

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

“*SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI: ESTUDO ANATÔMICO E
HISTOQUÍMICO DAS FOLHAS E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL
FARMACÊUTICO DO EXTRATO ETANÓLICO E SUAS FRAÇÕES”.

ADEMIR SALVI JÚNIOR
FARMACÊUTICO INDUSTRIAL



ARARAQUARA - SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

“*SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI: ESTUDO ANATÔMICO E
HISTOQUÍMICO DAS FOLHAS E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL
FARMACÊUTICO DO EXTRATO ETANÓLICO E SUAS FRAÇÕES”.

ADEMIR SALVI JÚNIOR
FARMACÊUTICO INDUSTRIAL

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA - SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S184s Salvi Júnior, Ademir
 Schinus terebinthifolius Raddi: estudo anatômico e histoquímico das
folhas e investigação do potencial farmacêutico do extrato etanólico e suas
frações / Ademir Salvi Júnior. - Araraquara, 2009.
81 f.

 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Fármacos e Medicamentos
Orientador: Luis Vitor Silva do Sacramento

 1. *Schinus*. 2. Aroeira-vermelha. 3. Análise histoquímica. 4. Avaliação
farmacognóstica. 5. Atividade antibacteriana. I. Sacramento, Luis Vitor Silva
do, orientador. II. Título.

CAPES: 4030005

Dedicatória

“O mestre que caminha à sombra do templo rodeado de discípulos, não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e de sua ternura. Se ele for verdadeiramente sábio, não te convidará a entrar na mansão de seu saber, mas antes o conduzirá ao limiar de tua própria mente”

(Gibran Khalil Gibran)

Dedico todo o meu trabalho, seu prestígio e honra, aos que são a essência de minha vida.

A Deus, Nosso Senhor, pelo dom da vida e sublime presença em meu ser, pelo privilégio concedido e pela graça de permitir a conclusão deste trabalho.

À Nossa Senhora Aparecida, pela singular proteção, poderosa intercessão e graças. Consagro à sua santidade o meu entendimento.

À minha família, meu pai Ademir, minha mãe Terezinha e meu irmão Adriano, enquanto pessoas igualmente belas e admiráveis em essência, por constituírem estímulos e atitudes que bem influenciaram minha pessoa impulsionando-me a buscar vida a cada momento. Guardo-lhes o mais profundo agradecimento por terem aceito a privação da minha companhia em função dos estudos, concedendo-me a oportunidade de me realizar ainda mais.

À minha avó e madrinha, Leonora, pelas orações a mim oferecidas durante toda essa caminhada, pelos seus “docinhos de pinga”, sua alegria, seu carinho e afeto.

À minha noiva Carolina, que com palavras não consigo descrever o quanto significa para mim. Você, meu amor, minha vida, meu tudo, meu nada, que está ao meu lado em todas as horas, que me compreende, que me faz sorrir, me faz feliz, me faz amar e sentir-me amado. Você é mais do que uma paixão, encanta pela elegante simplicidade, requintada gentileza e nobreza transbordante. Obrigado pelo seu respeito e amor, por existir e estar comigo.

Agradecimentos

"Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só nem nos deixa só. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas há os que não levam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossa vida, e a prova de que duas almas não se encontram ao acaso"

(Antoine de Saint-Exupéry)

A realização deste trabalho não é mérito individual, mas resultado da contribuição de inúmeras pessoas que participaram direta ou indiretamente para o seu desenvolvimento. Agradecer é sempre necessário e também, é um ato honrado de gratidão.

Ao meu Orientador, Prof. Luis Vitor Silva do Sacramento, pela orientação incondicional. Quando poderia ser simplesmente orientador, foi mestre, transmitindo-me seus conhecimentos e experiências, mostrando o seu profissionalismo e, com isso revelando o seu lado humanista. Quando poderia ser mestre, foi amigo, e em sua amizade entendeu-me ajudando e incentivando a seguir pelos caminhos da vida, das luzes, rumo à satisfação plena dos ideais humanos e profissionais. Expresso os meus maiores agradecimentos e o meu profundo respeito, que serão sempre poucos diante do muito que me foi ofertado.

À Profa. Dra. Tais Maria Bauab, pelo papel fundamental de sua “co-orientação”, se assim posso dizer; por instruir e repartir comigo os seus conhecimentos, colocando em minhas mãos ferramentas “novas” com as quais, como asas, me abriram novos horizontes.

A todos os Professores que fizeram do magistério um ideal, mesclando a arte de ensinar com o dom da convivência, tornando-se meus amigos e transmitindo suas experiências que muito ajudaram na minha formação.

Aos técnicos e amigos dos laboratórios de Botânica, Microbiologia e Química Orgânica da Unesp, Campus de Araraquara, que participaram das atividades desenvolvidas neste trabalho.

Aos Professores que participaram do Exame de Qualificação, Dra. Isabele Rodrigues Nascimento, Dra. Tais Maria Bauab e Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, pelos relevantes apontamentos e preparação para a defesa dessa dissertação.

Aos Professores que participaram da Comissão Examinadora de Defesa, Dr. Norberto Peporine Lopes, Dra. Hérica Regina Nunes Salgado e Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, pelas críticas construtivas e importantes sugestões auferidas à finalização do trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, à Seção de Pós-graduação, ao Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, ao Departamento de Fármacos e Medicamentos, seus professores e servidores, ressaltando o apoio do servidor Luiz Eduardo

dos Santos (Dudu) do Laboratório de Farmacognosia, pela seriedade, trabalho e empenho em suas atribuições.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Botânica, em especial a Angélica Barretto (Teka) por todos os momentos vividos neste tempo, pela amizade, cumplicidade, carinho e afeto.

Aos amigos que fiz nesta etapa de minha vida, quero agradecer a todos por estarem sempre comigo, dando-me força e incentivo. Por dizerem algumas vezes, o que eu realmente precisava ouvir, em lugar do que eu gostaria que dissessem, e por ter me mostrado um outro lado a considerar, nos momentos difíceis. Por compartilhar tantas coisas boas, criando várias lembranças. Ter um amigo é algo especial, ter vários é sensacional, mas ser amigo de alguém é ainda melhor.

“Escolhe um trabalho de que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida”

(Confúcio)

A Escola de Enfermagem “Maurício de Medeiros”, pela oportunidade de trabalho ao conceder minha primeira experiência profissional em docência e pela confiança depositada. Agradeço à Direção da Escola, a todos os seus funcionários, professores e alunos pelo apoio, aprendizado e amizade que me ofereceram.

A UniPinhal (Fundação Pinhalense de Ensino) pela confiança e reconhecimento profissional.

Epígrafe

Nascemos para manifestar a glória do universo que está dentro de nós. Não está apenas em um de nós: está em todos nós. E conforme deixamos nossa própria luz brilhar, inconscientemente damos às outras pessoas permissão para fazer o mesmo.

A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.

Nelson Rolihlahla Mandela

SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUÇÃO	3
4. OBJETIVOS	5
 CAPÍTULO I - <i>SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS</i> RADDI	 6
1. Introdução	6
1.1. Classificação taxonômica e sistemática	6
1.2. Aspectos botânicos	8
1.3. Aspectos fitoquímicos	10
1.4. Aspectos etnobotânicos e farmacológicos	11
 CAPÍTULO II - ESTUDO ANATÔMICO E HISTOQUÍMICO DAS FOLHAS .	 14
1. Introdução	14
2. Metodologia	15
2.1. Material botânico	15
2.2. Estudo anatômico	15
2.3. Estudo histoquímico	16
3. Resultados e discussão	17
3.1. Estudo anatômico	17
3.2. Estudo histoquímico	21
4. Conclusão	24
 CAPÍTULO III - CONTROLE DE QUALIDADE DA DROGA VEGETAL	 25
1. Introdução	25
1.1. Estabelecimento dos parâmetros da qualidade	26
2. Metodologia	27
2.1. Processamento pós-colheita para a obtenção da droga vegetal	27
2.2. Determinação do resíduo sólido do vegetal fresco	28
2.3. Obtenção da droga vegetal pulverizada	28
2.4. Caracterização físico-química da droga vegetal pulverizada originada das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	28
2.4.1. Amostragem	28
2.4.2. Determinação da granulometria da droga vegetal pulverizada	29
2.4.3. Estudo e determinação do tamanho médio das partículas	29
2.4.4. Determinação da densidade	29
2.4.5. Determinação de água pela perda por dessecação	30
2.4.6. Determinação do pH	30
2.4.6.1. Determinação potenciométrica do pH	30
2.4.6.2. Determinação colorimétrica do pH	31
2.4.7. Determinação de cinzas totais	31
2.4.8. Determinação de cinzas insolúveis em ácido	31
2.4.9. Determinação de extrativos no extrato alcoólico	32
2.4.10. Determinação do resíduo insolúvel no álcool	32
3. Resultados e discussão	32
3.1. Processamento pós-colheita para a obtenção da droga vegetal	32
3.2. Obtenção da droga vegetal pulverizada	33
3.3. Caracterização físico-química da droga vegetal pulverizada originada das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	33

4. Conclusão	39
CAPÍTULO IV - ESTUDO FITOQUÍMICO	41
1. Introdução	41
1.1. Análise fitoquímica preliminar	42
1.2. Processo extrativo: considerações gerais	43
1.3. Fracionamento por partição	43
1.4. Cromatografia em camada delgada	44
2. Metodologia	44
2.1 Triagem fitoquímica preliminar	44
2.2. Obtenção do extrato etanólico	45
2.3. Fracionamento do extrato vegetal	46
2.4. Perfil cromatográfico	46
3. Resultados e discussão	46
4. Conclusão	50
CAPÍTULO V - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	51
1. Introdução	51
1.1. Pesquisa da atividade biológica	51
1.2. Estudo antibacteriano	52
2. Metodologia	53
2.1. Extratos vegetais	53
2.2. Amostras bacterianas	54
2.3. Estocagem e manutenção das cepas	54
2.4. Espectro de absorção do extrato etanólico e frações do extrato vegetal	54
2.5. Padronização da suspensão bacteriana	54
2.6. Preparo do extrato etanólico e frações do extrato vegetal	55
2.7. Determinação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em microplacas	55
2.7.1. Método de diluição em microplacas	55
2.7.1.1. Leitura espectrofotométrica das microplacas	56
2.7.1.2. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) a partir do método de diluição em microplacas	57
2.7.1.3. Leitura das microplacas utilizando resazurina como revelador	57
3. Resultados e discussão	57
3.1. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas com leitura espectrofotométrica	57
3.2. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas utilizando resazurina como revelador	60
3.3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) das amostras vegetais que apresentaram atividade antibacteriana	63
4. Conclusão	64
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	67

1. RESUMO

SALVI JUNIOR, A. “*Schinus terebinthifolius* Raddi: estudo anatômico e histoquímico das folhas e investigação do potencial farmacêutico do extrato etanólico e suas frações”. Araraquara, 2009. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

Schinus terebinthifolius Raddi, pertence à família Anacardiaceae, é popularmente denominada como aroeira-vermelha. Trata-se de uma espécie nativa da América do Sul, especialmente do Brasil, Paraguai e Argentina. No Brasil ocorre ao longo da Mata Atlântica desde o nordeste até o sul do país. Consta oficialmente na primeira edição da Farmacopeia Brasileira, a qual designa as cascas do tronco como seu farmacógeno, embora estudos revelem que folhas e frutos também podem ser utilizados como fonte de substâncias ativas e, devido a este fato, desperta um grande interesse para a pesquisa. Na literatura é citada como cicatrizante, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana. Este trabalho teve como objetivos: descrever a anatomia da região mediana de folíolos de *Schinus terebinthifolius*; realizar testes histoquímicos nas folhas da espécie com fins de caracterização preliminar de constituintes químicos de interesse; realizar o estudo granulométrico da droga vegetal pulverizada proveniente do processo de moagem de folhas de *S. terebinthifolius*; estabelecer a caracterização físico-química da droga vegetal; realizar a análise fitoquímica preliminar do extrato e frações obtidas; e, avaliar a atividade antimicrobiana do extrato e das frações utilizando-se a técnica de microdiluição em placas. Os resultados da anatomia revelaram as formas das estruturas celulares das folhas e os tipos de inclusões celulares presentes; na análise histoquímica e triagem fitoquímica identificou-se a presença de grupamentos fenólicos, flavonoides e taninos, terpenoides e saponinas de interesse farmacológico; na caracterização físico-química destacou-se importantes informações para o estabelecimento dos parâmetros referentes ao controle da qualidade da droga; na atividade antibacteriana, o extrato e suas frações, mostraram-se efetivos frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em função dos resultados encontrados, pode-se concluir que as folhas da aroeira-vermelha apresentam metabólitos ativos com potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos.

Palavras-chave: *Schinus*, aroeira-vermelha, análise histoquímica, avaliação farmacognóstica, atividade antibacteriana.

2. ABSTRACT

SALVI JUNIOR, A. **“*Schinus terebinthifolius* Raddi: anatomical and histochemical study of the leaves and research of pharmaceutical potential of the ethanolic extract and its fractions”**. Araraquara, 2009. (Master in Pharmaceutical Sciences) Univ. Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

Schinus terebinthifolius Raddi, belongs to the Anacardiaceae family, is popularly known as Brazilian pepper. It is native from South America, especially Brazil, Paraguay and Argentina. In Brazil it occurs along the Atlantic Forest from the northeast to the south. Officially listed in the first edition of the Brazilian Pharmacopoeia, which means the bark of the trunk as its pharmacogens, although studies show that fruits and leaves can also be used as a source of active substances, and due to this fact, arouses a great interest for search. The literature cited as healing, anti-inflammatory, antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. This study aimed to describe the anatomy of the middle region of leaves of *Schinus terebinthifolius*; perform tests histochemical in leaflets of the species for purposes of preliminary characterization of chemical constituents of interest; perform the study granulometric to the sprayed drug plant from the process of grinding the leaves of *S. terebinthifolius*; establish the physical-chemical characterization of the drug plant; perform the preliminary phytochemical analysis of extract and fractions obtained; and, to evaluate the antimicrobial activity of the extract and the fractions using the microdilution plates. The results of the anatomy revealed the forms of cellular structures of the leaves and the types of cellular inclusions present; the histochemical analysis and phytochemical screening could identified the presence of phenolic groups, flavonoids and tannins, terpenoids and saponins of pharmacological interest; in physical-chemical characterization to be detached important information for the establishment of the parameters concerning to quality control of drug; of the antibacterial activity, the extract and the fractions were shown to be effective against the *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.. Given these results, it can be concluded that the leaves of Brazilian pepper shows of active metabolites with potential for the development of a herbal medicine.

Keywords: *Schinus*, Brazilian pepper, histochemical analyses, pharmacognostic assessment, antibacterial activity.

3. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais como recurso terapêutico é tão antiga quanto à civilização humana e, por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais constituíram o arsenal terapêutico (EISENBERG et al., 1998). Além disso, pelo seu paralelo com o desenvolvimento da cultura humana, foi e ainda é acompanhada por significados mágico-religiosos e visões peculiares de saúde e doença (RATES, 2001).

A utilização de plantas medicinais vem atingindo um público cada vez maior. O retorno à medicina natural ou tradicional requer um posicionamento muito firme dos meios acadêmicos. É fato preocupante, o uso indiscriminado de plantas medicinais sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico. Isto vem acontecendo com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população (BALLVÉ et al., 1995). A fitoterapia existe principalmente no mercado informal, o que representa grande perigo à saúde da população (BENDAZZOLI, 2000).

A identificação correta das espécies, sua forma de uso, controle de qualidade e mecanismo de ação, também constituem questões a serem resolvidas. A identificação dos vegetais proporciona aos laboratórios especializados (ervanários, farmácias de manipulação, indústrias de fitoterápicos, estabelecimentos de ensino farmacêutico) condições para efetuarem sua preparação, comercialização ou estudo, com segurança alicerçada em conhecimento científico (BALLVÉ et al., 1995).

O uso de plantas medicinais, especialmente na América do Sul, contribui significativamente para os cuidados básicos com a saúde. Para o tratamento de infecções comuns, muitas plantas são utilizadas no Brasil na forma de extrato bruto, infusões ou emplastros, sem nenhuma evidência científica de sua eficácia (PESSINI et al., 2003). Existem casos em que as preparações utilizando o extrato bruto são mais eficazes do que aquelas preparadas com quaisquer de seus princípios ativos isolados (MATOS, 2000).

Inegavelmente, as plantas medicinais e os fitoterápicos apresentam papel importante na saúde das pessoas, pois cerca de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são de origem vegetal (OMS, 1991; RATES, 2001).

Segundo a OMS, plantas medicinais são todas aquelas silvestres ou cultivadas, utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar ou modificar processos fisiológicos, patológicos ou não, ou ainda empregadas como fonte de fármacos ou de seus precursores/derivados. Os fitoterápicos são produtos medicinais acabados e etiquetados, cujos componentes ativos são moléculas obtidas da extração de drogas vegetais (partes aéreas ou

subterrâneas de plantas, ou outro material vegetal, ou combinações destes, em estado bruto ou em formas de preparações vegetais) (OMS, 2000; RATES, 2001).

O conhecimento sobre as plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As primitivas civilizações cedo se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo. Toda essa informação foi sendo, de início, transmitida oralmente às gerações posteriores, para depois, com o aparecimento da escrita, passar a ser compilada e guardada como um tesouro precioso (CUNHA, 2005).

O Brasil possui uma das maiores diversidades vegetais do mundo e inúmeras experiências vinculadas ao conhecimento popular das plantas medicinais e tecnologia para correlacionar o saber popular e científico (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006; SANTOS et al., 2009).

Com o propósito de se obter as informações necessárias sobre plantas para fins medicinais, etnofarmacognostas estão atualmente empenhados nesses estudos devido ao risco eminente da perda total de tais conhecimentos empíricos, considerando-se o que está acontecendo em diversas regiões do globo, onde a rápida mudança do modo de vida de sociedades está provocando o desaparecimento da sua medicina popular, que se apoia, quase sempre, em floras muito importantes. Enquadradas nesta problemática, há um esforço sistemático para o estudo de espécies empregadas na medicina popular (CUNHA, 2005).

Há sistemas terapêuticos, de importância mundial, que empregam plantas no tratamento das doenças (CUNHA, 2005). Em casos específicos, a aplicação dependerá diretamente da concentração e composição química de metabólitos secundários presentes, os quais podem variar significativamente seu perfil em função de fatores como estado fitoquímico, fatores geográficos (localização), ecológicos (habitat), variabilidade genética (expressa pelos quimiotipos), processo de extração empregado, entre outros (BANDONI, 2000; MOURA et al., 2007).

Os flavonoides, taninos e óleos essenciais, metabólitos secundários presentes na *S. terebinthifolius*, mostram-se de grande valia, destacando-se com aplicação nas indústrias de medicamentos, cosméticos e perfumaria, indústrias de alimentos (como flavorizantes, antioxidantes e corantes de alimentos e bebidas) e indústrias de curtimento de couro (LAWRENCE, 1984; QUEIRES e RODRIGUES, 1998; ALLARDICE et al., 1999; TOSS et al., 2008).

4. OBJETIVOS

Os objetivos foram traçados para fornecer informações úteis para a identificação de *Schinus terebinthifolius*, bem como propor parâmetros de controle de qualidade da droga vegetal originada de folhas e, ainda, avaliar o potencial antibacteriano da espécie. Para atingi-los foi possível:

- Descrever a anatomia da região mediana de folíolos de *Schinus terebinthifolius*;
- Realizar testes histoquímicos nas folhas da espécie com fins de caracterização preliminar de constituintes químicos de interesse;
- Realizar o estudo granulométrico da droga vegetal pulverizada proveniente do processo de moagem de folhas de *S. terebinthifolius*;
- Estabelecer a caracterização físico-química da droga vegetal;
- Realizar a análise fitoquímica preliminar do extrato e frações obtidas;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato e das frações utilizando-se a técnica de microdiluição em placas.

CAPÍTULO I

SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI

1. Introdução

Muito conhecida dos brasileiros por suas potencialidades medicinais - e por isso também rica em denominações populares - a aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) pertence à família Anacardiaceae e é popularmente denominada como aroeira-vermelha. Nativa da América do Sul, ocorre no Brasil em regiões de Mata Atlântica, remanescentes ou reflorestadas, desde o Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul. Consta na primeira edição da Farmacopeia Brasileira, a qual designa as cascas do troco como seu farmacógeno. No entanto, suas folhas têm despertado interesses farmacológicos como fonte de princípios ativos. Na etnobotânica e em resultados de ensaios farmacológicos é citada como cicatrizante, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana. Figueiredo (2009) aponta que na década de 60, Geraldo Vandré fez uma citação à árvore nos versos de uma canção considerada subversiva, denominada Arrueira, que constou nas listas dos censores do governo ditatorial como uma provocação e estímulo contra o regime militar de então.

“Madeira de dar em doido vai descer até quebrar
É a volta do cipó de aroeira no lombo de quem mandou dar”
(Arrueira - Geraldo Vandré)

1.1. Classificação taxonômica e sistemática

Ao publicar, em 1673, a “*Histoire General des Drogues*” o farmacêutico Pierre Pomet, adotou a classificação e a descrição taxonômica, para complementar uma identificação botânica mais precisa e estável, resolvendo problemas da origem e da descrição dos caracteres das plantas ou dos órgãos utilizados, encorajando, a partir desta época, o estudo das plantas para a aplicação no tratamento de doenças (CUNHA, 2005).

Schinus terebinthifolius Raddi pertence à família Anacardiaceae a qual é representada por 70 gêneros e cerca de 600 espécies de árvores e arbustos, conhecidos por serem frutíferos e apresentarem madeira de boa qualidade (PIO CORRÊA, 1984). Esta família está distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais, com alguns representantes em zonas

temperadas. Apresenta importância econômica para a produção de taninos e resinas, bem como de alimentos, com alguns frutos comestíveis. Muitas espécies são cultivadas para ornamentação. Alguns membros desta família possuem tecidos resinosos, resina esta, às vezes, irritante para a pele. (FAMÍLIA Anacardiaceae, 2009).

O gênero é chamado de *Schinus*, nome grego para a árvore Mastic (*Pistacia lentiscus*), a qual se assemelha. Compreende cerca de 30 espécies nativas para a América do Sul (FAMÍLIA Anacardiaceae, 2009). Ao longo dos tempos tem havido um número razoável de reclassificações no âmbito deste gênero e anteriores designações incorretamente continuam a ser utilizada por aqueles desconhecidos das mudanças, inclusive, em alguns casos, os departamentos governamentais e até mesmo livros didáticos (SCHINUS, 2008a). Cabe ressaltar que cerca de 25% dos gêneros dessa família são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa (CORREIA et al., 2006). Entre as aroeiras há algumas que apresentam ação irritante para a pele, porém não esta, a aroeira-vermelha, que também é conhecida como aroeira-mansa (AROEIRA vermelha, 2009b).

Schinus terebinthifolius Raddi é uma espécie nativa da América do Sul, especialmente do Brasil, Paraguai e Argentina (DEGÁSPARI et al., 2005). É encontrada em algumas partes da América Central e algumas regiões da Europa, África, Ásia e, nos Estados Unidos, ocorre no Havaí, nos Estados da Califórnia, do Arizona e da Flórida onde foi introduzida para fins ornamentais. No Brasil, ocorre espontaneamente na costa litorânea, em áreas remanescentes da Mata Atlântica, e em outros tipos de formações vegetais, devido à sua grande plasticidade ecológica (BAGGIO, 1988; LORENZI e MATOS, 2002; SANTOS et al., 2007; CARVALHO-MACHADO, 2008). A espécie é encontrada desde a planície costeira até altitudes de 1.100 m a 1.200 m (BAGGIO, 1988).

