.], v. 19, n. 3, p.657-667, 2005.

RODRIGUES, C. D. N.; SALATINO, A. Hydrocarbons from epicuticular waxes of *Allagoptera* (Arecaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p.265-266, 2006.

RODRIGUES, E. et al. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], [s. v.], [s. n.], ago. 2010.

ROJAS G.; et al Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases, **Journal of Ethnopharmacology**. [s. l.], v. 74, n. 1, p.97-101, 2000.

RORAIMA. Decreto nº 12.816-E, de 5 de junho de 2011. Declara situação de anormalidade caracterizada como Estado de Calamidade Pública no Estado de Roraima, afetados por inundações e alagamentos e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado de Roraima**. Boa Vista-RR, 2011.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico**, Fortaleza, jul. 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C. methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**. [s. l.], v. 8, [s. n.], p.121-137, 2002.

SANT'ANA, P. J. P. **Bioprospecção no Brasil: Contribuição para uma gestão ética**. Brasília: Paralelo 15, 2002.

SANTOS, F. V.; POZETTI, G. L., VARANDA, E. A. Avaliação da mutagenicidade do extrato alcoólico de *Orbignia phalerata*. **Planta médica**, Botucatu, v. 8, n. 4, p.156-168, out. 2006.

SEQUEIRA, J. B. et al. Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: sucuba). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104. [s. n.], p. 659-661, 2009.

SERRA, M.C.C. **As propriedades antioxidantes do mel**. O apicultor. Disponível em <<http://www.oapicultor.com/artigos/Propriedades%20anti%20Oxidante.pdf>>. Acesso em: 23 dez. 2011.

SILVA, A. de J. R. da; Estudo da atividade antimicrobiana de *Socratea exorrhiza* (Martius) H. Wendland., In: Congresso Nacional de Botânica, 53, 2002. Recife. **Anais...** Recife, Sociedade Botânica do Brasil, UFPE, 2002. p.135.

SILVA, A.G. A importância de flavonóides na taxonomia de Monocotiledôneas. **Natureza on line**, [s. l.], v. 5, n. 1, p.44-47, 2007.

SILVEIRA, C.S. et al. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 15 n. 2, p.143-148, abr./jun. 2005.

SILVEIRA, L. M. da SILVA. et al. Antimicrobial activity methodologies applied to plants extracts: comparison between two agar diffusion techniques **Revista Brasileira de farmacognosia**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SIPAM. Sistema de Proteção da Amazônia. **Boletim Climático da Amazônia**. Brasília, v. 8, n. 80, jun. 2011.

SIQUEIRA, J. M. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach, **QUÍMICA NOVA**, [s. l.], v. 2, n. 5, jan.1998.

SOCHA, R. et al. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. **Food Chemistry**, [s. l.], v.113, [s. n.], p.568-574, 2009.

SOSNOWSKA, J; BALSLEV, H. American palm ethnomedicine: A meta-analysis. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, [s. l.], v. 5, n. 43, p. 1-11, dez. 2009.

SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 2, p.351-355, 2007.

SUZUKI, M.; et al. Pharmacological effects of saw palmetto extract in the lower urinary tract. **Acta Pharmacológica Sinica**, [s.l], v.30, n.3, p.271–281, mar. 2009.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, jan./dez. 2003.

TYLKOWSKI, B. et al. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, [s. l.], v. 48, [s. n.], p.124–130, nov. 2010.

VALILLO, M. I. et al. Composição química da sementes de *Archontophoenix alexandrae* H. Wendland e Drude (Arecaceae). **Revista Árvore**, [s. l], v. 28, n. 5, p.676-679, 2004.

VASCONCELOS, M. S. L.; et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 5, p.1323-1338, 2007.

VERAS, E. de O. **Análise do potencial bioativo de extratos brutos da raiz de Arecaceae contra leveduras e bactérias patogênicas**. 2004. 45p. Monografia (Especialização em Recursos Naturais) - Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais/PRONAT-UFRR. Boa Vista/RR, 2004.

VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. Engenharia do metabolismo de Plantas Medicinais. In: **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. YUNES R.A; CALIXTO, J. B. (Org.). Chapecó: UNOESC, [s. l.], v. 1, [s. n.], p. 381-432, 2001.

VILHENA, R. C. Q. de; LINS, A.; LUNA, M. de S. Estudo Anatômico, morfológico e o crescimento das raízes adventícias de *Iriatea exorrhiza* Mart. (Palm), “Paxiúba”. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, Belém, v. 1, n. 1/2, p. 87-109, ago. 1984.

VON BAUM, H.; MARRE, R.. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 295, [s. n.], p. 503-511, 2005.

XAUD, H. A. M. et al. Potencial Madeireiro de Florestas Naturais do Campo Experimental Confiança (Embrapa Roraima), Município do Cantá, Roraima. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2005, 16p. (**Documentos 1**).

YÁÑEZ, M. A.; VALOR, C.; CATALÁN, V.. A simple cost-effective method for the quantification of total coliforms and *Escherichia coli* in potable water. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 65, n. 3, p. 608-611, 2006.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001.

ZAMPINNI, I. C.; et al. Antimicrobial activity of selected plant from “the Argentine Puna” against sensitive and multi-resistant bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 124, n. 3, p.499-505, maio. 2009.

ZANETTI, S.; et al. Evaluation of the antimicrobial properties of the essential oil of *Myrtus communis* L. against clinical strains of *Mycobacterium spp.* **Hindawi Publishing Corporation**, [s.l.], [s. v.], [s. n.], p.1-3. abr. 2010.

Zhang, Z., et al. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovii*. **Planta Médica**, [s. l.], v. 68, n. 1, p.49–54, jan. 2002.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). Florianópolis: Universitária, 2004.