

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

“*SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI: ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E
INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS E
FRAÇÕES”.

ADEMIR SALVI JÚNIOR
FARMACÊUTICO INDUSTRIAL



ARARAQUARA - SP
2013

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

“*SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI: ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E
INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS E
FRAÇÕES”.

ADEMIR SALVI JÚNIOR
FARMACÊUTICO INDUSTRIAL

Tese 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 Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento
CO-ORIENTADORA: Dra. Mary Ann Foglio

ARARAQUARA - SP

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S184s Salvi Junior, Ademir
Schinus terebinthifolius Raddi: estudo farmacognóstico e investigação da atividade biológica de extratos e frações / Ademir Salvi Junior. – Araraquara, 2013.
140 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Luís Vitor Silva do Sacramento.
Coorientadora: Mary Ann Foglio.

1. *Schinus terebinthifolius*. 2. Aroeira-vermelha. 3. Atividade antimicrobiana.
4. Atividade antitumoral. 5. Controle de qualidade. I. Sacramento, Luís Vitor Silva do,
orient. II. Foglio, Mary Ann, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005

Folha de aprovação

ADEMIR SALVI JÚNIOR

“*SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI: ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E INVESTIGAÇÃO
DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS E FRAÇÕES”

A Comissão Examinadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 29 de agosto de 2013, considerou o candidato Ademir Salvi Júnior **aprovado** para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - Divisão de Microbiologia
da Universidade Estadual de Campinas

Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - Divisão de Farmacologia e
Toxicologia da Universidade Estadual de Campinas

Dra. Tais Maria Bauab

Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
do Câmpus de Araraquara da UNESP

Dr. André Gonzaga dos Santos

Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
do Câmpus de Araraquara da UNESP

Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento - Orientador

Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
do Câmpus de Araraquara da UNESP

Dedicatória

Tudo está ligado, como o sangue que une uma família.

Todas as coisas estão ligadas.

O que acontece a Terra recai sobre os filhos da Terra.

Não foi o homem que teceu a trama da vida.

Ele é só um fio dentro dela.

Tudo o que fizer à teia, estará fazendo a si mesmo.

(Chefe Seattle - 1856)

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

À minha família:

À minha esposa Carolina, que com palavras não consigo descrever o quanto significa para mim. Como uma "Pedra Angular", pela sua mediação, me trouxe o equilíbrio para balancear as ideias concorrentes apostas que habitavam em meu pensamento, sendo fundamental, central, em minhas tomadas de decisões. Guardo-lhe o mais profundo agradecimento, meu eterno amor, por ter aceito a privação da minha companhia em função dos estudos e do trabalho, concedendo-me a oportunidade de me realizar ainda mais. Obrigado pelo seu respeito e amor, por existir e estar comigo.

Ao meu pai Ademir e minha mãe Terezinha, enquanto pessoas igualmente belas e admiráveis em essência, que como uma "Pedra Fundamental", foram a peça inicial de grande importância para as bases da edificação de minha educação, de minha vida, por constituírem estímulos e atitudes que bem influenciaram minha pessoa impulsionando-me a buscar vida a cada momento, a buscar meus sonhos, a traçar metas e estabelecer prioridades para atingir meus objetivos.

Ao meu irmão, Adriano, pela nossa infância, pela cumplicidade no olhar, pelas fantasias e sonhos, pelas nossas conquistas, pela atenção, dedicação, apoio, segurança, carinho e amor, por todos os momentos e por tudo que você representa para mim.

À minha avó e madrinha, Leonora, pelas orações a mim oferecidas durante toda essa caminhada, pela sua alegria, seu carinho e afeto.

Agradecimentos

"Enquanto os rios correrem para o mar, os montes fizerem sombra aos vales e as estrelas fulgirem no firmamento, deve durar a recordação do benefício recebido na mente do homem reconhecido."

(Publio Marón Virgílio)

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.

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.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, pela orientação incondicional. Quando poderia ser simplesmente orientador, foi mestre, transmitindo-me seus conhecimentos e experiências, mostrando que a arte da vida faz pouca distinção entre o trabalho e o lazer, e simplesmente por sua visão de excelência, deixou para mim a decisão do saber. Expresso os meus maiores agradecimentos e o meu profundo respeito, que serão sempre poucos diante do muito que me foi ofertado.

À minha Co-orientadora, Profa. Dra. Mary Ann Foglio, pelo papel fundamental de sua orientação. Quando tudo parecia perdido, ajudou-me a procurar o que reflete o que sou e aquilo que mais desejo, colocando em minhas mãos ferramentas com as quais me dirigiram a novos horizontes. Expresso meus agradecimentos e minha profunda admiração.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp, à Seção de Pós-graduação, ao Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, ao Departamento de Fármacos e Medicamentos e a Biblioteca de Ciências Farmacêuticas, seus professores e servidores, pela seriedade, trabalho e empenho em suas atribuições e, incentivo à pesquisa.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), às Divisões de Fitoquímica, Agrotecnologia, Microbiologia e, Farmacologia e Toxicologia do CPQBA da Universidade Estadual de Campinas, seus pesquisadores e colaboradores, pelo acolhimento, estímulo, apoio e suporte técnico à pesquisa.

Ao Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal - UniPinhal, ao Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal, seus dirigentes, técnicos e demais colaboradores, pela oportunidade de pesquisa.

À CAPES e ao PADC/FCF-UNESP pelo apoio financeiro ao desenvolvimento científico.

Aos Professores que participaram do Exame de Qualificação, Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, Dr. Aristeu Gomes Tininis e Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, pelos relevantes apontamentos e preparação para a defesa dessa tese.

Aos Professores que participaram da Comissão Examinadora de Defesa, Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, Dra. Tais Maria Bauab, Dr. André Gonzaga dos Santos e Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, pelas observações e contribuições dadas ao trabalho.

"Cada novo amigo que ganhamos no decorrer da vida aperfeiçoa-nos e enriquece-nos, não tanto pelo que nos dá, mas pelo que nos revela de nós mesmos."

(Miguel de Unamuno)

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.

Ao meu querido amigo Flávio dos Santos Campos, pela mão amiga, pela cumplicidade e pela sua amizade tão sincera, pela convivência, pelos ouvidos sempre disponíveis, mesmo quando só tinha "besteiras" pra dizer, pelos conselhos nos momentos de dificuldade e pelos momentos filosóficos e insanos.

Aos amigos (...) do Laboratório de Botânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, que participaram das atividades desenvolvidas neste trabalho, em especial à técnica do laboratório, Angélica Barretto, por todos os momentos vividos neste tempo, pela amizade, cumplicidade, dedicação, carinho e afeto.

Aos amigos (...) do CPQBA-Unicamp, pela amizade, parceria e ajuda que me foram dispensados, por terem tomado muitos dos ensaios como se fossem seus, em especial à técnica da Divisão de Fitoquímica, Ilza Maria de Oliveira Sousa, aos bolsistas da Divisão de Microbiologia, Vivian Fernandes Furletti Góes e Marcio de Oliveira e à pesquisadora da Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, pelo auxílio nos experimentos realizados em cada uma das Divisões.

Não poderia deixar de agradecer aos que fizeram possível a minha estada em Campinas, meus queridos amigos, padrinhos e madrinhas, Rebeca Martins Iricevolto, Carlos Alexandre de Oliveira Ferrari, Marcos Adriano Vieira Messias e Franciane Heloise Moraes Messias, pela imensa ajuda e convívio nesse período.

Divido com todos vocês esta etapa de minha vida.

Ademir Salvi Júnior

Epígrafe

“Para fazer face a situações assim, que me convencem de minha impotência, tenho aplicado, com vitória, uma estratégia que minha longa existência me fez aprender: entrego o problema ou entrego a mim mesmo, confiando na providência divina, e, portanto, predisposto a aceitar o que vier como resposta, e, numa prova de amor e fé, agradeço a Deus, antecipadamente, pela resposta que Ele achar melhor, seja qual for.

Entrego, confio, aceito e agradeço!”

(José Hermógenes de Andrade Filho)

RESUMO

SALVI JUNIOR, A. "***Schinus terebinthifolius* Raddi: estudo farmacognóstico e investigação da atividade biológica de extratos e frações**". Araraquara, 2013. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

A utilização de plantas medicinais vem atingindo um público cada vez maior visto o retorno à medicina natural. É fato preocupante o uso indiscriminado de plantas medicinais sem o devido conhecimento farmacognóstico. *Schinus terebinthifolius* Raddi, conhecida como aroeira-vermelha, é uma espécie arbórea nativa, com ocorrência na Mata Atlântica, Matas Ciliares e Cerrado. Suas propriedades farmacológicas têm despertado o interesse de grupos de pesquisa, desde sua inclusão na Farmacopeia Brasileira (1929) e recentemente figura como espécie de interesse na RENISUS (2009) e na RENAME (2012). Apesar de seu potencial farmacológico, a designação do farmacógeno, como sendo as cascas do tronco, parte da planta que depende de um processo de regeneração após sua retirada, o que de acordo com a demanda pode ser visto como um risco ambiental à espécie, este estudo busca o reconhecimento laboratorial das folhas da espécie como droga, visando sua conservação e utilização racional. Este trabalho teve como objetivo estudar os aspectos farmacognósticos de folhas de *S. terebinthifolius* Raddi, de três localidades, visando contribuir com informações referentes ao controle de qualidade físico-químico da droga vegetal, bem como avaliar a atividade antimicrobiana e antiproliferativa *in vitro* de extratos, óleo essencial e frações obtidas de folhas de *S. terebinthifolius*. As análises do controle de qualidade foram realizadas segundo normas farmacopeicas e não farmacopeicas, a atividade antimicrobiana segundo normas do CLSI para microdiluição em placa e bioautografia e a atividade antiproliferativa pelo ensaio da sulforrodamina B. Os resultados da caracterização físico-química apresentaram, como valores médios, resíduo sólido 40,32%, perda de água por secagem 59,68%, granulometria entre pó grosso e moderadamente grosso, tamanho médio das partículas 0,3102 mm, densidade 0,57 g/ml, perda de água por dessecação 7,54%, pH 4,12 U, cinzas totais 5,94%, cinzas insolúveis em ácido 0,36% e teor de extrativos 29,79%; a análise fitoquímica revelou a presença de grupamentos fenólicos, taninos e terpenoides; a atividade antimicrobiana apresentou-se como relevante, evidenciando uma melhor atividade do óleo essencial em relação aos extratos brutos, já para as frações apresentou-se como promissora para as frações FC_{EB}, FD_{EB} e FE_{EB} com seletividade para *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *F. nucleatum* e *C. albicans*, e para as frações FG_{OE}, FH_{OE} e FJ_{OE} com seletividade para *F. nucleatum*, *C. albicans*, *S. aureus*, *S. mitis* e *S. mutans*, e pelo ensaio de bioautografia delineou-se as bandas ativas (Rf) da amostra testada; e, a atividade antiproliferativa apresentou, de forma geral, uma melhor atividade dos extratos brutos em relação ao óleo essencial, já para as frações mostrou-se com atividade moderada para a fração FA_{OE}, com seletividade para a linhagem tumoral de ovário e pele, e com uma atividade fraca sobre as linhagens de leucemia, rim, queratinócito, mama e próstata, do mesmo modo, mostrou-se com atividade fraca para as frações FC_{EB} e FD_{EB}, com seletividade semelhante para a linhagem de próstata e fibroblasto embrionário murinho, e a FC_{EB} ainda apresentou seletividade para glioma e cólon. Em função dos resultados encontrados, pode-se concluir que as folhas da aroeira-vermelha apresentam metabólitos ativos com potencial de interesse farmacológico.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius*. aroeira-vermelha. controle de qualidade. atividade antimicrobiana. atividade antitumoral.

ABSTRACT

SALVI JUNIOR, A. "***Schinus terebinthifolius* Raddi: pharmacognosy study and investigation of the biological activity of extracts and fractions**". Araraquara, 2014. (Doctor in Pharmaceutical Sciences) Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

The use of medicinal plants has reached a increasing public since the return to natural medicine. It is a worrisome the indiscriminate use of medicinal plants without proper pharmacognostic knowledge. *Schinus terebinthifolius* Raddi, known as mastic-red, is a native tree species, occurring in the Atlantic Forest, Riparian Forest and Cerrado. Their pharmacological properties have attracted the interest of research groups, since their inclusion in the Brazilian Pharmacopoeia (1929) and recently attached as species of concern in the RENISUS (2009) and RENAME (2012). Despite their pharmacological potential, the designation of pharmacogeno, as the shells of the trunk, part of the plant depends on a regeneration process after withdrawal, according to the demand can be viewed as an environmental risk to the species, This study seeks recognition of laboratory sheets of the species as a drug, aiming their conservation and rational use. This work aimed to study the pharmacognostic aspects of leaves of *S. terebinthifolius* Raddi, of the three localities, to contribute with information relating to quality control physicochemical vegetal drug, as well as evaluate the antimicrobial and antiproliferative activity in vitro of extracts, essential oil and fractions obtained from leaves of *S. terebinthifolius*. The analyses of quality control were performed according to pharmacopoeical and non pharmacopoeical standards, the antimicrobial activity according to standards of the CLSI for microdilution plate and bioautography, and antiproliferative activity by the test of sulforhodamine B. The results of physicochemical characterization presented as mean values, solid residue 40.32%, water loss on drying 59.68%, grain size between coarse and moderately coarse powder, average particle size of 0.3102 mm, density 0.57 g/mL, moisture content of 7.54%, pH 4.12 U, total ash 5.94%, acid insoluble ash 0.36% and extractives content 29.79%; the phytochemical analysis revealed the presence of phenolic groups, tannins and terpenoids; the antimicrobial activity was presented as relevant, showing a better activity of essential oil compared to crude extracts, now for fractions appeared as promising for FC_{EB}, FD_{EB} and FE_{EB} fractions with selectivity for *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *F. nucleatum* and *C. albicans*, and for FG_{OE}, FH_{OE} and FJ_{OE} fractions with selectivity for *F. nucleatum*, *C. albicans*, *S. aureus*, *S. mitis* and *S. mutans*, and by bioautography assay delimited the active bands (Rf) of the sample tested; and, the antiproliferative activity showed, in general, a better activity of crude extracts compared to the essential oil, now for fractions it showed with moderate activity for FA_{OE} fraction with selectivity for tumor lineage ovarian and skin, and a weak activity against leukemia, kidney, keratinocyte, breast and prostate cell lines, similarly, it was shown with weak activity for FC_{EB} and FD_{EB} fractions with similar selectivity to lineage of prostate and mouse embryonic fibroblasts, and FC_{EB} still showed selectivity for glioma and colon, and FC_{EB} fraction still showed selectivity for glioma and colon cell lines. Due the these results, it can be concluded that the leaves of the mastic-red showed active metabolites with potential of interest pharmaceutical

Key words: *Schinus terebinthifolius*. mastic-red. quality control. antimicrobial activity. antitumor activity.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1. <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	14
1.1. Aspectos botânicos	15
1.2. Aspectos fitoquímicos	16
1.3. Aspectos etnobotânicos e farmacológicos	18
2. Parâmetros da qualidade da droga vegetal	20
3. Investigação fitoquímica de drogas vegetais	21
4. Investigação farmacológica de drogas vegetais	21
OBJETIVOS	23
1. Objetivo geral	23
2. Objetivos específicos	23
CAPÍTULO I - Caracterização físico-química da droga vegetal	24
1. Introdução.....	24
1.1. Estabelecimento dos parâmetros da qualidade	25
2. Materiais e métodos	26
2.1. Material botânico	26
2.2. Processamento pós-colheita para a obtenção da droga vegetal (seleção e secagem)	26
2.3. Determinação do resíduo sólido do vegetal fresco	26
2.4. Obtenção da droga vegetal pulverizada	27
2.5. Caracterização físico-química da droga vegetal pulverizada originada das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	27
2.5.1. Amostragem	27
2.5.2. Determinação da granulometria da droga vegetal pulverizada	27
2.5.2.1. Estudo e determinação do tamanho de partícula	28
2.5.3. Determinação da densidade	28
2.5.4. Determinação de água pela perda por dessecação	29
2.5.5. Determinação do pH	29
2.5.6. Determinação de cinzas totais	29
2.5.7. Determinação de cinzas insolúveis em ácido	30
2.5.8. Determinação de substâncias extraíveis	30
3. Resultados e discussão	32
3.1. Obtenção do material botânico e processamento pós-colheita para a obtenção da droga vegetal pulverizada	32
3.2. Caracterização físico-química da droga vegetal pulverizada originada das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	33
4. Conclusão.....	42

CAPÍTULO II - Estudo fitoquímico	43
1. Introdução.....	43
1.1. Análise fitoquímica preliminar	44
1.2. Processo extrativo: considerações gerais.....	45
1.3. Cromatografia em camada delgada.....	45
1.4. Cromatografia em coluna por adsorção.....	46
2.1. Processos fitoquímicos	47
2.1.1. Processos extrativos para a obtenção dos extratos brutos em diclorometano e etanol e, do óleo essencial de folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	47
2.1.2. Perfil cromatográfico dos derivados vegetais por cromatografia em camada delgada	48
2.1.3. Triagem fitoquímica por cromatografia em camada delgada.....	48
2.1.4. Fracionamento e purificação do extrato bruto e do óleo essencial	49
2.1.4.1. Fracionamento e purificação do extrato bruto por extração em fase sólida.....	49
2.1.4.2. Fracionamento e purificação do óleo essencial por cromatografia em coluna.....	50
3. Resultados e discussão	51
CAPÍTULO III - Avaliação da atividade antimicrobiana para micro-organismos orais	65
1. Introdução.....	65
1.1. Pesquisa da atividade biológica	66
1.2. Estudo antimicrobiano.....	66
2. Materiais e métodos	69
2.1. Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	69
2.1.1. Amostras vegetais.....	69
2.1.2. Micro-organismos.....	69
2.1.3. Meios de cultura	69
2.1.4. Estocagem e manutenção das cepas	70
2.1.5. Preparo do inóculo	70
2.1.5.1. Padronização da suspensão bacteriana.....	70
2.1.5.2. Padronização da suspensão de levedura.....	71
2.1.6. Preparo dos derivados vegetais para os ensaios de atividade microbiana.....	71
2.1.7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em placas	71
2.1.7.1. Método de microdiluição em placas.....	71
2.1.7.2. Leitura das placas utilizando solução de cloreto de trifênil tetrazólio como revelador para determinação da CIM.....	73
2.1.8. Determinação da concentração bactericida (CBM) e fungicida mínima (CFM) dos derivados vegetais selecionados a partir do método de microdiluição em placas	73
2.1.9. Atividade antimicrobiana diferencial com base na concentração inibitória mínima.....	74
2.1.10. Determinação da atividade antimicrobiana por método de bioautografia, de acordo com Slusarenko e colaboradores (1989) em placas de cromatografia em camada delgada (CCD)	74
2.1.10.1. Preparo dos derivados vegetais.....	74
2.1.10.2. Preparo das placas de CCD	74

2.1.10.3. Preparo e padronização do inóculo	75
2.1.10.4. Teste de atividade antimicrobiana	75
2.1.10.5. Leitura dos resultados	76
3.1. Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em placas	77
3.2. Atividade antimicrobiana diferencial com base na concentração inibitória mínima.....	84
3.3. Determinação da atividade antimicrobiana por método de bioautografia, em placas de CCD	88
CAPÍTULO IV - Avaliação da atividade antiproliferativa	97
1. Introdução.....	97
2. Materiais e métodos	101
2.1. Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	101
2.1.1. Extratos vegetais.....	101
2.1.2. Amostras celulares.....	101
2.1.3. Ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa	101
2.1.3.1. Preparo das amostras vegetais (extratos brutos, óleo essencial e frações)	102
2.1.3.2. Determinação da atividade antiproliferativa das amostras, pelo ensaio da sulforrodamina B, com leitura espectrofotométrica das microplacas.....	103
2.1.4. Análise dos resultados	104
4. Conclusão.....	127
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
REFERÊNCIAS.....	130

INTRODUÇÃO¹

A utilização de produtos naturais como recurso terapêutico é tão antiga quanto à civilização humana e, por muito tempo, os produtos vegetais constituíram o único arsenal terapêutico (EISENBERG et al., 1998).

A utilização de plantas medicinais vem atingindo um público cada vez maior. O retorno à medicina natural ou tradicional torna-se um fato preocupante, devido ao uso indiscriminado de plantas medicinais sem qualquer conhecimento farmacognóstico. Isto exige um posicionamento firme dos meios científicos e regulatórios, visto a utilização de plantas, ditas como medicinais, sem uma dada confirmação de sua ação farmacológica, fato este, que vem acontecendo com a maioria das espécies vegetais utilizadas pela população (BALLVÉ et al., 1995).

O Brasil possui uma das maiores diversidades vegetal do mundo e inúmeras experiências vinculadas ao conhecimento popular das plantas medicinais e tecnologia para correlacionar o saber popular e científico (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). O Estado de São Paulo é formado, basicamente, pelos Biomas Mata Atlântica e Cerrado (BIOTA/FAPESP, 2004). A importância desses ecossistemas foi mundialmente reconhecida com a inclusão de ambos na lista de *hotspots* (regiões biologicamente mais ricas e ameaçadas do planeta) organizada pela Conservation International (CONSERVATION, 2013).

O interesse pela identificação e utilização de espécies de plantas com propriedades farmacológicas tem se intensificado nos últimos anos. Isto pode ser visualizado pelos vários projetos apoiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no âmbito do programa BIOTA/FAPESP, os quais geraram resultados que subsidiaram a criação da Rede Biota de Bioprospecção e Bioensaios (BIOprospecTA), também financiada pela FAPESP, evidenciando as inúmeras possibilidades da exploração da biodiversidade do Estado de São Paulo (ZUCCHI, 2013).

A investigação, que nos últimos anos tem sido feita no reino vegetal em populações espontâneas de determinadas espécies, mostra a variabilidade genética das plantas traduzida em composições químicas diferentes, explicando os motivos de uma espécie, numa determinada região, ser recomendada para uma aplicação terapêutica e, noutra, por vezes, ser indicada para um uso bem diferente.