Dentro de sua amplitude ambiental, a espécie apresenta distintas formas de crescimento, com ecótipos de porte, variando desde pequenos arbustos (50 a 60 cm) até árvores com 15 metros de altura (REITZ et al., 1983).

São muitas as plantas conhecidas com o nome de aroeira ou arrueira, nome de várias espécies de plantas da família Anacardiaceae (AROEIRA, 2008), e pelos nomes populares que carregam deixam transparecer que se trata de espécies espalhadas pelo país afora (AROEIRA brasileira, 2009). Especificamente *Schinus terebinthifolius* Raddi, a aroeira-vermelha, é nativa do Brasil e consta oficialmente na Farmacopeia Brasileira de 1929. É também, conhecida popularmente como: aroeira-brasileira, aroeira-branca, aroeira-negra, aroeira-da-praia, aroeira-do-brejo, aroeira-do-iguapé, aroeira-do-campo, aroeira-do-paraná, aroeira-do-sertão, aroeira-mansa, aroeira-pimenteira, aroeira-precoce, aguará-yba, aguaraiíba,

bálsamo, cabuí, cambuí, corneíba, fruto-do-sabiá e pimenta-rosa (PHARMACOPEIA, 1929; SCHINUS, 2008b; AROEIRA mansa, 2009; AROEIRA vermelha, 2009a). É designada também pelas de suas sinonímias botânicas: *Schinus mucronulata*, *Schinus weinmanniifolius*, *Schinus riedeliana*, *Schinus selloana*, *Schinus damaziana*, *Schinus raddiana* (AROEIRA mansa, 2009), *Astronium juglandifolium* Griseb., *Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl. (AROEIRA vermelha, 2009a). As denominações internacionais utilizadas são: Brazilian pepper, Brazilian holly, Brazilian pepper tree, Christmas berry e Florida holly (EUA), Mexican pepper, pimienta de Brasil (Porto Rico), faux poivrier e poivre rose (França), Rosapfeffer (Alemanha), warui (Ilhas Fiji) (SCHINUS, 2008d).

1.2. Aspectos botânicos

A aroeira-vermelha (Figura 1) é uma árvore dióica, de pequeno porte e de folhas perenes. Ocorre em várias formações vegetais, sendo mais comum em beiras de rios, córregos e em várias várzeas úmidas de formação secundária, contudo cresce também em terrenos secos e pobres (LORENZI, 2000).



Fonte: <http://www.oasisplantas.es/imagenes/productos/Arbolado/Schinus%20terebinthifolius.JPG>

Figura 1: Aspectos morfológicos de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*) A: exemplar cultivado em vaso para ornamentação de interiores; B: detalhe da inflorescência e das folhas; C: frutos maduros.

O fuste é geralmente curto e tortuoso, sustentando uma copa arredondada, pouco densa e atraente, principalmente quando há floração (pequenos cachos de flores brancas) e frutificação (cachos de frutos globulosos, vermelhos) (REITZ et al., 1983). Sua madeira, muito pesada (densidade 1,19 g/cm³), de grande resistência mecânica e praticamente

imputrescível (AROEIRA vermelha, 2009a), tem sido utilizada na forma de mourões, cercas, lenha e carvão (ALLARDICE et al., 1999).

A casca, em sua superfície externa, é de cor pardo-acinzentada, profundamente fendida no sentido longitudinal e um tanto no sentido transversal, muito rugosa, recoberta muito irregularmente de manchas mais claras e apresenta de longo em longo placas de líquens; a face interna é estriada longitudinalmente e de cor pardo-avermelhada; esta casca é impregnada de matéria resinosa, que aparece frequentemente em sua superfície (AROEIRA, 1929).

As folhas são compostas, alternadas, imparipinadas, com 2,5 a 12 cm de comprimento e possuindo de 3 a 13 (normalmente 7 a 11) folíolos elípticos-oblongos, com superfícies superiores verde-escuras e superfícies inferiores verde claras e margens dentadas, com nervuras claras; têm, como detalhe principal, ráquis aladas. As flores são pequenas e dispostas em inflorescências axilares e terminais do tipo rácemo, ostentando sépalas de formas triangulares a lanceoladas com margens ciliadas. Ambas as flores, masculinas e femininas, ocorrem em pedicelos e têm basicamente a mesma estrutura. O florescimento ocorre principalmente durante os meses de setembro a janeiro, surgindo pequenas flores de coloração branco-esverdeadas, aromáticas e melíferas, e devido a este fato são muito atrativas para as abelhas, o que as tornam muito importantes para a apicultura. O pólen abundante pode provocar reações alérgicas e irritações em pessoas sensíveis. (REITZ et al., 1983; SANCHOTENE, 1985; FERRITER, 1997; ALLARDICE et al., 1999; LORENZI, 2000; DEGÁSPARI et al., 2005; SANTOS et al., 2007; SCHINUS, 2008b; SCHINUS, 2008c; AROEIRA brasileira, 2009; AROEIRA mansa, 2009).

As árvores de *S. terebinthifolius* frutificam predominantemente no período de janeiro a julho (LORENZI, 2000). Seus frutos são pequenos, possuindo um formato arredondado, do tipo drupa e apresentam coloração verde no início e depois se tornam rosadas a avermelhadas e brilhante, reunidos em cachos pendentes; apresentam polpa avermelhada e comestível, tornando a aroeira muito procurada e preferida pela avifauna. Na Flórida, seus frutos são utilizados para decoração de natal, o que lhe conferiu a denominação de Christmas Berry. A pequena semente do fruto da aroeira-vermelha, redonda e lustrosa é única, marrom escura medindo cerca de 3 mm de diâmetro. Inscreve-se entre as muitas especiarias existentes e que são utilizadas essencialmente para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária universal. O sabor suave e levemente picante e adocicado do fruto da aroeira-vermelha, bem como sua bonita aparência, de uso decorativo permite o seu emprego em variadas preparações, podendo ser utilizada na forma de grãos inteiros ou moídos. No entanto, é

especialmente apropriada para a confecção de molhos que acompanham as carnes brancas, de aves e peixes, por não sobrepor o seu gosto sutil (USP, 2002). Introduzida na cozinha europeia, é muito popular na França, onde é utilizada na ornamentação e como tempero de preparações culinárias, com o nome de *poivre rose* (pimenta-rosa); considerado um tipo de pimenta doce (REITZ et al., 1983; SANCHOTENE, 1985; FERRITER, 1997; LORENZI, 2000; DEGÁSPARI et al., 2005; SANTOS et al., 2007; SCHINUS, 2008b; AROEIRA brasileira, 2009; AROEIRA mansa, 2009). Seu sabor é parecido com o da pimenta do reino, sendo um pouco mais suave, aromáticos, adocicados e, ao mesmo tempo, levemente apimentados (AROEIRA vermelha, 2009b; FIGUEIREDO, 2009).

A propagação se dá por sementes e, certamente, por estaquia a partir de segmentos da raiz e do caule. O crescimento é relativamente rápido, podendo atingir 1,0 m de altura no primeiro ano (SANCHOTENE, 1985).

A aroeira-vermelha é uma árvore bastante interessante e muito utilizada para arborização urbana. Seu porte médio e a frutificação ornamental, aliadas à beleza e rusticidade da planta, fazem com que ela seja uma excelente escolha para o paisagismo, prestando-se como arvoreta e para a formação de cercas-vivas. Ela também é indicada para reflorestamento de áreas degradadas e mata ciliar, pois é uma árvore pioneira. A aroeira-vermelha é considerada como planta invasora em muitos países onde é exótica, devido à facilidade de propagação (AROEIRA mansa, 2009; FIGUEIREDO, 2009).

1.3. Aspectos fitoquímicos

As principais características morfo-histológicas e químicas da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, com vistas ao seu reconhecimento laboratorial como droga, são referentes às partes da planta utilizada e sua relação à presença de classes de metabólitos secundários (JORGE e MARKMANN, 1996). Segundo a Farmacopeia Brasileira (1929), a parte do material vegetal a ser utilizado é a casca, embora estudos revelem que além das cascas, folhas e frutos também podem ser utilizados como fonte de substâncias e, devido a este fato, desperta um grande interesse para a pesquisa.

O interesse pela espécie se dá pelo seu metabolismo secundário que produz diversos compostos ativos entre outros compostos. Os estudos fitoquímicos de *S. terebinthifolius* detectaram a presença de compostos fenólicos simples, flavonoides e taninos, óleos essenciais, esteróides, triterpenos, antraquinonas e saponinas na espécie (LAWRENCE, 1984; JORGE e MARKMANN, 1996; QUEIRES e RODRIGUES, 1998; LIMA et al., 2006).

Estudos já desenvolvidos detectaram que tanto as cascas como as folhas revelaram-se igualmente ricas em taninos e em óleos essenciais. A única diferença substancial entre a composição química de ambas é no que se refere à presença de flavonoides e saponinas, as quais se destacaram nas cascas (JORGE e MARKMANN, 1996). Verificou-se também a presença de compostos fenólicos nos frutos; extratos obtidos a partir destes apresentaram quantidade significativa de flavona apigenina (o qual justifica a coloração amarelada), ácido elágico e também flavanona naringina (DEGÁSPARI et al., 2005).

Os óleos essenciais são ricos em mono e sesquiterpenos e apresentaram diferenças na proporção relativa dessas substâncias. Estudos apresentaram, com a obtenção do óleo essencial de folhas, compostos químicos majoritários distintos, como sabineno, α -pineno, β -pineno, cariofileno, germacreno-D, biciclogermagreno, *trans*-cariofileno e limoneno (MOURA et al., 2007; SANTOS et al., 2007). Sendo também identificados, em relação ao óleo essencial obtido de frutos maduros, predominantemente, os monoterpenos: α -3-careno e α -pineno, e os sesquiterpenos: β -gurjuneno, *cis*- β -guaieno, *trans*- β -guaieno, α -muuroleno, *trans*-calameno, cubenol e epi- α -muurolol (GEHRKE et al., 2007).

1.4. Aspectos etnobotânicos e farmacológicos

As investigações etnofarmacológicas e etnobotânicas têm sido a principal abordagem reconhecida por cientistas em todo o mundo, como uma estratégia de seleção de plantas medicinais (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006; SANTOS et al., 2009).

Quase todas as partes de *S. terebinthifolius*, incluindo folhas, cascas, frutos, sementes, resinas, e oleoresina (ou bálsamo), têm sido utilizada medicinalmente pelos povos indígenas em todas as regiões tropicais (PANETTA e MCKEE, 1997). As partes utilizadas de *S. terebinthifolius* que apresentam propriedades medicinais são as cascas, as folhas e os frutos e, o seu emprego correto para fins terapêuticos pela população em geral, requer o seu uso selecionado por sua eficácia e segurança terapêuticas, baseadas na tradição popular ou cientificamente validadas como medicinais. É fundamental que a escolha do material a ser utilizado, das formas corretas de preparações e administração de seus produtos sejam destinados para o seu uso, conforme o caso, em preparações diversas para serem ingeridas, ditas de uso interno e em outras preparações para uso na pele ou nas mucosas das cavidades naturais, ditas como uso externo (LORENZI e MATOS, 2002).

A literatura etnobotânica cita o uso das cascas, com base na tradição popular, na forma de cozimento (decocto), especialmente pelas mulheres, em banhos de assento após o parto e como anti-inflamatório e cicatrizante, ou como medicação caseira contra febre e para o tratamento de doenças do sistema urinário e do aparelho respiratório, bem como nos casos de hemoptise (expectoração sanguínea ou sanguinolenta), afecções e hemorragias uterinas (BRAGA, 1960; LORENZI, 1992; GRUENWALD et al., 2000). Da casca, extrai-se o óleo empregado contra tumores e doenças da córnea (DEGÁSPARI et al., 2005). Segundo Santos e colaboradores (2009), em um estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais, destacou-se a aroeira dentre as mais vendidas pelos raizeiros, devido aos relatos de uso sobre a atividade cicatrizante e anti-inflamatória em afecções bucais.

Com base no uso tradicional e farmacológico e clínico o extrato das cascas pode ser usado no tratamento tópico de ferimentos da pele, de mucosas em geral e nos casos de cervicites (ferida no colo do útero) e cervicovaginites (WANICK e BANDEIRA, 1974) e também de hemorroidas inflamadas; na forma de gargarejos ou bochechos com o decocto para afecções gengivais e da garganta, podendo ser ingerido para combater a azia e a gastrite (MATOS, 2002). Esta atividade pode ser útil para estudos químico-estruturais e farmacológicos, bem como à síntese de novos anti-inflamatórios como alternativa aos que provocam irritação gástrica (JORGE e MARKMANN, 1996).

Além das cascas, as folhas também são usualmente preparadas na forma de decocto com finalidade expectorante, antisséptica, antidiarréica e cicatrizante (PACIORNIK, 1990; RODRIGUES e CARVALHO, 2001; DI-STASI, 2002; LORENZI e MATOS, 2002; MATOS, 2002). Em muitos estudos *in vitro*, extratos de folhas da aroeira brasileira demonstram ação antiviral contra vírus de plantas e apresentam ser citotóxicos contra alguns tipos de cânceres (AROEIRA brasileira, 2009).

As folhas e frutos são adicionados à água de lavagem de feridas e úlceras, para limpeza de pele e de ação bactericida, embora a eficácia e a segurança do uso destas preparações não tenham sido, ainda, comprovadas cientificamente (BRAGA, 1960; LORENZI, 1992; GRUENWALD et al., 2000).

Em análises laboratoriais, assim como o extrato das folhas, os óleos essenciais, tanto das folhas quanto do fruto, têm demonstrado ação fungicida - contra *Candida* (*in vitro*) - e, uma atividade antimicrobiana em estudos clínicos. O óleo essencial das folhas e dos frutos é indicado em distúrbios respiratórios, pois contém alta concentração de monoterpenos. É eficaz em micoses, candidíase (uso local) e alguns tipos de protozoários intestinais. Age também como auxiliar no tratamento de alguns tipos de tumores/cânceres (carcinoma, sarcoma, dentre

outros) e como agente antiviral e anti-bactericida. Possui ação regeneradora dos tecidos e é útil em escaras, queimaduras e problemas de pele (DEGÁSPARI et al., 2005; AROEIRA brasileira, 2009). O óleo essencial também é indicado, externamente na forma de gel, loções ou sabonetes, para limpeza de pele, coceiras, espinhas (acne), manchas, desinfecção de ferimentos, micoses e para o banho diário (AROEIRA brasileira, 2009).

Os resultados dos ensaios farmacológicos de *S. terebinthifolius*, em diferentes modelos, registraram a existência de propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias (GAZZANEO et al., 2005), antioxidante (VELÁSQUEZ et al., 2003; EL-MASSRY, 2009), antitumoral (QUEIRES et al., 2006) e antimicrobiana incluindo nesta ação *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans* (WANICK e BANDEIRA, 1974, MARTÍNEZ et al., 1996; GUERRA et al., 2000; MELO-JÚNIOR et al., 2002; DEGÁSPARI et al., 2005; SCHMOURLO et al., 2005; LIMA et al., 2006; SOARES et al., 2007; EL-MASSRY, 2009). A ação cicatrizante e anti-inflamatória da droga pode estar relacionada à presença de taninos, que podem apresentar também ação antimicrobiana, antiviral, antioxidante e antitumoral. A presença dos flavonoides pode indicar uma potencialização da ação cicatrizante de *S. terebinthifolius*, devido aos flavonoides serem geralmente anti-inflamatórios, embora podem apresentar também ação antiviral e anticarcinogênica. Os óleos essenciais podem estar também relacionados à sua ação anti-inflamatória e antibacteriana (JORGE e MARKMANN, 1996).

O uso das preparações de aroeira deve ser revestido de cautela por causa da possibilidade do aparecimento de fenômenos alérgicos na pele e nas mucosas (LORENZI e MATOS, 2002). Em todas as partes da planta foi identificada a presença de pequena quantidade de alquil-fenóis, substâncias causadoras de dermatite alérgicas em pessoas sensíveis (REICHERT e FRERICHS, 1945; GRUENWALD et al., 2000).

O amplo emprego desta planta na medicina popular é motivo para a sua escolha como tema de estudos, visando o seu emprego como fonte de ativos para o desenvolvimento de um medicamento (fitoterápico ou fitofármaco) eficaz e seguro.

CAPÍTULO II

ESTUDO ANATÔMICO E HISTOQUÍMICO DAS FOLHAS

1. Introdução

A tarefa de identificar os seres vivos surgiu com a necessidade humana de individualizá-los para estudos e utilizações diversas. Identificar uma espécie vegetal significa oferecer-lhe meios seguros para que seja reconhecida por suas características morfológicas. Trata-se de uma tarefa árdua partindo-se do pressuposto que os indivíduos são semelhantes no nível intraespecífico, principalmente (SACRAMENTO, 2009).

A área farmacêutica necessita de material certificado quanto à sua identificação botânica para relacionar seguramente o perfil químico dos princípios ativos com uma identidade válida e reconhecida pela comunidade técnico-científica (SACRAMENTO, 2009).

As espécies vegetais apresentam inúmeras características morfológicas que podem ser estudadas e correlacionadas à sua identidade, dentre elas o arranjo dos tecidos anatômicos. Aquelas que ainda guardam em seu repertório genético-fisiológico evolutivo um metabolismo intrínseco e rico de possibilidades bioquímicas são pródigas em fabricar muitas substâncias, as quais podem ser identificadas quando ainda presentes no interior dos tecidos (SALVI JÚNIOR et al., 2008; SOUZA et al., 2008; CEZAR-JUNIOR et al., 2008).

As plantas, principalmente as de uso medicinal podem apresentar sinonímias vulgares e também científicas dificultando os trabalhos de identificação e aumentando as incertezas do processo. Diversos equívocos de identificação vegetal ocorrem quando não são observadas as técnicas mais apropriadas para o intento (SACRAMENTO, 2009).

Numa investigação criteriosa esgotam-se as possibilidades de erro quando são executadas análises complementares que associam os caracteres anatômicos com a ocorrência dos princípios ativos característicos de uma espécie determinados pela histoquímica e pelos ensaios fitoquímicos preliminares (SALVI JÚNIOR et al., 2009; SOUZA-MOREIRA et al., 2009). É importante ressaltar que o estudo macro da morfologia vegetal deve também estar relacionado às práticas de investigação para nortear a análise dirimindo a dependência de equipamentos que muitas vezes podem ser de difícil acesso (SACRAMENTO, 2009).

Em estudos farmacobotânicos objetiva-se caracterizar e identificar espécies de interesse medicinal, bem como as drogas vegetais originadas de suas partes, garantindo assim

uma autenticidade para a matéria-prima fornecedora de princípios ativos. Nem sempre caracterizar somente a droga vegetal se faz necessário. Conhecer microscopicamente outros órgãos da planta fornecedora da droga eleita torna-se, num processo de identificação complementar ou assessor, importante (SACRAMENTO, 2009).

Inúmeras experiências com este ramo podem ser encontradas na literatura. Destaca-se os trabalhos de Alberton et al., 2001 e Sanches et al. 2007.

Os conhecimentos relacionados à Farmacobotânica são desta forma exercitados pelo agente identificador, pois para entender os processos técnicos inerentes às atividades de investigação anatômica e histoquímica, ele terá que ter percorrido uma série de experiências teóricas e práticas relacionadas sobretudo à Anatomia Vegetal e à Química (SACRAMENTO, 2009).

2. Metodologia

2.1. Material botânico

As folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi foram colhidas ao amanhecer, em agosto de 2008, no início do período de floração, de plantas localizadas no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da FCF, no município de Araraquara, Estado de São Paulo, nas coordenadas 21° 48' 53.7''S e 48° 12' 07,6''W, com altitude de 656 metros. Na mesma ocasião, foram amostrados ramos férteis do mesmo exemplar para a confecção de exsiccatas e depositados no Herbário Rioclarense sob o número HRCB 51.668 e HRCB 51.669.

2.2. Estudo anatômico

Para a análise anatômica de *Schinus terebinthifolius*, foram selecionadas folhas maduras de ramos desenvolvidos. O limbo dos folíolos amostrados foi dividido em três regiões: terço superior, mediano e inferior. Os terços superior e inferior foram desprezados e terço mediano do limbo foliar foi sub-amostrado em aproximadamente 9 mm² da área próxima à nervura central, tendo-se o cuidado de amostrar também a fração adjacente à nervura.

Em seguida, o material foi fixado em solução de glutaraldeído (2,5%) e formaldeído (4%), por imersão, durante 12 horas, sob condições de vácuo a temperatura ambiente.

Após a fixação, o material foi desidratado e submetido à pré-infiltração e à infiltração para polimerização em resina sintética glicol metacrilato, segundo Kraus e Arduin (1997), sendo observadas as recomendações do fabricante da resina (Leica®).

Os blocos contendo o material incluído foram cortados em micrótomo de rotação para obtenção de secções com 7 µm de espessura. Após a secagem e aderência em lâminas de vidro, as secções foram coradas com azul de toluidina (0,05%) em tampão fosfato (pH 6,8) (KRAUS e ARDUIN, 1997). Após a coloração, as secções foram montadas em resina sintética Permount®. Procedeu-se o estudo anatômico com o auxílio de microscópio com captura de imagens (Leitz® DMRXE).

Para análise dos estômatos, fragmentos do terço médio foram submetidos à dissociação com HNO₃ (10%) durante 72 horas em estufa a 65 °C. Em seguida foram executadas três lavagens sucessivas em água destilada, e neutralização com NaOH (0,1%) e novamente lavagem em água destilada. Clarificou-se os fragmentos obtidos em hipoclorito de sódio (2%) durante três minutos, e duas lavagens em solução de ácido acético (0,002%). Foi aplicado azul de astra (1%) durante três minutos. Fez-se uma lavagem rápida em etanol (50%), procedendo-se em seguida a montagem em lâminas de vidro contendo solução de glicerina:água (1:1) (adaptado de GHOUSE e YUNUS, 1972; RUZIN, 1999).

2.3. Estudo histoquímico

Em relação ao estudo histoquímico, cortes transversais à mão foram realizados em folíolos frescos, examinados e fotografados com auxílio do microscópio de captura de imagens.

Os testes foram realizados de acordo com as recomendações propostas por Ascensão (2003), tanto para identificação de substâncias apolares como para as polares. Os reagentes empregados para evidenciar as substâncias apolares foram: Sudan III (JOHANSEN, 1940) para lipídios totais; sulfato azul do Nilo (CAIN, 1947) para diferenciação de lipídios ácidos e neutros; tetróxido de ósmio (GANTER e JOLLÉS, 1969-1970) para a identificação de lipídios insaturados; reagente de Nadi (DAVID e CARDE, 1964) para identificação de óleos essenciais e óleo-resinas; tricloreto de antimônio (HARDMAN e SOFOWORA, 1972; MACE e HOWELL, 1974) para identificação de esteroides; ácido sulfúrico para a identificação de lactonas sesquiterpênicas (Geissman e Griffin, 1971) e 2,4-dinitrofenilhidrazina (GANTER e JOLLÉS, 1969-1970) para identificação de terpenoides com grupo carbonila. Para substâncias polares foram empregados: cloreto férrico (GANTER e JOLLÉS, 1969-1970) e dicromato de

potássio (GABE, 1968) para a identificação de compostos fenólicos totais; vanilina clorídrica (MACE e HOWELL, 1974) para a identificação de taninos, reagente de Dragendorff (SVENDSEN e VERPOORTE, 1983) para identificação de alcaloides; lugol (JENSEN, 1962) para a identificação de amido; vermelho de rutênio (JOHANSEN, 1940) para identificar pectinas e azul brilhante de Comassie (FISCHER, 1968) para identificar proteínas totais.