¹ Na organização desta Tese, o texto foi dividido em capítulos numerados sequencialmente, e sistematizado segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

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 certos metabólitos secundários (JORGE; MARKMANN, 1996). Segundo a primeira edição da Farmacopeia Brasileira (AROEIRA, 1929), a parte do material vegetal a ser utilizado é a casca, embora estudos desenvolvidos por Salvi Júnior (2009), revelem que além das cascas, as folhas também podem ser utilizadas como fonte de constituintes farmacologicamente ativos.

O interesse terapêutico pela espécie *S. terebinthifolius* se dá pelas suas propriedades farmacológicas, o que pode ser percebido desde sua inclusão na primeira edição da Farmacopeia Brasileira em 1929 e recentemente, pela divulgação, em fevereiro de 2009, da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), na qual esta espécie foi incluída. Esta lista de plantas medicinais representa aquelas que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), visando orientar estudos que possam subsidiar a elaboração de produtos para uso da população, com eficácia e segurança (AROEIRA, 1929; MINISTÉRIO, 2009a).

Além disso, em novembro de 2009, o Ministério da Saúde aprovou a Portaria nº 2.982, que contém em seu anexo II uma lista de medicamentos fitoterápicos, que inclui a espécie *S. terebinthifolius* como produto para tratamento ginecológico anti-infeccioso tópico simples, na forma farmacêutica de gel e óvulo (MINISTÉRIO, 2009b).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2011, elaborou o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, o qual dá suporte às práticas de manipulação e dispensação de fitoterápicos nos Programas de Fitoterapia no SUS e, entre as formulações apresentadas de espécies vegetais e formas farmacêuticas comuns nos serviços de fitoterapia, encontra-se indicada as cascas secas do caule de *S. terebinthifolius* para preparação extemporânea de produto ginecológico anti-inflamatório e cicatrizante de uso externo (BRASIL, 2011).

Finalmente, o Ministério da Saúde publicou, em março de 2012, a Portaria MS/GM nº 533, que estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do SUS, apresentando no item 88.1, do anexo I, sobre os medicamentos fitoterápicos, a espécie *S. terebinthifolius* com ação cicatrizante, anti-inflamatória e anti-séptica tópica, para uso ginecológico nas apresentações de gel e óvulo. Consequentemente, essas divulgações acarretam em aumento da procura da espécie citada e a sua utilização na terapêutica. Fato que desperta preocupação sobre a coleta correta do material vegetal utilizado para este fim (MINISTÉRIO, 2012a; MINISTÉRIO, 2012b).

A utilização terapêutica de uma dada planta medicinal está relacionada à presença de metabólitos secundários, que representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante (KUTCHAN, 2001). Segundo Cunha (2005), as correlações entre a estrutura química dos constituintes ativos e sua ação farmacológica são de grande importância quanto a apresentação da atividade. A aplicação de plantas medicinais em sistemas terapêuticos dependerá diretamente da concentração e composição química de metabólitos secundários presentes, os quais podem variar significativamente seu perfil em função de fatores como estado fitofenológico, fatores geográficos (localização), ecológicos (habitat), variabilidade genética (expressa pelos quimiotipos), processo de extração empregado, entre outros (BANDONI, 2000; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

É recomendável que as plantas medicinais bem como as drogas vegetais apresentem uma pequena variabilidade de suas características físico-químicas, químicas e biológicas resultando em qualidade assegurada para o uso terapêutico. Por isso, torna-se necessário a padronização de alguns aspectos principais da droga vegetal, estabelecendo-se dessa forma parâmetros de qualidade (CUNHA, 2005).

Além das preocupações com a saúde do indivíduo, há também a preocupação ambiental com espécies nativas do Brasil, as quais vêm sofrendo a ameaça de extinção pela fragmentação e destruição de seu *habitat*, fruto do extrativismo irracional.

Por estas razões, fez-se necessário o estudo científico, da droga vegetal originada de folhas da espécie *S. terebinthifolius*, visando o seu estudo farmacognóstico como droga vegetal, para com a determinação das variações de parâmetros físico-químicos do controle de qualidade da droga vegetal, como também, para verificar sua atividade biológica, para com o seu potencial farmacológico, de forma que, a espécie possa vir a ser utilizada como agente terapêutico seguro e eficaz. Este estudo gerou informações relevantes à identificação das populações e ao seu emprego na terapêutica.

1. *Schinus terebinthifolius* Raddi

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). 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). O gênero *Schinus* compreende cerca de 30 espécies nativas para a América do Sul (EVANS, 2002) e, em contraste as outras plantas do mesmo gênero, a dermatite é praticamente desconhecida para a espécie *S. terebinthifolius*, que é conhecida como aroeira-mansa (HURTADO, 1986).

S. terebinthifolius é uma espécie nativa da América do Sul, especialmente do Brasil, Paraguai e Argentina (DEGÁSPARI et al., 2005). É encontrada também em algumas partes da América Central e algumas regiões da Europa, África, Ásia e nos Estados Unidos. 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; MATOS, 2002; SANTOS et al., 2007; CAVALHER-MACHADO et al., 2008).

1.1. Aspectos botânicos

S. terebinthifolius (Figura 1), é uma espécie dioica e, dentro de sua amplitude ambiental, apresenta distintas formas de crescimento, com ecótipos de porte, variando desde pequenos arbustos até árvores com 15 metros de altura e, de folhas perenes (REITZ et al., 1983; LORENZI, 2000). O tronco 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).

Figura 1: Aspectos morfológicos da aroeira-vermelha (*S. terebinthifolius*) A: aspecto geral da árvore; B: folhas; C: inflorescência; D: frutos maduros; E: casca do caule.



FONTE: Viveiro Ipê (2013).

A casca, em sua superfície externa, é de cor pardo-acinzentada, fendida no sentido longitudinal e um tanto no sentido transversal, muito rugosa, recoberta muito irregularmente de manchas mais claras; 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 normalmente de 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, O florescimento ocorre durante os meses de setembro a janeiro, surgindo pequenas flores de coloração branco-esverdeadas, aromáticas e melíferas. 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).

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. A pequena semente do fruto da aroeira-vermelha, redonda e lustrosa é única, marrom escura medindo cerca de 3 mm de diâmetro (REITZ et al., 1983; SANCHOTENE, 1985; FERRITER, 1997; LORENZI, 2000; DEGÁSPARI et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

1.2. Aspectos fitoquímicos

As principais características da espécie *S. terebinthifolius*, 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; MARKMANN, 1996). Segundo a Farmacopeia Brasileira, 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 (PHARMACOPEIA, 1929, SALVI JÚNIOR, 2009).

Estudos fitoquímicos de *S. terebinthifolius* detectaram a presença de compostos fenólicos simples, flavonoides e taninos, óleo essencial, esteroides, triterpenos, antraquinonas e saponinas (LAWRENCE, 1984; JORGE; MARKMANN, 1996; QUEIRES; RODRIGUES, 1998; LIMA et al., 2006; SALVI JUNIOR, 2009).

Segundo estudos de Jorge e Markmann (1996), detectaram que tanto as cascas como as folhas revelaram-se igualmente ricas em taninos e em óleo essencial. Uma das diferenças substanciais entre a composição química de ambas é no que se refere à presença de flavonoides e saponinas, as quais se destacaram nas cascas (JORGE; 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 de flavanona naringina (DEGÁSPARI et al., 2005).

As folhas e frutos avermelhados são ricos em óleo essencial, e estudos mostraram altas concentrações de monoterpenos (STAHL et al., 1983; MALIK et al., 1994), juntamente com alguns sesquiterpenos hidrocarbonetos (SINGH et al., 1998). Estudos anteriores apresentaram ainda diferenças na proporção relativa dessas substâncias, sendo que no óleo essencial de folhas observou-se como compostos químicos majoritários, sabineno, α -pineno, β -pineno, cariofileno, germacreno-D, biciclogermagreno, *trans*-cariofileno e limoneno, *cis*- β -terpineol, *E*-cariofileno, β -cedreno e citronelal (MOURA et al., 2007; SANTOS et al., 2007; EL-MASSRY et al., 2009). Sendo também identificados, em relação ao óleo essencial obtido de frutos maduros, predominantemente, os monoterpenos: limoneno, α -pineno, α -felandreno, β -felandreno e α -3-careno, e os sesquiterpenos: β -gurjuneno, *cis*- β -guaiano, *trans*- β -guaiano, α -muuroleno, *trans*-calameno, cubenol e epi- α -muurolol, (-)- β -elemeno, (-)- α -gurjuneno, (-)-*E*- β -cariofileno e (\pm)-germacreno D, além de três sesquiterpenos hidrocarbonetos do tipo espiro ciclopropano (GEHRKE et al., 2007; RICHTER et al., 2010).

A partir das folhas de *S. terebinthifolius* foram isolados e identificados, sete compostos polifenólicos, incluindo, dois ésteres de ácido quínico (ácido 5-O-cafeoilquínico e ácido 5-O-cumaroilquínico), três glicosídeos miricetina (miricetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1'' \rightarrow 6'')- β -D-galactopiranosídeo, miricetina 3-O- β -D-glucuronido, miricetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo), 1,6-digaloil- β -D-glucose e (+)-catequina (FARAG, 2008). Estudos desenvolvidos por Hayashi e colaboradores (1989), revelaram a presença de pentagaloil-glucose, a partir de isolados das partes aéreas da planta.

Estudos realizados com extrato etanólico obtido a partir de folhas de *S. terebinthifolius* identificaram, dentre os principais compostos fenólicos, ácido tânico (FARAG, 2008), ácido caféico, ácido cumárico e ácido siríngico (EL-MASSRY et al., 2009).

A aplicação de derivados vegetais de *S. terebinthifolius*, para o desenvolvimento e/ou produção de medicamentos fitoterápicos, em sistemas terapêuticos específicos dependerá diretamente da concentração e composição química de metabólitos secundários presentes na matéria-prima vegetal e, em relação aos estudos supracitados, os dados indicam a

existência de vários quimiotipos de *S. terebinthifolius*, com prevalência de compostos químicos majoritários distintos demonstrados entre espécies de diferentes regiões.

1.3. Aspectos etnobotânicos e farmacológicos

Quase todas as partes de *S. terebinthifolius*, folhas, cascas, frutos, sementes, resinas, e oleoresina (ou bálsamo), têm sido utilizadas medicinalmente pelos povos indígenas em todas as regiões tropicais (PANETTA; MCKEE, 1997). 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 (LORENZI; MATOS, 2002).

A literatura etnobotânica cita o uso das cascas, com base na tradição popular, na forma de decocto, 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; LIMA et al., 2006). 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 como cicatrizante e anti-inflamatório em afecções bucais.

Com base no uso tradicional, 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; 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).

Além das cascas, as folhas também são usadas como antisséptico, anti-inflamatório, balsâmico, hemostático e antioxidante (LIMA et al., 2006). São usualmente preparadas na forma de decocto com finalidade expectorante, antisséptica, antidiarreica e cicatrizante (PACIORNIK, 1990; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; DI-STASI, 2002; LORENZI; MATOS, 2002; MATOS, 2002). Estudos *in vitro*, com extratos de folhas da aroeira brasileira demonstraram ação antiviral contra vírus de plantas e apresentaram ser citotóxicos contra alguns tipos de cânceres (SANTANA, et al., 2012). As folhas e frutos são adicionados à água de lavagem de feridas e úlceras, para limpeza de pele e de ação bactericida (BRAGA, 1960; LORENZI, 1992; GRUENWALD et al., 2000).

Estudos anteriores demonstraram que o pentagalolil-glucose isolado das partes aéreas da planta apresenta atividade de inibição da xantina oxidase, enzima envolvida na hipercolesterolemia e hiperuricemia (HAYASHI et al., 1989); que triterpenos presentes em frutos apresentaram-se como inibidores específicos competitivos de fosfolipase A₂ segregada (JAIN et al., 1995); que frações enriquecidas com flavonoides apresentaram atividade genotóxica *ex vivo* e *in vivo* (CARVALHO et al., 2003); que polifenóis purificados a partir das folhas da planta apresentaram atividade anti-proliferativa, pela indução de apoptose em células tumorais de próstata (CARVALHO et al., 2003; QUEIRES et al., 2006); que extratos etanólicos de folhas apresentaram atividade sequestrante de radicais livres (CERUKS et al., 2007); e, que extratos aquosos de cascas do caule e frações de acetato de etila apresentaram atividade antialérgica, inibindo a formação de edema e a liberação de histamina *in vivo* (CAVALHER-MACHADO et al., 2008);

Por outro lado, 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 (carcinoma, sarcoma, dentre outros) e como agente antiviral e antibactericida. Possui ação regeneradora dos tecidos e é útil em escaras, queimaduras e problemas de pele (DEGÁSPARI et al., 2005; LIMA et al., 2006). 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; LUCENA et al., 2006), antioxidante (VELÁSQUEZ et al., 2003; EL-MASSRY et al., 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; 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; BRAGA et al., 2007; JOHANN; PIZZOLATTI; DONNICI, 2007; SOARES et al., 2007; EL-MASSRY et al., 2009; SALVI JUNIOR, 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 a possibilidade de apresentarem ação anti-inflamatórias, embora

possam apresentar também ação antiviral e anticarcinogênica. Os óleos essenciais podem estar também relacionados à sua ação anti-inflamatória e antibacteriana (JORGE; MARKMANN, 1996).

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.

2. Parâmetros da qualidade da droga vegetal

Os estudos desenvolvidos e a crescente participação de plantas medicinais e de medicamento de origem vegetal no arsenal terapêutico despertou em todo o mundo uma preocupação quanto à qualidade da matéria-prima utilizada, segundo o uso ao qual se destina, havendo a necessidade de se efetuar análises de caracterização referentes ao controle de qualidade da droga vegetal, utilizando-se de técnicas modernas e eficientes (SHARAPIN et al., 2000).

Alguns parâmetros essenciais, como os de autenticidade, de pureza e integridade, e de análise quantitativa para compostos químicos e marcadores, para a avaliação da qualidade das matérias-primas vegetais podem variar dependendo da procedência do material e de processamentos inadequados da planta à produção do fitoterápico e/ou fitofármaco. As variações se apresentam, principalmente na composição química, em relação ao teor de constituintes e pelas deteriorações e contaminações, o que ressalta a importância dos estudos de caracterização farmacognóstica, correlacionados com a atividade farmacológica. Assim, o controle de qualidade de matérias-primas assume particular importância e as informações que as circundam devem ser conhecidas (SHARAPIN et al., 2000; FARIAS, 2001; HEINRICH et al., 2007; BRASIL, 2010).

A partir do estabelecimento dos parâmetros de qualidade para a matéria-prima, que é a determinante inicial da qualidade de um fitoterápico, 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. Os parâmetros da qualidade para fins farmacêuticos são estabelecidos, de acordo com bases científicas e técnicas, 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).

3. Investigação fitoquímica de drogas vegetais

As plantas medicinais sintetizam vários compostos biologicamente ativos, que na maioria das vezes, são produtos do metabolismo secundário e, mesmo por não estarem ligados diretamente à manutenção da vida do vegetal, estão relacionados à interação da planta com o seu ecossistema. A ampla diversidade de metabólitos secundários está relacionada a diferentes atividades biológicas, justificando a necessidade de um aprofundamento no conhecimento das propriedades das espécies vegetais e sua utilização na formulação de medicamentos. Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários nas plantas, ocorrem em diferentes razões (sazonais e diárias; intra-planta, inter e intra-específica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão gênica pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. A existência de uma ampla variedade de compostos sintetizados pelas plantas é um dos maiores obstáculos encontrados nos estudos fitoquímicos e farmacológicos de espécies vegetais, pois quaisquer alterações das variações temporais e espaciais, bem como de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos, além do estresse e estímulos físicos e químicos, podem alterar qualitativa e quantitativamente a produção desses metabólitos ativos, em plantas (CORDELL, 2000; CORRÊA et al., 2006).

A investigação fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença, assim podendo 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 fracionamento, isolamento e a elucidação estrutural das mesmas (FALKENBERG et al., 2010).

4. Investigação farmacológica de drogas vegetais

A natureza, em especial as plantas, tem sido fonte de agentes medicinais para o tratamento de um amplo espectro de doenças há milhares de anos (CRAGG et al., 2009). O interesse na pesquisa de novas substâncias ativas, de origem vegetal, tem aumentado significativamente nos últimos anos e com isso, várias empresas privadas e organizações governamentais têm instituído projetos de pesquisa nesta área (CALIXTO, 2000).

Segundo Kinghorn e colaboradores (2009), desde 1960 pequenas moléculas derivadas de produtos naturais têm fornecido um número significativo de quimioterápicos importantes. A pesquisa de produtos naturais, seja como extratos padronizados ou como

compostos puros, tem como um de seus objetivos, a investigação científica para a obtenção de produtos mais eficazes e com menos toxicidade.

A investigação de plantas medicinais utilizadas popularmente resultou em alguns avanços terapêuticos, cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética, sendo 25% provenientes de plantas (RATES, 2001). Segundo Cox (1994), 80% da população mundial residente em países em desenvolvimento, utilizam plantas como fonte de medicamentos e 20% dos indivíduos de países desenvolvidos recorrem às mesmas para o tratamento de diversas doenças. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), dos 80% da população que se utiliza de práticas tradicionais (práticas integrativas e complementares) na atenção primária à saúde, 85% usam plantas medicinais ou preparações destas e, desse total, pelo menos 30% se deu por indicação médica.

Programas de rastreamento de produtos naturais biologicamente ativos requerem bioensaios específicos. A detecção de compostos com a atividade desejada em extratos complexos de plantas depende da confiabilidade e da sensibilidade de sistemas de ensaio utilizados. Assim, os bioensaios são essenciais para o monitoramento dos efeitos requeridos ao longo do fracionamento e purificação pela atividade bioguiada até que as substâncias ativas sejam obtidas (HUSSAIN et al., 2007).

Com o aprimoramento de metodologias de análise em cultura de células foi possível, no final da década de 80, o desenvolvimento de modelos, possibilitando a existência de uma metodologia para triagem *in vitro*, visando à pesquisa de novos compostos que inibam o crescimento dessas células (BOYD, 1989; QUEIROZ et al., 1999). Os modelos de estudo *in vitro* são amplamente utilizados e direcionam a pesquisa para moléculas com potencial terapêutico. Esse tipo de análise, por ter condições de avaliar grande número de substâncias em pouco tempo, aumenta a possibilidade para descoberta de novos compostos ativos (HOLBECK, 2004; SUGGITT; BIBBY, 2005). Um resultado positivo em um estudo *in vitro*, portanto, é apenas o primeiro passo no estudo de um fitomedicamento.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Estudar os aspectos farmacognósticos de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi coletadas em três localidades, nos campos experimentais da Unesp de Araraquara, do CPQBA-Unicamp e da UniPinhal, bem como verificar a atividade biológica de seus extratos, óleo essencial e frações, intencionando fornecer informações para o uso terapêutico racional da espécie.

2. Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros farmacognósticos referentes ao controle de qualidade físico-químico das drogas vegetais oriundas das três localidades;
- Realizar a triagem fitoquímica dos extratos de folhas de *S. terebinthifolius*;
- Verificar a variabilidade de composição dos extratos, dos indivíduos de *S. terebinthifolius* coletados;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e frações obtidos de folhas de *S. terebinthifolius*, sobre cepas de referência (ATCC) prevalentes na microbiota oral, utilizando-se a técnica de microdiluição em placas e bioautografia;
- Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* de extratos e frações obtidos de folhas de *S. terebinthifolius* sobre linhagens de células tumorais humanas.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL

1. Introdução

Considerando a crescente participação de plantas medicinais e de medicamento de origem vegetal no arsenal terapêutico, e a preocupação quanto à qualidade da matéria-prima utilizada, observa-se a necessidade de se efetuar análises de caracterização referentes ao controle de qualidade da droga vegetal, utilizando-se de técnicas modernas e eficientes (SHARAPIN et al., 2000).

Alguns parâmetros essenciais para a qualidade das matérias-primas vegetais podem variar dependendo da procedência do material e de processamentos inadequados da planta à produção do fitoterápico e/ou fitofármaco. As variações se apresentam, principalmente, na composição química, em relação ao teor de constituintes e pelas deteriorações e contaminações, o que ressalta a importância dos estudos de caracterização farmacognóstica, correlacionados com a atividade farmacológica. Assim, o controle de qualidade de matérias-primas assume particular importância (SHARAPIN et al., 2000; FARIAS, 2001; HEINRICH et al., 2007).

A qualidade da droga vegetal, determinante inicial da qualidade de um produto, é dada por um conjunto de critérios de análises que caracterizam a matéria-prima para o uso ao qual se destina. A partir do estabelecimento de parâmetros de qualidade para a matéria-prima vegetal, os procedimentos de análise devem ser realizados de acordo com bases técnicas e científicas, preconizando o emprego de metodologias químicas, físicas ou físico-químicas e biológicas, sendo necessária a correlação entre os parâmetros analisados e a finalidade pretendida. 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).

Nos últimos anos, a legislação brasileira para medicamentos fitoterápicos evoluiu muito em vários aspectos, com a criação de regras específicas e recomendações para a matéria-prima farmacêutica à base de plantas e, para produtos fitoterápicos, para garantir sua eficácia, segurança e um padrão de qualidade consistente (BUFAINO, 2013; ZÖLLNER; SCHWARZ, 2013). 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. Segundo Zöllner e Schwarz

(2013), isso ocorre porque as condições regulamentares para produtos fitoterápicos no Brasil foram negligenciadas em um nível alarmante. 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

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, a qualidade do produto final estará, em grande parte, assegurada. Os parâmetros da qualidade para fins farmacêuticos são estabelecidos, de acordo com bases científicas e técnicas, nas Farmacopeias e Códigos oficiais, podendo ser utilizadas Farmacopeias de diferentes países, além de monografias complementares, como as elaboradas pela OMS, 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. 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, sendo de forma que todo o processo analítico deve ser validado e variações nos resultados devem ser consideradas estatisticamente (SHARAPIN et al., 2000; FARIAS, 2001).

Alguns parâmetros essenciais, como os de autenticidade, de pureza e integridade, e de análise quantitativa para compostos químicos e marcadores, para a avaliação da 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; BRASIL, 2010).

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

2. Materiais e Métodos

2.1. Material botânico

Folhas de *S. terebinthifolius* foram colhidas da coleção de plantas medicinais, localizadas no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) de Araraquara, no município de Araraquara, estado de São Paulo; no Campo Experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA), da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), no bairro de Betel, município de Paulínia, estado de São Paulo; e, na Área de Experimentação de Horticultura do Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UniPinhal), na Rodovia Pinhal/Jacutinga, município de Espírito Santo do Pinhal, estado de São Paulo.

Na mesma ocasião, foram amostrados ramos férteis do mesmo exemplar para a confecção de exsicatas a serem depositadas em herbário.

2.2. Processamento pós-colheita para a obtenção da droga vegetal (seleção e secagem)

As folhas frescas colhidas foram examinadas e separadas manualmente, descartando as que não apresentavam características convenientes, como manchas, deformações, rompidas, perfuradas por insetos, com corpos/resíduos estranhos. Sequencialmente procedeu-se então a secagem em estufa com ar circulante (Marconi[®] MA 035, para a amostra da Unesp; e, Fabbe[®], modelo 170, para as amostras do CPQBA e UniPinhal) aquecido a temperatura de 40 °C, até a obtenção de massa constante, quando então foram acondicionadas adequadamente e armazenadas em local seco e ao abrigo da luz.

2.3. Determinação do resíduo sólido do vegetal fresco

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

2.4. Obtenção da droga vegetal pulverizada

O processo utilizado para a moagem das folhas secas, obtidos após secagem, foi por seccionamento através de moinho de facas (Tecnal[®], para a amostra da Unesp; e, MR[®], para as amostras do CPQBA e UniPinhal).

2.5. 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 (1988 e 2010) e, outras técnicas não farmacopeicas descritas por Ansel e colaboradores (2000); Martins e Sacramento (2004) e Aulton (2005).

2.5.1. Amostragem

Do total obtido de droga pulverizada, foram retiradas amostras utilizando a técnica de quarteamento, conforme a necessidade para a execução das análises (AMOSTRAGEM, 2010, p.196).

2.5.2. Determinação da granulometria da droga vegetal pulverizada

Para padronizar a análise e determinar a granulometria da droga vegetal pulverizada foi amostrada 25 g de pó (Tecnal[®] Mark 1300). Foi montado um conjunto de tamises (Granutest[®]) de acordo ao tamis de maior abertura sobre o de abertura menor e, colocando o conjunto sobre o receptor de tamises operado por dispositivo mecânico (Produtest[®]). A amostra foi distribuída uniformemente pelo tamis superior e, em seguida, o conjunto foi tampado. O processo foi executado em tamisador vibratório, de ação mecânica uniforme, durante um período de quinze minutos, com vibração de 100 vibrações/min. Após o término deste tempo, utilizando um pincel, foi removida toda a amostra retida na superfície superior de cada malha para um papel impermeável. Os pós recolhidos do coletor e das frações remanescente sobre cada tamis foram pesados. Calculou-se o percentual retido em cada tamis, utilizando o seguinte cálculo (DETERMINAÇÃO, 2010, p.92):

$$\% \text{ retida pelo tamis} = P_1 / P_2 \cdot 100$$

onde:

P1 = Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas);

P2 = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas);

100 = Fator de porcentagem.

Os cálculos foram realizados com auxílio de *software* Excel® e expressos como média de três determinações.

2.5.2.1. Estudo e determinação do tamanho de partícula

Pela distribuição apresentada na determinação da granulometria e por estudos de passagem e retenção da droga vegetal pelos tamises a partir da quantidade de pó utilizada, realizada pelo método de tamisação, foi possível construir planilhas e gráficos para a determinação do tamanho médio das partículas e distribuição do tamanho das partículas, utilizando-se 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 determinado por método de tamisação, quanto às suas proporções de faixa granulométrica e assim determinado pelo cálculo do diâmetro médio das partículas ($d_{(av)}$), como segue, sendo o resultado obtido pela média de três determinações (ANSEL et al., 2000).

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

2.5.3. Determinação da densidade

Para a determinação da densidade aparente da droga vegetal pulverizada foram tomadas três amostras, obtidas por quarteamento. Cada amostra foi transferida para um 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 da 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; SACRAMENTO, 2004). Os valores de densidade considerados resultaram da média calculada de três determinações para cada amostra.

2.5.4. Determinação de água pela perda por dessecação

Foi transferido cerca de 5 g, exatamente pesado, de amostra preparada, para pesa-filtro tarado, previamente dessecado nas mesmas condições a serem adotadas para a amostra, durante 30 minutos. A amostra foi dessecada em estufa (Fanen[®]) a 100-105 °C, durante cinco horas, até peso constante. A porcentagem de água foi calculada em relação à droga seca (DETERMINAÇÃO, 2010, p.194).

A porcentagem da perda por dessecação foi calculada pela equação segundo Farmacopeia Brasileira (DETERMINAÇÃO, 2010, p.91) e expressa pela média de três determinações.

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Pa = massa da amostra;

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação;

Ps = massa do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

2.5.5. Determinação do pH

Foram pesadas 99,0 g de água destilada e, após aquecimento e ebulição durante cinco minutos, a água destilada fervente foi vertida sobre exatamente 1,0 g da droga vegetal pulverizada. Em seguida, o recipiente foi tampado e o material foi deixado em infusão por quinze minutos. Decorrido este período, foi realizada uma filtração utilizando-se algodão. Aguardou-se o arrefecimento da solução extrativa obtida, à temperatura ambiente, 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.

2.5.6. Determinação de cinzas totais

Foi calcinado previamente o cadinho de porcelana em mufla (Quimis[®]) a temperatura de 450 °C, por 30 minutos. O mesmo foi resfriado em dessecador e sua massa-tara

determinada em balança analítica (Tecnal[®] Mark 1300) (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.4.2.4.).

Foram pesados, exatamente, cerca de 3 g da amostra pulverizada e, transferida para cadinho previamente tarado. A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e incinerada, aumentando-se gradativamente a temperatura até no máximo 600 ± 25 °C, até que todo o carvão fosse eliminado. Um gradiente de temperatura (30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C) foi utilizado. Após procedimento, o cadinho foi resfriado em dessecador e pesado, até massa constante (DETERMINAÇÃO, 2010, p.195). Os resultados calculados foram expressos em porcentagem de cinzas em relação à droga seca e representados pela média de três determinações.

2.5.7. Determinação de cinzas insolúveis em ácido

O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido durante cinco minutos com 25 mL de ácido clorídrico a 7% (m/v) em cadinho coberto com vidro de relógio. O vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente, juntando-se a água de lavagem ao cadinho. O resíduo insolúvel em ácido foi recolhido sobre papel de filtro isento de cinza (Nalgon[®] 3550), lavando-o com água quente até que o filtrado se mostrasse neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, seco sobre chapa quente (Tecnal[®] TE 018) e incinerado a cerca de 500 °C, em mufla, até peso constante (DETERMINAÇÃO, 2010, p.195). Os resultados calculados foram expressos em porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca e representados pela média de três determinações.

2.5.8. Determinação de substâncias extraíveis

Método de extração a quente: foi determinada a massa-tara de um frasco de erlenmeyer com capacidade para 250 mL, com boca esmerilhada. Foi transferido para ele, exatamente, cerca de 4,0 g de droga vegetal seca, finamente pulverizada. Foram adicionados 100 mL de água e, em seguida, pesado para obter a massa total, incluindo o frasco. O frasco foi tampado, agitado e deixado em repouso por uma hora. Um condensador de refluxo foi acoplado ao frasco, e o sistema foi aquecido por uma hora, posteriormente resfriado e pesado. Após o refluxo, a massa original foi corrigida com solvente especificado no ensaio para a droga vegetal. O solvente adicionado foi misturado bem e filtrado, rapidamente, por meio de um filtro seco. Foram transferidos 25 mL do filtrado para uma cápsula de porcelana tarada e evaporado até securo em banho de água. O resíduo foi seco

a 105 °C por seis horas, e esfriado em dessecador por 30 minutos e pesado, imediatamente. A porcentagem de materiais extraídos foi calculada em mg/g de material seco e os resultados foram representados pela média de três determinações (DETERMINAÇÃO, 2010, p.199).

3. Resultados e Discussão

O controle de qualidade e a padronização de um fitoterápico envolvem várias etapas, tendo 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 ANVISA (BRASIL, 2010) e a ausência de estudos farmacognósticos, dessa natureza, para folhas da espécie *S. terebinthifolius*, buscou-se colaborar com o estudo desta espécie. Para isso foram realizados ensaios com o objetivo de verificar a variabilidade dos parâmetros de qualidade do material botânico.

3.1. Obtenção do material botânico e processamento pós-colheita para a obtenção da droga vegetal pulverizada

As folhas de *S. terebinthifolius* Raddi foram colhidas, ao amanhecer, das coleções de plantas medicinais, na FCF-Unesp, nas coordenadas geográficas (latitude e longitude) -21° 48' 53.7''S e 48° 12' 07,6''W, com altitude de 656 metros, em agosto de 2008 (Acesso 1); na CPMA-Unicamp, do exemplar de referência 1707, nas coordenadas geográficas -22° 47' 50.81", -47° 6' 44.18", em maio de 2011 (Acesso 2); e, na UniPinhal, nas coordenadas geográficas -22° 12' 29.20", -46° 44' 39.71", em maio de 2011 (Acesso 3). As exsicatas confeccionadas foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) sob o número de tombo N°UEC 172003, N°UEC 94740 e N°UEC 172004, respectivamente para os Acessos 1, 2 e 3.

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 2.2.

A etapa considerada a mais importante do processamento pós-colheita é 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).

Posteriormente ao processo de secagem, desenvolveu-se o processo de moagem, no qual, por meio de aplicação de uma força localizada, são produzidas tensões nas partículas, capazes de provocar sua ruptura, e assim, a obtenção da droga vegetal

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

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

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 levou em consideração o grau de divisão da droga e a quantidade de droga disponível.

De um modo geral, para se observar os resultados das análises desenvolvidas, seguem os valores determinados para cada parâmetro (Tabela 1), referentes às amostras de *S. terebinthifolius* e que serão abordados com maiores detalhes na sequência do texto.

Tabela 1: Dados dos parâmetros de análises farmacognósticas desenvolvidas para a espécie *S. terebinthifolius*, referentes ao controle de qualidade físico-químico de drogas vegetais oriundas de três Acessos (resultados expressos pela média de três determinações \pm desvio padrão).

Determinação	Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	M_Acesso
Resíduo sólido do vegetal fresco (%)	40,96 \pm 0,49	41,23 \pm 0,24	38,78 \pm 1,87	40,32
Perda de água por secagem (%)	59,04 \pm 0,49	58,77 \pm 0,24	61,22 \pm 1,87	59,68
Classificação granulométrica dos pós	Grosso	MD. grosso ¹	MD. grosso ¹	-
Distribuição de tamanho das partículas	Assim. neg. ²	Bimodal	Bimodal	-
Tamanho médio das partículas (mm)	0,4460	0,2553	0,2292	0,3102
Densidade (g/mL)	0,52 \pm 0,009	0,59 \pm 0,007	0,59 \pm 0,003	0,57
Perda de água por dessecação (%)	6,21 \pm 0,17	8,05 \pm 0,02	8,37 \pm 0,10	7,54
pH por potenciometria (U)	3,96 \pm 0,06	4,39 \pm 0,02	4,00 \pm 0,01	4,12
Cinzas totais (%)	5,63 \pm 0,06	6,25 \pm 0,11	5,94 \pm 1,54	5,94
Cinzas insolúveis em ácido (%)	0,59 \pm 0,31	0,29 \pm 0,22	0,20 \pm 0,07	0,36
Teor de extrativos (%)	30,12 \pm 1,31	31,80 \pm 1,70	27,44 \pm 1,71	29,79

Acessos: Acesso 1 (Unesp); Acesso 2 (CPQBA); Acesso 3 (UniPinhal).

M_Acesso: média dos valores dos parâmetros de análise.

¹ MD. grosso: moderadamente grosso.

² Assim. neg.: assimetria negativa.

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 das amostras 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 $40,96\% \pm 0,49$, $41,23\% \pm 0,24$ e $38,78\% \pm 1,87$ de resíduo sólido do vegetal fresco. Dessa forma, pode-se correlacionar, a um valor médio de $59,04\% \pm 0,49$, $58,77\% \pm 0,24$ e $61,22\% \pm 0,24$ a *perda de água e/ou de substâncias voláteis* durante o processo de secagem, para os Acessos 1, 2 e 3, respectivamente. As diferenças entre esses valores podem estar relacionadas às variações dos elementos ambientais, como umidade relativa do ar, disponibilidade hídrica, temperatura e altitude, em função dos locais de acesso.

A *avaliação granulométrica* do material vegetal pulverizado é um parâmetro importante a ser investigado. 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, devido a maior exposição das células a operação de extração, de auxiliar no processamento de mistura de pós, e à redução do volume bruto do órgão vegetal, visando melhores condições de manipulação e transporte.

A granulometria dos pós obtidos a partir das folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius* em moinhos de facas, permitiu apontar que a maior parte das partículas encontra-se entre a faixa granulométrica de 1,000 mm a 0,300 mm, para o Acesso 1, e de 0,850 mm a 0,250 mm, para os Acessos 2 e 3, como apresentados na Tabela 2 e Figura 2. Segundo a classificação dos pós proposta pela Farmacopeia Brasileira V (2010), os pós de folhas de *S. terebinthifolius* obtidos nesse processo de moagem, puderam ser classificados como pó grosso (Acesso 1), 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 μm , e pó moderadamente grosso (Acessos 2 e 3), o qual se refere àquelas partículas que passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 0,710 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 μm . Comparativamente as amostras são distintas entre si, porém as amostras dos Acessos 2 e 3 demonstram similaridade granulométrica, diferentemente da amostra do Acesso 1, essa observação pode ser melhor compreendida pela influência das propriedades do material vegetal na redução de tamanho das partículas (STANIFORTH, 2005a), que se deve ao processo de propagação de quebra, resistência do material vegetal e dureza superficial, além do conteúdo de umidade do material vegetal, fatores estes que podem afetar o processo de cominuição. Considerando que as amostras se originam de um mesmo tipo de órgão vegetal - as folhas - embora de indivíduos diferentes, pode se considerar que a

resistência do material vegetal (da fragilidade ou da plasticidade) e a dureza superficial (material mais duro ou de elevada elasticidade) são relativamente semelhantes.

Em contrapartida, o teor de umidade dos materiais analisados apresentaram valores relativamente semelhantes para as amostras dos Acessos 2 e 3, de 8,05% e 8,37% de umidade, respectivamente. Entretanto, valor diferente e inferior para a amostra do Acesso 1, de 6,21% de umidade, e considerando as inter-relações com a iniciação e a propagação de quebra do material, que está relacionado ao processo de moagem utilizado, embora executado mediante ao mesmo princípio de funcionamento - por seccionamento -, foi desenvolvido em moinhos de marcas de fabricante diferentes, para a amostra do Acesso 1 e amostras dos Acessos 2 e 3, conforme apresentado no item 2.4., onde as condições mecânicas dos equipamentos podem apresentar características específicas, quanto ao motor, rotação, rotor, capacidade de moagem e potência. Fatores esses constatados que, podem interferir na operação de redução de tamanho da partícula, levando a essa diferença granulométrica e, conseqüentemente aos resultados das análises de distribuição de tamanho das partículas e tamanho médio das partículas. Fica evidente que é importante conhecer e controlar o tamanho da partícula, no que tange à produção e eficácia de medicamentos fitoterápicos.

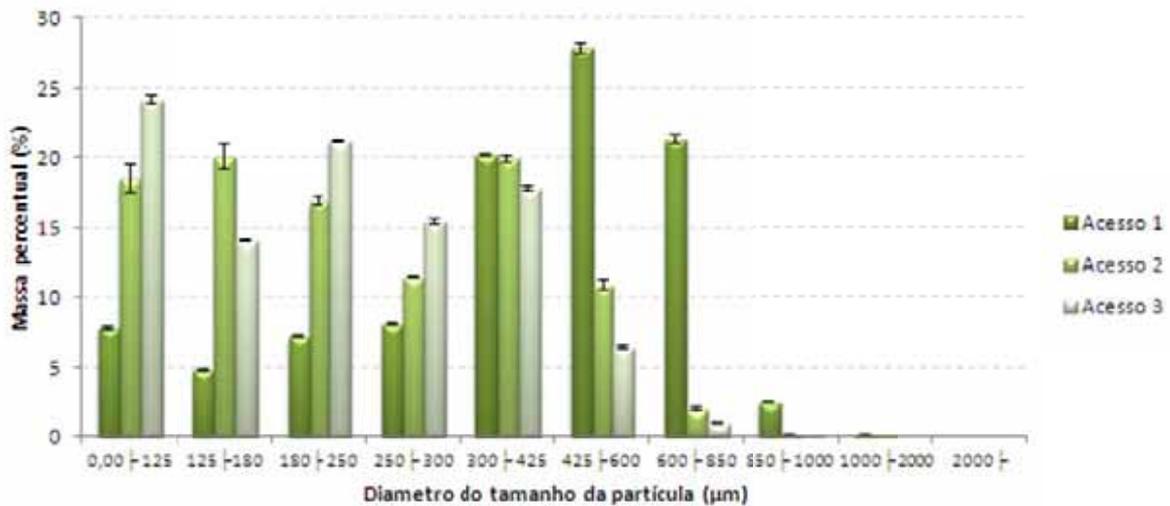
Tabela 2: Análise granulométrica por tamisação de folhas de *S. terebinthifolius* pulverizadas, oriundas de três Acessos.

Faixa granulométrica (mm)	Acesso 1			Acesso 2			Acesso 3		
	Massa (g)	% retida	Desvpad*	Massa (g)	% retida	Desvpad*	Massa (g)	% retida	Desvpad*
0,00 125	1,92	7,83	0,13	4,53	18,47	1,06	5,86	24,18	0,33
125 180	1,18	4,80	0,05	4,93	20,11	0,97	3,40	14,02	0,09
180 250	1,78	7,25	0,04	4,14	16,88	0,36	5,14	21,23	0,09
250 300	1,98	8,09	0,05	2,81	11,45	0,11	3,73	15,40	0,13
300 425	4,96	20,25	0,08	4,89	19,96	0,26	4,29	17,71	0,21
425 600	6,82	27,82	0,36	2,66	10,87	0,40	1,56	6,44	0,11
600 850	5,22	21,29	0,30	0,49	2,00	0,10	0,23	0,94	0,03
850 1000	0,61	2,50	0,04	0,05	0,20	0,01	0,02	0,08	0,01
1000 2000	0,04	0,16	0,00	0,01	0,05	0,01	0,00	0,00	0,00
2000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Acessos: Acesso 1 (Unesp); Acesso 2 (CPQBA); Acesso 3 (UniPinhal).

* Desvpad: desvio padrão.

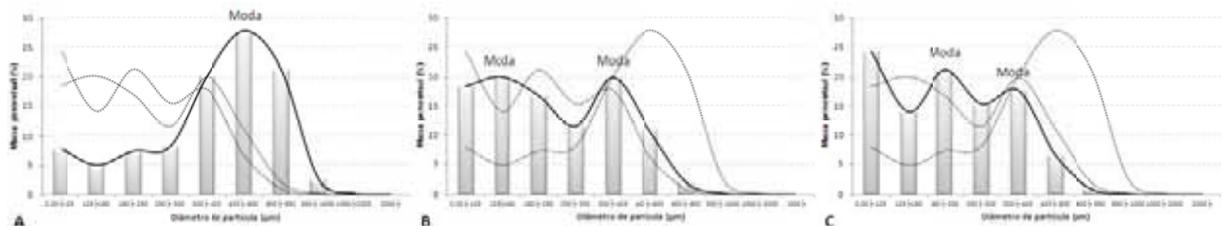
Figura 2: Distribuição da faixa granulométrica, da análise por tamisação, de folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius*, originárias de três Acessos. Acesso 1 (Unesp), Acesso 2 (CPQBA) e Acesso 3 (UniPinhal).



Pela distribuição apresentada na determinação da granulometria (Figura 2) 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 a distribuição de tamanho das partículas e o tamanho médio das partículas de folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius*.

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 3), 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 3: Histograma da distribuição de partícula e curva de distribuição de massa relativa do tamanho da partícula de folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius*, oriundas de três Acessos. A: Acesso 1 (Unesp), uma distribuição com assimetria negativa; B: Acesso 2 (CPQBA), uma distribuição bimodal; C: Acesso 3 (UniPinhal), uma distribuição bimodal.



O histograma (Figura 3) possibilitou definir a distribuição de tamanho de partícula e comparar as características dos pós constituídos de partículas com inúmeros diâmetros diferentes e com diferente distribuição de tamanho. Dessa forma, foi possível confrontar a

distribuição de tamanho apresentado na Figura 3.A, a qual expressou uma maior proporção de partículas mais grossas quando comparada com a distribuição dos pós apresentados nas Figuras 3.B e 3.C, análise esta que corrobora com a determinação granulométrica dos pós, a qual classificou a amostra do Acesso 1 como pó grosso e as amostras dos Acessos 2 e 3 como pó moderadamente grosso.

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 e, em algumas distribuições, ocorre mais de uma moda, a qual representa uma distribuição bimodal de um pó (STANIFORTH, 2005b). Dessa forma, foi possível classificar as curvas de distribuição de massa relativa do tamanho da partícula das folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius*, a qual apresentou para a amostra do Acesso 1 uma assimetria negativa, característica esta, por apresentar uma curva com um alongamento da cauda no sentido das faixas de tamanho menor, conforme dispersão apresentada na Figura 3.A. e, para as amostras dos Acessos 2 e 3 uma distribuição bimodal, caracterizada por apresentar algumas das partículas mais grosseiras da população que ficaram com uma granulometria maior, provocando o surgimento de uma moda na região das partículas de maior tamanho, enquanto uma fração das partículas apresentaram um outro valor modal, localizado na região das partículas mais finas, conforme dispersão apresentada nas Figuras 3.B e 3.C.