Neste trabalho, para a detecção das lactonas sesquiterpênicas, foi adotado o procedimento descrito por Geissman e Griffin (1971) modificado por Higuchi (2007), que recomenda a reação com uma solução de ácido sulfúrico concentrado:glicerina 1:1 (v/v).

Como controle para identificação de substâncias apolares, as secções foram tratadas por dez minutos em cada passagem da série etanólica (25%, 50%, 75% e 100%) e cetônica (50% em etanol e 100%), seguida de reidratação gradual (LEWINSOHN et al., 1998). Como controle para identificação de substâncias polares, as secções foram tratadas com banho em solução comercial de hipoclorito de sódio (máximo de 2%) por 15 minutos, seguido de três banhos consecutivos em solução água destilada:ácido acético (1:500).

De acordo com Kraus e Arduin (1997), os testes usados nos estudos anatômicos para o reconhecimento de classes de metabólitos celulares, em geral, reagem a mais de uma substância, gerando a necessidade de testes complementares, com controle, para garantir correta interpretação. Em razão dessa recomendação, foram realizadas de uma a três repetições para cada substância, sendo considerados passíveis de testes complementares aqueles compostos determinados por apenas uma reação de coloração.

3. Resultados e discussão

3.1. Estudo anatômico

A Figura 2 mostra os principais caracteres verificados no estudo anatômico dos folíolos de *S. terebinthifolius*.

As secções transversais do terço médio da lâmina foliolar revelam uma epiderme uniestratificada, com as células da face adaxial maiores que as da face abaxial e com um formato tabular bem definido. Adjacente a camada de células da face adaxial, pode-se encontrar uma hipoderme, contendo células que variam quanto ao aspecto tabular, as quais são maiores que as células epidérmicas (Figura 2A).

Observa-se que o mesofilo apresenta uma organização dorsiventral, constituída por duas camadas de células de parênquima paliádico, que ocupa aproximadamente 75% da

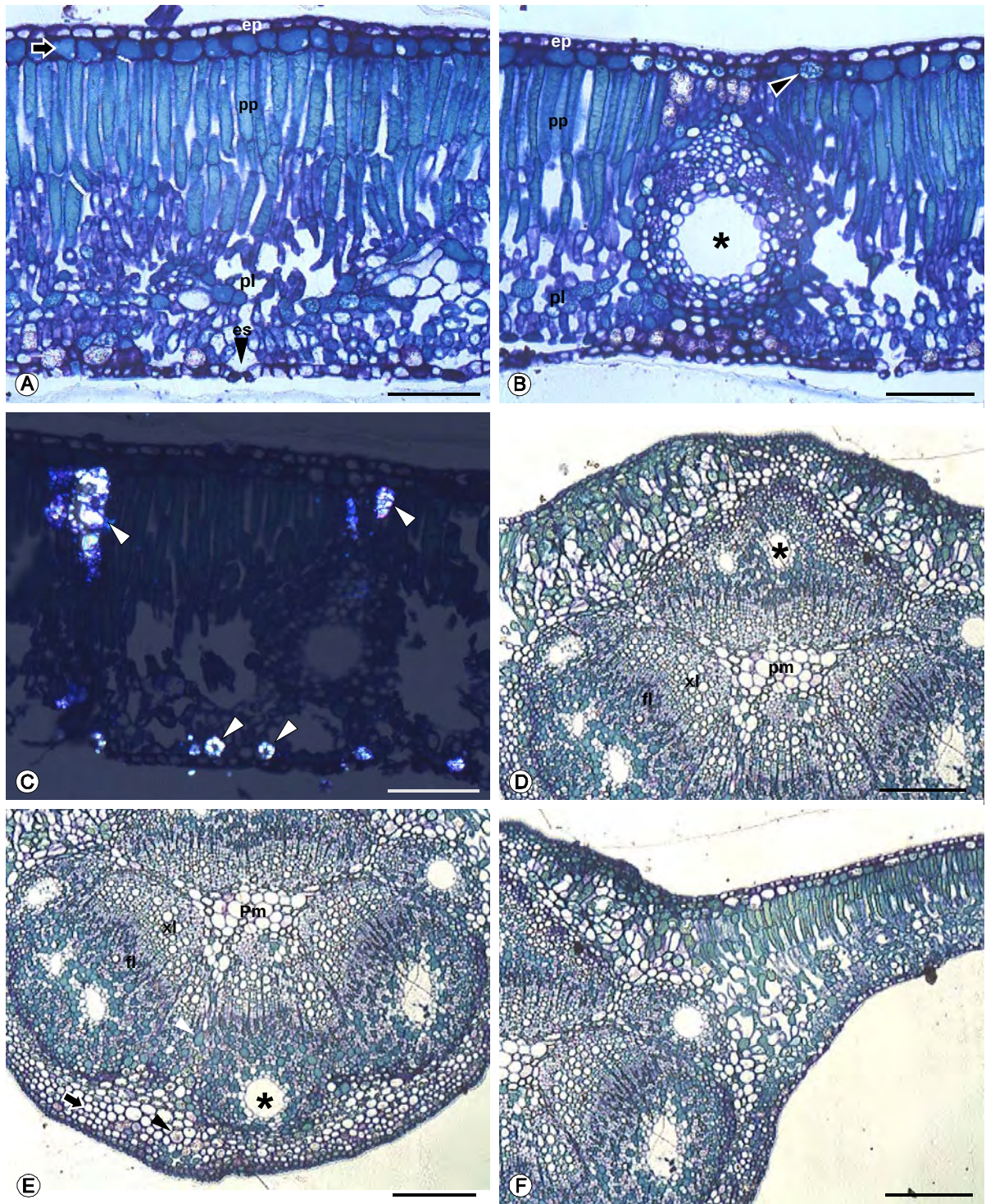


Figura 2. Aspectos anatômicos do folíolo de *S. terebinthifolius*. A: região do mesofilo observando-se epiderme, hipoderme (seta), parênquima clorofiliano composto pelo parênquima paliçádico (pp) e parênquima lacunoso (pl) e estômato (ponta de seta); B: mesofilo com destaque para a ocorrência de cavidade secretora (asterisco), idioblasto cristalífero na hipoderme contendo drusas (ponta de seta) e estômato; C: idioblastos drusíferos dispersos no parênquima clorofiliano, sob luz polarizada (pontas de seta); D: visão da face adaxial da nervura principal mostrando a disposição celular do parênquima medular (pm), cavidades secretoras (asterisco), floema (fl) e xilema (xl); E: visão da face abaxial da nervura principal mostrando colênquima angular (seta), drusas (ponta de seta preta), cavidades secretoras (asterisco), idioblastos fenólicos (ponta de seta branca), floema (fl), xilema (xl) e parênquima medular (pm); F: região de transição do limbo para a nervura principal mostrando a transição discreta do parênquima clorofiliano para o parênquima fundamental. Barras: A, B e C: 50 μ m; D, E e F: 100 μ m.

espessura do mesofilo. Dentre as células desse parênquima, próximo a hipoderme, encontram-se células que possuem aglomerados de cristais de oxalato de cálcio do tipo drusas (Figura 2C). O parênquima lacunoso apresenta arranjos compactos com poucos espaços intercelulares e células de formas variadas. Observa-se que em algumas das células desse parênquima, localizadas próximas a epiderme abaxial, há uma grande quantidade de drusas (Figura 2C). No mesofilo podem ser encontradas grandes cavidades secretoras, possuidoras de células epiteliais e endodérmicas.

A nervura central na região do terço mediano do limbo foliolar, é côncava nas superfícies abaxial e adaxial. A epiderme mostra células pouco menores que as do mesofilo, mais arredondadas. Na face abaxial verifica-se colênquima angular, onde podem ser observadas 5 a 7 estratos de células, contendo grande quantidade de drusas. A nervura possui um parênquima medular discreto com células de formato poliédrico e com vacúolo grande (Figura 2E). Cavidades secretoras aparecem na região floemática do sistema vascular, sendo distribuídas acompanhando a tendência circular deste último (Figuras 2D e 2 E).

Na região de transição do parênquima clorofiliano com a nervura central, células parenquimáticas da nervura aparecem entremeadas às do parênquima clorofiliano interrompendo-lhe uma sequência na nervura, consolidada pelo colênquima angular na área central (Figura 2D e 2F).

O sistema vascular é formado por feixes colaterais, ocorrendo interrupções de células parenquimáticas que avançam em direção à região medular. No xilema, os elementos de vaso dispõem-se radialmente à região central.

A Figura 3 mostra os aspectos verificados nas secções transversais da ráquis foliar: um formato côncavo na região abaxial e plano na região adaxial, onde duas expansões laterais aparecem. Estas possuem epiderme uniestratificada com células de formato tabular e às vezes arredondado, dois estratos na hipoderme, parênquima clorofiliano (palicádico e lacunoso) e um colênquima na extremidade do bordo.

O estelo da ráquis possui um parênquima medular constituído por células isodiamétricas, de paredes delgadas, observando-se a ocorrência de idioblastos fenólicos dispersos (Figura 2A). Na região do floema, cavidades secretoras aparecem dispostas radialmente acompanhando o cilindro vascular (Figuras 2A e 2D).

Na região superior plana um colênquima interrompe a continuidade circular do parênquima fundamental na ráquis; há ocorrência de fibras nesta região e que também acompanham o cilindro do feixe vascular anficrival. Neste, o xilema possui elementos de vaso dispostos radialmente e o floema, acompanha uma região cambial; fibras separam uma região

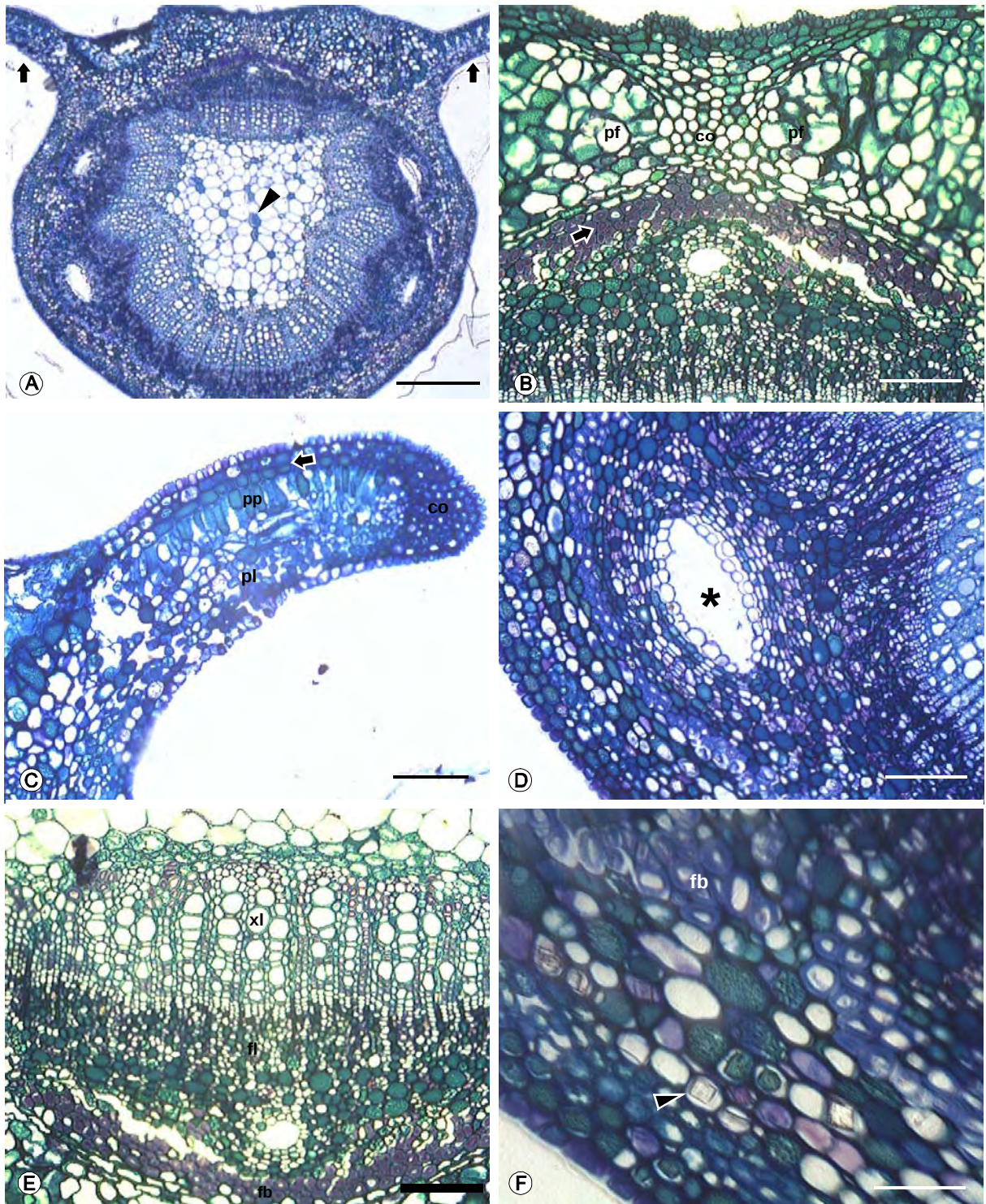


Figura 3. Aspectos anatômicos do folíolo de *S. terebinthifolius*. A: visão geral da ráquis apresentando as expansões laterais (setas) e idioblasto fenólico (ponta de seta); B: região superior da ráquis mostrando a disposição do parênquima fundamental (pf) e colênquima (co) e, evidenciando a presença de fibras (seta); C: aspecto da expansão lateral da ráquis mostrando a organização dos tecidos semelhante a do limbo observando-se dois estratos na hipoderme (seta); parênquima paliádico (pp); parênquima lacunoso (pl), colênquima (co); D: detalhe da cavidade secretora (asterisco) e dos tecidos adjacentes; E: região inferior da ráquis evidenciando a organização do xilema (xl), floema (fl) e das fibras (fb); F: região da ráquis apresentando detalhes das fibras (fb) e de idioblastos cristalíferos com monocristais (ponta de seta). Barras: A: 200 µm; B, C, D e E: 50 µm; F: 32 µm.

cortical discreta formada por células de parênquima e colênquima anelar (Figura 3D), onde podem ser encontrados idioblastos contendo monocristais e drusas, ambos de oxalato de cálcio, prevalecendo em ocorrência os monocristais (Figura 3F).

3.2. Estudo histoquímico

Um fator importante para a diagnose de drogas vegetais corresponde às inclusões celulares tanto de natureza orgânica ou inorgânica. As substâncias sintetizadas no metabolismo vegetal pode-se ser evidenciadas por reações histoquímicas, com as quais podemos identificar um grupo de substâncias de interesse do ponto de vista farmacêutico associando-os às características de identificação da espécie. O estudo histoquímico realizado para as folhas de *S. terebinthifolius* e seus resultados estão apontados na Tabela 1 e podem ser visualizados nas Figuras 4 e 5.

Tabela 1. Estudo histoquímico realizado em folhas de *Schinus terebinthifolius*.

Polaridade da substância	Grupo de substâncias	Reativo histoquímico	Resultado
substâncias apolares	lipídios totais	sudan III	Positivo
	lipídios ácidos e lipídios neutros	sulfato azul do Nilo	Positivo
	óleos essenciais e oleoresinas	reagente de Nadi	Negativo
	esteroides	tricloreto de antimônio	Negativo
	lactonas sesquiterpênicas	ácido sulfúrico	Negativo
	terpenoides c/ grupo carbonila	2,4-dinitrofenilhidrazina	Positivo
substâncias polares	compostos fenólicos totais	cloreto férrico	Positivo
	taninos	vanilina clorídrica	Positivo
	alcaloides	reagente de Dragendorff	Negativo
	amido	lugol	Negativo
	proteínas totais	azul brilhante de Comassie	Positivo

A Figura 4 mostra os resultados positivos obtidos para as substâncias apolares. Os lipídios totais evidenciados pelo sudan III ocorrem em pequenos lipossomos dispersos em todo o domínio mesofílico dos folíolos, havendo uma concentração maior no parênquima clorofiliano em relação à região da nervura principal. Nesta última, os lipídios aparecem evidentes nas cavidades secretoras principalmente em suas células epiteliais (Figuras 4B e 4C). O sudan III ao também evidenciar as ceras cuticulares mostrou que as células epidérmicas dos folíolos apresentam suas paredes celulares bastante cutinizadas conferindo adequada impermeabilização à perda hídrica e proteção contra agentes patogênicos (Figuras 4A, 4B e 4C).

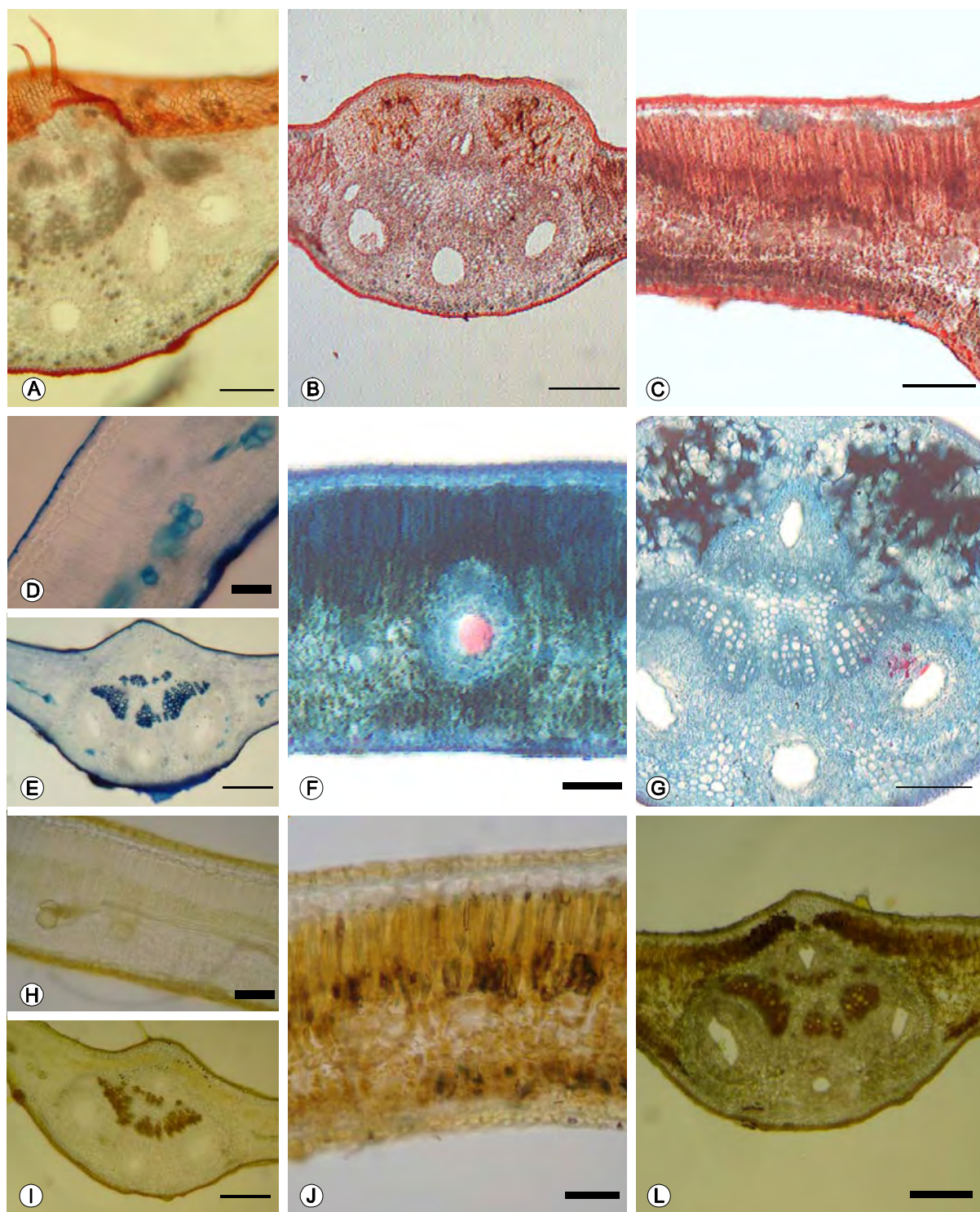


Figura 4. Resultados positivos para as reações histoquímicas em folíolos de *S. terebinthifolius* para as principais classes de metabólitos apolares: aspectos gerais da região do mesófilo e da nervura principal. A, D, E, H e I: controle negativo (série hidroetanólica e cetônica, seguida de reidratação gradual, com coloração específica para cada classe de metabólito) para lipídios totais (A), lipídios ácidos e lipídios neutros (D e E) e terpenoides (H e I); B e C: lipídios totais (sudam III); F e G: lipídios ácidos (coloração azul) e lipídios neutros (coloração rósea) (sulfato azul do Nilo); J e L: terpenoides com grupo carbonila (2,4-dinitrofenilhidrazina). Barras: A, B, E e I: 100 µm; C, D, G, H e L: 50 µm; F e J: 32 µm.