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. Os valores do tamanho médio das partículas apresentados para os Acessos 1, 2 e 3 foram de 0,4460 mm, 0,2553 mm e 0,2292 mm, respectivamente, sendo determinado pelo cálculo descrito em micromerítica, segundo Ansel e colaboradores (2000) e representados na Tabela 3.

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

Abertura média (mm)	Acesso 1			Acesso 2			Acesso 3		
	Massa retida (g)	% retida	% retida x AB	Massa retida (g)	% retida	% retida x AB	Massa retida (g)	% retida	% retida x AB
-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,500	0,04	0,16	0,24	0,01	0,05	0,08	0,00	0,00	0,00
0,925	0,61	2,50	2,31	0,05	0,20	0,19	0,02	0,08	0,08
0,725	5,22	21,29	15,44	0,49	2,00	1,45	0,23	0,94	0,68
0,513	6,82	27,82	14,26	2,66	10,87	5,57	1,56	6,44	3,30
0,363	4,96	20,25	7,34	4,89	19,96	7,23	4,29	17,71	6,42
0,275	1,98	8,09	2,22	2,81	11,45	3,15	3,73	15,40	4,23
0,215	1,78	7,25	1,56	4,14	16,88	3,63	5,14	21,23	4,57
0,153	1,18	4,80	0,73	4,93	20,11	3,07	3,40	14,02	2,14
0,063	1,92	7,83	0,49	4,53	18,47	1,15	5,86	24,18	1,51
Σ	24,51	100	44,60	24,50	100	25,53	24,22	100	22,92

Acessos: Acesso 1 (Unesp); Acesso 2 (CPQBA); Acesso 3 (UniPinhal).

AB: abertura média.

 Σ : somatória.

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 por Martins e Sacramento (2004). A média dos resultados das análises desenvolvidas apresentou o valor de densidade de 0,52 g/mL \pm 0,009, 0,59 g/mL \pm 0,007 e 0,59 g/mL \pm 0,003 para os Acessos 1, 2 e 3, respectivamente. Nota-se novamente a variação de valores entre as amostras analisadas, com as amostras dos Acessos 2 e 3 bastante similares e diferindo da amostra do Acesso 1. Essa variação também pode estar relacionada à influência das propriedades do material vegetal na redução de tamanho das partículas, onde se deduz que a granulometria do material pode representar uma influência direta sobre a determinação da densidade aparente, pelo fato de apresentar partículas com inúmeros diâmetros equivalentes diferentes. Observa-se diferenças significativas nas acomodações dessas partículas, quanto ao grau de concentração de massa, em um determinado volume. Partículas com maior grau de divisão - amostras dos Acessos 2 e 3 - apresentam faixa de distribuição mais ampla, tendem a ocupar um menor volume, dessa forma necessita-se de uma maior massa de droga vegetal para ocupar um dado volume determinado, apresentando assim uma maior densidade aparente. O caso inverso – amostra

do Acesso 1 - corresponde a uma menor densidade aparente. Vale ressaltar que tal ensaio constitui-se numa exigência estabelecida pela RDC 14/2010 (BRASIL, 2010).

A densidade aparente de um dado material vegetal pode ser utilizada como ferramenta auxiliar para fins de identificação da espécie vegetal, visto que órgãos diferentes de diferentes espécies apresentam constituição celular que diferem muito na sua estrutura, essas diferenças são resultado de processos de diferenciação. Dessa forma, se padronizar um dado diâmetro equivalente de partícula de uma droga vegetal, de um órgão específico de uma dada espécie, pode-se utilizar a análise deste parâmetro para a identificação de uma dada amostra (granulometricamente padronizada) em relação à espécie em questão.

A droga vegetal contém, naturalmente, uma certa quantidade de água, que subsiste à 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 por método gravimétrico, segundo Farmacopeia Brasileira (2010, p.194). 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 IV (1988, p.V.4.2.3.) estabelece limites de umidade para drogas vegetais 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 $6,21\% \pm 0,17$, $8,05\% \pm 0,02$ e $8,37\% \pm 0,10$ de umidade contida na droga vegetal para os Acessos 1, 2 e 3, respectivamente. Esse valor, observado para a amostra do Acesso 1, situado fora da faixa percentual estabelecida, pode ser validado segundo a Farmacopeia Brasileira III (1977, p.38), no que se refere a, toda vez que na descrição de um produto não for indicada a percentagem da perda por dessecação, é tolerado um valor de até 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.

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 ácidos orgânicos pertencentes às diversas séries, tais como aromáticos, terpênicos, heterocíclicos, 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. 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, o valor do pH da água destilada utilizada como líquido extrator foi verificado. Desenvolveu-se, para a determinação do valor do pH, segundo Farmacopeia brasileira (1988, p.V.2.19.-V.2.19-2.), o método de potenciometria.

A determinação potenciométrica do pH foi obtida pela leitura em peagômetro, obtendo-se o valor médio para a água destilada de $4,75 \pm 0,09$ unidades de pH e, para os extratos de folhas de *S. terebinthifolius* dos Acessos 1, 2 e 3, os valores médios de $3,96 \pm 0,06$, $4,39 \pm 0,02$ e $4,00 \pm 0,01$ unidades de pH, respectivamente, 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. Valores acima do limite máximo estabelecido podem indicar a presença de contaminantes. Há, portanto, necessidade de estabelecer os limites de variação considerados normais para o conteúdo de cinzas de uma determinada espécie vegetal (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 organometálicos integrantes da planta (cinzas fisiológicas) e/ou de matéria estranha, principalmente solo e areia que adere à superfície da droga (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 (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.4.2.4.; SHARAPIN et al., 2000). A determinação das *cinzas insolúveis em ácido* permite 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 $5,63\% \pm 0,06$, $6,25\% \pm 0,11$ e $5,94\% \pm$

1,54 para cinzas totais e, $0,59\% \pm 0,31$, $0,29\% \pm 0,22$ e $0,20\% \pm 0,07$ para cinzas insolúveis em ácido, para as amostras dos Acessos 1, 2 e 3, respectivamente.

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 de substâncias extraíveis é um processo quantitativo relacionado aos constituintes químico presentes na espécie vegetal. Este ensaio destina-se à determinação do teor de substâncias extraíveis (ativas ou não), segundo o método utilizado. A média dos resultados obtidos nas determinações de substâncias extraíveis referente aos processos extrativos de folhas pulverizadas de *S. terebinthifolius*, dos Acessos 1, 2 e 3, apresentaram respectivamente os valores de $301,17 \text{ mg/g} \pm 13,14$, $318,00 \text{ mg/g} \pm 16,99$ e $274,43 \text{ mg/g} \pm 17,08$ de materiais extraídos, o que representa um percentual de $30,12\% \pm 1,31$, $31,80\% \pm 1,70$ e $27,44\% \pm 1,71$ do teor de extrativos obtido nas circunstâncias estabelecidas.

4. Conclusão

A matéria-prima vegetal deve ser submetida a testes padrões de referência iniciais de acordo com a sua finalidade e, deve apresentar características dentro dos padrões apresentados em monografias específicas, como nas farmacopeias, caso contrário é intitulada como inadequada para sua aplicabilidade.

Mediante os resultados obtidos foi possível demonstrar, primeiramente, que as amostras analisadas de *S. terebinthifolius* encontram-se dentro dos limites gerais de normalidade, para o teor de umidade, preconizado por bases científicas e técnicas, apresentando valores inferiores a 14%. Para os demais parâmetros analisados não há dados de literatura específicos para folhas *S. terebinthifolius* para a realização de uma análise comparativa aos resultados obtidos. Dessa forma, os dados apresentados neste trabalho podem ser utilizados como dados preliminares, podendo compor especificações futuras.

Nesta amostragem, os valores apresentados pelos parâmetros analisados para cada amostra, em relação a média geral e aos desvios padrões pertinentes, não apresentam variações que possam intervir na representatividade e qualidade da droga vegetal. Os resultados não sugerem uma grande influência dos parâmetros quanto aos fatores ambientais, e mesmo genéticos, pelas análises de resíduo sólido do vegetal fresco, perda de água pelo processo de secagem, pH, cinzas e teor de extrativos, onde os valores obtidos não apresentaram variações que possam ser ditas como significativas.

Em contrapartida, os resultados apresentaram uma influência dos parâmetros quanto aos fatores relacionados ao processamento da droga vegetal, devido a utilização de diferentes moinhos para o processamento das amostras do Acesso 1 e Acessos 2 e 3, observado pela diferença dos valores apresentados pelas análises relacionadas a granulométrica (classificação, distribuição e tamanho médio das partículas) e densidade.

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, o interesse despertado é em permitir que o nosso mercado tenha medicamentos à base de plantas contendo matérias-primas vegetais coerentes com os dados da literatura e, conseqüentemente, a eficácia esperada e segurança.

CAPÍTULO II 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 nucleicos, 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 denominados 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, em grande maioria, aos vegetais, sendo seu metabolismo específico, 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 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., 2010).

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., 2010).

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., 2010). 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., 2010).

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., 2010).

A realização das reações de caracterização diretamente no extrato bruto pode eventualmente mascarar o resultado. O fracionamento do extrato permite concentrar os metabólitos, e a realização dos testes com as frações obtidas aumentam a sensibilidade do método e possibilitam geralmente reações mais nítidas (FALKENBERG et al., 2010).

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., 2010).

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., 2010).

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., 2010).

1.3. 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., 2010). 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; CROMATOLOGRAFIA, 2010, p.105). 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 farmacopeias 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 e eluente (COSTA, 2001).

1.4. Cromatografia em coluna por adsorção

A cromatografia em coluna é um método de separação que desempenha um papel importante na purificação de compostos de valor na investigação e produção de produtos farmacêuticos. É um método que pode ser utilizado, de maneira rápida e econômica, para a obtenção de substâncias com pureza elevada. Na prática, fornecem um alto grau de confiabilidade, a transferência direta de escala de análise e um processamento otimizado (CROMATOLOGRAFIA, 2010, p.107).

Além da separação dos compostos de uma mistura, tem-se o interesse em coletar as frações resultantes desse processo contendo os componentes da mistura para posterior análise e/ou utilização, que pode ser a identificação de um ou mais de seus componentes, determinação da atividade biológica de um ou mais constituintes da fração, verificação da utilização de uma fração isolada; purificação de um fármaco e outros.

2. Materiais e Métodos

2.1. Processos fitoquímicos

Para o desenvolvimento dos processos fitoquímicos foram utilizados os materiais vegetais obtidos e preparados conforme as metodologias descritas (itens 2.1., 2.2. e 2.4.) no Capítulo I.

2.1.1. Processos extrativos para a obtenção dos extratos brutos em diclorometano e etanol e, do óleo essencial de folhas de *Schinus terebinthifolius*

Os extratos brutos foram obtidos a partir de folhas secas por processos de extração sob refluxo em aparelho extrator de Soxhlet, sob aquecimento suficiente para manter o solvente em ebulição moderada durante quatro horas e, por maceração dinâmica, em períodos de duas horas, em agitador oscilatório (realizando uma sequência de três séries), a temperatura ambiente, adotando-se a proporção de 1:5 (m/v) entre a droga vegetal pulverizada e o líquido extrator.

Para ambos os processos, foram realizadas extrações, primeiramente, com diclorometano (Merck® P.A.) (polaridade de 3,4), para a obtenção da solução extrativa. No processo de maceração a solução extrativa obtida foi filtrada em algodão. As soluções extrativas recolhidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida (Buchi® R-215) com temperatura máxima de 40 °C, transferidas a frascos de vidros adequados e secas em capela, resultando no extrato bruto diclorometânico (EBd). O resíduo vegetal, resultante do processo de extração com diclorometano, foi retomado e submetido a uma segunda extração, com etanol (Merck® P.A.) (polaridade de 5,2), para a obtenção da solução extrativa etanólica. No processo de maceração a solução extrativa etanólica obtida foi filtrada em algodão. As soluções extrativas recolhidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura máxima de 40 °C, transferidas a frascos de vidros adequados e secas em capela, resultando no extrato bruto etanólico (EBet). Os valores de rendimento referentes aos processos extrativos desenvolvidos foram calculados com base na massa (Micronal® AB204) de resíduo seco obtido.

O óleo essencial foi obtido a partir de folhas frescas pelo processo de destilação por arraste à vapor, com auxílio de aparelho tipo Clevenger. Foi introduzida no balão uma quantidade de massa de folhas frescas rasuradas, e sequencialmente, destilada por arraste à vapor, utilizando água destilada como solvente, por período de duas horas. Terminada a operação, o sistema foi deixado a esfriar e, o volume do óleo essencial, e também o

hidrolato, foram recolhidos do tubo graduado. O aparelho tipo Clevenger foi lavado com diclorometano para a retirada de resíduos aderidos a parede da vidraria e, o seu conteúdo transferido e agitado, juntamente com óleo obtido, em funil de separação. A fase contendo o óleo essencial e o hidrolato (diclorometano) foi recolhida em béquer, a amostra foi seca, agitando-a em mistura com sulfato de sódio anidro. A mistura foi filtrada e levada ao evaporador rotatório, a temperatura ambiente, para a obtenção do óleo essencial (OE). Os valores de rendimento referentes aos processos extrativos desenvolvidos foram calculados com base na massa de óleo essencial obtido.

2.1.2. Perfil cromatográfico dos derivados vegetais por cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos brutos e óleo essencial obtidos foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD), usando como fase estacionária cromatoplas de alumínio cobertas com sílica gel (Merck® CCF-C/25). As análises foram desenvolvidas utilizando-se como fase móvel sistemas de solventes (Merck® P.A.), de diferentes polaridades, utilizando: hexano:acetato de etila (85:15), CH₂Cl₂/MeOH (99:01), CH₂Cl₂/MeOH (95:05) e, CH₂Cl₂/MeOH (90:10) e BAW, aos quais as cromatoplas foram eluídas (o sistema BAW foi constituído por um sistema de solventes, butanol:ácido acético:água destilada (4:1:5), o qual foi preparado em funil de separação e, após homogeneização e separação das fases, a fase inferior constituída foi descartada e utilizada a fase superior). Em seguida, para a detecção dos compostos, as cromatoplas foram submetidas a irradiação com luz ultravioleta a 254 e 365 nm e, posteriormente pulverizadas com solução de anisaldeído como revelador, seguido de aquecimento em estufa a 100 °C. Posteriormente as imagens das cromatoplas foram digitalizadas.

2.1.3. Triagem fitoquímica por cromatografia em camada delgada

Os extratos brutos diclorometânico e etanólico obtidos por processos extrativos, conforme metodologia descrita no item 2.1.1., foram submetidos à triagem fitoquímica por CCD, para a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse. As amostras foram aplicadas em cromatoplas de alumínio de sílica gel (Merck® CCF-C/25) para separação dos compostos químicos presentes. As placas foram eluídas com CH₂Cl₂/MeOH (90:10) e, reveladas com reagentes seletivos para cada classe de compostos (Tabela 4), para a verificação dos principais grupos químicos, os quais resultaram no desenvolvimento de coloração característica. 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).

Tabela 4: Triagem fitoquímica desenvolvida em cromatoplasas por reações químicas de caracterização de classes de substâncias (WAGNER et al., 1984) presentes nos derivados da droga vegetal de folhas de *S. terebinthifolius*.

Grupo de substâncias vegetais de interesse	Reveladores com reagente seletivo
Grupos cromóforos	UV 254 e 365 nm
Alcaloides	Dragendorff
Cumarinas	KOH metanólico + UV
Esteroides	Liebermann
Flavonoides	Produto natural (NP/PEG)
Taninos	FeCl ₃ :MeOH:água
Terpenos	Vanilina sulfúrica ácida

UV: radiação ultravioleta; KOH: hidróxido de potássio; NP/PEG: difenilborato de aminoetanol; FeCl₃: cloreto férrico; MeOH: metanol.

2.1.4. Fracionamento e purificação do extrato bruto e do óleo essencial

Dentre os derivados vegetais testados, o que apresentou melhores resultados quanto a avaliação da resposta da atividade biológica (Capítulos III e IV), foi submetido ao processo de fracionamento, dando-se continuidade a pesquisa, com as frações obtidas nesse processo.

2.1.4.1. Fracionamento e purificação do extrato bruto por extração em fase sólida

As frações foram obtidas pela separação dos componentes constituintes da mistura de compostos presentes no extrato por extração em fase sólida, em funil de placa porosa, empregando-se como fase estacionária sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) para cromatografia em coluna (Merck®). A técnica foi conduzida utilizando-se como fase móvel sistemas de solventes (Merck® P.A.), eluído sucessivamente, com gradientes de hexano (100%), hexano:CH₂Cl₂ (90:10 - 10:90), CH₂Cl₂ (100%), CH₂Cl₂:MeOH (99,9:0,1 - 98,0: 2,0) e MeOH (100%), respectivamente. A amostra foi preparada com o extrato bruto:sílica gel (1:1 m/m), a qual foi introduzida à coluna preparada nas condições de correlação de amostra:sílica gel (1:3 m/m). O eluato foi controlado, recolhendo-se frações de 25 mL, por um cromatograma de fluxo por CCD. As frações recolhidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida (Buchi® R-215) com temperatura máxima de 40 °C até completa eliminação do solvente, resultando nas frações do extrato bruto (F_{EB}). Os valores de rendimento referente ao processo desenvolvido foram calculados com base na massa (Micronal® AB204) de componente seco das frações obtidas.

2.1.4.2. Fracionamento e purificação do óleo essencial por cromatografia em coluna

As frações foram obtidas pela separação dos componentes constituintes da mistura de compostos presente no óleo essencial por cromatografia em coluna usando sistema isocrático, em suporte de vidro preenchido com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) para cromatografia em coluna (Merck®), como fase estacionária. A técnica foi conduzida utilizando-se como fase móvel (Merck® P.A.) hexano:acetato de etila (95:05). A amostra foi preparada com o óleo essencial:sílica gel (1:1 m/m), a qual foi introduzida à coluna preparada nas condições de correlação de amostra:sílica gel (1:30 m/m). O eluato foi controlado, recolhendo-se frações de 10 mL, por um cromatograma de fluxo por CCD. As frações recolhidas foram concentradas em evaporador rotatório (Buchi® R-215), a temperatura ambiente, resultando nas frações do óleo essencial (F_{OE}). Os valores de rendimento referente ao processo desenvolvido foram calculados com base na massa (Micronal® AB204) das frações obtidas.

3. Resultados e discussão

Os derivados da droga vegetal foram obtidos de folhas de *S. terebinthifolius* por processos extrativos, desenvolvidos sob refluxo em aparelho de Soxhlet e por maceração em agitador oscilatório, resultando em extratos brutos diclorometânicos (EBdS e EBdM) e extratos brutos etanólicos (EBetS e EBetM) e, por processo de destilação por arraste de vapor, com aparelho tipo Clevenger, resultando na obtenção do óleo essencial (OE), conforme metodologia descrita no item 2.1.1., e esquematicamente representada nas Figuras 4 e 5.

Figura 4: Fluxograma dos processos extrativos, sob refluxo em aparelho de Soxhlet e por maceração dinâmica, para a obtenção dos extratos brutos diclorometânicos e etanólicos de folhas de *S. terebinthifolius*.

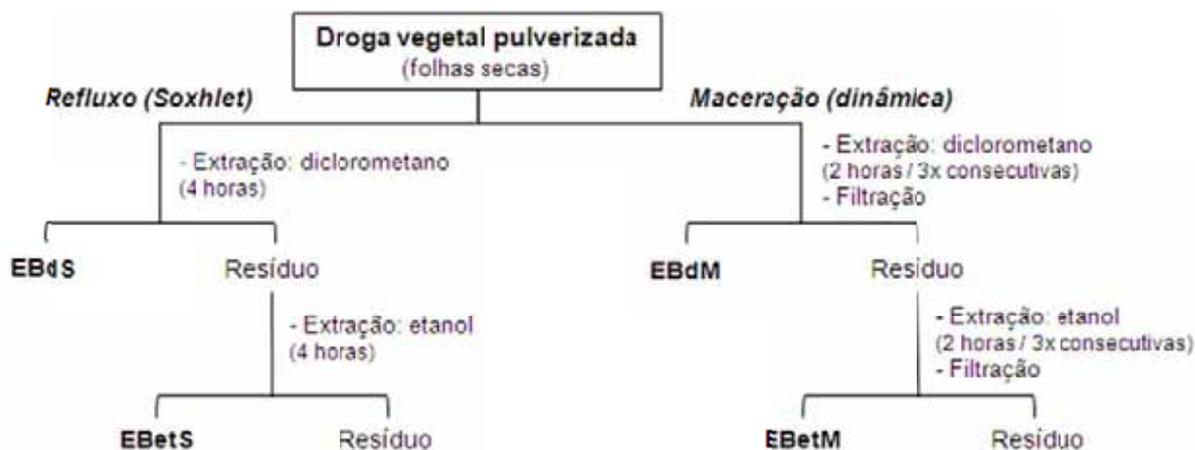
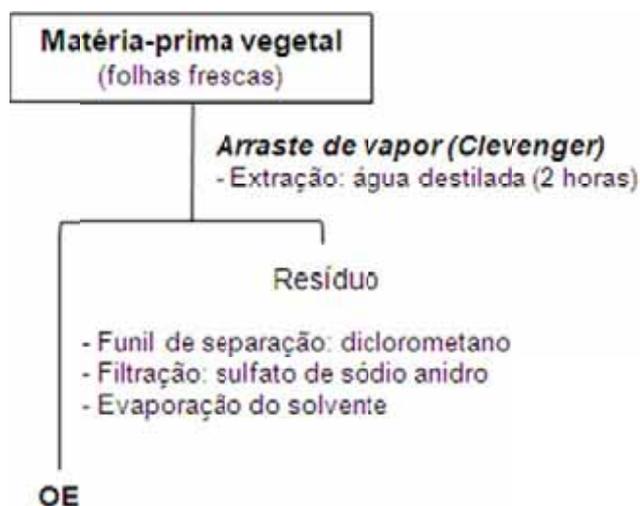


Figura 5: Fluxograma do processo de destilação por arraste de vapor, em aparelho tipo Clevenger, para a obtenção do óleo essencial de folhas de *S. terebinthifolius*.



Com base na massa de resíduo seco dos extratos brutos e do óleo essencial obtidos foram calculados os valores de rendimento dos processos extrativos que estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5: Rendimento dos processos extrativos - sob refluxo em aparelho de Soxhlet, por maceração dinâmica e por arraste de vapor em aparelho tipo Clevenger - referente à massa de resíduo seco dos extratos brutos e do óleo essencial obtidos no processo extrativo de folhas de *S. terebinthifolius*.

Processo extrativo		Rendimento*, segundo origem da matéria-prima vegetal		
Método de extração	Derivado	Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3
Refluxo em Soxhlet (método a quente)	EBdS	6,69%	9,01%	4,92%
	EBetS	11,14%	6,50%	8,80%
Maceração dinâmica (método a frio)	EBdM	7,50%	9,33%	6,58%
	EBetM	20,20%	14,36%	18,88%
Arraste de vapor em Clevenger	OE	-	0,08%	-

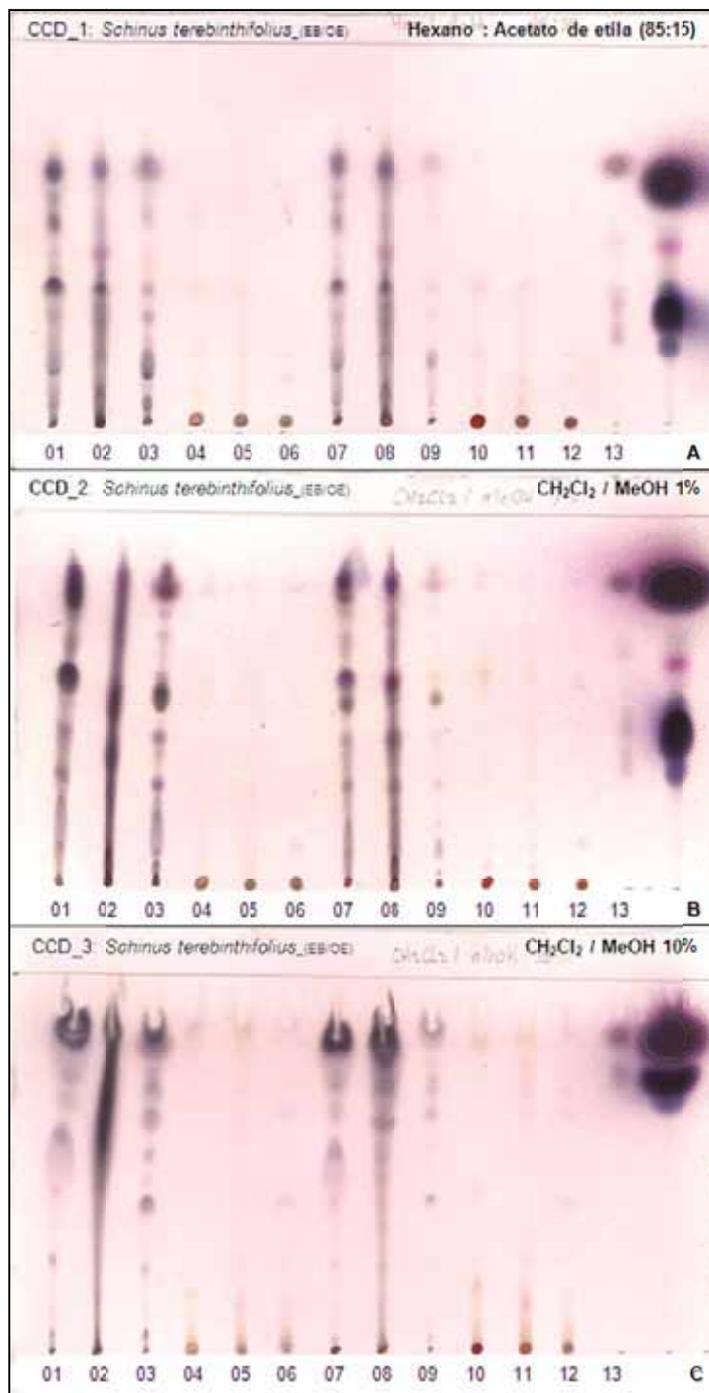
Acessos: Acesso 1 (Unesp); Acesso 2 (CPQBA); Acesso 3 (UniPinhal).

*Porcentagem (%): massa/massa.

Derivados: EBdS: extrato bruto diclorometânico obtido por Soxhlet; EBetS: extrato bruto etanólico obtido por Soxhlet; EBdM: extrato bruto diclorometânico obtido por maceração; EBetM: extrato bruto etanólico obtido por maceração; OE: óleo essencial.

Empregou-se para a análise do perfil químico dos extratos brutos e óleo essencial obtidos da matéria-prima vegetal, a técnica de cromatografia em camada delgada. A análise foi desenvolvida conforme metodologia descrita no item 2.1.2. Buscou-se avaliar os compostos presentes nos derivados de droga vegetal obtidos, quanto à separação de seus componentes pela migração diferencial das substâncias sobre a camada adsorvente da cromatoplaca, por três sistemas eluentes de fase orgânica de diferentes polaridades utilizados: hexano:acetato de etila (85:15), CH₂Cl₂:MeOH (99:01) e CH₂Cl₂:MeOH (90:10). Os perfis cromatográficos por CCD estão apresentados na Figura 6.

Figura 6: Perfil cromatográfico por CCD de extratos brutos e óleo essencial de folhas de *S. terebinthifolius*, matéria-prima vegetal oriundas da Unesp, CPQBA e UniPinhal.



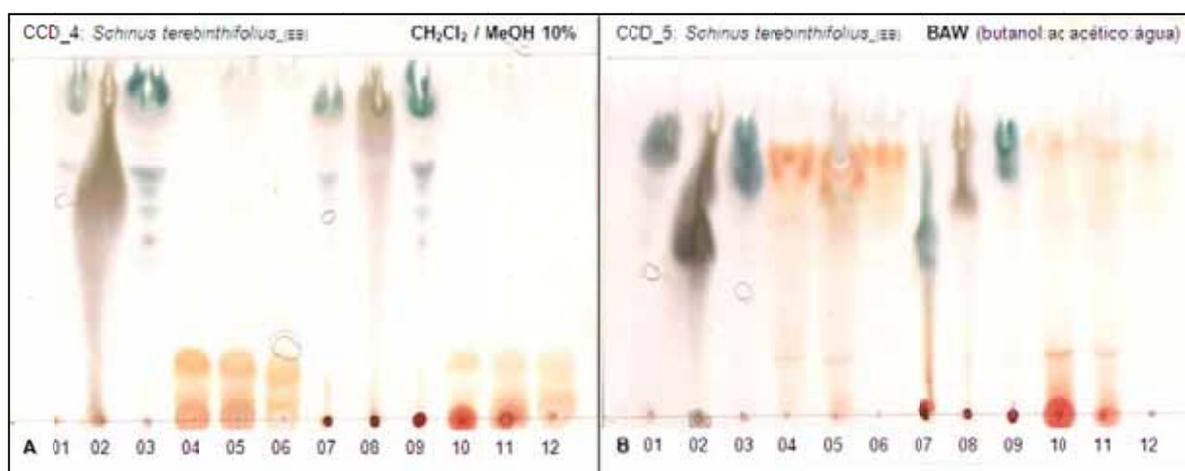
Amostras: 01 EBdS_{CPQBA}; 02 EBdS_{UNESP}; 03 EBdS_{UniPinhal}; 04 EBetS_{CPQBA}; 05 EBetS_{UNESP}; 06 EBetS_{UniPinhal}; 07 EBdM_{CPQBA}; 08 EBdM_{UNESP}; 09 EBdM_{UniPinhal}; 10 EBetM_{CPQBA}; 11 EBetM_{UNESP}; 12 EBetM_{UniPinhal} e 13 OE_{CPQBA}. Fase móvel: A) hexano:acetato de etila (85:15); B) CH₂Cl₂:MeOH (99:01); C) CH₂Cl₂:MeOH (90:10). Revelador: UV a 254 e 365 nm e sol. anisaldeído.

De acordo com a Figura 6, percebe-se que há uma pequena variação nos perfis cromatográficos dos extratos diclorometânicos bem como dos extratos etanólicos de folhas de *S. terebinthifolius*, o que pode ser devido ao quimiotipo, isto é, diferença na composição química entre os diferentes Acessos estudados. Segundo Santos e colaboradores (2007),

em um estudo que avaliou as possíveis alterações químicas do derivado vegetal de exemplares de *S. terebinthifolius*, não houve variação da composição química do derivado vegetal, para um mesmo acesso, durante os meses de coleta. Por outro lado, foram observadas diferenças químicas entre os Acessos estudados, em todos os meses avaliados, verificando que as mesmas produzem compostos químicos majoritários diferentes. Pilan e pesquisadores (2011), em um estudo para avaliar o teor e a composição química do derivado vegetal de populações de aroeira, observaram em suas análises uma grande variabilidade em termos de teor de óleo e composição química entre as populações, ressaltando a importância do quimiotipo de interesse para uma dada utilização em particular. Esses estudos corroboram a variação dos perfis cromatográficos encontrados para as amostras estudadas no presente trabalho e podem justificar a diferença na resposta das atividades biológicas em relação aos derivados vegetais frente aos testes avaliados (ver Capítulos III e IV).

Desenvolveu-se também análise, por cromatografia em camada delgada, para os extratos brutos diclorometânico e etanólico, em solução de concentração de 30 mg mL⁻¹, sendo aplicado à placa 10 µL (microsseringa Microliter™ #701) do extrato padronizado. As análises foram desenvolvidas utilizando-se como fase móvel dois sistemas de solventes: CH₂Cl₂:MeOH (90:10) e BAW. Os perfis cromatográficos por CCD estão apresentados na Figura 7.

Figura 7: Perfil cromatográfico por CCD de extratos brutos de folhas de *S. terebinthifolius*, matéria-prima vegetal oriundas da Unesp, CPQBA e UniPinhal.



Amostras: 01 EBdS_{CPQBA}; 02 EBdS_{UNESP}; 03 EBdS_{UniPinhal}; 04 EBetS_{CPQBA}; 05 EBetS_{UNESP}; 06 EBetS_{UniPinhal}; 07 EBdM_{CPQBA}; 08 EBdM_{UNESP}; 09 EBdM_{UniPinhal}; 10 EBetM_{CPQBA}; 11 EBetM_{UNESP} e 12 EBetM_{UniPinhal}. Fase móvel: A) CH₂Cl₂/MeOH (90:10); B) BAW. Revelador: UV a 254 e 365 nm e sol. Anisaldeído.

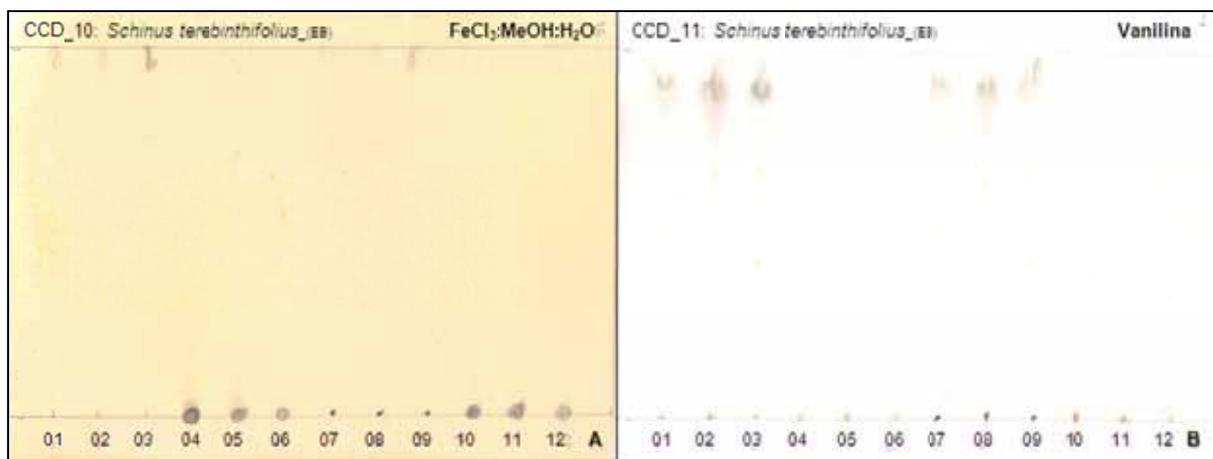
Com a finalidade inicial de investigação e de avaliação da presença de grupos de metabólitos secundários em folhas de *S. terebinthifolius*, utilizou-se um conjunto de técnicas apropriadas para a triagem fitoquímica por CCD da droga vegetal em questão. Os resultados da análise fitoquímica dos extratos brutos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultado referente à triagem fitoquímica por CCD dos extratos brutos da droga vegetal pulverizada de folhas de *S. terebinthifolius*, segundo Wagner e colaboradores (1984),

Grupos de substâncias	Reveladores específicos	Resultados das análises	Extratos brutos
Grupos cromóforos	UV 254 e 365 nm	Positivo	EBdS e EBdM _{CPQBA}
Alcaloides	Dragendorff	Negativo	-
Cumarinas	KOH metanólico + UV	Negativo	-
Esteroides	Liebermann	Negativo	-
Flavonoides	NP/PEG	Negativo	-
Taninos	FeCl ₃ :MeOH:H ₂ O	Positivo	EBetS e EBetM
Terpenos	Vanilina sulfúrica ácida	Positivo	EBdS e EBdM

Pela análise do perfil cromatográfico, dentre os grupos de substâncias pesquisadas na triagem fitoquímica por CCD (Tabela 6), pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas quando reveladas com reagentes específicos às classes descritas na literatura (WAGNER et al., 1984), foi possível observar e inferir, pela positividade da reação (Figura 8), a presença de terpenoides nos extratos diclorometânicos (EBdS e EBdM), a partir da reação com vanilina sulfúrica ácida, caracterizado pela coloração violeta e, a presença de taninos nos extratos etanólicos (EBetS e EBetM), a partir da reação com o revelador seletivo constituído de FeCl₃:MeOH:H₂O, caracterizada pela coloração azul, localizada no ponto de aplicação, indicando a presença de taninos hidrolisáveis. Foi observado também pontos de fluorescência através da irradiação com luz UV a 254 e 365 nm, somente para os extratos diclorometânicos proveniente da matéria-prima vegetal coletada no Acesso 2 (CPQBA), obtidos tanto por refluxo (EBdS_{CPQBA}) quanto por maceração (EBdM_{CPQBA}).

Figura 8: Triagem fitoquímica por CCD, segundo Wagner e colaboradores (1984), de extratos brutos de folhas de *S. terebinthifolius*, matéria-prima vegetal oriundas da Unesp, CPQBA e UniPinhal.

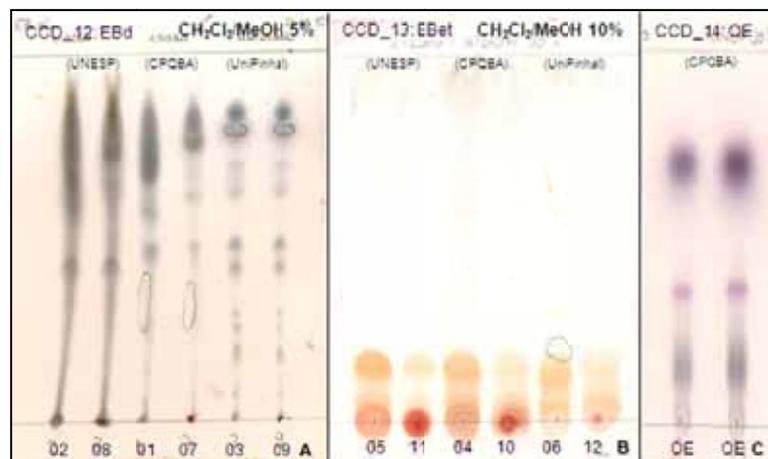


Amostras: 01 EBd_{CPQBA}; 02 EBd_{UNESP}; 03 EBd_{UniPinhal}; 04 EBet_{CPQBA}; 05 EBet_{UNESP}; 06 EBet_{UniPinhal}; 07 EBd_{CPQBA}; 08 EBd_{UNESP}; 09 EBd_{UniPinhal}; 10 EBet_{CPQBA}; 11 EBet_{UNESP} e 12 EBet_{UniPinhal}. Fase móvel: CH₂Cl₂/MeOH (90:10). Reveladores: A) FeCl₃:MeOH:H₂O (Taninos) e B) vanilina sulfúrica ácida (Terpenos).

Os resultados da triagem fitoquímica constituem uma orientação e devem ser interpretados em conjunto com os resultados de 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).

Posteriormente, procedeu a análise pela técnica de cromatografia em camada delgada para os extratos brutos diclorometânico e etanólico e óleo essencial, em soluções de concentrações de 30 mg mL⁻¹ para os EB e de 10 mg mL⁻¹ para o OE, sendo aplicados à placa 10 µL (microseringa Microliter™ #701) do derivado padronizado. As análises foram desenvolvidas utilizando-se como fase móvel, CH₂Cl₂:MeOH (95:05) para os EBd, CH₂Cl₂:MeOH (90:10) para os EBet e, hexano:acetato de etila (90:10) para o OE, a fim de evidenciar diferenças em relação à origem da matéria-prima vegetal e do método de extração. Os perfis cromatográficos por CCD estão apresentados na Figura 9.

Figura 9: Perfil cromatográfico por CCD de extratos brutos e óleo essencial de folhas de *S. terebinthifolius*, matéria-prima vegetal oriundas da UNESP, CPQBA e UniPinhal.



Amostras: A) 02 EBd_{SUNESP}; 08 EBd_{MUNESP}; 01 EBd_{CPQBA}; 07 EBd_{CPQBA}; 03 EBd_{UniPinhal}; 09 EBd_{UniPinhal}; B) 05 EBet_{SUNESP}; 11 EBet_{MUNESP}; 04 EBet_{CPQBA}; 10 EBet_{CPQBA}; 06 EBet_{UniPinhal}; 12 EBet_{UniPinhal}; C) OE_{CPQBA}. Fase móvel: A) CH₂Cl₂:MeOH (95:05); B) CH₂Cl₂:MeOH (90:10); C) hexano:acetato de etila (90:10). Revelador: UV a 254 e 365 nm e sol. anisaldeído.

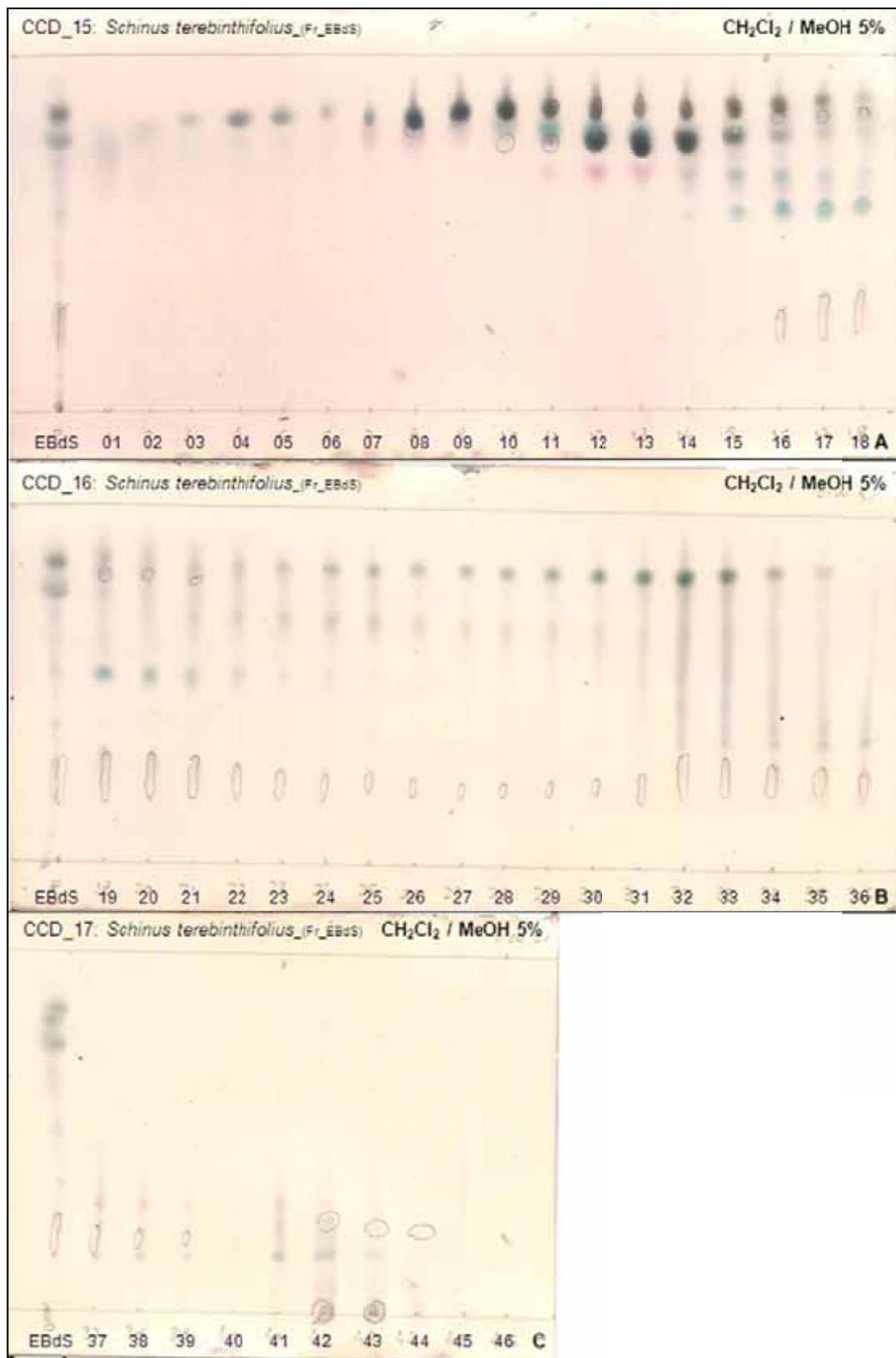
Pela análise do perfil cromatográfico (Figura 9) foi possível comparar os perfis dos extratos obtidos, em relação à origem do material vegetal e a técnica utilizada no processo extrativo. Pode-se constatar uma certa similaridade entre os perfis dos extratos diclorometânico obtidos, tanto por refluxo quanto por maceração de um mesmo indivíduo, diferindo-se em relação à área de coleta das amostras vegetais (Figura 9.A).