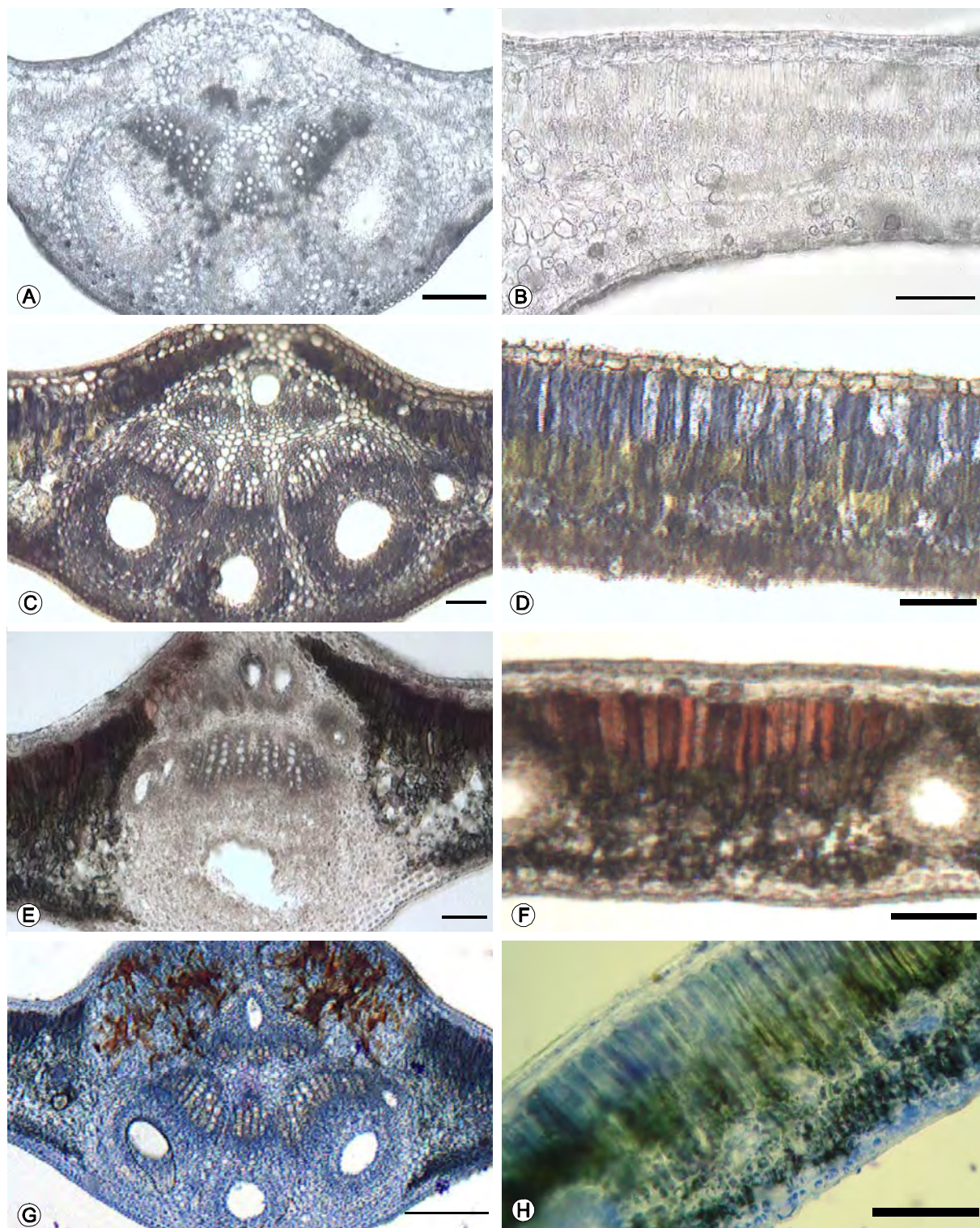


Figura 5. Resultados positivos para as reações histoquímicas em folíolos de *S. terebinthifolius* para as principais classes de metabólitos polares: aspectos gerais da região da nervura principal e do mesofilo do limbo foliar. A e B: controle negativo para classes de compostos polares (solução de hipoclorito de sódio, seguido de banho em solução de água destilada:ácido acético (1:500)); C e D: compostos fenólicos totais (cloreto férrico); E e F: taninos (vanilina clorídrica); G e H: proteínas (azul brilhante de Comassie).

Os lipídios ácidos e neutros aparecem evidenciados pelo sulfato azul do Nilo, que por ser um corante alocromático permite esta distinção. Nas Figuras 4F e 4G podem ser visualizados os lipídeos neutros (gorduras) marcados de coloração rósea, concentrados próximos às cavidades secretoras e os lipídeos ácidos (fosfolipídicos) marcados de azul concentrados no clorênquima.

De acordo com o resultado negativo obtido com o reagente de Nadi não se pode afirmar que os lipídeos evidenciados pelo sudan III sejam óleos essenciais ou oleoresinas. Os terpenoides com grupamentos carbonílicos aparecem evidenciados pela coloração alaranjada no teste com 2,4-dinitrofenilhidrazina nas Figuras 4J e 4L.

A Tabela 1 mostra que os testes histoquímicos para as classes dos metabólitos polares apontam resultados positivos para a ocorrência de compostos fenólicos, tânicos e proteicos. Na Figura 5 pode-se observar os caracteres visuais referentes a estas reações. Os compostos fenólicos como um todo foram evidenciados com cloreto férrico nas regiões parenquimáticas dos folíolos, destacando-se que esta ocorrência se deu em maior intensidade no parênquima paliçádico, quase que exclusivamente em seu primeiro estrato celular (Figura 5D). Num desdobramento da classe fenólica foi testada a ocorrência de taninos sendo evidenciado que estes podem ser encontrados no primeiro estrato de células do parênquima paliçádico (Figura 5F). Os compostos protéicos estão distribuídos nas regiões parenquimáticas da nervura, bem como localizados no parênquima paliçádico (no estrato celular adjacente a face adaxial) e nas células do parênquima lacunoso mais próximo a epiderme da face abaxial.

4. Conclusão

Os caracteres anatômicos descritos para *S. terebinthifolius* contribuem para a identificação da espécie e auxiliam na identificação desta droga vegetal. Os folíolos de aroeira-vermelha podem ser indicados como fonte de princípios ativos de diferentes classes, passíveis de serem extraídos e podem ser utilizados como fonte potencial para fitoterápicos, indicando diretrizes mais definidas para estudos fitoquímicos de prospecção. Embora estudos mais aprofundados devam ser realizados acerca do estudo fitoquímico desta espécie.

CAPÍTULO III

CONTROLE DE QUALIDADE DA DROGA VEGETAL

1. Introdução

Considerando a participação crescente de plantas medicinais e de medicamento de origem vegetal no arsenal terapêutico, cresce a necessidade de efetuar o controle de qualidade utilizando de técnicas modernas e eficientes. As plantas medicinais, que constituem matéria-prima para a produção de fitoterápicos e/ou fitofármacos, apresentam variações no teor de seus constituintes e podem sofrer deteriorações e contaminações. Assim, o controle de qualidade de matérias-primas assume particular importância (SHARAPIN et al., 2000).

Entende-se por qualidade o conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima para o uso ao qual se destina. A partir do estabelecimento dos parâmetros de qualidade para a matéria-prima, e considerando-se um planejamento adequado e um controle do processo de produção do medicamento, a qualidade do produto final estará, em grande parte, assegurada. A qualidade da matéria-prima vegetal é a determinante inicial da qualidade de um fitoterápico (FARIAS, 2001).

A qualidade das matérias-primas vegetais não garante, por si, a eficácia, a segurança e a qualidade do produto final. A eficácia é dada pela comprovação, através de ensaios farmacológicos, dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos. A segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos, bem como pela existência de contaminantes nocivos à saúde. A segurança e a eficácia dependem de diversos fatores, como a metodologia de obtenção, a formulação e a forma farmacêutica e, devem ser definidas para cada produto, estabelecendo parâmetros de controle de qualidade do produto final (FARIAS, 2001).

A qualidade adequada das matérias-primas deve ser realizada de acordo com bases científicas e técnicas. Nos procedimentos rotineiros de análise de qualidade, geralmente é preconizado o emprego de metodologias químicas, físicas ou físico-químicas e biológicas, sendo necessária a correlação entre os parâmetros analisados e a finalidade que se destina (FARIAS, 2001).

Estabelecido esses critérios, o emprego de protocolos de análise, permitindo o acompanhamento e a documentação de todos os procedimentos, é fundamental para assegurar e/ou gerenciar a qualidade (FARIAS, 2001).

Embora haja no país uma legislação que estabeleça critérios para a qualidade, e normas para produção e comercialização, os produtos fitoterápicos ainda têm sido comercializados fora dos padrões estabelecidos, sem garantia da eficiência terapêutica desejada ou da ausência de riscos à saúde do consumidor. Soma-se a isto, ainda, a venda de produtos a base de plantas medicinais sem nenhuma comprovação pré-clínica nem clínica de sua eficácia e segurança (YUNES et al., 2001) e a ausência de farmacovigilância (BRANDÃO et al., 2002).

1.1. Estabelecimento dos parâmetros da qualidade

Os parâmetros da qualidade para fins farmacêuticos são estabelecidos nas Farmacopeias e Códigos oficiais (FARIAS, 2001). Um método de análise prescrito na Farmacopeia não é necessariamente o único nem o mais avançado sob o ponto de vista científico. É, no entanto, o método oficial no qual serão baseadas as decisões em casos de dúvidas ou litígio (SHARAPIN et al., 2000).

As farmacopeias são códigos oficiais ou oficialmente adotados onde são descritos os padrões de qualidade dos medicamentos e os métodos para a sua análise, os quais a monografia deve ser considerada como um todo, capaz de assegurar qualidade adequada ao produto a que se destina (SHARAPIN et al., 2000). No caso das matérias-primas vegetais oriundas de plantas clássicas, ou seja, aquelas estudadas tanto do ponto de vista químico, quanto farmacológicos, existem monografias definindo critérios de identidade, de pureza e de teor de constituintes químicos. Dependendo da origem do vegetal, podem ser utilizadas Farmacopeias de diferentes países, além de monografias complementares, como as elaboradas pela Organização Mundial de Saúde (FARIAS, 2001).

No caso das plantas medicinais brasileiras, a grande maioria encontra-se descrita apenas na primeira edição da Farmacopeia Brasileira, editada em 1929, sendo que partes das monografias foram suprimidas na segunda edição ou destinadas ao Formulário Nacional (FARIAS, 2001). Quando uma droga vegetal não consta em uma Farmacopeia atualizada, é essencial que se elabore uma monografia estabelecendo padrões de qualidade dessa planta como matéria-prima.

Alguns parâmetros essenciais para a qualidade das matérias-primas vegetais podem variar dependendo da procedência do material. As variações, principalmente na composição química, ressaltam a importância dos estudos de caracterização farmacognóstica, correlacionados com a atividade farmacológica. Assim sendo, a origem geográfica exata e as condições do cultivo, estágio de desenvolvimento, colheita, secagem e armazenamento, bem como de tratamentos com agrotóxicos, descontaminantes e conservantes devem ser conhecidos (FARIAS, 2001).

O estabelecimento de parâmetros quantitativos, para matérias-primas vegetais, é normalmente determinado pelo teor de um conjunto de substâncias, preferencialmente correlacionadas com a finalidade de uso. Para as plantas é estabelecido um teor mínimo, baseado em análises sistemáticas. Nos ensaios quantitativos devem ser consideradas as características químicas e físico-químicas dos constituintes, evitando-se erros analíticos ou problemas de abrangência analítica ou limites de aceitabilidade (FARIAS, 2001).

As análises realizadas com a amostra têm por objetivo definir se a matéria-prima poderá ser empregada na elaboração de medicamentos. Portanto, durante todo o procedimento de análise, a matéria-prima deverá permanecer armazenada separadamente, em quarentena, aguardando o laudo técnico e, conseqüentemente, a sua liberação. Segundo as normas de boas práticas de fabricação, deve-se guardar como contraprova uma quantidade da amostra utilizada na análise, caso seja necessário repetir os ensaios. Além disso, todo processo analítico deve ser validado e variações nos resultados deverão ser consideradas estatisticamente. Nas análises de matérias-primas é preconizada a realização de ensaios em triplicata (FARIAS, 2001).

O objetivo final em todos os casos é fazer com que um produto oferecido como substância medicamentosa satisfaça um padrão de qualidade, enquadrando-se nas exigências da monografia, quando analisado pelos métodos preconizados pela Farmacopeia ou Códigos oficiais (SHARAPIN et al., 2000).

2. Metodologia

2.1. Processamento pós-colheita para a obtenção da droga vegetal

As folhas frescas colhidas foram examinadas e separadas manualmente. Sequencialmente, as folhas foram submetidas à lavagem com água corrente e, em seguida, a desinfecção em solução de hipoclorito de sódio (0,2% de cloro ativo) durante 20 minutos.

Após a retirada do excesso de água procedeu-se a secagem em estufa com ar circulante (Marconi[®] MA 035) aquecido a temperatura de 40 °C, até a obtenção de massa constante, quando então foram armazenadas em local seco e ao abrigo da luz (SHARAPIN et al., 2000).

2.2. Determinação do resíduo sólido do vegetal fresco

Tomou-se uma amostra das folhas frescas (10 g), a qual foi fragmentada o suficiente e em seguida transferida para uma estufa com circulação de ar a temperatura de 40 °C, até massa constante. Calculou-se a porcentagem do resíduo sólido na amostra e os resultados foram expressos pela média de três determinações (DETERMINAÇÃO, 1997, p.X-1.).

2.3. Obtenção da droga vegetal pulverizada

A metodologia utilizada para a moagem das folhas secas foi por seccionamento através de moinho de facas (Tecnal[®]) seguidas pelo método que combina impacto e atrito pelo emprego de moinho de bolas (Fabbe[®]). Este processo duplo objetivou a redução do tamanho das partículas de modo a aumentar, posteriormente, seu contato com o líquido extrator (AULTON, 2005).

2.4. Caracterização físico-química da droga vegetal pulverizada originada das folhas de *Schinus terebinthifolius*

Os métodos de avaliação da droga vegetal foram desenvolvidos segundo normas farmacopeicas, descritas nas seguintes obras de referência: Farmacopeia Brasileira, 1977 e 1988; e, outras técnicas não farmacopeicas descritas por Ansel et al., 2000; Costa, 2001, Martins e Sacramento, 2004; Aulton, 2005.

2.4.1. Amostragem

Do total obtido para a droga pulverizada, retiraram-se várias amostras utilizando a técnica de quarteamento conforme a necessidade para a execução das análises (AMOSTRAGEM, 1988, p.V.4.2.1.).

2.4.2. Determinação da granulometria da droga vegetal pulverizada

Para padronizar a granulometria da droga vegetal pulverizada amostrou-se 25 g de pó. Colocou-se a amostra sobre um jogo de tamises (Granutest[®]), operados por dispositivos mecânicos (Produtest[®]), de abertura nominal das malhas correspondentes a 1,180; 0,840; 0,590; 0,420; 0,250; 0,177 mm, provido de tampa e recipiente coletor. O processo foi executado em tamisador vibratório, de ação mecânica uniforme, durante um período de trinta minutos (a F. bras. IV preconiza 20 minutos no mínimo), na escala de 100 vibrações/min de acordo com as instruções do fabricante do equipamento. Posteriormente, foram pesados, cuidadosamente, os pós recolhidos do coletor e a fração remanescente sobre cada tamis (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.2.11.). Os resultados foram transpostos para o *software* Excel[®] e expressos de acordo com o termo utilizado e, representados pela média de três determinações.

2.4.3. Estudo e determinação do tamanho médio das partículas

Pela distribuição apresentada na determinação da granulometria e por estudos de passagem e retenção da droga vegetal a partir da quantidade de pós utilizada, realizada pelo método de tamisação, pode-se construir planilhas e gráficos para a determinação do tamanho médio das partículas e distribuição do tamanho das partículas utilizando o *software* Excel[®].

A distribuição de tamanho de partícula foi desdobrada em intervalos de tamanhos diferentes, representados na forma de histograma, gerado a partir de dados da faixa granulométrica, o qual permitiu que o percentual de partículas apresentadas num dado diâmetro equivalente fosse determinado (AULTON, 2005).

O tamanho médio das partículas da droga vegetal pulverizada foi quantificado por método de tamisação, quanto às suas proporções de faixa granulométrica e assim determinado pelo cálculo do diâmetro médio das partículas (d_{av}), sendo o resultado obtido pela média de três determinações (ANSEL et al., 2000).

2.4.4. Determinação da densidade

Para a determinação da densidade aparente da droga vegetal pulverizada foram tomadas três amostras de 25 g obtidas por quarteamento e separadas em frascos plásticos independentes.

Cada amostra foi transferida para encapsulador onde foram dispostos três grupos de vinte e cinco cápsulas gelatinosas duras de tamanho 0 (zero), que individualmente possuem volume conhecido de 0,688 mL; a massa das cápsulas vazias referente a cada grupo foi determinada anteriormente. Após o preenchimento dos grupos de cápsulas com a droga vegetal pulverizada, a massa foi determinada e, descontada a massa das cápsulas vazias a densidade aparente foi calculada dividindo-se os valores obtidos por exatamente 17,20 mL (25 x 0,688 mL) (MARTINS e SACRAMENTO, 2004). Os valores de densidade considerados resultaram da média calculada de três determinações para cada amostra.

2.4.5. Determinação de água pela perda por dessecação

Método gravimétrico: colocou-se cerca de 10 g da droga pulverizada, preparada e exatamente pesada, em cápsula de evaporação, tarada. Secou-se em estufa (Fanen[®]) a 105 °C por cinco horas e pesou-se. Continuou-se a dessecação, pesando a intervalos de uma hora, até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não fosse superior a 0,25% (MÉTODO, 1977, p.914).

A porcentagem da perda por dessecação foi calculada pela equação segundo Farmacopeia Brasileira (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.2.9.) e expressa pela média de três determinações.

$$\frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

Pa = massa da amostra;

Pu = massa da cápsula de evaporação contendo a amostra antes da dessecação;

Ps = massa da cápsula de evaporação contendo a amostra após a dessecação.

2.4.6. Determinação do pH

2.4.6.1. Determinação potenciométrica do pH

Pesou-se 99,0 g de água destilada e, após aquecimento e ebulição durante 5 minutos, verteu-se a água destilada fervente sobre exatamente 1,0 g da droga vegetal pulverizada. Em seguida, tampando-se o recipiente, deixou-se o material em infusão por 15 minutos. Decorrido este período, foi realizada uma filtração utilizando-se algodão. Aguardou-se o arrefecimento da solução extrativa obtida para a verificação do pH da solução-problema em peagômetro

(Analion[®] pH-metro), previamente calibrado. Para uma melhor reprodutibilidade deste teste o valor do pH da água também foi verificado (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.2.19.). O resultado foi expresso pela média de três determinações.

2.4.6.2. Determinação colorimétrica do pH

Baseou-se no emprego de papéis indicadores, que tem a propriedade de mudar de coloração conforme a variação de pH. A determinação foi levada a efeito umedecendo-se o papel indicador (Universalindikator[®] - Merck) com a solução-problema e observando-se a mudança de coloração (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.2.19.2.).

2.4.7. Determinação de cinzas totais

Calcinou-se previamente o cadinho de porcelana em mufla (Quimis[®]) a temperatura de 450 °C por um período de 30 minutos. O mesmo foi resfriado em dessecador e sua massa-tara foi determinado em balança analítica (Tecnal[®] Mark 1300). Posteriormente, amostrou-se exatamente três gramas da droga pulverizada, a qual foi distribuída uniformemente no cadinho, incinerou-se o material e, em seguida, submeteu-se a calcinação em mufla a temperatura de 450 °C por um período de duas horas, até a que todo o carvão fosse eliminado. Após procedimento, o cadinho foi deixado em dessecador para arrefecimento seguindo-se a determinação da massa até que o valor atingisse uma massa constante (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.4.2.4.). Os resultados calculados foram expressos em porcentagem de cinzas em relação à droga seca e representados pela média de três determinações.

2.4.8. Determinação de cinzas insolúveis em ácido

O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi aquecido a fervura durante cinco minutos com 25 mL de ácido clorídrico (70 g/L) em cadinho coberto com vidro de relógio. Após procedimento, lavou-se o vidro de relógio com cinco mL de água quente, juntando esta água ao cadinho. Recolheu-se o resíduo insolúvel em ácido, por filtração, sobre papel de filtro isento de cinza (Nalgon[®] 3550), lavando-o com água quente até que o filtrado se mostrasse límpido. Transferiu-se o papel de filtro contendo o resíduo para o cadinho original, secou-se sobre chapa quente (Tecnal[®] TE 018) e incinerou-se a cerca de 500 °C até massa constante (DETERMINAÇÃO, 1988, p. V.4.2.5.). Os resultados calculados foram expressos em

porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca e representados pela média de três determinações.

2.4.9. Determinação de extrativos no extrato etanólico

Num balão volumétrico de 50 mL de capacidade juntou-se 2,5 g de droga pulverizada (tamis com malhas de 0,22 mm de largura) e o etanol diluído, a 70 °GL, até perfazer o volume indicado. Arrolhou-se e agitou-se o balão durante duas horas. Filtrou-se.

Para um balão de boca larga, munido de rolha, seco e tarado, mediu-se, utilizando-se pipeta volumétrica, 25 mL do filtrado, promoveu-se a evaporação da solução etanólica até a secura por aquecimento em banho-maria, deixou-se depois arrefecer num exsiccador, onde permaneceu durante 48 horas, pesou-se e calculou-se a percentagem de extrato solúvel (COSTA, 2001).

2.4.10. Determinação do resíduo insolúvel no etanol

Aqueceu-se em balão cônico de 250 mL de capacidade, munido de condensador vertical, a banho-maria fervente durante 15 minutos, exatamente, 1 g de droga pulverizada com 50 mL de etanol. Deixou-se arrefecer durante uma hora, com agitações ocasionais.

Filtrou-se por um filtro de papel, pequeno, seco na estufa a 105 °C e tarado. Lavou-se o balão e o resíduo retido no filtro com etanol, frio, até que este passou-se a incolor.

Secou-se o filtro e o resíduo, a 105 °C, até massa constante. Com este valor calculou-se a percentagem do resíduo insolúvel no etanol (COSTA, 2001).

3. Resultados e discussão

3.1. Processamento pós-colheita para a obtenção da droga vegetal

O **processamento pós-colheita** tem por objetivo a conservação das características físicas, químicas, organolépticas e farmacológicas da droga vegetal. O processamento inadequado resulta em matéria-prima de baixa qualidade, com perda de princípios ativos, aumento da carga microbiana e má apresentação comercial (SHARAPIN et al., 2000).

As folhas frescas colhidas foram selecionadas de modo a se obter amostras em condições adequadas para a utilização, conforme descrito no item 2.1.

O processamento pós-colheita trata-se de um procedimento que suscita controvérsias, pois se a lavagem com água retira da droga a terra e a areia aderidas, pode retirar, também parte de princípios ativos e, seguramente, aumenta a umidade do material, que necessitará de mais tempo para secar. A lavagem com hipoclorito reduz a carga bacteriana, entretanto, como o hipoclorito é oxidante, há o risco de oxidar, também, os princípios ativos. A etapa mais importante do processamento pós-colheita é, sem dúvida, a secagem. O processo de secagem interrompe o processo de degradação pela inativação enzimática e processos fermentativos, impede o desenvolvimento de micro-organismos e as reações de oxidação e hidrólise quando conduzidos adequadamente (SHARAPIN et al., 2000).

Paralelamente ao processo de secagem executou-se a **determinação do resíduo sólido de vegetal fresco**, determinação esta que indica a perda de água e/ou de substâncias voláteis durante o processo de secagem da espécie vegetal. A estabilização da droga vegetal, com a obtenção de uma massa constante, deu-se após decorrido 72 horas do início do processo de secagem e, os resultados da análise apresentaram um valor médio de $40,96\% \pm 0,49$ de resíduo sólido do vegetal fresco. Dessa forma, pode-se correlacionar, a um valor médio de $59,04\% \pm 0,49$, a perda de água e/ou de substâncias voláteis durante o processo de secagem.

3.2. Obtenção da droga vegetal pulverizada

O procedimento de moagem possibilitou reduzir mecanicamente o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o assim, para as próximas etapas de desenvolvimento de análises e, posteriormente, um processo adequado de extração.

3.3. Caracterização físico-química da droga vegetal pulverizada originada das folhas de *Schinus terebinthifolius*

O controle de qualidade e a padronização de um fitoterápico envolvem várias etapas, entretanto, a fonte e a qualidade das matérias-primas vegetais têm um papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis (CALIXTO, 2000).

Tendo em vista as exigências atuais por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004) e a ausência de estudos farmacognósticos para a espécie *Schinus terebinthifolius*, buscou-se colaborar com o estudo desta espécie. Para isso foram realizados ensaios com o objetivo de estabelecer parâmetros de qualidade do material botânico. As

análises foram desenvolvidas por processos descritos anteriormente e seus resultados estão elencados conforme se segue.