Na Figura 9.B observou-se a ocorrência das mesmas bandas, tanto pela extração por refluxo quanto por maceração, entretanto a intensidade de sinal apresenta-se mais intensa para os extratos obtidos por refluxo, o que pode ser indicativo de um melhor rendimento no processo, pois se trata de um procedimento exaustivo de extração, o qual leva ao esgotamento do material vegetal. Na Figura 9.C pode-se observar a separação dos constituintes majoritários, em três bandas distintas, o que pode representar grupos de constituintes de caracteres semelhantes.

Inicialmente, foram obtidos os extratos brutos diclorometânico, rico em compostos de baixa a média polaridade, os extratos brutos etanólicos, enriquecido em compostos de média e alta polaridade, e óleo essencial, composto por constituintes de baixa polaridade. Esses derivados vegetais foram submetidos a prévios ensaios de atividade antimicrobiana e antiproliferativo, assim sendo, de acordo aos resultados apresentados nos Capítulos III e IV, o EBd_{CPQBA}, foi selecionado, juntamente com o OE, para o prosseguimento dos estudos fitoquímicos, e da atividade biológica.

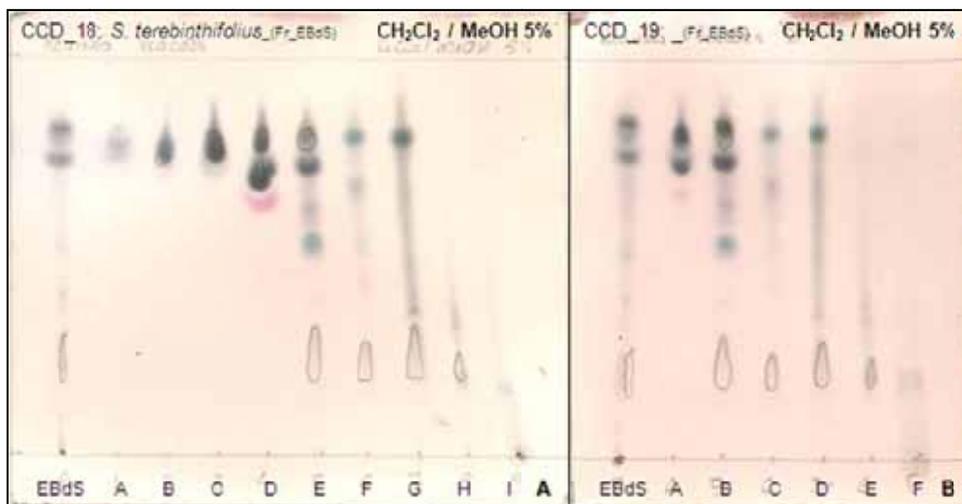
Conduziu-se então o fracionamento do EBdS_{CPQBA}, pela técnica de extração em fase sólida, conforme metodologia descrita no item 2.1.4.1. As frações foram recolhidas, em frascos devidamente identificados, resultando em um total de 46 frações, e monitoradas por cromatogramas de fluxo por CCD, sendo os seus componentes determinados (Figura 10). Com base na análise dos perfis cromatográficos, as frações equivalentes foram agrupadas, inicialmente, em 9 frações, sendo de F1-F6, F7-F8, F9-F10, F11-F13, F14-F22, F23-F30, F31-F36, F37-F40, F41-F46, e nomeadas em FA, FB, FC, FD, FE, FF, FG, FH, FI, respectivamente (Figura 11.A). Posteriormente, após reanálise do perfil cromatográfico dessas frações, elas foram reagrupou-as em 6 frações, sendo de FA-FD, FE, FF, FG, FH, FI e, renomeadas em FA_{EB}, FB_{EB}, FC_{EB}, FD_{EB}, FE_{EB}, FF_{EB}, respectivamente.(Figura 11.B). Com base na massa das frações obtidas, foram calculados os valores de rendimento (Tabela 7).

Figura 10: Cromatograma de fluxo por CCD das frações obtidas, por cromatografia em coluna filtrante, do EBdS_{CPQBA} de folhas de *S. terebinthifolius*.



Fase móvel: CH₂Cl₂:MeOH (95:05). Revelador: UV a 254 e 365 nm e sol. anisaldeído.

Figura 11: Perfil cromatográfico por CCD das frações obtidas, por cromatografia em coluna filtrante, do EBdS_{CPQBA} de folhas de *S. terebinthifolius*.



A) perfil cromatográfico das frações equivalentes agrupadas e nomeadas em FA, FB, FC, FD, FE, FF, FG, FH, FI. B) perfil cromatográfico das frações equivalentes reagrupadas e renomeadas em FA_{EB}, FB_{EB}, FC_{EB}, FD_{EB}, FE_{EB}, FF_{EB}. Fase móvel: CH₂Cl₂:MeOH (95:05). Revelador: UV a 254 e 365 nm e sol. anisaldeído.

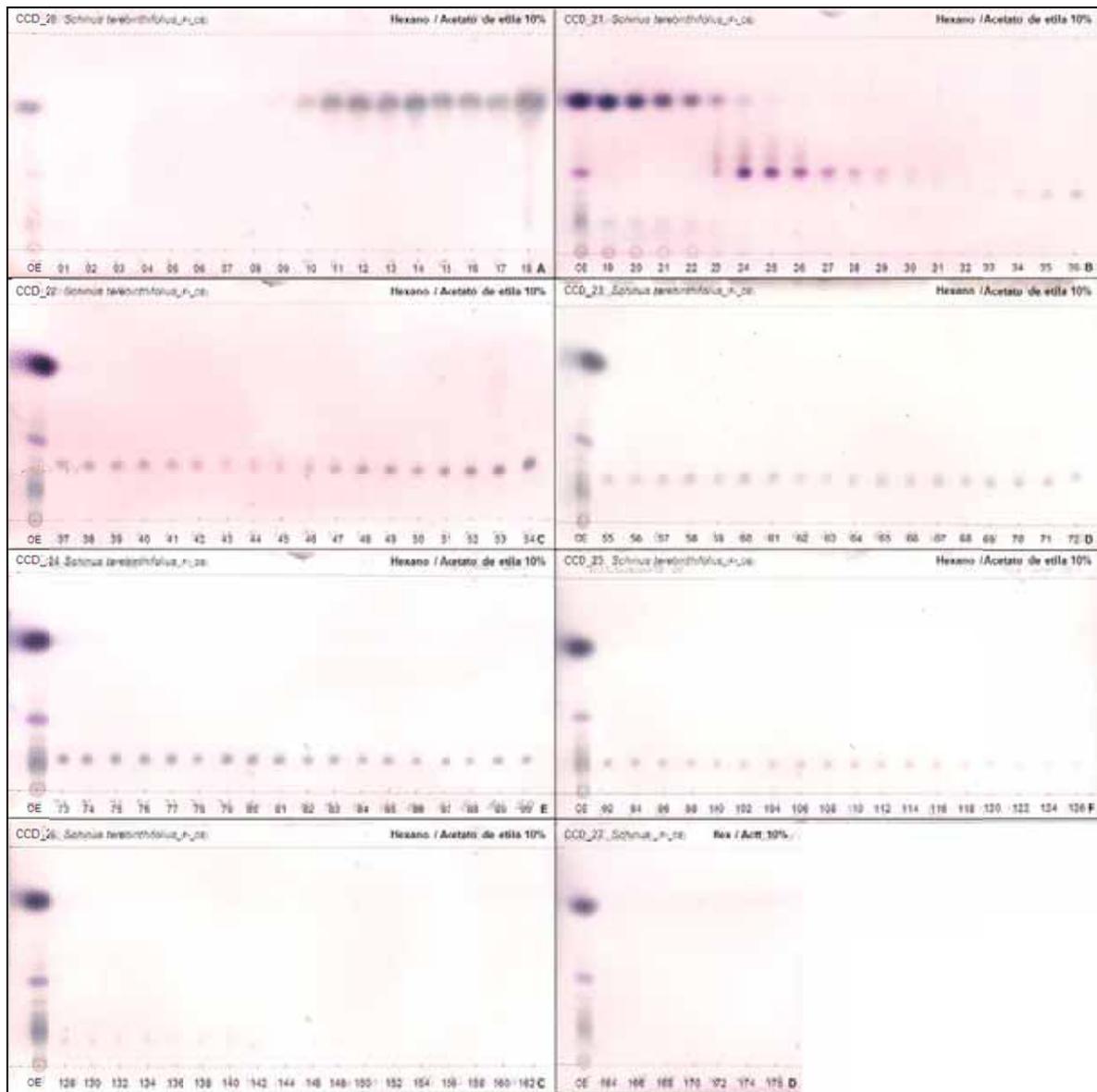
Tabela 7: Rendimento referente à massa do componente seco constituinte das frações obtidas do processo de cromatografia em coluna filtrante do EBdS_{CPQBA} de folhas de *S. terebinthifolius*.

Fração do EBdS _{CPQBA}	Massa do componente da fração (g)	Rendimento (%)
FA _{EB}	0,3208	31,83
FB _{EB}	0,2409	23,90
FC _{EB}	0,0572	05,67
FD _{EB}	0,1318	13,08
FE _{EB}	0,0156	01,55
FF _{EB}	0,1053	10,45

Dado: massa de EBdS_{CPQBA} utilizado, para cálculo de rendimento, de 1,008 g.

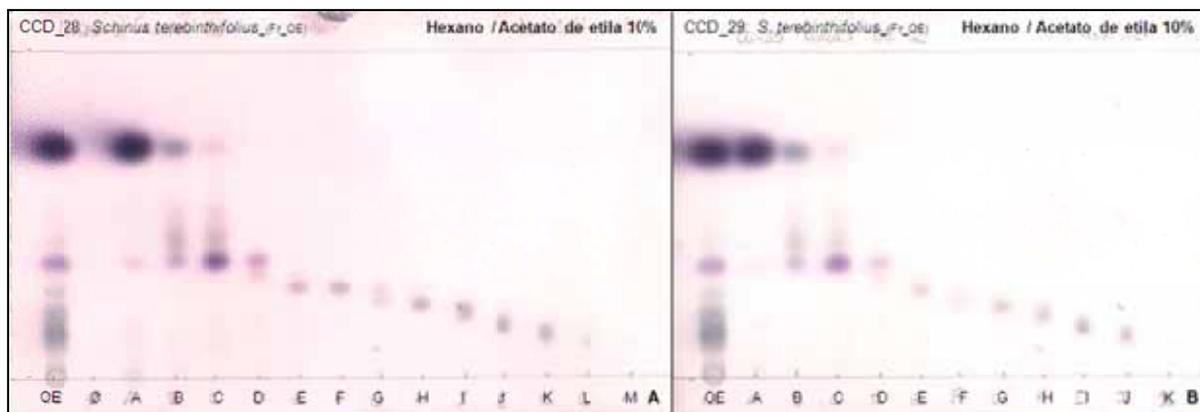
Conduziu-se também o fracionamento do OE, pela técnica de cromatografia em coluna, conforme metodologia descrita no item 2.1.4.2. As frações foram recolhidas, em frascos devidamente identificados, resultando em um total de 175 frações, e monitoradas por cromatogramas de fluxo por CCD (Figura 12). Com base na análise dos perfis cromatográficos, as frações equivalentes foram agrupadas em 14 frações, sendo de F1-F7, F8-F22, F23, F24-F26, F27-F32, F33-F36, F37-F42, F43-F47, F48-54, F55-F72, F73-F90, F91-126, F127-F162, F163-175, e nomeadas como FØ, FA, FB, FC, FD, FE, FF, FG, FH, FI, FJ, FK, FL, FM, respectivamente (Figura 13.A). Posteriormente, após reanálise do perfil cromatográficos dessas frações, estas foram reagrupadas em 11 frações, sendo a FØ descartada e, de FA, FB, FC, FD, FE-FF, FG, FH, FI, FJ, FK, FL-FM, e, renomeadas em FA_{OE}, FB_{OE}, FC_{OE}, FD_{OE}, FE_{OE}, FF_{OE}, FG_{OE}, FH_{OE}, FI_{OE}, FJ_{OE}, FK_{OE}, respectivamente (Figura 13.B). Com base na massa das frações obtidas e da quantidade de óleo fracionado, foram calculados os valores de rendimento (Tabela 8).

Figura 12: Cromatograma de fluxo por CCD das frações obtidas, por cromatografia em coluna clássica isocrática, do OE de folhas de *S. terebinthifolius*, resultando em 175 frações.



Fase móvel: hexano:acetato de etila (90:10). Revelador: UV a 254 e 365 nm e sol. anisaldeído.

Figura 13: Perfil cromatográfico por CCD das frações obtidas, por cromatografia em coluna clássica isocrática, do OE de folhas de *S. terebinthifolius*.



A) perfil cromatográfico das frações equivalentes agupadas e nomeadas em FØ, FA, FB, FC, FD, FE, FF, FG, FH, FI, FJ, FK, FL, FM. B) perfil cromatográfico das frações equivalentes reagupadas e renomeadas em FA_{OE}, FB_{OE}, FC_{OE}, FD_{OE}, FE_{OE}, FF_{OE}, FG_{OE}, FH_{OE}, FI_{OE}, FJ_{OE}, FK_{OE}. Fase móvel: hexano:acetato de etiva (90:10). Revelador: UV a 254 e 365 nm e sol. anisaldeído.

Tabela 8: Rendimento referente à massa do componente do óleo das frações obtidas do processo de cromatografia em coluna clássica isocrática do OE de folhas de *S. terebinthifolius*.

Fração do OE	Massa da fração (g)	Rendimento (%)
FA _{OE}	0,6611	64,13
FB _{OE}	0,0107	1,04
FC _{OE}	0,0140	1,36
FD _{OE}	0,0106	1,03
FE _{OE}	0,0077	0,75
FF _{OE}	0,0044	0,43
FG _{OE}	0,0056	0,54
FH _{OE}	0,0314	3,05
FI _{OE}	0,0261	2,53
FJ _{OE}	0,0408	3,96
FK _{OE}	0,0282	2,74

Dado: massa de OE utilizado, para cálculo de rendimento, de 1,0308 g.

Queires e pesquisadores (2006) avaliaram os efeitos de polifenóis purificados a partir de folhas de aroeira brasileira e observaram efeitos inibidores de frações purificadas de flavonoides sobre linhagem de câncer de próstata. 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 antirradicalar, que resultou no isolamento de cinco compostos fenólicos ativos (galato de etila, galato de metila, miricetrina, quercitrina e miricetina). Cavalher-Machado e pesquisadores (2008) investigaram a atividade antialérgica da fração de acetato de etila de folhas de *S. terebinthifolius*, enriquecida de ácido gálico,

metil galato e 1,2,3,4,6-pentagalactoilglucose e, demonstraram a inibição da liberação de histamina durante a degranulação de mastócitos e influxo de eosinófilos. Farag (2008), em seu estudo sobre compostos fenólicos de folhas de *S. terebinthifolius*, isolou e identificou pela primeira vez dois ésteres de ácido quínico (ácido 5-O-cafeoilquínico e ácido 5-O-cumaroilquínico), três glicosídeos miricetina (miricetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1^{'''}→6^{''})- β -D-galactopiranosídeo, miricetina 3-O- β -D-glucuronido, miricetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo), 1,6-digalactoil- β -D-glucose 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 siríngico, ácido cumárico, ácido elágico, ácido galico e catequina (traço). 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. Salvi Júnior (2009), em seu estudo farmacognóstico com folhas de *S. terebinthifolius*, detectou, por triagem fitoquímica preliminar e triagem por CCD, do extrato bruto etanólico e frações, a presença de taninos pirogálicos (hidrolisáveis), de galotaninos e elagitaninos, flavonoides (flavonóis), saponinas, terpenoides e/ou núcleo fundamental de esteroides e heterosídeos e, avaliou o efeito do extrato e das frações sobre micro-organismos, observando-se uma atividade promissora dos derivados vegetais como agentes antibacterianos. Gomes e pesquisadores (2010) avaliaram a atividade de lectina isolada de folhas *S. terebinthifolius* contra *C. albicans* e *E. coli*, e constataram que esta substância é um biomaterial de potencial aplicação antimicrobiana. Fatos esses que fizeram relevante a continuidade dos estudos com folhas de aroeira, para com o desenvolvimento do presente trabalho.

Tomando-se como base esses estudos e outros já publicados, correlacionando dados fitoquímicos quanto a presença de certos metabólitos, técnicas de separação, purificação e isolamento de componentes químicos de plantas medicinais, com investigações de atividades biológicas desses componentes, pelas evidências dos derivados de folhas de *S. terebinthifolius* possuírem tais compostos ativos, reforça-se o tema desse trabalho quanto a utilização das folhas de aroeira como farmacógeno.

4. Conclusão

As folhas de *S. terebinthifolius* podem ser indicadas como fonte de compostos, de diferentes classes, passíveis de ser extraídos. Isso pode ser observado pelo rendimento obtido nos processos extrativos. Quanto aos valores de rendimento obtidos, observou-se um melhor rendimento no processo de maceração dinâmica em relação à extração sob refluxo em aparelho Soxhlet, independente dos líquidos extratores utilizados. Em relação aos solventes usados, o diclorometano apresentou similaridades relativas aos processos utilizados, logo o etanol apresentou diferenças de rendimento aos processos extrativos, revelando uma maior eficiência na maceração dinâmica. Em relação às amostras, a do Acesso 1 apresentou um maior rendimento extrativo, quando utilizado etanol como solvente, dessa forma, calcula-se que esse Acesso apresenta uma concentração maior de compostos de média e alta polaridade em relação aos demais. Da mesma forma, a amostra do Acesso 2 apresentou um maior rendimento, ao uso de diclorometano, o que se pode considerar uma concentração maior de compostos de baixa a média polaridade em relação aos demais Acessos.

Os resultados da pesquisa relacionada com o perfil fitoquímico das folhas de aroeira-vermelha verificaram a ocorrência de grupos de metabólitos secundários de interesse, e revelaram a presença de terpenoides nos extratos diclorometânicos (EBdS e EBdM) e, de compostos fenólicos (taninos hidrolisáveis) nos extratos etanólicos (EBetS e EBetM), tanto para o processo de extração sob refluxo em aparelho Soxhlet quanto para maceração dinâmica, para todos os Acessos avaliados.

Os resultados observados na extração em fase sólida mostraram-se inferiores, quando comparados à cromatografia em coluna, a qual se mostrou mais efetiva para a separação dos componentes da mistura do derivado vegetal analisado, com a obtenção de compostos mais purificados, ou até mesmo, substâncias puras.

Esses resultados permitem estabelecer uma estratégia para a extração, fracionamento, purificação e isolamento das substâncias presentes no derivado vegetal de folhas de *S. terebinthifolius*.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PARA MICRO-ORGANISMOS ORAIS

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 sua atividade e toxicidade, como foi o caso de plantas que ainda hoje são utilizadas na medicina tradicional e na medicina clássica (CUNHA; ROQUE, 2005).

No início do século 20, antes da “Era sintética”, 80% dos medicamentos eram obtidos de raízes, cascas e folhas. Ao longo da história, os produtos naturais têm sido investigados e utilizados como matéria-prima para tratamentos de doenças. Em tempos atuais os produtos naturais continuam sendo fontes significantes de fármacos e o emprego de medicamentos à base de plantas é muito importante em muitas regiões do mundo (CUNHA; ROQUE, 2005; McCHESNEY et al., 2007).

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; ROQUE, 2005). Segundo a OMS, 80% da população mundial residente em países em desenvolvimento, faz uso de medicamentos derivados de plantas medicinais. Pesquisas demonstram que mais de 90% da população já fez uso de alguma planta medicinal (CORRÊA; ALVES, 2008). No Brasil, a rica biodiversidade, como a maior diversidade vegetal do mundo, ampla diversidade sociocultural, uso de plantas medicinais vinculado ao conhecimento tradicional e tecnologia para validar cientificamente esse conhecimento, contribuiu para que a utilização das plantas medicinais seja considerada uma área estratégica e um grande potencial para o desenvolvimento dessa terapêutica para o país.

No mundo Ocidental, principalmente nas últimas décadas, tem ocorrido um renovado interesse pelo uso das plantas medicinais na terapêutica, constituindo, em certas circunstâncias, uma ajuda nos cuidados primários à saúde e um excelente complemento terapêutico, compatível com a medicina clássica (CUNHA; ROQUE, 2005). Esse interesse, popular e institucional, vem crescendo no sentido de fortalecer a fitoterapia no SUS. A OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário, tendo em conta a utilização de plantas ou preparações

destas no que se refere à atenção primária de saúde. Ao lado disso, destaca-se a participação dos países em desenvolvimento nesse processo, já que possuem 67% das espécies vegetais do mundo (MINISTÉRIO, 2006).

No Brasil, a regulamentação de acesso e utilização de plantas medicinais e fitoterápicos está sendo contemplada pela Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF), que vem estabelecendo diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações nessa área. Cabe ressaltar a normatização, pela Portaria nº 971 de maio de 2006, da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, a qual enfatiza a introdução de plantas medicinais e fitoterápicas no âmbito da atenção básica no sistema público.

1.1. Pesquisa da atividade biológica

Considerando-se a existência de aproximadamente 300 mil espécies de plantas superiores, apenas uma pequena porcentagem, estimada em 10 mil espécies, tem seu uso medicinal documentado (McCHESNEY et al., 2007). Dentre as espécies botânicas existentes, a espécie *S. terebinthifolius* foi selecionada para o estudo da atividade biológica, levando-se em conta o aspecto etnobotânico e seu potencial antimicrobiano.

A pesquisa da atividade biológica de plantas medicinais e aromáticas visa descobrir aquelas 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, óleos essenciais, frações ou substâncias isoladas. Seja geral ou específica, a triagem produz somente suposições sobre a atividade que a amostra possa vir a ter (LÚCIO, 2000).

O estudo fitoquímico bio guiado, 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 antimicrobiano

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 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, não ter efeitos indesejáveis ao hospedeiro, ser estável quimicamente, entre outras. A atividade antimicrobiana é um item relevante na caracterização de extratos vegetais, dada a 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, confirmou-se, quanto ao potencial antimicrobiano apresentado em baixas concentrações de extrato, a ocorrência de inibição sobre o crescimento de micro-organismos (LIMA et al., 2000). Isso confirma a grande importância que tais produtos possuem como perspectiva para produção de novos e eficientes fármacos 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 nucléicos e inibição da síntese de ácidos nucleicos.

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 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, sendo o

método de microdiluição em placas, um método quantitativo, utilizado para a determinação da concentração inibitória mínima e que permite a análise de vários compostos em pequenas quantidades e em 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, fundamenta a avaliação do potencial das substâncias presentes em *Schinus terebinthifolius*, como agentes antimicrobianos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

2.1.1. Amostras vegetais

Para o desenvolvimento dos estudos de atividade antimicrobiana, pela bioprospecção de compostos vegetais antimicrobianos, foram utilizados os extratos brutos e óleo essencial e, posteriormente todas as frações do extrato e do óleo essencial vegetal de *S. terebinthifolius* obtidos conforme as metodologias descritas no Capítulo II.

2.1.2. Micro-organismos

As cepas de bactérias utilizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana foram selecionadas levando-se em consideração a composição microbiana dos biofilmes orais e dos principais micro-organismos relacionados à cárie, gengivite e outras infecções da cavidade oral: *Fusobacterium nucleatum* (anaeróbio estrito) ATCC 25586, *Porphyromonas gingivalis* (anaeróbio estrito) ATCC 33277, *Prevotella intermedia* (anaeróbio estrito) ATCC 25611, *Staphylococcus aureus* (aeróbio) ATCC 6538, *Streptococcus mitis* (anaeróbio) ATCC 903, *Streptococcus mutans* (microaerófilo) ATCC 25175 e *Streptococcus sanguis* (microaerófilo) ATCC 10556. A cepa de levedura, *Candida albicans* (aeróbio) ATCC 18804, foi introduzida ao estudo devido a sua coparticipação na formação dos biofilmes dentais e sua prevalência na cavidade oral.

2.1.3. Meios de cultura

Foram utilizados para manutenção dos micro-organismos e realização dos testes de atividade antimicrobiana por método de bioautografia, os meios de cultura: Brain Heart Infusion Agar (BHI Ágar) (BD Bacto™) ou Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck®) para a cepa de *Staphylococcus aureus*, Brain Heart Infusion Agar (BHI Ágar) (BD Bacto™) acrescido de cloreto de L-cisteína (Synth®) para as cepas de *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* e, Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (Merck®) para a cepa da levedura *C. albicans*.

Para a realização dos testes de atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em placas foi utilizado o caldo BHI para a bactéria aeróbia, o caldo BHI

acrescido de L-cisteína para as bactérias anaeróbias e microaerófilas e, o caldo Sabouraud, para a levedura.

Para a realização dos testes de atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia em CCD foi utilizado o BHI Ágar ou TSA para a bactéria aeróbia, o BHI Ágar acrescido de L-cisteína para as bactérias anaeróbias e microaerófilo e, o SDA para a levedura.

2.1.4. Estocagem e manutenção das cepas

As amostras microbianas foram mantidas em meios de cultura apropriados acrescido de 20% de glicerol e conservadas em ultrafreezer a -70 °C. Para os ensaios de atividade, as cepas foram repicadas em caldos apropriados, incubadas em estufa (Fanem[®], modelo 002 CB) durante 24 horas a 37 °C.

2.1.5. Preparo do inóculo

O preparo dos inóculos para os testes de suscetibilidade foram realizados seguindo as recomendações do protocolo M7-A6, para bactérias (CLSI, 2005) e, recomendações do protocolo M27-A2, para leveduras (CLSI, 2002).

2.1.5.1. Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana foi padronizada a partir de cultura obtida conforme item 2.1.3. Após agitação e consequente repouso, uma alíquota da suspensão foi transferida para tubo contendo solução salina 0,85% estéril, seguida de leitura e ajuste espectrofotométrico a 625 nm com absorvância de 0,08 a 0,10, correspondente a uma concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Para utilização na microplaca, foi realizado uma diluição seriada do inóculo a 1:10 em meio de cultura específico descrito no item 2.1.3.1., obtendo-se uma suspensão de concentração a $1,5 \times 10^6$ células mL⁻¹ e, desta, 1 mL foi adicionado em 500 µL de meio de cultura específico, obtendo-se uma suspensão correspondente a concentração de 1×10^6 células mL⁻¹, para que, com a aplicação de 100 µL desta nos poços da microplaca, resulte em uma concentração final de 5×10^5 células mL⁻¹, conforme as recomendações do protocolo M7-A6 para bactérias (CLSI, 2005).

2.1.5.2. Padronização da suspensão de levedura

A suspensão de levedura foi padronizada a partir de cultura obtida conforme item 2.1.3. Após agitação e conseqüente repouso, uma alíquota da suspensão foi transferida para tubo contendo solução salina 0,85% estéril, seguida de leitura e ajuste espectrofotométrico a 530 nm com absorvância de 0,08 a 0,10, correspondente a uma concentração equivalente a $5,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Para utilização na microplaca, foi realizado uma diluição seriada do inóculo a 1:100 em meio de cultura específico descrito no item 2.1.3.1., obtendo-se uma suspensão de concentração a $5,0 \times 10^4$ células mL⁻¹, seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão, para que, com a aplicação de 100 µL desta nos poços da microplaca, resulte em uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ células mL⁻¹, conforme as recomendações do protocolo M27-A2, para leveduras (CLSI, 2002).

2.1.6. Preparo dos derivados vegetais para os ensaios de atividade microbiana

Os extratos brutos e o óleo essencial foram preparados em solução de 20 mg mL⁻¹, em propileno glicol P.A. (Cetus/Ecibra®), antes da realização dos testes de atividade antimicrobiana.

As frações do extrato EBdS_{CPQBA} e do óleo essencial foram preparadas em solução de 4 mg mL⁻¹, em propileno glicol P.A. (Cetus/Ecibra®), antes da realização dos testes.

2.1.7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em placas

A CIM foi determinada através da microdiluição em placa, segundo a Norma M7-A6, para bactérias (CLSI, 2005) e, Norma M27-A2, para leveduras (CLSI, 2002) do Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente, National Committee for Clinical Laboratory Standards), com modificações.

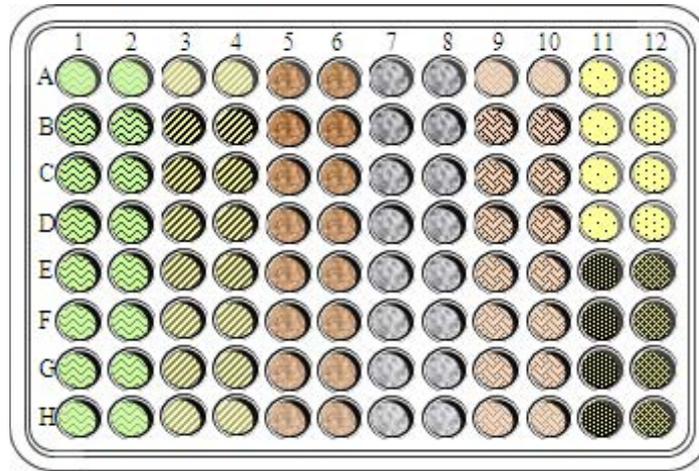
2.1.7.1. Método de microdiluição em placas

Os métodos para determinação da CIM foram realizados segundo normas do CLSI adaptando-se as técnicas propostas. Os testes foram realizados em placas para cultura (Test Plate 96F 92096 / TPP®), descartáveis e estéreis de 96 poços (8 linhas de A-H / 1-12 colunas), de fundo plano, com tampa. Foram utilizados os meios de cultura, conforme item 2.1.3.1. Os derivados vegetais foram preparados em solução conforme descrito no item

2.1.5. Para o desenvolvimento dos testes foram utilizadas cepas padrão, conforme apresentado no item 2.1.2.

Aos 96 poços da placa (linhas de A a H e colunas de 1 a 12) (Figura 14), foram depositados, aos orifícios das linhas B-H das colunas de 1-10, 100 μL do meio de cultura líquido (caldo) estéril (item 2.1.3.1.). Em seguida, aos orifícios da linha B das colunas de 1-10 foram acrescentados 100 μL das soluções das amostras a serem testadas, de concentração conhecida (uma amostra diferente para cada coluna, em duplicata) e, o conteúdo dos orifícios foi homogeneizado com o meio e transferidos (Multicanal Eppendorf Research® plus), por diluições seriadas, das linhas B até H, sendo os 100 μL finais desprezados de modo a obter uma concentração decrescente das amostras. Após as diluições seriadas, as concentrações avaliadas, para a bioprospecção das amostras vegetais variaram entre 5000 e 78,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e, para a avaliação das frações, do extrato e do óleo, variaram entre 1000 e 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sequencialmente, foram adicionados 100 μL do inóculo do micro-organismo a ser avaliado (item 2.1.2.), para concentração final de 5×10^5 células mL^{-1} , para bactérias e, $2,5 \times 10^3$ células mL^{-1} , para leveduras, aos orifícios das linhas B-H das colunas de 1-10. Foram reservados orifícios para teste de controles, sendo aos orifícios da coluna 11 das linhas de A-D depositados 200 μL (Multicanal Eppendorf Research® plus) do meio, para controle de esterilidade do meio de cultura; aos orifícios da coluna 11 das linhas de E-H foram depositados 100 μL do meio e adicionados, posteriormente, 100 μL do inóculo, para o controle de crescimento bacteriano; aos orifícios da coluna 12 das linhas de A-D foram depositados 50 μL do meio, adicionados 50 μL de antibiótico e, posteriormente, 100 μL do inóculo, para o controle positivo; aos orifícios da coluna 12 das linhas de E-H foram depositados 50 μL do meio, adicionados 50 μL do solvente utilizado para o preparo da amostra (item 2.1.5.) e, posteriormente, 100 μL do inóculo, para o controle negativo. Aos orifícios da linha A das colunas de 1-10 foram depositados 150 μL do meio e acrescentados 50 μL da solução da amostra a ser testada, de concentração conhecida (uma amostra diferente para cada coluna, em duplicata), sendo estes referentes ao controle de esterilidade das amostras. Posteriormente, as microplacas foram levadas à estufa incubadora (Fanem®, modelo 002 CB), por 24/48 horas, a temperatura de 36 °C, em atmosfera aeróbia, microaerofilia ou anaeróbia (AnaeroGen™) dependendo da exigência do micro-organismo (CLSI 2002, 2005).

Figura 14: Esquema demonstrativo da microplaca de 96 orifícios, mostrando a distribuição das linhas e colunas, utilizada para a avaliação da CIM.



Coluna 11, linhas A-D: controle de esterilidade do meio de cultura. Coluna 11, linhas E-H: controle de crescimento bacteriano. Coluna 12, linhas A-D: controle positivo (antibiótico). Coluna 12, linhas E-H: controle negativo (solvente); Linha A, colunas 1-10: controle de esterilidade das amostras. Linhas B-H, colunas 1-10: avaliação das amostras vegetais.

2.1.7.2. Leitura das placas utilizando solução de cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) como revelador para determinação da CIM

Após o período de incubação foi desenvolvido o método de revelação da placa por solução de cloreto 2-3-5 trifetil tetrazólio (CTT) para a determinação da CIM. Para isto, foram adicionados aos 96 orifícios das placas, 50 µL da solução de CTT, preparado na concentração de 0,1 g / 100 mL em água estéril e, posteriormente, as placas foram reincubadas por três horas, para a viragem de coloração. O valor da CIM foi definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano, capaz de impedir o crescimento visível de um micro-organismo, pelo aparecimento de coloração vermelha conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória, em testes de sensibilidade (CLSI, 2002; CLSI, 2005).

2.1.8. Determinação da concentração bactericida (CBM) e fungicida mínima (CFM) dos derivados vegetais selecionados a partir do método de microdiluição em placas

A atividade bactericida e fungicida das amostras vegetais foi confirmada pela determinação da CBM e CFM, pelo plaqueamento por superfície do material do poço correspondente à CIM e concentrações anteriores a este, em meio de cultura específico. A CBM e CFM foram definidas como a concentração capaz de impedir o crescimento microbiano em meio de cultura sólido específico (CLSI 2002, 2005).

2.1.9. Atividade antimicrobiana diferencial com base na concentração inibitória mínima (CIM)

O método para a determinação da atividade antimicrobiana diferencial foi adaptado das técnicas do National Cancer Institute (NCI, 2013). Este estudo foi realizado considerando-se os valores da concentração inibitória mínima obtidos da avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* pelo método de microdiluição em placas.

Para executar análise comparativa, os valores das CIMs para os micro-organismos testados frente ao composto teste foram convertidos nos seus valores logarítmicos [$\log_{10}(\text{CIM})$]. Os valores de $\log_{10}(\text{CIM})$ dos micro-organismos foram utilizados para cálculo da média [M_CIM] em relação ao composto teste. Para a preparação dos dados, cada valor de $\log_{10}(\text{CIM})$ foi subtraído da média correspondente para criar um valor, nomeado de delta, originando valores positivos e negativos, segundo a expressão:

$$\Delta = M_CIM - \text{Log}_{10}(\text{CIM})$$

Criou-se um gráfico padrão traçando os valores de delta, positivos e negativos, gerados a partir de um conjunto de valores de CIM.

2.1.10. Determinação da atividade antimicrobiana por método de bioautografia, de acordo com SLUSARENKO e colaboradores (1989) em placas de cromatografia em camada delgada (CCD)

Para o desenvolvimento dos estudos de atividade antimicrobiana por método de bioautografia por CCD, foram utilizados o óleo essencial vegetal (OE) e as frações do extrato bruto (EBdS_{CPQBA}) de *S. terebinthifolius* obtidos conforme a metodologia descrita no Capítulo II.

2.1.10.1. Preparo dos derivados vegetais

As amostras de OE e frações do EBdS_{CPQBA} foram preparadas em solução, na concentração de 10 mg mL⁻¹, em acetato de etila (Merck® P.A.).

2.1.10.2. Preparo das placas de CCD

Primeiramente, as cromatoplasmas foram ajustadas às dimensões adequadas, de 6x6 cm, para acomodação em placas de Petri. Após dissolução das amostras vegetais em acetato de etila, aplicou-se uma concentração (µL) (seringa Microliter™ #701), previamente

determinada, de 60 e 90 µg do OE e de 100 µg das frações FB_{EB}, FC_{EB} e FD_{EB} do EBdS_{CPQBA}, em cromatoplas de alumínio de sílica gel (Merck® CCF-C/25), em triplicata. Para eluição utilizou-se um sistema solvente, previamente determinado, de hexano:acetato de etila (90:10) para as cromatoplas de OE e CH₂Cl₂:MeOH (95:05) para as cromatoplas das frações do EBdS_{CPQBA}. Uma das placas foi submetida a irradiação com luz ultravioleta a 254 e 365 nm e, posteriormente pulverizadas com solução de anisaldeído como revelador e as outras duas foram submetidas aos ensaios de bioautografia.

2.1.10.3. Preparo e padronização do inóculo

O inóculo, dos micro-organismos utilizados (item 2.1.2.) para os testes de bioautografia, foi preparado a partir do crescimento microbiano decorrido de 24/48 horas em meios de cultura BHI Ágar ou TSA (aeróbios), BHI Ágar acrescido de cloreto de L-cisteína (anaeróbios) e, SDA (levedura) a temperatura de 37 °C. Procedeu-se a padronização transferindo-se células, da cultura preparada, do tubo de manutenção, para tubo contendo solução salina 0,15%, esterilizada. A densidade óptica da suspensão microbiana foi ajustada de acordo a leitura espectrofotométrico, a 625 nm (bactérias) e 530 nm (levedura), com absorvância de 1,9, de modo a padronizar a concentração inicial de células a uma concentração equivalente de 10⁸ UFC mL⁻¹.

2.1.10.4. Teste de atividade antimicrobiana

A suspensão de micro-organismos preparada, conforme descrito no item 2.1.9.3., foi inoculada por técnica de “pour plate” no meio de cultura (ágar) apropriado, conforme item 2.1.3.1., utilizando-se a proporção de 1:1000 (v:v). Uma alíquota de 0,5 mL de solução de cloreto 2-3-5 trifênil tetrazólio (CTT) a 1 mg mL⁻¹ foi adicionada ao meio inoculado, como indicador de atividade respiratória das células. A seguir, o meio foi vertido em placas de Petri, sobre as placas de CCD, onde foram aplicadas as amostras de derivados vegetais. Posteriormente, após homogeneização, as placas foram levadas à estufa incubadora (Fanem®, modelo 002 CB), por 24/48 horas, a temperatura de 37 °C, em atmosfera aeróbia, microaerofilia ou anaeróbia (AnaeroGen™) dependendo da exigência do micro-organismo.

2.1.10.5. Leitura dos resultados

O CTT permite avaliar qualitativamente se houve inibição do crescimento em locais correspondentes a uma determinada fração da amostra corrida na placa em questão, pela formação de halos de inibição, região onde não haverá reação com o revelador.

3. Resultados e discussão

3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em placas

Os testes de microdiluição em placas foram realizados conforme descritos na metodologia para a avaliação da atividade antimicrobiana (item 2.1.6.) As amostras avaliadas foram representadas, primeiramente, pelos extratos brutos diclorometânicos e etanólicos e, o óleo essencial vegetal de *S. terebinthifolius* obtidos conforme a metodologia descrita no item 2.1.1., do Capítulo II. Posteriormente, pela análise dos resultados obtidos pela bioprospecção dos derivados vegetais testados, com a melhor atividade antimicrobiana observada e, por outros fatores anteriormente apresentados, um dos extratos brutos e o óleo essencial vegetal foram selecionados e submetidos ao processo de fracionamento, conforme a metodologia descrita no item 2.1.4., do Capítulo II, para prosseguimento do estudo microbiológico.

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos e óleo essencial vegetal testados pode ser observada pela leitura das placas, de acordo com a viragem da coloração, e os resultados das análises revelaram os perfis de susceptibilidade ou resistência das cepas de referência às amostras vegetais testadas e, estão apresentados na Tabela 9 com os valores das CIMs correspondentes e, representados pela Figura 15.

Tabela 9: Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$, dos extratos brutos e óleo essencial de *S. terebinthifolius*, pelo método de microdiluição em placas utilizando solução de cloreto 2-3-5 trifênil tetrazólio (CTT) como revelador.

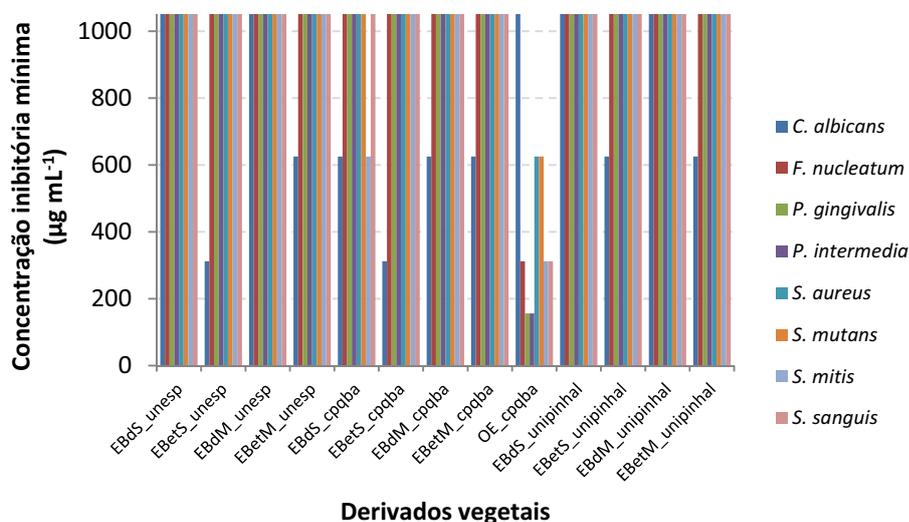
Micro-organismos	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$)													
	Acesso 1				Acesso 2						Acesso 3			
	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM	OE	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM	
<i>C. albicans</i>	2500	312	1250	625	625	312	625	625	2500	2500	625	1250	625	
<i>F. nucleatum</i>	*	2500	*	*	1250	2500	*	*	312	*	2500	*	2500	
<i>P. gingivalis</i>	2500	2500	5000	2500	5000	2500	5000	2500	156	2500	2500	2500	2500	
<i>P. intermedia</i>	5000	1250	*	1250	5000	1250	*	1250	156	5000	2500	2500	2500	
<i>S. aureus</i>	*	2500	*	2500	2500	2500	*	*	625	2500	2500	*	2500	
<i>S. mutans</i>	*	2500	*	2500	1250	2500	1250	*	625	*	2500	*	2500	
<i>S. mitis</i>	*	1250	*	2500	625	1250	*	*	312	*	2500	*	2500	
<i>S. sanguis</i>	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	312	2500	2500	2500	2500	

Acessos: Acesso 1 (Unesp); Acesso 2 (CPQBA); Acesso 3 (UniPinhal).

EBdS: extrato bruto diclorometânico obtido por Soxhlet; EBetS: extrato bruto etanólico obtido por Soxhlet; EBdM: extrato bruto diclorometânico obtido por maceração; EBetM: extrato bruto etanólico obtido por maceração; OE: óleo essencial.

*: > 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 15: Concentração inibitória mínima (CIM) relevante em $\mu\text{g mL}^{-1}$, dos extratos brutos e óleo essencial de *S. terebinthifolius* como potenciais agentes antimicrobianos, pelo método de microdiluição em placas utilizando solução de cloreto 2-3-5 trifenil tetrazólio (CTT) como revelador.