Para que os resultados dos métodos de análise da qualidade da droga vegetal expressassem valores representativos da quantidade total da droga disponível, foi imprescindível recorrer a técnicas de **amostragem** definidas e uniformes. O procedimento de amostragem especificado levou em consideração o grau de divisão da droga e a quantidade de droga disponível.

A **avaliação granulométrica** do material vegetal pulverizado é um parâmetro imprescindível a ser estabelecido. Ao determinar a granulometria do pó resultante da redução de folhas de *S. terebinthifolius*, pode-se estimar a eficiência dos processos de moagem utilizados, correlacionando-os ao grau de divisão da droga vegetal obtido ao seu enquadramento as características granulométricas expressas em farmacopeias e códigos oficiais e, também, deduz-se que o maior grau de pulverização da droga vegetal representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo e mistura.

A granulometria do pó obtido a partir das folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius* em moinhos de facas e bolas, permite afirmar que a maior parte das partículas encontra-se entre a faixa granulométrica de 0,250 mm a 0,840 mm como apresentado na Tabela 2 e Figura 6. Segundo a classificação dos pós proposta pela Farmacopeia Brasileira IV (1988), o pó de folhas de *S. terebinthifolius* obtido nesse processo de moagem, pode ser classificado como pó grosso, o qual se refere àquelas partículas que passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1,7 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 μ m (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.2.11.).

Tabela 2: Análise granulométrica por tamisação de folhas de *S. terebinthifolius* pulverizadas

Tamis N° ABNT	Faixa granulométrica	Massa retida (g)			Média amostral (g)	Porcentagem retida	Desvio padrão
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3			
16 - 20	1,180 - 0,840	0,241	0,245	0,352	0,279	1,12	0,063
20 - 30	0,840 - 0,590	4,859	4,640	4,901	4,800	19,19	0,140
30 - 40	0,590 - 0,420	8,392	8,190	9,082	8,555	34,20	0,468
40 - 60	0,420 - 0,250	5,478	5,755	5,183	5,472	21,88	0,286
60 - 80	0,250 - 0,177	2,845	2,900	2,559	2,768	11,07	0,183
80 - coletor	0,177 - 0,000	3,053	3,349	3,013	3,138	12,55	0,184

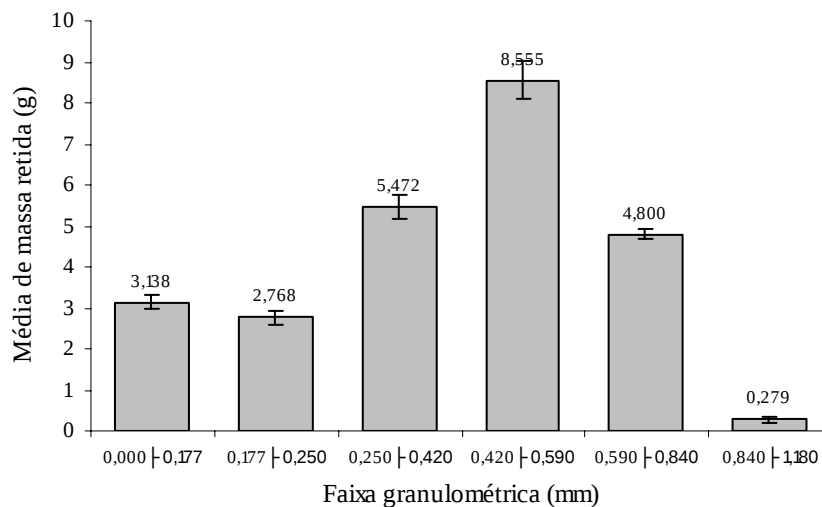


Figura 6: Distribuição da faixa granulométrica de folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius*

Pela distribuição apresentada na determinação da granulometria e por estudos de passagem e retenção da droga vegetal a partir da quantidade de pós utilizada, realizada pelo método de tamisação, pode-se determinar o tamanho médio das partículas e a distribuição do tamanho das partículas de folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius*.

O **tamanho médio das partículas** da droga vegetal pulverizada foi quantificado por método de tamisação, quanto às suas proporções de faixa granulométrica, devido à dificuldade em determinar uma única dimensão de partícula, uma vez que o processo de moagem resulta em partículas irregulares. O valor do tamanho médio das partículas apresentado foi de 0,4292 mm, sendo determinado pelo cálculo descrito em micromerítica, segundo Ansel et al. (2000) e representados na Tabela 3.

Tabela 3: Cálculo de tamanho médio das partículas de folhas de *S. terebinthifolius* pulverizadas, segundo Ansel et al. (2000)

Tamis N°	Abertura média (mm)	Massa retida* (g)	% retida	% retida x Abertura média
16 – 20	1,01	0,279	1,12	1,13
20 – 30	0,715	4,800	19,19	13,72
30 – 40	0,505	8,555	34,20	17,27
40 – 60	0,335	5,472	21,88	7,33
60 – 80	0,2135	2,768	11,07	2,36
80 - coletor	0,0885	<u>3,138</u>	<u>12,55</u>	<u>1,11</u>
		25,012	100,00	42,92

* Média de três determinações

$$d_{(av)} = \Sigma \frac{(\% \text{ retida}) \cdot (\text{abertura média})}{100}$$

$$d_{(av)} = \frac{42,92}{100} = 0,4292 \text{ mm}$$

Como a maioria dos pós contém partículas com um número elevado de diâmetros equivalentes diferentes, a **distribuição de tamanho de partícula** foi desdobrada em intervalos de tamanhos diferentes, representados na forma de histograma (Figura 7), gerado a partir de dados da faixa granulométrica (Tabela 2), o qual permitiu que o percentual de partículas apresentadas num dado diâmetro equivalente fosse determinado.

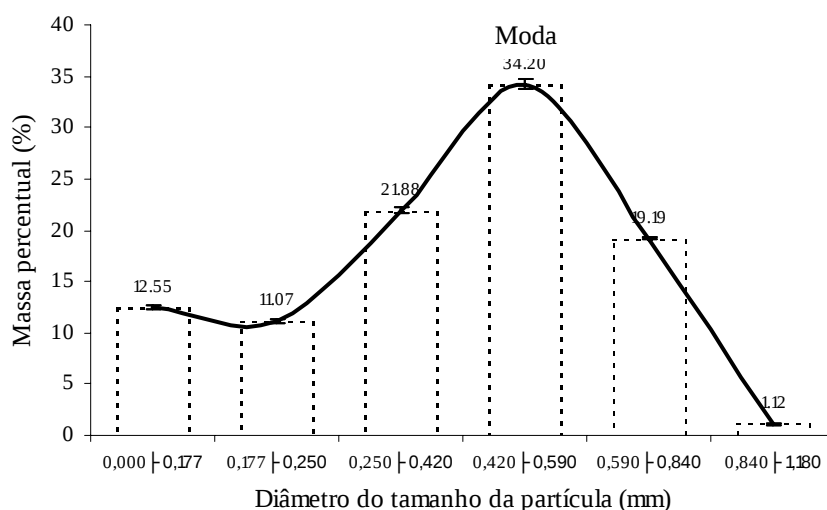


Figura 7: Histograma da distribuição do tamanho de partícula e curva de distribuição de massa percentual do tamanho da partícula de folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius*

O valor do maior percentual de partículas apresentadas num dado diâmetro equivalente - representado como moda - separa a curva normal em duas metades iguais, uma vez que a distribuição é simétrica, mas nem todas as populações de partículas são caracterizadas por uma curva de distribuição normal, de modo que as distribuições de partículas dessas populações exibem assimetria, como neste caso. Dessa forma, foi possível classificar a curva de distribuição de massa percentual ao tamanho de partícula das folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius*, a qual apresentou uma assimetria negativa, característica esta, por apresentar uma curva com um alongamento da cauda no sentido das faixas de tamanho menor (AULTON, 2005), conforme dispersão apresentada na Figura 7.

A **densidade** é empregada como sinônimo de massa específica. Salvo determinação contrária, a densidade adotada é a aparente a 25°/25°, isto é, representa a relação entre a massa aparente de uma substância (droga vegetal) ao ar a temperatura de 25 °C e a massa de igual volume de água destilada nas mesmas condições de temperatura e pressão (DENSIDADE, 1977, p.38).

A **densidade aparente** para as partículas obtidas, na pulverização de folhas de *S. terebinthifolius* pelo processo de moagem realizado, foi avaliada segundo metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (1977). A média dos resultados das análises desenvolvidas apresentou o valor de densidade de $0,5085 \text{ g/mL} \pm 0,003$. Vale ressaltar que tal ensaio constitui-se numa exigência estabelecida pela RDC 48/2004 (BRASIL, 2004).

A droga vegetal contém, naturalmente, uma certa quantidade de água, que subsiste desde a secagem da planta. É importante que se conheça esse valor, pois é um índice relacionado à sua preparação e à garantia de sua conservação (COSTA, 2001). Daí a necessidade do estabelecimento de limites de umidade para drogas vegetais (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.2.9.). A **determinação do teor de água pela perda por dessecação** do material vegetal pulverizado de *S. terebinthifolius* foi conduzida conforme estabelecido, por método gravimétrico, segundo Farmacopeia Brasileira (1977, p.914). Amostras do material pulverizado foram submetidas à temperatura de 105°C e, dessa forma, dessecadas até peso constante, quando o ensaio foi dado por concluído. Este ensaio visa determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza expelida nas condições específicas (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.2.9.). Uma quantidade residual excessiva de água pode indicar a possibilidade de a matéria-prima vegetal ter sido mal preparada ou de se encontrar acondicionada inconvenientemente (COSTA, 2001). Portanto em circunstâncias capazes de propiciar o desenvolvimento de insetos e de micro-organismos, como bactérias e fungos e, permitir a ocorrência de reações enzimáticas, como hidrólise, as quais promovem alterações e/ou degradação dos seus constituintes ativos e, conseqüentemente acarretando a deterioração da droga vegetal.

Para assegurar a qualidade da matéria-prima vegetal, a Farmacopeia Brasileira (1988, p.V.4.2.3.) estabelece limites de umidade para drogas vegetais, em geral, na faixa de 8 a 14%. A média dos resultados obtidos na determinação por dessecação de folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius* foi dada por concluída quando duas pesagens sucessivas não diferiram entre si por mais de 5 mg, conforme estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (1988, p.V.4.2.3.) e, apresentaram um valor de $5,3\% \pm 0,1$ de umidade contida na droga vegetal. Valor este situado fora da faixa percentual estabelecida, mas segundo assegura a Farmacopeia Brasileira (1977, p.38), toda vez que na descrição de um produto não for indicada a percentagem da perda por dessecação, é tolerado um máximo de cinco por cento. Portanto, alicerçado neste conteúdo, pode-se afirmar que o teor de umidade encontrado na determinação por dessecação de folhas de *S. terebinthifolius* amostradas, encontra-se dentro das normas adequadas. Como resultado,

a determinação da água é importante para demonstrar a concordância com os padrões das farmacopeias.

Outro parâmetro utilizado para a caracterização de um material vegetal é referente à concentração hidrogeniônica do extrato, ou seja, a **determinação do pH** da solução extrativa. Encontram-se, nas plantas, diversos ácidos minerais, mas particularmente orgânicos pertencentes às diversas séries, aromáticas, terpênicas, heterocíclicas, em geral combinados sob a forma de sais, ésteres, lactonas, amidas, nos lipídios, essências, resinas, glicídios, proteínas e em outros constituintes naturais. Uma parte destes ácidos encontra-se também no estado livre, solubilizada no citoplasma, e por tal motivo pode dosear a acidez total das suas soluções extrativas. Em soluções aquosas, os ácidos dissociam-se parcialmente em íons, e essa acidez pode ser medida pela concentração dos hidrogênios na solução (COSTA, 2001). Para a determinação do pH do extrato de folhas de *S. terebinthifolius*, primeiramente, para uma melhor reprodutibilidade da análise, o valor do pH da água destilada também foi verificado, devido ao fato desta ser utilizada no procedimento para a obtenção da solução extrativa. Desenvolveu-se, para a determinação do valor do pH, segundo Farmacopeia brasileira (1988, p.V.2.19.-V.2.19-2.), os métodos de potenciometria e de colorimetria.

A determinação colorimétrica do pH baseou-se no emprego do papel indicador, indicando como resultados o valor médio para a água destilada de 5 unidades de pH e, para o extrato de folhas de *S. terebinthifolius* o valor médio de 4 unidades de pH, o qual foi levado a efeito pela ocorrência da mudança de coloração do papel indicador. A determinação potenciométrica do pH foi obtida, pela leitura em peagômetro indicando como resultados o valor médio para a água destilada de $5,32 \pm 0,03$ unidades de pH e, para o extrato de folhas de *S. terebinthifolius* o valor médio de $3,94 \pm 0,02$ unidades de pH, o que sugere a presença de substâncias ácidas no farmacógeno analisado.

O conteúdo de cinzas nas drogas vegetais constitui, dentro de certos limites, um índice individual simultaneamente de identificação e pureza, mas logo que ultrapasse um máximo de limite estabelecido, pode considerar-se como presença de contaminantes. Há, portanto, necessidade de marcar um âmbito de variação dentro do qual se considere normal o conteúdo de cinzas (COSTA, 2001). Para tal, procedeu-se a **determinação de cinzas totais**, seguido da **determinação de cinzas insolúveis em ácido**. As cinzas resultantes da incineração do material vegetal podem derivar de constituintes minerais e de organo-metálicos integrantes da planta, o qual se denomina como cinzas fisiológicas e, aquele que deriva da matéria estranha, principalmente solo e areia que adere à superfície da droga, recebe a designação de cinzas não fisiológicas (FARMACOPEIA, 1988; SHARAPIN et al., 2000; COSTA, 2001).

A determinação de cinzas totais envolve a determinação tanto da cinza fisiológica quanto da não fisiológica e consiste em medir a quantidade do resíduo não volatilizado após a calcinação da droga, o que permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.4.2.4.; SHARAPIN et al., 2000). A determinação das cinzas insolúveis em ácido é preconizada no caso de farmacógenos, permitindo a verificação de sílica, principalmente areia e terra silícea e constituintes silicosos presentes na droga vegetal (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.4.2.5.; SHARAPIN et al., 2000; COSTA, 2001; FARIAS, 2001). As médias das análises desenvolvidas apresentaram os valores de $18,33\% \pm 1,53$ para cinzas totais e, $0,33\%$ para cinzas insolúveis em ácido.

As substâncias extrativas obtidas de drogas vegetais dependem de sua própria natureza e/ou da classe das substâncias de interesse e, do solvente utilizado no processo de extração dessas substâncias. A **determinação do extrato etanólico e do resíduo insolúvel no etanol** são processos quantitativos relacionados aos constituintes químicos presentes na espécie vegetal. Estes ensaios destinam-se à determinação do teor de substâncias ativas presentes nas drogas vegetais e, seus resultados são complementares e possuem o mesmo significado analítico. A média dos resultados obtidos nas determinações do extrato etanólico e do resíduo insolúvel no etanol referente aos processos extrativos de folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius* apresentaram os valores de $30\% \pm 2,31$ do teor de extrativos obtido nas circunstâncias estabelecidas e, de $62,1\% \pm 1,02$ de resíduo, valor este que representa as substâncias insolúveis retidas por filtração.

4. Conclusão

A qualidade da droga vegetal pode interferir diretamente na ação farmacológica da espécie. Pesquisas avaliando a qualidade da matéria-prima e de produtos a base de plantas medicinais e, com o estabelecimento de parâmetros de qualidade juntamente com prioridades de conservação e armazenamento de derivados de plantas medicinais, são suportes que apresentam grande importância dentro a avaliação farmacognóstica para assegurar a qualidade de uso a que se destina. Segundo Carvalho e colaboradores (2009), a falta de métodos de controle adequados tem limitado a comercialização de produtos com alta qualidade, especialmente aqueles derivados de espécies nativas, como *Schinus terebinthifolius*.

Destaca-se a importância dessas informações para o início do estabelecimento dos parâmetros referentes ao controle da qualidade das folhas de *S. terebinthifolius*, com a

realização de futuros estudos para essa espécie vegetal, garantindo com isso, a confiabilidade nos resultados, para que sejam utilizadas com finalidade fitoterápica. Como os métodos são convencionais e de resultados reprodutíveis e, conduzem a resultados úteis de análise, reitera-se o estudo de amostras oriundas de vários locais para verificar a repetência das informações, bem como determinar-se os desvios pertinentes.

CAPÍTULO IV

ESTUDO FITOQUÍMICO

1. Introdução

O metabolismo vegetal compreende o conjunto de reações químicas, que visam ao aproveitamento de nutrientes e, que continuamente estão ocorrendo em cada célula. Os compostos químicos formados, degradados, ou simplesmente transformados por essas reações são chamados de metabólitos (SANTOS, 2001).

Os processos metabólicos que estão envolvidos na produção de macromoléculas, como, carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos, os quais apresentam um elevado grau de similaridade entre os organismos e, por serem considerados processos essenciais envolvidos na transformação de moléculas de nutrientes nas unidades constitutivas essenciais à vida do organismo e comuns aos seres vivos, são designados de metabolismo primário (SANTOS, 2001). A partir dos produtos do metabolismo primário, através de rotas biossintéticas diversas e à custa de energia, as espécies vegetais são capazes de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias de natureza química e propriedades bastante diversas, denominadas de micromoléculas, como flavonoides, taninos, antraquinonas, cumarinas, terpenos, saponinas, alcaloides, as quais geralmente apresentam estrutura complexa e com marcantes atividades biológicas. Estas substâncias, cuja produção e acúmulo estão restritas aos vegetais, sendo seu metabolismo específico e único, caracterizam-se muitas vezes como elementos de diferenciação, pelo fato dos compostos encontrarem-se geralmente presentes nas plantas em pequenas quantidades e, por vezes, em células especializadas, caracterizando-as especificamente. Embora não essenciais para a manutenção da vida do organismo, garantem vantagens para a sua sobrevivência e perpetuação, em seu ecossistema. A este processo, que originam o segundo grupo de compostos químicos, dá-se a denominação de metabolismo secundário (VON POSER, 2001; SANTOS, 2001; PARANHOS, 2005).

Os estudos fitoquímicos compreendem as etapas de extração, fracionamento, isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, responsáveis - ou não - pela ação biológica. Esses conhecimentos permitem identificar a espécie vegetal e,

conjuntamente com ensaios de atividade biológica, analisar e caracterizar frações ou substâncias bioativas (SONAGLIO et al., 2001).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou as substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural das mesmas (FALKENBERG et al., 2001).

1.1. Análise fitoquímica preliminar

A triagem fitoquímica ou “screening” fitoquímico é uma das etapas iniciais da investigação de plantas medicinais, através de um conjunto de técnicas, para o desenvolvimento da pesquisa fitoquímica (LÚCIO, 2000).

A triagem fitoquímica preliminar consiste na caracterização de um determinado grupo de substâncias presentes em uma espécie vegetal, desenvolvida a partir do processo extrativo de substâncias presentes na planta com a utilização de um solvente adequado e posterior caracterização dessas substâncias no extrato. Em análises fitoquímicas, quando não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado, costuma-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente, conseguindo-se uma extração fracionada, em que as diferentes frações contêm compostos de polaridades também crescentes (FALKENBERG et al., 2001).

Classicamente, a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse tem sido conseguida pela realização de reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico (FALKENBERG et al., 2001). Métodos estes, que devem permitir avaliação rápida, com reações sensíveis, reprodutíveis e de baixo custo e, que permitem determinar qualitativamente a presença dos principais grupos de constituintes químicos de uma planta, tanto livres, quanto na forma conjugada e, a partir daí, orientar a extração e/ou fracionamento dos extratos para o isolamento dos grupos de maior interesse (LÚCIO, 2000).

A utilização de material vegetal fresco pode ser indispensável para a detecção de alguns componentes específicos, visto que seu emprego traz a vantagem de evitar a presença de substâncias provenientes do metabolismo de fenecimento vegetal. No caso de execução da

análise fitoquímica em tempo distante da coleta, o material deve ser tratado, visando: a sua estabilização, de forma a impedir a ação enzimática e, assim, evitar a alteração dos compostos químicos originalmente presentes no vegetal e; a retirada de água, através da secagem, tendo por finalidade impedir reações de hidrólises e de crescimento microbiano (FALKENBERG et al., 2001).

Para algumas reações, o extrato pode ser empregado diretamente, enquanto que, em outras, o solvente deve ser previamente eliminado. Usualmente, estas reações são realizadas em tubo de ensaio ou placa de toque, podendo também ser utilizada a detecção cromatográfica com reagentes específicos (FALKENBERG et al., 2001).

A realização das reações de caracterização diretamente no extrato bruto pode eventualmente mascarar o resultado. O fracionamento do extrato e a realização dos testes com as frações obtidas possibilitam geralmente reações mais nítidas (FALKENBERG et al., 2001).

1.2. Processo extrativo: considerações gerais

Antes de executar uma extração, deve-se considerar uma série de fatores que interferem nessa operação, tais como as características do material vegetal, o seu grau de divisão, o meio extrator e o processo extrativo (FALKENBERG et al., 2001).

O solvente utilizado deve ser o mais seletivo possível para extrair apenas as substâncias de interesse ou em maior quantidade. Como a seletividade depende da polaridade, o grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja extrair determina o solvente ou mistura de solventes que se aproxima do ótimo de seletividade para a extração (FALKENBERG et al., 2001).

Os fatores relacionados aos métodos de extração dizem respeito à agitação, temperatura e ao tempo de execução. Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios extratores e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se deseja preparar (FALKENBERG et al., 2001).

1.3. Fracionamento por partição

O fracionamento de um extrato vegetal pode se iniciar pelo processo de partição por solventes orgânicos de polaridade crescente. O fracionamento por partição implica numa dissolução seletiva e distribuição entre as fases de dois solventes imiscíveis. Este fenômeno

pode ser aplicado com vistas à separação de componentes de uma mistura de substâncias presentes em um extrato vegetal (FALKENBERG et al., 2001).

1.4. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia é um método físico-químico que permite a separação de misturas de substâncias em seus componentes individuais. Esta técnica permite também obter informações quantitativas e qualitativas sobre as substâncias contidas em uma mistura (ROCHA, 2000).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise, tanto de extratos vegetais quanto para avaliar o resultado de um processo de separação (FALKENBERG et al., 2001). Esta técnica consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada fina de adsorvente, retido sobre uma superfície plana (ROCHA, 2000). Utiliza-se o desenvolvimento dessa técnica com maior frequência na análise vegetal, em virtude da simplicidade e facilidade de compreensão, rapidez de execução, sensibilidade, versatilidade, reprodutibilidade e baixo custo oferecido pela técnica e, ainda, pelos resultados apresentados. Assim, algumas farmacopéias empregam-na como processo habitual na identificação de substâncias (ROCHA, 2000; COSTA, 2001).

Há, porém, necessidade de fixar as circunstâncias experimentais, em virtude de vários fatores modificarem os resultados, como os adsorventes, espessura das camadas, umidade, eluente (COSTA, 2001).

2. Metodologia

2.1. Triagem fitoquímica preliminar

A caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse foi conseguida pela realização de reações químicas (Tabela 4), que resultaram no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico, conforme descritos em Costa (2001) para a caracterização de taninos, flavonoides, cumarinas, heterosídeos cardiotônicos e cianogenéticos, saponinas, antraquinonas, alcaloides e metilxantinas.

Tabela 4: Reações químicas de caracterização de grupos de substâncias presentes na droga pulverizada de folhas de *S. terebinthifolius*

Grupo de substâncias de interesse	Método de reação
Taninos	Gelatina Sais de ferro (FeCl_3) Acetato de chumbo Ácido nitroso
Flavonoides	Shinoda (cianidina) Taubock (oxalo-bórica) Pew (zinco metálico) Cloreto férrico Cloreto de alumínio
Saponinas	Índice de espuma
Alcaloides	Dragendorff Mayer Bertrand
- Alcaloide de núcleo tropano	Vitali
- Alcaloides quinólicos	Grahe
Heterosídeos cardiotônicos	Liebermann-Burchard Kedde Keller-Kiliani
Heterosídeos cianogenéticos	Tira de papel de picrato de sódio
Antraquinonas	Antraquinônicos livres Antraquinônicos combinados - O-heterosídeos - C-heterosídeos
Cumarinas	Técnica do anel associada a radiações ultravioletas
Metilxantinas	Amônia

2.2. Obtenção do extrato etanólico

O extrato etanólico foi obtido por processo de turbólise (FALKENBERG et al., 2001) adotando-se a proporção de 10% (m/v) entre a droga vegetal pulverizada e o líquido extrator. Realizou-se a extração por agitação em alta velocidade concomitante a elevadas forças de cisalhamento pelo turbo-extrator, com uma solução etanólica a 70 °GL, por um período total de 15 minutos, realizando uma sequência de três séries de cinco minutos com intervalos de três minutos de repouso. A solução extrativa obtida foi filtrada em papel filtro quantitativo (Quanty[®] poros de 8 µm) e após, o filtrado concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida (Marconi[®] MA 120) com temperatura máxima de 40 °C até completa eliminação do solvente orgânico e posteriormente, concentrada até a secura. O rendimento da extração foi calculado com base na massa de resíduo seco assim obtido.

2.3. Fracionamento do extrato vegetal

O extrato bruto obtido foi solubilizado em mistura de metanol:água (7:3 v/v) conduzindo-se o fracionamento por partição líquido-líquido com os solventes: hexano:metanol/água (1:1 v/v); acetato de etila:água (1:1 v/v); butanol:água (1:1 v/v), obtendo-se a fração hexânica, fração acetato de etila, fração butanólica e fração aquosa. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida (Heidolph® Laborota 400) com temperatura máxima de 40 °C até completa eliminação do solvente orgânico e posteriormente, concentrada até a secura em capela. O rendimento das frações foi calculado com base na massa de resíduo seco assim obtido.

2.4. Perfil cromatográfico

Após a obtenção das frações do extrato, realizou-se a triagem por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do extrato e das frações obtidas. A CCD foi desenvolvida com fase estacionária em placas de sílica gel comerciais (Sorbent technologies® Sílica G - UV 254 - 200 µm), utilizando como fase móvel dois sistemas de solventes: CHCl₃:MeOH:*n*-PrOH:H₂O (5:6:1:4 v/v/v/v, fase orgânica) e CHCl₃:MeOH:H₂O (43:37:20 v/v/v, fase orgânica), aos quais as placas foram eluídas. Em seguida, as cromatoplasas foram reveladas com anisaldeído/H₂SO₄ e aquecidas em estufa (Marconi® MA 033) a 100 °C, para observar a presença de classes de metabólitos de interesse.

As classes de substâncias foram determinadas pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas quando reveladas, com as colorações das classes descritas na literatura (WAGNER et al., 1984).

3. Resultados e discussão

Com a finalidade inicial de investigação e de avaliação da presença de grupos de metabólitos secundários relevantes em folhas de *S. terebinthifolius*, desenvolveu-se, por um conjunto de técnicas apropriadas, a **triagem fitoquímica preliminar** da droga vegetal em questão. Os resultados da análise fitoquímica preliminar do extrato e frações deram-se referentes ao desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico para a caracterização de grupos de substâncias presentes na droga vegetal. Os resultados das análises estão apontados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultado referente à triagem fitoquímica preliminar da droga vegetal pulverizada de folhas de *S. terebinthifolius*

Grupo de substâncias de interesse	Resultado da análise
Taninos	Positivo
Flavonoides	Positivo
Saponinas	Positivo
Alcaloides	Negativo
Heterosídeos cardiotônicos	Positivo
Heterosídeos cianogênicos	Negativo
Antraquinonas	O-heterosídeos – negativo C-heterosídeos – negativo
Cumarinas	Negativo
Metilxantinas	Negativo

Dentre os grupos de substâncias pesquisadas no “screening” fitoquímico, cujos resultados estão elencados na Tabela 4, foi possível detectar, pela positivação da reação, através de reações inespecíficas (ocorrendo através de grupos funcionais ou estruturas comuns as substâncias) e de reações específicas (ocorrendo somente com algumas estruturas típicas de uma única classe de substância), a **presença de taninos**, a partir do desenvolvimento da *reação com gelatina*, pela formação de precipitado e, *reação com sais de ferro* (FeCl_3), pela coloração azul dada, indicando a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e, também pelo desenvolvimento da *reação com acetato de chumbo*, pela formação de precipitado esbranquiçado indicando a presença de galotaninos (união entre unidades de ácido gálico via ligações meta-depsídicas) e, *reação com ácido nitroso*, pela formação imediata de coloração rósea que passa a púrpura, indicando a presença de taninos do ácido elágico; a **presença de flavonoides**, a partir do desenvolvimento da *reação de Shinoda* (reação da cianidina), pelo desprendimento de hidrogênio nascente e formação de coloração vermelha a rósea, indicado pela redução de derivados flavônicos em antociânicos, *reação de Pew* (reação com zinco metálico), pela formação de coloração vermelha, pela presença de flavonoides, *reação de Taubock* (reação oxalo-bórica), pelo aparecimento de fluorescências amarelo-esverdeadas, indicando a presença particular de flavonóis, *reação com o cloreto férrico*, pela coloração variável verde-castanha, consoante a flavonóis e/ou flavononas; *reação com o cloreto de alumínio*, pela manifestação de fluorescência verde amarelado intenso característica, indicando a presença de compostos flavônicos; a **presença de saponinas**, a partir do desenvolvimento do *índice de espuma*, pela formação, persistente, de um anel de espuma; a **presença de heterosídeos cardiotônicos**, a partir do desenvolvimento da *reação de Liebermann-Burchard*, obtendo-se um coloração castanha esverdeada, caracterizando o

núcleo fundamental de esteróide e triterpenóides, *reação de Kedde*, pela coloração fugaz, de castanho avermelhado a vermelho violeta, atribuído a presença do anel lactâmico insaturado, *reação de Keller-Kiliani*, pelo desenvolvimento de um anel de coloração castanho-avermelhada na interface dos líquidos e juntamente a coloração azul-esverdeada, adquirida gradualmente, pela camada acética, particularidade esta, das desóxioses frequentes nos heterosídeos.

Ceruks e colaboradores (2007), em seu estudo fitoquímico dos constituintes fenólicos polares de *S. terebinthifolius*, desenvolveram o fracionamento cromatográfico do extrato em etanol das folhas de *S. terebinthifolius*, guiado pelo ensaio para detecção do potencial anti radicalar, que resultou no isolamento de cinco compostos fenólicos ativos, galato de etila, galato de metila, miricetrina, quercitrina e miricetina, cujas estruturas foram identificadas com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN.

Farag (2008), em seu estudo sobre compostos fenólicos de folhas de *S. terebinthifolius* isolou e identificou pela primeira vez dois ésteres de ácido quínico: 5-O-ácido cafeoilquínicos e 5-O-ácido cumaroilquínicos; três glicosídeos miricetina: miricetina-3-O-alfa-L-ramnopiranosil (1"-> 6") beta-D-galactopiranosídeo, miricetina-3-O-beta-D-glicuronídeo e miricetina 3-O-beta-D-galactopiranosídeo; 1,6-digalloyl-beta-D-glicose e (+)-catequina.

El-Massry e colaboradores (2009), estudando a composição química, no extrato etanólico, de folhas de *S. terebinthifolius* identificaram os compostos fenólicos: ácido caféico, ácido sirínico, ácido cumárico, ácido elágico, ácido galico e catequina (traço).

Tomando-se como base os estudos de Ceruks et al. (2007), Farag (2008) e El-Massry et al. (2009) e, correlacionando esses dados à triagem fitoquímica preliminar desenvolvida neste trabalho, com a positividade referente aos grupos de substâncias fenólicas no extrato, pode-se prever a existência dessas substâncias na amostra estudada. Carvalho e colaboradores (2009), em seus estudos, desenvolveram um método de cromatografia líquida (simples, preciso, específico e sensível) para quantificação de ácido gálico, como marcador, a partir de matérias-primas e produtos finais, de *Schinus terebinthifolius*.

O **extrato etanólico** foi obtido por processo de turbólise, conforme metodologia descrita no item 2.2., adotando-se a proporção de 10% (m/v) entre a droga vegetal pulverizada e o líquido extrator, utilizando-se uma solução etanólica a 70 °GL. Graduação etanólica esta, escolhida pelo fato que, segundo Falkenberg (2001), praticamente todos os constituintes de interesse para a análise fitoquímica apresentam alguma solubilidade em misturas etanólicas, de tal modo que estas costumam ser empregadas com frequência.

O **fracionamento do extrato vegetal** foi desenvolvido pelo processo de partição por solventes orgânicos de polaridade crescente, iniciando-se pelo solvente hexano, e sequencialmente pelos solventes acetato de etila, *n*-butanol e água, conforme metodologia descrita no item 2.3. Com base na massa de resíduo seco assim obtido, foram calculados os valores de rendimento dos processos extrativos e, os seus valores estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Rendimento referente à massa de resíduo seco obtido no processo extrativo da droga vegetal

Rendimento	Extrato e frações				
	Extrato EtOH	Fr. Hex	Fr. AcOET	Fr. BuOH	Fr. H ₂ O
	31,12%	0,56%	12,75%	2,86%	13,64%

Empregou-se para a análise dos extratos obtidos da droga vegetal, a técnica de **cromatografia em camada delgada**, um método clássico para a identificação dos grupos de constituintes químicos presentes no extrato etanólico e frações obtidas, assim como avaliar o resultado do processo desenvolvido de separação. A análise foi desenvolvida conforme metodologia descrita no item 2.4. Buscou-se caracterizar a presença dos constituintes majoritários presentes em *S. terebinthifolius*, tanto no extrato quanto nas frações, por dois sistemas eluentes de fase orgânica de diferentes polaridades: um sistema (quaternário) composto de CHCl₃:MeOH:*n*.PrOH:H₂O (5:6:1:4), de maior polaridade e, um outro sistema de menor polaridade, composto de CHCl₃:MeOH:H₂O (43:37:20). Sistemas estes utilizados para a avaliação da separação dos componentes da mistura através da migração diferencial das substâncias sobre uma camada adsorvente da placa de CCD. Os perfis cromatográficos por CCD estão apresentados na Figura 8.

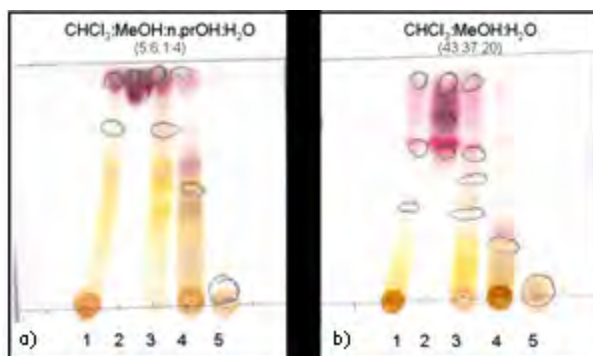


Figura 8: Perfil cromatográfico por CCD de extrato e frações de folhas de *S. terebinthifolius*. Amostras: 1- extrato etanólico, 2- fração hexano, 3- fração acetato de etila, 4- fração *n*-butanol, 5- fração aquosa. 3a) Sistema eluente (quaternário): CHCl₃:MeOH:*n*.PrOH:H₂O (5:6:1:4); 3b) Sistema eluente CHCl₃:MeOH:H₂O (43:37:20).

Pela análise do perfil cromatográfico, apresentado na Figura 8 e, pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas quando reveladas, com as colorações das classes descritas na literatura (WAGNER et al., 1984), foi possível observar e inferir quanto as classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico e nas frações provenientes de folhas de *S. terebinthifolius*, tais como taninos, caracterizados pela coloração caramelo localizada no ponto de aplicação; compostos fenólicos (flavonoides), caracterizados pela coloração amarela; saponinas e terpenos, caracterizados pela coloração arroxeadas e diferenciados pelo índice de retenção (R_f), o qual as saponinas apresentam R_f menor que os terpenos. Deve-se ressaltar que as características apresentadas pela amostra é função das condições estabelecidas (do tipo de suporte empregado e do sistema eluente utilizado).

Os resultados da triagem fitoquímica constituem, apenas, uma orientação e devem ser interpretados em conjunto com os resultados do triagem farmacológica. Assim, quando uma planta revela uma dada ação durante uma triagem farmacológica e presença de um dado grupo de substâncias na triagem fitoquímica, é bastante provável que a ação farmacológica seja devida à fração da substância ou associação delas (LÚCIO, 2000).

4. Conclusão

A pesquisa de constituintes químicos de espécies vegetais está relacionada com perfis fitoquímicos que verificam a ocorrência de grupos de metabólitos secundários de interesse. Um modo de fracionar extratos por partição inicia-se com solventes de polaridades crescentes, implicando numa dissolução seletiva e distribuição entre as fases, aplicada à separação dos componentes da mistura. A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise, tanto de extratos brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação.

As folhas de aroeira-vermelha podem ser indicadas como fonte de princípios ativos de diferentes classes, passíveis de ser facilmente extraídos e que podem ser utilizados como fonte potencial para novos fitoterápicos, embora estudos mais aprofundados devam ser realizados acerca do estudo fitoquímico desta espécie.

Esses resultados permitem estabelecer uma estratégia para o isolamento das substâncias presentes no extrato hidroalcoólico das folhas de *S. terebinthifolius*. A identificação e/ou isolamento das substâncias ativas será empregado em ensaios futuros direcionados pelos resultados da avaliação das atividades biológicas.

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

1. Introdução

As plantas sempre foram o principal meio a que a humanidade recorreu para tratamento das doenças. Inicialmente, de modo empírico, foi pela experimentação, selecionando e conhecendo, para muitas, a sua atividade e toxicidade, como foi o caso de tantas plantas que ainda hoje são utilizados na medicina tradicional e na medicina clássica (CUNHA e ROQUE, 2005).

O homem sempre utilizou os produtos naturais, em particular, como meio de tratamento das suas doenças, e, ainda hoje, o emprego de medicamentos à base de plantas é muito importante em muitas regiões do mundo (CUNHA e ROQUE, 2005).

Deve-se destacar o importante emprego das plantas na terapêutica nos países em desenvolvimento, onde a população, devido à sua grande ligação a costumes ancestrais, continua a usá-las como principal fonte de medicamento (CUNHA e ROQUE, 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde, 80% da população mundial faz uso de medicamentos derivados de plantas medicinais. No Brasil pesquisas demonstram que mais de 90% da população já fez uso de alguma planta medicinal (CORRÊA e ALVES, 2008). A riqueza da diversidade vegetal brasileira contribuiu para que a utilização das plantas medicinais seja considerada uma área estratégica para o país.

No mundo Ocidental, principalmente nas últimas décadas, tem-se vindo a assistir um renovado interesse pelo uso das plantas medicinais na terapêutica, constituindo, em certas circunstâncias, uma ajuda nos cuidados primários a saúde e um excelente complemento terapêutico, compatível com a medicina clássica (CUNHA e ROQUE, 2005).

1.1. Pesquisa da atividade biológica

A pesquisa da atividade biológica com extratos de plantas visa descobrir aqueles que apresentam finalidades terapêuticas. A triagem deve ser cuidadosamente padronizada, para que seja segura e reprodutível. A quantidade do material em teste, necessária para efetivar essa triagem, deve ser pequena e os procedimentos planejados podendo-se utilizar o material

bruto como extratos de plantas, ou frações de extratos. Seja geral ou específica, a triagem produz somente suposições sobre a atividade que a amostra possa vir a ter no ser humano enfermo (LÚCIO, 2000).

O estudo fitoquímico bioguiado, feito a partir dos diferentes tipos de extratos, são desenvolvidos por análises realizadas por um painel de testes de atividade biológica escolhida de acordo com a análise dos dados etnobotânicos, a bibliografia e os objetivos a atingir (triagem de atividade). Os resultados dessa fase são determinantes para estudos mais aprofundados da espécie vegetal em questão.

1.2. Estudo antibacteriano

As substâncias antimicrobianas ou antibióticas representam talvez o maior avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas ou mais, com progresso sem limites dentro da terapêutica medicamentosa. O referido grupo de medicamentos condiciona, de forma efetiva, o efeito de espécies microbianas patogênicas e oportunistas responsáveis pelas mais variadas patologias que tanto provocaram e provocam a incapacidade prolongada ou óbito de seres humanos, sem restrição de faixa etária, situação financeira ou estado da saúde do indivíduo atingido. Os antimicrobianos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, prevenir o desenvolvimento de micro-organismos resistentes, ausência de efeito indesejáveis ao hospedeiro, estabilidade química, entre outras. A atividade antimicrobiana é um item relevante na caracterização de extratos vegetais, dada à importância e o número bastante grande de doenças infecciosas que acometem o homem (COWAN, 1999; LIMA et al., 2000).

A partir da década de 80, o interesse em encontrar agentes antimicrobianos naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico tem aumentado consideravelmente (RAUHA et al., 2000).

Em um amplo estudo sobre plantas medicinais, avaliando a atividade antimicrobiana de extratos vegetais contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, micobactérias, leveduras e fungos filamentosos, confirmaram, quanto ao potencial antimicrobiano apresentado em baixas concentrações de extrato, a ocorrência de inibição sobre o crescimento de micro-organismos. O que confirma a grande importância que tais produtos possuem como perspectiva para produção de novos e eficientes produtos farmacêuticos que possam ser

utilizados na medicina para terapêutica de processos infecciosos e, de modo geral, os agentes antimicrobianos podem manifestar sua atividade por vários mecanismos, como lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alteração das moléculas de proteínas e ácidos nucleicos, e inibição da síntese de ácidos nucleicos (LIMA et al., 2000).

O conhecimento sobre determinadas substâncias presentes em espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos (LIMA et al., 2000). Entre as várias atividades biológicas referentes às substâncias fenólicas, a atividade antimicrobiana é uma das mais estudadas. A toxicidade dos taninos para com os micro-organismos tem sido bem documentada. Tais estudos envolvem vários campos de pesquisas, entre eles destacam-se o de alimentos, plantas, solos, patologia de plantas, farmacologia e nutrição humana e animal (SCALBERT, 1991).

Vários métodos podem ser utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo aplicados em estudos de triagem de novas substâncias ativas. A técnica de difusão em ágar e métodos de diluição em tubos e/ou microplacas podem ser utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana de compostos químicos. Contudo, o método de diluição em microplacas permite a análise de vários compostos e diferentes espécies bacterianas concomitantemente (ELOFF, 1998).

Pelo fato das plantas medicinais representarem um papel muito importante na saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento e, devido às possibilidades de aplicação de extratos de plantas na terapêutica e o envolvimento de espécies vegetais em diferentes doenças, fez-se fato importante, a avaliação do potencial das substâncias presentes em *Schinus terebinthifolius*, como agentes antibacterianos.

2. Metodologia

2.1. Extratos vegetais

Para o desenvolvimento dos estudos de atividade antibacteriana foram utilizados o extrato e frações do extrato vegetal de *Schinus terebinthifolius* obtidos conforme a metodologia descrita no capítulo IV.

2.2. Amostras bacterianas

As cepas utilizadas para a avaliação da atividade antibacteriana constaram de espécies Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Bacillus subtilis* ATCC 19659, e Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2.3. Estocagem e manutenção das cepas

As amostras bacterianas foram mantidas em Caldo Muller-Hinton (MH) acrescido de 20% de glicerol e conservadas em freezer a -20 °C. Para o uso, as cepas foram repicadas em caldo Muller-Hinton, incubados (Fanen[®] CB 002) durante 24 horas a 37 °C, as quais foram utilizadas na padronização do inóculo.

2.4. Espectro de absorção do extrato etanólico e frações do extrato vegetal

Na observação do extrato vegetal e suas frações a serem testadas, foi avaliado a absorção de cada amostra em espectrofotômetro (Pharmacia LKB[®] Ultrospec III) num intervalo de leitura de 400 a 655 nm, para a determinação do comprimento de onda possivelmente absorvível (interferente).

Foi realizado o espectro de varredura do extrato vegetal e frações do extrato na concentração de 1000 µg/mL, utilizando-se como branco a água purificada. Para determinação da avaliação de absorção de cada amostra foi observada também a absorvência do meio de cultura (caldo MH), por apresentar coloração amarelada.

As análises permitiram avaliar o melhor comprimento de onda, o qual foi utilizado nos ensaios de atividade antibacteriana com leitura espectrofotométrica.

2.5. Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana foi padronizada adicionando-se uma cultura preparada a partir do crescimento bacteriano decorrido de 24 horas em caldo MH a temperatura de 37 °C e, posteriormente, após agitação e consequente repouso, uma alíquota da suspensão foi transferida para outro tubo contendo tampão PBS estéril até atingir uma turvação comparável ao tubo da Escala McFarland correspondente 0,5 unidade (aproximadamente $1,5 \times 10^8$

UFC/mL) e seguida de leitura espectrofotométrica a 620 nm com absorvância de 0,10 a 0,15 (corresponde até a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para utilização na microplaca, o inóculo foi diluído a 1:10 em tampão PBS estéril (obtendo-se uma suspensão correspondendo a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL) (SANCHES, 2004).

2.6. Preparo do extrato etanólico e frações do extrato vegetal

O extrato vegetal e as frações do extrato foram preparados em solução estoque de 2000 µg/mL. As amostras de extrato etanólico 70 °GL e, frações aquosa, butanólica e acetato foram preparadas em água destilada estéril, e, a fração hexânica foi preparada em solução de metanol com 20% de Twen 80 e água estéreis. As amostras foram preparadas em momento antes da realização dos testes.

2.7. Determinação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em microplacas

Foi determinada a CIM utilizando diluição em microplaca, segundo a Norma M7-A6 do National Committee for Clinical Laboratory Standards, porém com modificações descritas neste item (NCCLS, 2003).

2.7.1. Método de diluição em microplacas

Os métodos para determinação da CIM foram realizados adaptando-se as técnicas propostas por Ellof (1998). O teste foi realizado em microplacas (Costar® 3595) estéreis de 96 orifícios, de fundo plano, com tampa. Foi utilizado caldo MH como meio de cultura. O extrato etanólico e frações do extrato foram preparados como solução estoque conforme descrito no item 2.6. Para cada bateria de testes foi testada uma cepa padrão, conforme apresentado no item 2.2.

Os 96 orifícios da microplaca, das linhas de A a H e das colunas de 1 a 12 (Figura 9), foram preenchidos com 80 µL de meio líquido (caldo MH) estéril. Foram reservados orifícios para controle, sendo: os orifícios das linhas de A a H da coluna 1 para o controle do meio de cultura; os orifícios das linhas de A a H da coluna 2 para o controle de crescimento bacteriano; aos orifícios das linhas de A a H da coluna 3 foram adicionados 100 µL de cloridrato de ciprofloxacino, na concentração de 35 µg/mL, para o controle positivo; aos

orifícios das linhas de A a H da coluna 10 foram adicionados 100 µL do solvente utilizado para o preparo da solução estoque (item 2.7.), para o controle negativo; e, aos orifícios das linhas de A a H das colunas 11 e 12 foram adicionados, a cada orifício, 100 µL dos extratos testados para o controle destes, sendo a coluna 11 para um extrato e a coluna 12 para um outro extrato testado. Os orifícios iniciais das colunas 4, 5 e 6 foram reservados para a aplicação, em triplicata, de 100 µL de um dado extrato e, nos orifícios iniciais das colunas 7, 8 e 9 foram reservados para a aplicação, em triplicata, de 100 µL de um outro extrato. A partir desses orifícios (4, 5 e 6; 7, 8 e 9), com o auxílio de pipeta, foram feitas diluições seriadas das linhas A até H. Após as diluições seriadas, as concentrações finais na microplaca para as amostras vegetais foram de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 µg/mL. Sequencialmente, foram adicionados 20 µL da suspensão bacteriana (10^7 UFC/mL) aos orifícios das colunas de 2 a 10. Posteriormente, as microplacas foram levadas à estufa incubadora a temperatura de 37 °C, durante 24 horas.

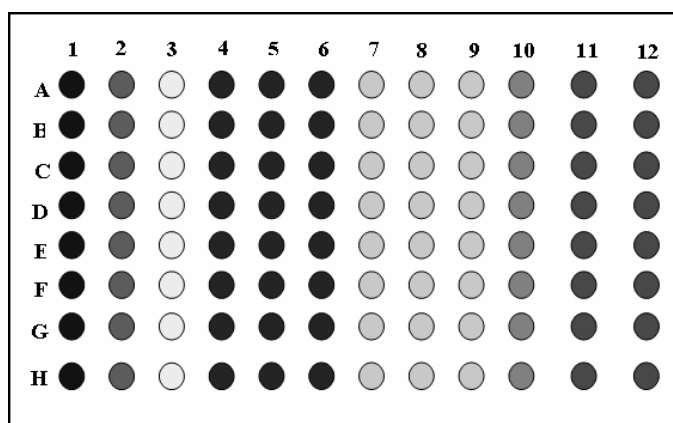


Figura 9: Esquema de microplaca de 96 orifícios, mostrando a distribuição das linhas e colunas, utilizada para a avaliação da CIM. Coluna 1: meio de cultura Muller Hinton; Coluna 2: controle de crescimento (meio de cultura com bactérias); Coluna 3: controle positivo (meio de cultura com antibiótico e bactérias); Colunas 4 a 6: amostra teste 1 (meio de cultura com extrato vegetal 1 e bactérias); Colunas 7 a 9: amostra teste 2 (meio de cultura com extrato vegetal 2 e bactérias); Coluna 10: controle negativo (meio de cultura com o solvente utilizado e bactérias); Colunas 11 e 12: controle dos extratos 1 e 2, respectivamente.

2.7.1.1. Leitura espectrofotométrica das microplacas

Ao término da incubação, as microplacas foram submetidas à leitura em leitor de microplacas (Bio-Rad® 550) a 595 nm, onde tiveram seus valores registrados, para a avaliação da atividade antibacteriana e CIM (ELLOF, 1998; NCCLS, 2003).

2.7.1.2. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) a partir do método de diluição em microplacas

Após a leitura espectrofotométrica e registro dos dados, as misturas contidas nos orifícios das microplacas, que apresentaram turvação característica, foram utilizadas para a realização da semeadura em placas de ágar Muller-Hinton para a determinação da CBM das amostras vegetais.

2.7.1.3. Leitura das microplacas utilizando resazurina como revelador

Após a leitura espectrofotométrica e semeadura em placas para a determinação da CBM, foi desenvolvido o método de resazurina para a determinação da atividade antibacteriana e CIM. Para isto, foram adicionados aos 96 orifícios das microplacas, 50 µL do corante resazurina (fenoxazin-3-ona), preparados na concentração de 0,1 mg/mL em água purificada. Utilizada como indicador de óxido-redução, a resazurina apresenta-se de coloração azul em meio oxidado e de coloração rósea em meio reduzido. Posteriormente, as microplacas foram incubadas em estufa à temperatura de 37 ± 1 °C, por no máximo duas horas, para a viragem de coloração. A CIM foi então determinada e definida como a menor concentração da amostra vegetal capaz de impedir a mudança de cor, ou seja, de inibir o crescimento celular (PALOMINO et al., 2002; MONTEJANO et al., 2005).

3. Resultados e discussão

3.1. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas com leitura espectrofotométrica

Os testes de diluição em microplacas foram realizados conforme descritos na metodologia para a avaliação da atividade antibacteriana (item 2.8.) As amostras avaliadas foram representadas pelo extrato etanólico, fração hexânica, fração de acetato de etila, fração butanólica e fração aquosa.

A atividade antibacteriana e a CIM do extrato e frações do extrato vegetal testados podem ser observados pela leitura espectrofotométrica no comprimento de onda a 595 nm. O valor da CIM preconizada pelo National Committee for Clinical Laboratory (NCCLS) frente a

bactérias é descrito como a menor concentração de um agente antibacteriano que impede o crescimento visível de um micro-organismo em testes de sensibilidade.

As Figuras 10 a 14 revelam os perfis de susceptibilidade ou resistência das cepas de referência *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* às amostras vegetais testadas e os valores das CIMs estão representadas na Tabela 7.

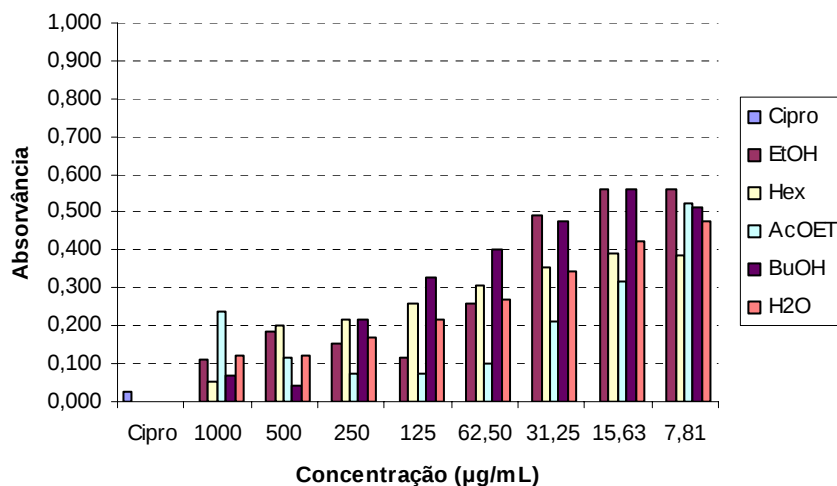


Figura 10: Atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações obtidas frente a *S. aureus*

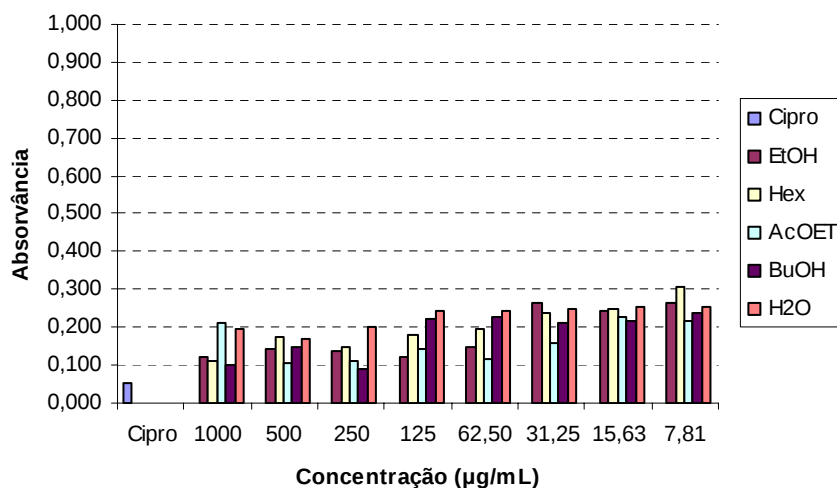


Figura 11: Atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações obtidas frente a *E. faecalis*

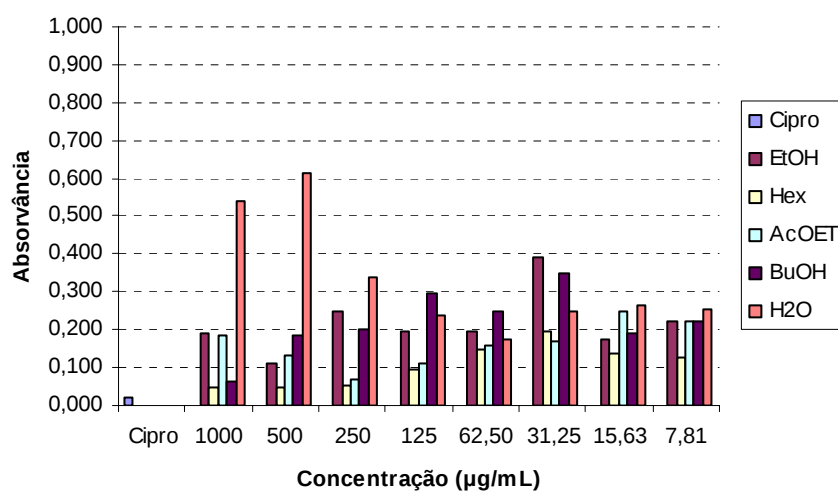


Figura 12: Atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações obtidas frente a *B. subtilis*

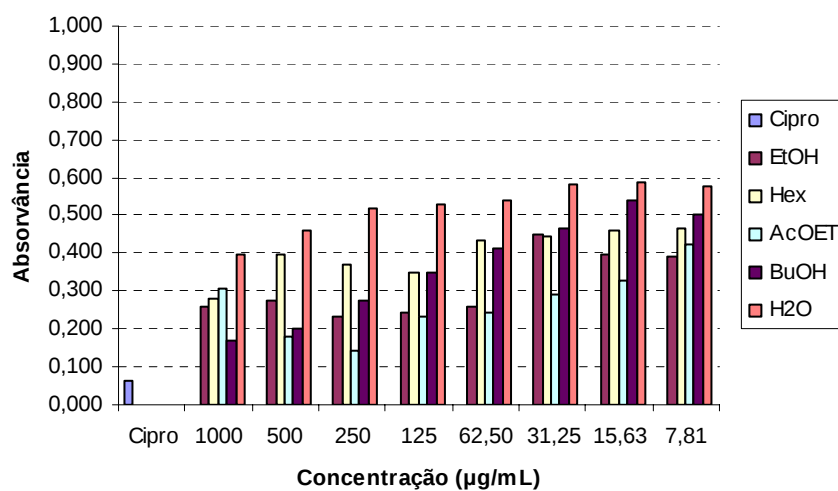


Figura 13: Atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações obtidas frente a *E. coli*

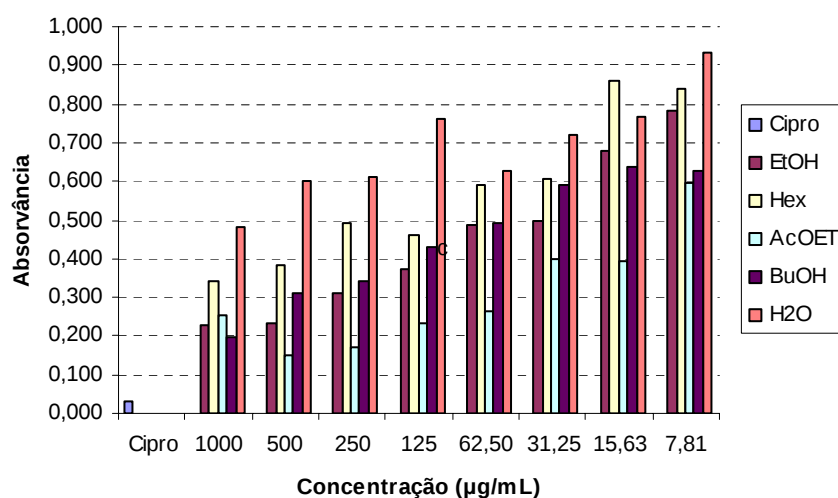


Figura 14: Atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações obtidas frente a *P. aeruginosa*.

Tabela 7: Determinação da atividade antibacteriana e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL, pela técnica de diluição em microplacas com leitura espectrofotométrica

Micro-organismos	Microdiluição da amostra vegetal (µg/mL)				
	Extrato etanólico	Fr. Hexano	Fr. Acetato	Fr. Butanol	Fr. Aquosa
<i>S. aureus</i>	125	1000	62,5	500	1000
<i>E. faecalis</i>	62,5	250	31,25	250	> 1000
<i>B. subtilis</i>	1000	250	250	1000	> 1000
<i>E. coli</i>	62,5	> 1000	> 1000	500	> 1000
<i>P. aeruginosa</i>	125	125	62,5	1000	> 1000

A concentração inicialmente testada foi de 1000 µg/mL indicando que se não houve atividade antibacteriana nesta concentração, o que não quer dizer que a amostra vegetal não tenha atividade contra as bactérias testadas em concentrações superiores a esta ou em outras que não foram testadas.

Os melhores resultados observados foram obtidos com a fração acetato de etila frente às bactérias: *E. faecalis* (CIM = 31,25), *S. aureus* e *P. aeruginosa* (CIM = 62,5), *B. subtilis* (CIM = 250) e, com o extrato etanólico frente às bactérias: *E. faecalis* e *E. coli* (CIM = 62,5), *S. aureus* e *P. aeruginosa* (CIM = 125) e, ainda, com a fração hexano frente às bactérias: *P. aeruginosa* (CIM = 125), *E. faecalis* e *B. subtilis* (CIM = 250).

3.2. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas utilizando resazurina como revelador

Segundo PALOMINO et al. (2002) e MONTEJANO et al. (2005), a resazurina é um corante diferencial que permite avaliar de forma relativa a viabilidade, contaminação bacteriana e a atividade antimicrobiana em função da mudança de cor no corante. A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi então determinada e definida como a menor concentração da amostra vegetal capaz de impedir a mudança de coloração azul para a coloração rósea. A viragem da coloração de resazurina na microplaca pode ser observada nas Figuras 15 a 17 e, os resultados das análises frente às cepas testadas estão apresentados na Tabela 8 com os valores da CIM correspondentes.

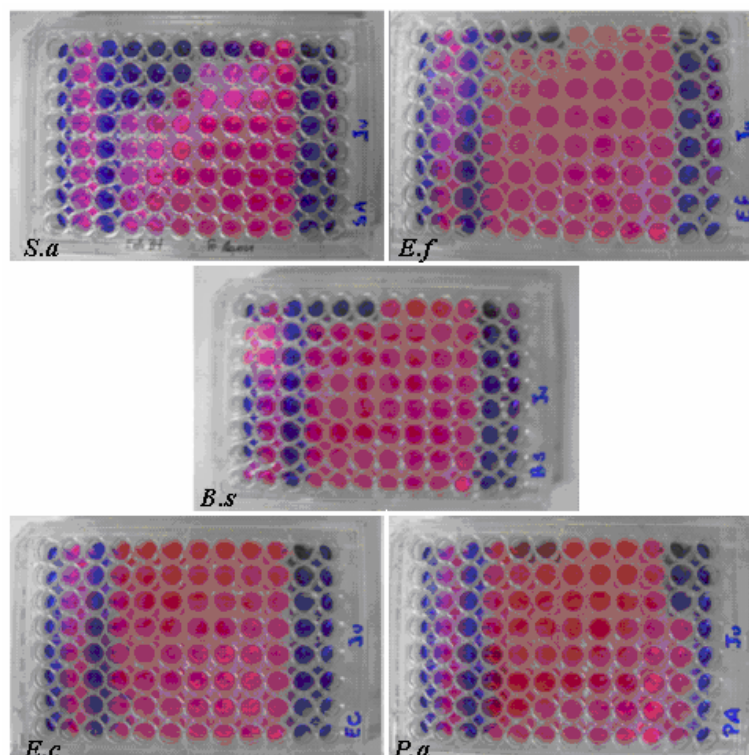


Figura 15: Teste de diluição em microplacas utilizando resazurina como revelador, na determinação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM), para o extrato etanólico (4, 5 e 6) e fração aquosa (7, 8, e 9), frente as cepas referências *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*

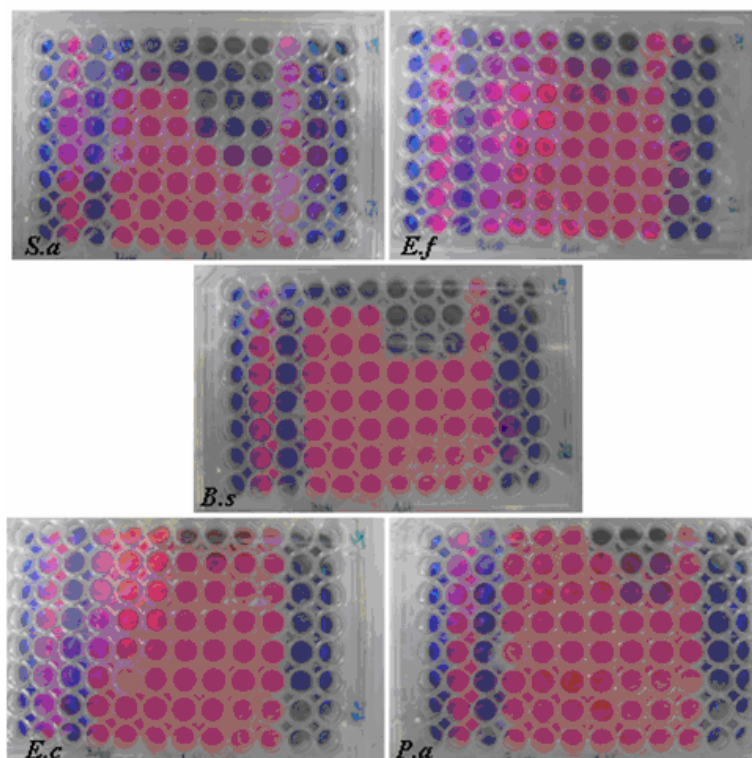


Figura 16: Teste de diluição em microplacas utilizando resazurina como revelador, na determinação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM), para a fração butanólica (4, 5 e 6) e fração acetato de etila (7, 8, e 9), frente as cepas referências *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*

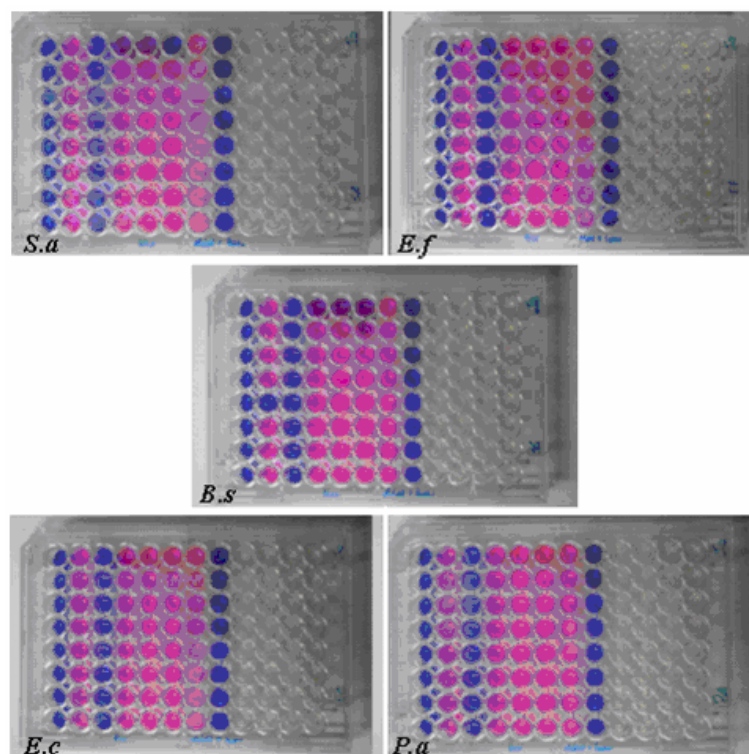


Figura 17: Teste de diluição em microplacas utilizando resazurina como revelador, na determinação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM), para a fração de hexano (4, 5 e 6), frente as cepas referências *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*

Tabela 8: Determinação da atividade antibacteriana e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL, pela técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador

Micro-organismos	Microdiluição da amostra vegetal (µg/mL)				
	Extrato etanólico	Fr. Hexano	Fr. Acetato	Fr. Butanol	Fr. Aquosa
<i>S. aureus</i>	250	1000	62,50	500	1000
<i>E. faecalis</i>	1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000
<i>B. subtilis</i>	1000	> 1000	250	1000	> 1000
<i>E. coli</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>P. aeruginosa</i>	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 8) pode-se dizer que a fração de acetato de etila de *S. terebinthifolius* apresentou uma melhor atividade contra *S. aureus* (CIM = 62,5) e também para *B. subtilis* (CIM = 125) em relação aos outros extratos testados, sendo observado uma ação também do extrato bruto para *S. aureus* (CIM = 250).

Uma das vantagens da CIM é que esta pode ser ampliada para determinar a CBM, a menor concentração de amostra vegetal capaz de destruir o micro-organismo. Para tal, as

amostras vegetais diluídas (CIM) foram subcultivadas em placas contendo ágar Muller-Hinton e incubadas durante 24 horas à temperatura de 37 °C.

3.3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) das amostras vegetais que apresentaram atividade antibacteriana

Este teste consiste verificar em quais concentrações as substâncias que possuem atividade antibacteriana são bacteriostáticas ou bactericidas. Os resultados para esta determinação estão apresentados de acordo com a Tabela 9.

De acordo com os resultados obtidos para CBM (Tabela 9) pode-se dizer que o extrato etanólico, a fração de acetato de etila e a fração butanólica apresentaram ação bactericida para as bactérias Gram-positivas: *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis* na concentração indicada na Tabela 8 sendo que, em concentrações diferentes a esta e, juntamente com as frações aquosa e hexânica, são consideradas como bacteriostático para as bactérias testadas.

Tabela 9: Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das amostras vegetais que apresentaram atividade antibacteriana

Micro-organismos	CBM da amostra vegetal em ágar Muller-Hinton (µg/mL)				
	Extrato etanólico	Fr. hexano	Fr. Acetato	Fr. Butanol	Fr. aquosa
<i>S. aureus</i>	500	*	1000	250	*
<i>E. faecalis</i>	*	*	*	500	*
<i>B. subtilis</i>	1000	*	1000	250	*
<i>E. coli</i>	*	*	*	*	*
<i>P. aeruginosa</i>	*	*	*	*	*

* Ação bacteriostática

Os resultados de atividade antibacteriana obtidos com a análise dos dados da leitura espectrofotométrica não foram idênticos aos obtidos com a análise dos dados utilizando a resazurina como revelador.

Os resultados das análises de leitura espectrofotométrica revelaram uma maior sensibilidade do teste, apresentando uma melhor atividade das amostras vegetais, em relação aos resultados do teste obtidos com a resazurina. Isso possivelmente ocorre devido ao ponto de viragem do revelador que é influenciado pelo pH e consequentemente pelo número de bactérias que há em cada orifício da microplaca.

Em linhas gerais as amostras vegetais apresentam atividade antibacteriana promissora, destacando-se a atividade da fração de acetato de etila, o que justifica a continuidade destes estudos.

4. Conclusão

Embora o mecanismo de ação da atividade antimicrobiana dos compostos presentes em *Schinus terebinthifolius* não seja conhecido, sugere-se enfatizar, para a fração de acetato de etila, um mecanismo de ação, como sendo este exercido pela sua atividade bacteriostática e não bactericida, em função dos resultados do CBM. A atividade antibacteriana está relacionada aos compostos bioativos da planta, os quais foram caracterizados pelas análises histoquímica, conforme item 3.2. do capítulo II e, triagem fitoquímica, conforme item 3. do capítulo IV. Mas, não se pode afirmar, neste caso, quais desses compostos químicos, isolados ou em associação, exercem a atividade antimicrobiana. Embora, observou-se a inexistência de uma ação sinérgica, para *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, pois o extrato etanólico apresentou atividades diferentes às suas frações ou, pode ser que, estes compostos, do extrato etanólico, estejam diluídas o suficiente para não demonstrar atividade. Entretanto, observou-se, para *E. coli*, uma ação sinérgica do extrato etanólico às suas frações.

O uso de extratos vegetais, tanto na medicina quanto na indústria farmacêutica, para o controle dos micro-organismos, é um fato real. Isso mostra que pode haver outras vias de obtenção destes agentes em vegetais superiores, além da via comum, que são os antibióticos. Assim, essa é uma das possíveis alternativas existentes, para que num futuro próximo, a aroeira-vermelha possa vir a ser empregada para o controle terapêutico de bactérias, que a cada dia tornam-se mais resistentes à ação dos muitos antibacterianos empregados atualmente.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo inicial para a caracterização anatômica dos folíolos, para o controle de qualidade da droga vegetal e determinação da sua composição em metabólitos secundários, tanto histoquímica quanto fitoquímica, bem como no subsequente potencial farmacêutico desses componentes, executado em *Schinus terebinthifolius*, de uso em medicina tradicional, contribuiu para o aumento destas informações na literatura, bem como para o arsenal terapêutico mundial. Fato este firmado pelo interesse demonstrado pelo Ministério da Saúde, com a inclusão e divulgação, em fevereiro de 2009, da espécie *S. terebinthifolius* na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus).

O interesse pelo estudo das folhas de *S. terebinthifolius* surgiu primeiramente pelo fato da sua utilização popular na terapêutica seguir a indicação farmacopeica, a qual designa a casca do tronco como farmacógeno e, pelo impacto ambiental decorrente deste fato, despertando a preocupação, sobre a coleta incorreta do material vegetal, o que pode dificultar a permanência da espécie em sua área de domínio.

A utilização de drogas vegetais requer um rigoroso controle de qualidade. Esse controle está definido nas Farmacopeias e também na literatura assessora, indicando métodos analíticos para tal. O estudo anatômico faz-se necessário para garantir e confirmar a identidade da espécie avaliando, por exemplo, seus caracteres, inclusões celulares, bem como seus constituintes ativos. Os estudos físico-químicos possibilitaram a verificação da autenticidade e da pureza da droga vegetal.

Correlacionando as informações obtidas da triagem fitoquímica preliminar para os grupos de metabólitos secundários caracterizados no extrato etanólico e nas frações do extrato, com os dados obtidos da análise histoquímica de folhas de *S. terebinthifolius* pode-se constatar a relação de positividade existente entre as análises executadas para ambos. Portanto, uma análise histoquímica bem executada pode nortear os estudos fitoquímicos de forma robusta.

A avaliação do potencial antibacteriano demonstrado nesse estudo reforça a utilização dessa espécie vegetal na medicina popular e, justifica ainda, a continuidade desta investigação

utilizando-se outros grupos de micro-organismos para a contribuição científica de seu perfil biológico.

A investigação até agora realizada, culmina numa pequena parte do que, até o momento, ainda está por se fazer, já que é grande o número de plantas ainda não estudadas, tanto no sentido de uma utilização direta, como da obtenção de novos constituintes bioativos, ou de novas moléculas que possam servir para semi-sínteses de compostos farmacologicamente ativos.

As metodologias utilizadas, bem como os resultados até este momento obtidos, servirão como base para orientar futuras investigações no estudo da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, bem como colaborar com estudos voltados para plantas medicinais e drogas vegetais, visando à obtenção de novos fitomedicamentos.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALBERTON, J.R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L.V.S.; FRANCO, S.L.; LIMA, M.A.P. Caracterização farmacognóstica de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Rev Bras Farmacog**, v. 11, n. 1, p. 37-50, 2001.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev Bras Farmacog**, v. 16, supl, p. 678-689, dez. 2006.

ALLARDICE, P.; BONE, K.; HUTCHISON, F. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil, 1999. p. 416.

AMOSTRAGEM. Métodos de farmacognosia. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. I, p. V.4.2.1.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR, L.V. **Farmacotécnica**: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Premier, 2000. 177 p.

AROEIRA brasileira: *Schinus terebinthifolius*. Disponível em: <<http://www.aromalandia.com.br/aroeira.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2009.

AROEIRA mansa: *Schinus terebinthifolius*. Disponível em: <http://www.jardineiro.net/br/banco/schinus_terebinthifolius.php>. Acesso em: 15 nov. 2009.

AROEIRA vermelha: *Schinus terebinthifolius*. Disponível em: <http://www.achetudoeregiao.com.br/arvores/Aroeira_vermelha.htm>. Acesso em: 15 nov. 2009a.

AROEIRA vermelha: *Schinus terebinthifolius*. Disponível em: <<http://www.arvores.brasil.nom.br/florin/aroeivm.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2009b.

AROEIRA. 2008. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Aroeira>>. Acesso em: 27 set. 2008.

AROEIRA. Monographias sobre as drogas vegetais e animais. In: PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Ed. Nacional, 1929. p. 100-101.

ASCENSÃO, L. **Técnicas histoquímicas convencionais de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de Cerrado**. Botucatu: IB-UNESP, 2003. 20p.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.162-168, 177-184.

BAGGIO, A.J. Aroeira como potencial para usos múltiplos na propriedade rural. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 17, p.25-32, dez. 1988.

BALLVÉ, A.C.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A.A.B.; DEUD JOSÉ, K.F. **Plantas medicinais de uso popular**: atlas farmacognóstico. Canoas: Ed. da ULBRA, 1995. 205p.

BANDONI, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina: **Editorial de La Universidad Nacional de La Plata**, 2000. p. 417.

BENDAZZOLI, W.S.; Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. **Mundo Saúde**, v. 24, n. 2, p. 123-126, mar/abr. 2000.

BRAGA, R.A. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960. p. 540.

BRANDÃO, M.G.L.; ALVES, R.M.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, P.; VIEIRA, M.T.; MOREIRA-CAMPOS, L.M. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. **Rev Bras Pl Med**, v.5, n.1, p.56-59, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Leis, decretos, etc... Resolução nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 mar. 2004.

CAIN, A.J. The use of Nile Blue in the examination of lipids. **Q J Microsc Sci**, v.88, p.383-392, 1947.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicine (phytoterapeutic agents). **Braz J Med Biol Res.**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, M.G.; FREIRE, F.D.; RAFFIN, F.N.; ARAGAÃO, C.F.S.; MOURA, T.F.A.L. LC determination of gallic acid in preparations derived from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Chromatographia**, v. 69, p. 249-253, 2009.

CAVALHER-MACHADO, S.C.; ROSAS, E.C.; BRITO, F.A.; HERINGE, A.P.; OILVEIRA, R.R.; KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES, M.G.M.O. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **Int Immunopharmacol**, v. 8, p. 1552-1560, 2008.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H.G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 597-599, 2007.

CEZAR-JUNIOR, L.A.; LEGRAMANDI, V.H.P.; SACRAMENTO, L.V.S. Estudo histoquímico das folhas de *Casearia sylvestris*. In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS, 8., 2008, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 2008. p. 26.

CORRÊA, C.C.; ALVES, A.F. **Plantas medicinais como alternativa de negócios: caracterização e importância**. In: Congresso Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Maringá, 2 p., julho, 2008. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/9/418.pdf>>. Acesso em: 05 nov. 2009.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Quim Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

COSTA, A.F. **Farmacognosia: farmacognosia experimental**. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. p. 303, 308-309. v. 3.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clin. Microbial. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564-82, 1999.

CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 4, 7, 10.

CUNHA, A.P.; ROQUE, O.R. Interesse da indústria farmacêutica pelas matérias-primas vegetais. In: CUNHA, A.P.da. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 58-59.

CUNHA, A.P.; ROQUE, O.R. Obtenção de moléculas com actividade farmacológica a partir de material vegetal e sua transformação em medicamento. In: CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 110.

DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris**. v. 258, p.1338-1340, 1964. (Série D)

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 617-622, maio/jun., 2005.

DENSIDADE. Métodos gerais. In: FARMACOPEIA brasileira. 3. ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977. p. 38, 914.

DETERMINAÇÃO da granulometria dos pós. Métodos físicos e físico-químicos. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. I, p. V.2.11.

DETERMINAÇÃO da perda por dessecação. Métodos físicos e físico-químicos. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. I, p. V.2.9.

DETERMINAÇÃO de cinzas insolúveis em ácido. Métodos de farmacognosia. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. I, p. V.4.2.5.

DETERMINAÇÃO de cinzas totais. Métodos de farmacognosia. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. I, p. V.4.2.4.

DETERMINAÇÃO do pH. Métodos físicos e físico-químicos. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. I, p. V.2.19.

DETERMINAÇÃO do pH. Métodos físicos e físico-químicos. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. I, p. V.2.19.2.

DETERMINAÇÃO do resíduo sólido de vegetal fresco. Métodos de preparação de forma farmacêutica básica. In: FARMACOPEIA Homeopática Brasileira. Métodos gerais. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997. pt. I, p. X-1.

DI-STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002. p. 340-350.

EISENBERG, D.M.; DAVIS, R.B.; ETTNER, S.L.; APPEL, S.; WILKEY, S.; VAN ROMPAY, M.; KESSLER, R.C. Trends in alternative medicine use in United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. **JAMA**, Chicago, v. 280, n. 18, p. 1569-1575, 1998.

ELLOF, J.N.A. A Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Med.**, v. 64, p. 711-713, 1998.

EL-MASSRY, K.F.; EL-GHORAB, A.H.; SHAABAN, H.A.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **J Agric Food Chem**, v. 57, p. 5265-5270, 2009.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2001. p. 165-166, 168-171, 175,177.

FAMÍLIA Anacardiaceae. Disponível em:<<http://www.arbolesornamentales.com/familias.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2009.

FARAG, S.F. Polyphenolic compounds from the leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **J Pharm Sci**, v. 31, p. 319-329, pt. 2, 2008.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2001. p. 199-203.

FARMACOPEIA brasileira. 3. ed. São Paulo: Andrei, 1977. p. 38.

FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. I, p. V.2.9., V.2.11., V.2.19., V.2.19.2., V.4.2.1., V.4.2.3., V.4.2.4., V.4.2.5.

FERRITER, A. **Brazilian pepper management for Florida**. Recommendations from the Brazilian pepper task force Florida exotic pest plant council, 1997.

FIGUEIREDO, L. Aroeira vermelha. **Terra da Gente**, São Paulo: n. 57, p. 45-46, jan. 2009.

FISCHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v. 16, p. 92-96, 1968.

GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson e Cie, 1968. 1113 p.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histochimie normale et pathologique**. Paris: Gauthier, Villars. 1969-1970. v. 2.

GAZZANELO, L.R.S.; LUCENA, R.F P.; ALBUQUERQUE, U.P. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **J Ethnobiol Ethnomed**, London, v. 1, p. 1-9, 2005.

GEHRKE, I.T.S.; STOLZ, E.D.; MOREL, A.F. Identificação dos principais constituintes do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* da região noroeste do RS. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2007.

GEISSMAN, T.A.; GRIFFIN, T.S. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid structure determination. **Phytochemistry**, v.10, p.2475-2485, 1971.

GHOUSE, A.K.M.; YUNUS, M. Preparation of epidermal peels from leaves of gymnosperms by treatment with hot, 60% HNO₃. **Stain Technol**, v. 47, p. 322-324, 1972.

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKKE, C. Physicians desk references (PDR) for herbal medicines. **Med Econ Co**, New Jersey, p. 858, 2000.

GUERRA, M.J.M.; BARREIRO, M.L.; RODRIGUEZ, Z.M.; RUBAICABA, Y. Actividad antimicrobiana de um extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Rev Cubana Plant Med**, v. 5, p. 23-25, 2000.

HARDMAN, R.; SOFOWORA, E.A. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. **Stain Technol**, v. 47, p. 205-208, 1972.

HIGUCHI, C.T. **Byrsonima spp**: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicrobiana e citotoxicidade de extratos e seus derivados. Araraquara, 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. p. 18

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**: principles and practice. San Francisco: WH Freeman, 1962. 408p.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.

JORGE, L.I.F.; MARKMANN, B.E.O. Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). **Rev Ciênc Farm**, São Paulo, v.17, p.139-145, 1996.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. v. 1, 198p.

LAWRENCE, B. A discussion of *Schinus molle* and *Schinus terebinthifolius*. **Perfumer & Flavorist**, v. 9, p. 65-69, 1984.

LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; KATZIR I.; RAVID U.; PUTIEVSKY E.; JOEL, D.M. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf., Poaceae). **Annals Botany**, v. 81, p. 35-39, 1998.

LIMA, E.O.; GUERRA, M.F.L.; SILVA, M.G. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). **Rev Bras Farm**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 3/4, p. 95-97, 2000.

LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P.; MARQUES, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v. 105, p. 137-47, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 1992. 360 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, 8 p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Plantarum, 2002. p. 49-59.

LÚCIO, E.M.R.A. Triagem farmacológica e triagem fitoquímica. In: SHARAPIN, N.; ROCHA, L.M.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A.; SANTOS, E.V.M.; ALMEIDA, J.M.L. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciências e Tecnologia para o Desenvolvimento, 2000. p. 197, 200,

MACE, M.E.; HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p.1297-1302, 1974.

MARTÍNEZ, M.J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, N.; JAUREGUI, A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v. 52, p. 171-174, 1996.

MARTINZ, A.B.; SACRAMENTO, L.V.S. Análise microscópica e física para controle de qualidade primário de matéria-prima vegetal pulverizada. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 16., 2004, Ilha Solteira. **Anais...** Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2004.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária UFC, 2000. 344p.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidade. 4. ed. Fortaleza: UFC, 2002. 267 p.

MCMANUS, J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technol**, v. 23, p. 99-108, 1948.

MELO-JÚNIOR, E.J.M.; RAPOSO, M.J.; LISBOA-NETO, J.A.; DINIZ, M.F.A.; MARCELINO-JÚNIOR, C.A.C.; SANT'ANA, A.E.G. Medicinal plants in the healing of dry sockets in rats: microbiological and microscopic analysis. **Phytomedicine**, Jena, v. 9, p. 109-116, 2002.

MÉTODO gravimétrico: procedimento para drogas vegetais. Água. Métodos gerais. In: FARMACOPEIA brasileira. 3. ed. São Paulo: Andrei, 1977. 914p.

MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTI, S. G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin and resorufin by *p*-benzoquinones in polar solvents. **Dyes Pigm.**, n. 64, p. 117-124, 2005.

MOURA, F.T.; VIEIRA, M.A.R.; FACANALI, R.; HABER, L.L.; OLIVEIRA, F.; MARQUES, M.O.M. Caracterização química do óleo essencial de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Aroeira vermelha). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 4., 2007, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2007.

NCCLS - **National Committee for Clinical Laboratory Standards Approved Standard**, M 27 - A, USA. 2003.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Pautas generales para las metodologías de investigación de la medicina tradicional. Ginebra, 2000. Disponível em <http://www.who.it/em>. Acesso em: 10 ago. 2004.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Pautas para a evaluación de medicamentos herbários**. Ginebra, 1991. Disponível em <http://www.who.it/em>. Acesso em: 10 ago. 2004

PACIORNIK, E.F. **A planta nossa de cada dia**. Curitiba: Copygraf, 1990. 24 p.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PANETTA, F.D.; MCKEE, J. Recruitment of the invasive ornamental, *S. terebinthifolius*, is dependent upon frugivores. **J Ecol**, v. 22, p. 432-438, 1997.

PARANHOS, A. Cultura de célula e tecidos vegetais in vivo: uma fonte alternativa de metabólitos secundários. In: CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2005. 66p.

PESSINI, G.L.; HOLESTZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Rev Bras Farmacog**, v. 13, supl., p. 21-24, 2003.

PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Ed. Nacional, 1929. p. 100-101.

PIO CORRÊA, M.; **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. 1.

QUEIRES, L.C.; FAUVEL-LAFETVE, F.; TERRY, S.; TAILLE, A.; KOUYOUMDJIAN, J.C.; CHOPIN, D.K.; VACHEROT, F.; RODRIGUES, L.E.; CREPIN, M. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius* Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. **Anticancer Res**, v. 26, n. 1A, p. 379-87, 2006.

QUEIRES, L.C.S.; RODRIGUES, L.E.A. Quantificação das substâncias fenólicas totais em órgãos da aroeira *Schinus terebinthifolius* (Raddi). **Braz Arch Biol Technol**, v. 41, p. 247-253, 1998.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Rev Bras Farmacog**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

RAUHA, J.P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.

REICHERT, B.; FRERICHS. **Tratado de farmácia practica**. Barcelona: Editorial Labor, 1945. v. 4, 772 p.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. **Sellowia**. Anais Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues, v. 70, n. 34/35, p. 5-483, 1983.

ROCHA, L.M. Controle de qualidade de produtos fitoterápicos. In: SHARAPIN, N.; ROCHA, L.M.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A.; SANTOS, E.V.M.; ALMEIDA, J.M.L. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciências e Tecnologia para o Desenvolvimento, 2000. p.160, 163-164.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 42p.

RUZIN, S.E. **Plant microtechnique and microscopy**. New York: Oxford University Press, 1999. 322p.

SACRAMENTO, L.V.S. **Estudo farmacobotânico de espécies medicinais**: produção vegetal, análise anatômica-histoquímica e caracterização granulométrica de drogas pulverizadas. Araraquara, 2009. Tese (Livre Docência). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, p. 70-71.

SALVI JÚNIOR, A.; GODINHO, C.C.; SILVA, A.M.L.; LEGRAMANDI, V.H.P.; SACRAMENTO, L.V.S. Análise histoquímica e triagem fitoquímica preliminar de *Schinus terebinthifolius* Raddi: um estudo comparativo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 7., 2009, Maringá. **Anais...** Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Maringá, CD-ROM, 2009.

SALVI JÚNIOR, A.; SILVA, A.M.L.; CEZAR-JUNIOR, L.A.; SACRAMENTO, L.V.S. Análise histoquímica de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 20., INTERNATIONAL CONGRESS OF ETHNOPHARMACOLOGY, 10., 2008, São Paulo. **Anais...** Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, International Congress of Ethnopharmacology, São Paulo, CD-ROM, 2008. p. 133.

SANCHES, A.C.C. **Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos**. Araraquara, 2004. 214f. p. 61-63, 165, 167-168. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

SANCHES, A.C.C.; LOPES, G.C.; TOLEDO, C.E.M.; SACRAMENTO, L.V.S.; SAKURAGUI, C.M.; MELLO, J.C.P. Estudo morfológico comparativo das cascas e folhas de *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum* - Leguminosae. **Latin Am J Pharm**, v. 26, p. 362-368, 2007.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre: Feplan, 1985. 311p.

SANTOS, A.C.A.; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SANTOS, P.L.; SERAFINI, L.A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1011-1013, 2007.

SANTOS, E.B.; DANTAS, G.S.; SANTOS, H.B.; DINIZ, M.F.F.M.; SAMPAIO, F.C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Braz J Pharmacog**, v. 19 (1B), p. 321-324, jan./mar. 2009.

SANTOS, R.I.dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O. SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2001. p. 333-334.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.*, v. 30, n. 12, p. 1875-1883, 1991.

SCHINUS terebinthifolius Raddi. Plantas de interesse econômico e ecológico: aroeira-pimenteira. abril, 2008. Disponível em: <http://pt.wikibooks.org/wiki/Plantas_de_interesse_econ%C3%B4mico_e_ecol%C3%B3gico:Aroeira-pimenteira>. Acesso em: 29 mai. 2008c.

SCHINUS terebinthifolius: tree. Disponível em: <<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?fr=1&si=22>>. Acesso em: 13 jun. 2008d.

SCHINUS. julho, 2008. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Schinus>>. Acesso em: 27 jul. 2008a.

SCHINUS. julho, 2008. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Schinus>>. Acesso em: 27 jul. 2008b.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; ALVIANO, C.S.; COSTA, S.S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v. 96, p.563-568, 2005.

SHARAPIN, N.; ROCHA, L.M.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A.; SANTOS, E.V.M.; ALMEIDA, J.M.L. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciências e Tecnologia para o Desenvolvimento, 2000. p.23-25, 146-149.

SOARES, D.G.S.; OLIVEIRA, C.B de; LEAL, C.; DRUMOND, M.R.S.; PADILHA, W.W.N. Atividade antibacteriana *in vivo* da tintura de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na descontaminação de escovas dentais contaminadas pelo *S. mutans*. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, v. 7, p. 253-257, 2007.

SONAGLIO, D., ORTEGA, G.G., PETROVICK, P.R., BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2001. 224p.

SOUZA, T.M.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R. **Análise histoquímica das folhas de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae)**. In: Congresso Nacional de Botânica, 59, Natal. Anais, 2008.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) leaves. **Rev Bras Farmacog**, 2009.

SVENDSEN, A.B.; VERPOORTE, R. **Chromatography of alkaloids**. New York: Elsevier Scientific Publishing, 1983. 276 p.

TOSS, D.; STEFFANI, E.; STEDILE, M.; ATTI-SERAFINI, L.; SANTOS, A.C.A. **Extração de compostos fenólicos de *Schinus terebinthifolius* (aroeira) utilizando dióxido de carbono supercrítico**. Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC. Florianópolis, SC. julho/2006. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra/SENIOR/RESUMOS/resumo_2492.html>. Acesso em: 05/06/2008.

USP. Biblioteca virtual do estudante brasileiro: aroeira. Disponível em: <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/acervo/paradidat/frutas/aroeira/aroeira.html>>. Acesso em: 24 jan. 2002.

VELÁSQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; BUSCHIAZZO, P.M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 74, p. 91-97, 2003.

VON POSER, G.L.; MENTZ, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2001. p. 68-69.

WAGNER, H.M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984. 320p.

WANICK, M.C.; BANDEIRA, J.A. Ação anti-inflamatória e cicatrizante de *Schinus aroeira* Vell., em pacientes com cervicite e cervicovaginite. **Rev Inst Antibiot**, Recife, v. 14, p. 105-106, 1974.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.