Derivados: EBdS: extrato bruto diclorometânico obtido por Soxhlet; EBetS: extrato bruto etanólico obtido por Soxhlet; EBdM: extrato bruto diclorometânico obtido por maceração; EBetM: extrato bruto etanólico obtido por maceração; OE: óleo essencial.

Pode-se dizer que houve atividade inibitória em função da concentração (CIM), dos derivados vegetais avaliados, frente ao crescimento dos micro-organismos testados. A concentração inicialmente testada para a bios prospecção dos extratos brutos e óleo essencial vegetal foi de $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ indicando que se não houve atividade antimicrobiana nesta concentração, o que não quer dizer que a amostra vegetal não tenha atividade contra os micro-organismos testados em concentrações superiores a esta ou em outras que não foram testadas.

Pesquisadores relatam que os derivados de produtos naturais com um CIM inferior a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados relevantes e derivados vegetais com um CIM inferior a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados promissores como potenciais agentes antimicrobianos (GIBBONS, 2004; VAN VUUREN, 2008; LAMOUNIER, 2012)

Os resultados das análises revelaram certa sensibilidade dos micro-organismos testados às amostras vegetais, apresentando uma atividade relevante das amostras do óleo essencial e de certos extratos brutos, de folhas de *S. terebinthifolius*, como potenciais agentes antimicrobianos.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 9 e Figura 15) pode-se dizer que o óleo essencial das folhas de *S. terebinthifolius* apresentou uma melhor atividade antimicrobiana contra *P. gingivalis* e *P. intermedia* (CIM $156 \mu\text{g mL}^{-1}$), também para *F. nucleatum*, *S. mitis* e *S. sanguis* (CIM $312 \mu\text{g mL}^{-1}$) e, *S. aureus* e *S. mutans* (CIM $626 \mu\text{g mL}^{-1}$) em relação aos outros derivados vegetais testados. Em relação aos extratos brutos testados, diclorometânicos e etanólicos, também obtidos de folhas de *S. terebinthifolius*, o EBetS_{UNESP}

e o EBetS_{CPQBA} se destacaram em atividade inibitória em função da concentração e, apresentam uma melhor atividade antimicrobiana contra *C. albicans* (CIM 312 µg mL⁻¹), seguido dos extratos, EBdS_{CPQBA} que apresentou atividade contra *C. albicans* e *S. mitis* (CIM 625 µg mL⁻¹) e EBetM_{UNESP}, EBdM_{CPQBA}, EBetM_{CPQBA}, EBetS_{UniPinhal} e EBetM_{UniPinhal} que apresentaram atividade contra *C. albicans* (CIM 625 µg mL⁻¹).

Pelos resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana e, em conjunto aos fatores discutidos nos demais Capítulos, levou-se ao fracionamento do óleo essencial (OE_{CPQBA}) e do extrato bruto (EBdS_{CPQBA}), o que resultou em 11 frações do OE_{CPQBA}, as quais foram nomeadas em FA_{OE}, FB_{OE}, FC_{OE}, FD_{OE}, FE_{OE}, FF_{OE}, FG_{OE}, FH_{OE}, FI_{OE}, FJ_{OE} e FK_{OE} e, 6 frações do EBdS_{CPQBA}, as quais foram nomeadas em FA_{EB}, FB_{EB}, FC_{EB}, FD_{EB}, FE_{EB} e FF_{EB}, como pode ser observado no Capítulo II.

As frações obtidas foram então submetidas à avaliação da atividade antimicrobiana e puderam ser observadas pela leitura das microplacas para a determinação das CIMs. Pode-se dizer que houve atividade inibitória em função da concentração (CIM), das frações OE_{CPQBA} e das do EBdS_{CPQBA} avaliadas, frente ao crescimento dos micro-organismos testados. A concentração inicialmente testada para a avaliação das atividades antimicrobianas foi de 1000 µg mL⁻¹.

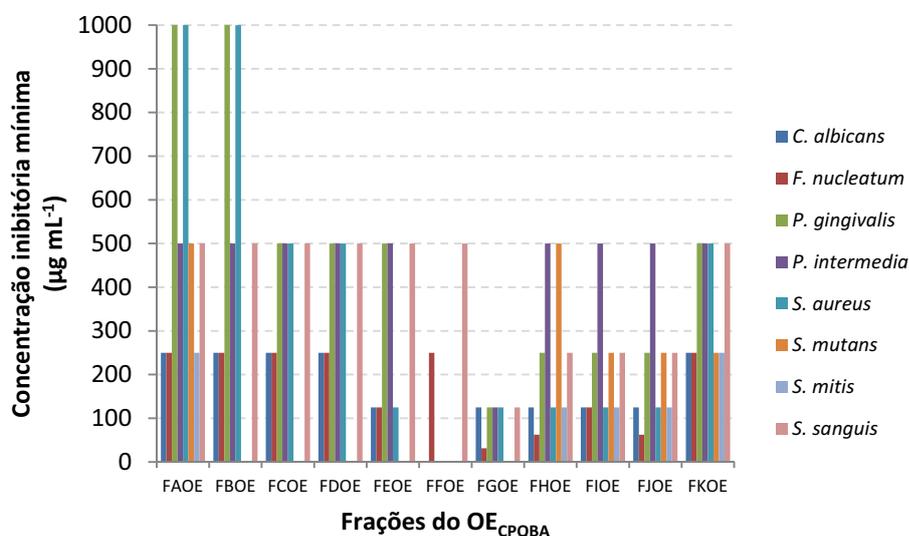
Os resultados referentes às atividades das frações do OE_{CPQBA} de folhas de *S. terebinthifolius* estão apresentados na Tabela 10 com os valores das CIMs correspondentes e, representados pela Figura 16.

Tabela 10: Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em µg mL⁻¹, das frações do OE_{CPQBA} de *S. terebinthifolius*, pelo método de microdiluição em placas utilizando solução de cloreto 2-3-5 trifênil tetrazólio (CTT) como revelador.

Micro-organismos	CIM das frações do OE _{CPQBA} (µg mL ⁻¹)										
	FA _{OE}	FB _{OE}	FC _{OE}	FD _{OE}	FE _{OE}	FF _{OE}	FG _{OE}	FH _{OE}	FI _{OE}	FJ _{OE}	FK _{OE}
<i>C. albicans</i>	250	250	250	250	125	NA	125	125	125	125	250
<i>F. nucleatum</i>	250	250	250	250	125	250	31,25	62,50	125	62,50	250
<i>P. gingivalis</i>	1000	1000	500	500	500	NA	125	250	250	250	500
<i>P. intermedia</i>	500	500	500	500	500	NA	125	500	500	500	500
<i>S. aureus</i>	1000	1000	500	500	125	NA	125	125	125	125	500
<i>S. mutans</i>	500	NA	NA	NA	NA	NA	NA	500	250	250	250
<i>S. mitis</i>	250	NA	NA	NA	NA	NA	NA	125	125	125	250
<i>S. sanguis</i>	500	500	500	500	500	500	125	250	250	250	500

NA: não avaliado

Figura 16: Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$, das frações do OE_{CPQBA} de *S. terebinthifolius*, pelo método de microdiluição em placas utilizando solução de cloreto 2-3-5 trifenil tetrazólio (CTT) como revelador.



De acordo com os resultados apresentados da análise das frações do óleo essencial testadas (Tabela 10 e Figura 16) e, segundo considerações de certos pesquisadores (GIBBONS, 2004; VAN VUUREN, 2008; LAMOUNIER, 2012), pode-se dizer que os resultados revelaram que as frações FG_{OE} , FH_{OE} e FJ_{OE} apresentaram uma atividade antimicrobiana mais elevada em relação as demais, podendo ser consideradas promissoras como potenciais agentes antimicrobianos. A fração FG_{OE} se destacou em atividade inibitória em função da concentração e, apresentou uma melhor atividade antimicrobiana contra *F. nucleatum* (CIM $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$), e contra *C. albicans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. aureus* e *S. sanguis* (CIM $125 \mu\text{g mL}^{-1}$), seguida das frações FH_{OE} e FJ_{OE} que apresentaram atividades semelhantes contra *F. nucleatum* (CIM $62,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e contra *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mitis* (CIM $125 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cabe ressaltar a atividade antimicrobiana das frações FI_{OE} contra *C. albicans*, *F. nucleatum*, *S. aureus* e *S. mitis* (CIM $125 \mu\text{g mL}^{-1}$) e FE_{OE} contra *C. albicans*, *F. nucleatum* e *S. aureus* (CIM $125 \mu\text{g mL}^{-1}$). De um modo em geral, os resultados revelaram certa sensibilidade dos micro-organismos às demais frações analisadas, podendo ser consideradas relevantes como potenciais agentes antimicrobianos.

Posteriormente ao teste de determinação da CIM, foi determinada a CBM e CFM, a menor concentração de amostra vegetal capaz de destruir o micro-organismo, das amostras que apresentaram atividade antimicrobiana.

Para tal, as amostras vegetais diluídas, no método de microdiluição em placas, foram subcultivadas pelo plaqueamento por superfície do material do poço correspondente à CIM e concentrações inferiores a esta, em meio de cultura específico e, incubadas durante 24/48

horas à temperatura de 37 °C. Este teste consiste verificar em quais concentrações as substâncias que possuem atividade antimicrobiana são bacteriostáticas ou bactericidas e fungistáticas ou fungicidas. Os resultados para esta determinação estão apresentados de acordo com a Tabela 11.

Tabela 11: Valores da concentração bactericida mínima (CBM) e da concentração fungicida mínima (CFM) das frações do OE_{CPQBA} de *S. terebinthifolius* que apresentaram atividade antimicrobiana.

Micro-organismos	CBM e CFM do OE _{CPQBA} (µg mL ⁻¹)										
	FA _{OE}	FB _{OE}	FC _{OE}	FD _{OE}	FE _{OE}	FF _{OE}	FG _{OE}	FH _{OE}	FI _{OE}	FJ _{OE}	FK _{OE}
<i>C. albicans</i>	1000	1000	*	1000	*	NA	1000	*	*	*	*
<i>F. nucleatum</i>	250	250	250	1000	*	*	*	1000	1000	125	*
<i>P. gingivalis</i>	*	*	*	*	*	NA	*	*	*	*	*
<i>P. intermedia</i>	*	*	*	*	*	NA	500	500	*	1000	*
<i>S. aureus</i>	1000	1000	500	500	250	NA	125	500	1000	250	1000
<i>S. mutans</i>	500	NA	NA	NA	NA	NA	NA	500	500	250	250
<i>S. mitis</i>	250	NA	NA	NA	NA	NA	NA	125	125	125	250
<i>S. sanguis</i>	*	*	500	*	*	*	250	500	1000	1000	*

*: > 1000 µg mL⁻¹

NA: não avaliado.

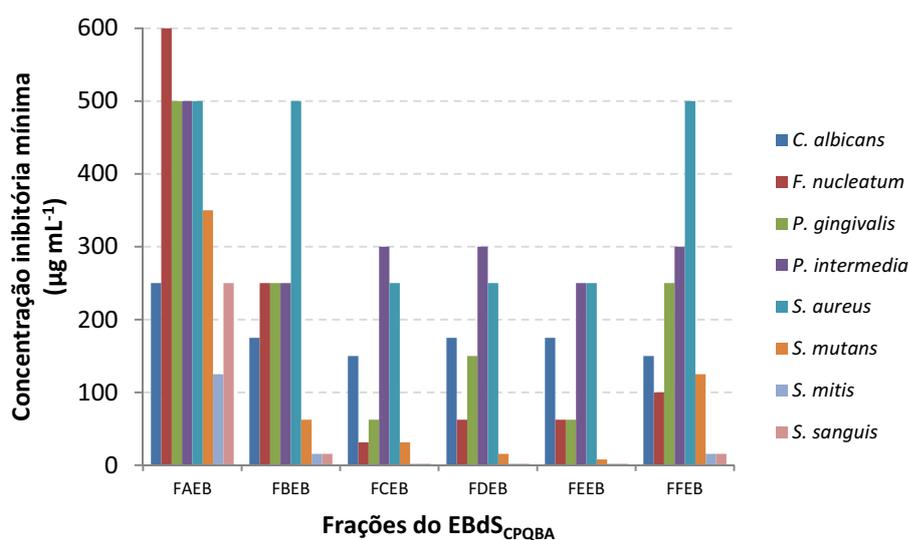
De acordo com os resultados obtidos para a CBM e CFM (Tabela 11) pode-se dizer que as frações do óleo essencial apresentaram ação bactericida e fungicida para os micro-organismos testados na concentração indicada na Tabela 11, sendo que em concentrações superiores a essas apresentam ação bacteriostática e fungistática. Os resultados também revelaram, para determinadas frações, valores de CBMs ou CFMs iguais as CIMs, o que pode ser considerado como os melhores resultados apresentados, devido a esses valores terem permanecido, como observado para as frações FG_{OE} frente a *S. aureus* (CIM 125 µg mL⁻¹), FH_{OE}, FI_{OE} frente a *S. mitis* (CIM 125 µg mL⁻¹) e FJ_{OE} frente a *F. nucleatum* e *S. mitis* (CIM 125 µg mL⁻¹). Cabe ainda destacar que não foi possível determinar a CBM e CFM para aquelas concentrações de frações que apresentaram valores acima da testada (> 1000 µg mL⁻¹).

Os resultados referentes às atividades das frações do EBdS_{CPQBA} de folhas de *S. terebinthifolius* estão apresentados na Tabela 12 com os valores das CIMs correspondentes e, representados pela Figura 17. Para os valores de CIMs obtidos acima da concentração de 62,5 µg mL⁻¹, foram desenvolvidos faixas de concentrações, para verificar a possibilidade de valores de CIM intermediárias, entre 1000 e 500, 500 e 250, 250 e 125 e 125 e 62,5 µg mL⁻¹, para avaliar melhor o valor das CIMs correspondentes às frações testadas.

Tabela 12: Valores de concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$, das frações do EBdS_{CPQBA} de *S. terebinthifolius*, pelo método de microdiluição em placas utilizando solução de cloreto 2-3-5 trifenil tetrazólio (CTT) como revelador.

Micro-organismos	CIM das frações EBdS _{CPQBA} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	FA _{EB}	FB _{EB}	FC _{EB}	FD _{EB}	FE _{EB}	FF _{EB}
<i>C. albicans</i>	250	175	150	175	175	150
<i>F. nucleatum</i>	600	250	31,25	62,50	62,50	100
<i>P. gingivalis</i>	500	250	62,50	150	62,50	250
<i>P. intermedia</i>	500	250	300	300	250	300
<i>S. aureus</i>	500	500	250	250	250	500
<i>S. mutans</i>	350	62,50	31,25	15,63	7,81	125
<i>S. mitis</i>	125	15,63	1,95	1,95	1,95	15,63
<i>S. sanguis</i>	250	15,63	1,95	1,95	1,95	15,63

Figura 17: Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$, das frações do EBdS_{CPQBA} de *S. terebinthifolius*, pelo método de microdiluição em placas utilizando solução de cloreto 2-3-5 trifenil tetrazólio (CTT) como revelador.



De acordo com os resultados apresentados da análise das frações do EBdS_{CPQBA} testadas (Tabela 12 e Figura 17) e, levando-se em consideração as ponderações anteriormente utilizadas (GIBBONS, 2004; VAN VUUREN, 2008; LAMOUNIER, 2012), pode-se dizer que os resultados revelaram que as frações FC_{EB}, FD_{EB} e FE_{EB} apresentaram uma atividade antimicrobiana mais elevada em relação as demais, podendo ser consideradas promissoras como potenciais agentes antimicrobianos. A fração FE_{EB} se destacou em atividade inibitória em função da concentração e, apresentou uma melhor atividade antimicrobiana contra *S. mitis* e *S. sanguis* (CIM 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$), contra *S. mutans* (CIM 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e contra *F. nucleatum* e *P. gingivalis* (CIM 62,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), seguida das frações, FD_{EB} que apresentou atividade contra *S. mitis* e *S. sanguis* (CIM 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$), contra *S.*

mutans (CIM 15,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e contra *F. nucleatum* (CIM 62,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e FC_{EB} que apresentou atividade contra *S. mitis* e *S. sanguis* (CIM 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$), contra *F. nucleatum* e *S. mutans* (CIM 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e contra *P. gingivalis* (CIM 62,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Cabe ressaltar a atividade antimicrobiana das frações FB_{EB} e FF_{EB} que apresentaram atividades semelhantes contra *S. mitis* e *S. sanguis* (CIM 15,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$). De um modo em geral, os resultados revelaram certa sensibilidade dos micro-organismos às demais frações analisadas, podendo ser consideradas relevantes como potenciais agentes antimicrobianos.

Posteriormente ao teste de determinação da CIM, foi determinada a CBM e CFM das frações do $\text{EBdS}_{\text{CPQBA}}$. Para tal, as amostras vegetais microdiluídas (CIM) foram subcultivadas pelo plaqueamento por superfície do material do poço correspondente à CIM e concentrações anteriores a esta, em meio de cultura específico e, incubadas durante 24/48 horas à temperatura de 37 °C. Este teste consiste verificar em quais concentrações as substâncias que possuem atividade antimicrobiana são bacteriostáticas ou bactericidas e fungistáticas ou fungicidas. Os resultados para esta determinação estão apresentados de acordo com a Tabela 13.

Tabela 13: Valores da concentração bactericida mínima (CBM) e da concentração fungicida mínima (CFM) das frações do $\text{EBdS}_{\text{CPQBA}}$ de *S. terebinthifolius* que apresentaram atividade antimicrobiana.

Micro-organismos	CBM e CFM das frações do $\text{EBdS}_{\text{CPQBA}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	FA_{EB}	FB_{EB}	FC_{EB}	FD_{EB}	FE_{EB}	FF_{EB}
<i>C. albicans</i>	250	175	150	175	175	200
<i>F. nucleatum</i>	700	250	31,25	62,50	62,50	125
<i>P. gingivalis</i>	500	500	125	150	300	250
<i>P. intermedia</i>	*	250	500	500	300	350
<i>S. aureus</i>	*	500	400	400	400	*
<i>S. mutans</i>	400	62,50	31,25	31,25	15,63	200
<i>S. mitis</i>	300	125	3,91	15,63	15,63	15,63
<i>S. sanguis</i>	250	15,63	1,95	1,95	1,95	31,25

* Ação bacteriostática

De acordo com os resultados obtidos para a CBM e CFM (Tabela 13) pode-se dizer que as frações do $\text{EBdS}_{\text{CPQBA}}$ apresentaram ação bactericida e fungicida para os micro-organismos testados na concentração indicada na Tabela 13, sendo que em concentrações superiores a essas apresentam ação bacteriostática e fungistática. Os resultados também revelaram, para determinadas frações, valores de CBMs ou CFMs iguais as CIMs, o que pode ser considerado como os melhores resultados apresentados, devido a esses valores terem permanecido, como observado para as frações FC_{EB} frente a *S. sanguis* (CIM 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e frente a *F. nucleatum* e *S. mutans* (CIM 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e FD_{EB} e FE_{EB} frente a *S. sanguis* (CIM 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e frente a *F. nucleatum* (CIM 62,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Cabe ainda

salientar a atividade bactericida da fração FB_{EB} frente a *S. sanguis* (CIM 15,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *S. mutans* (CIM 62,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

3.2. Atividade antimicrobiana diferencial com base na concentração inibitória mínima (CIM)

Este modelo pode ser utilizado para triar amostras com atividade antimicrobiana em potencial. O método de ensaio utilizado permite avaliar as amostras testadas em condições idênticas. A análise de dados experimentais, gerados de informações provenientes dos resultados dos testes biológicos - da avaliação da atividade antimicrobiana - é efetuada por método de comparação para classificar uma base de dados em ordem à similaridade das respostas, que é expressa quantitativamente como um coeficiente de correlação. (PAULL et al., 2013b)

A partir dos valores obtidos das CIMs, das frações do OE_{CPQBA} e das frações do $EBdS_{CPQBA}$, (Tabela 10 e 12, respectivamente), obteve-se a atividade antimicrobiana diferencial pelos valores de delta obtidos, calculando-se o $\log_{10}(\text{CIM})$ e a média dos logaritmos das frações do OE_{CPQBA} e das frações do $EBdS_{CPQBA}$ (M_{CIM}), subtraindo-se o valor de $\log_{10}(\text{CIM})$ de cada micro-organismo da média correspondente. O resultado referente à atividade antimicrobiana diferencial das frações do OE_{CPQBA} e das frações do $EBdS_{CPQBA}$ de folhas de *S. terebinthifolius* frente aos micro-organismos testados está apresentado nas Tabelas 14 e 15, e representado pelas Figuras 18 e 19, respectivamente.

Tabela 14: Valores de delta, resultantes de um conjunto de valores de CIM_{OE} , para estimar a atividade antimicrobiana diferencial das frações do OE_{CPQBA} de *S. terebinthifolius* frente aos micro-organismos testados.

Micro-organismos	Delta das frações do OE_{CPQBA}										
	FA_{EB}	FB_{OE}	FC_{OE}	FD_{OE}	FE_{OE}	FF_{OE}	FG_{OE}	FH_{OE}	FI_{OE}	FJ_{OE}	FK_{OE}
<i>C. albicans</i>	0,2634	0,3010	0,2007	0,2007	0,3010	NA	-0,1003	0,1881	0,1881	0,1505	0,1505
<i>F. nucleatum</i>	0,2634	0,3010	0,2007	0,2007	0,3010	0,1505	0,5017	0,4892	0,1881	0,4515	0,1505
<i>P. gingivalis</i>	-0,3387	-0,3010	-0,1003	-0,1003	-0,3010	NA	-0,1003	-0,1129	-0,1129	-0,1505	-0,1505
<i>P. intermedia</i>	-0,0376	0,0000	-0,1003	-0,1003	-0,3010	NA	-0,1003	-0,4139	-0,4139	-0,4515	-0,1505
<i>S. aureus</i>	-0,3387	-0,3010	-0,1003	-0,1003	0,3010	NA	-0,1003	0,1881	0,1881	0,1505	-0,1505
<i>S. mutans</i>	-0,0376	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-0,4139	-0,1129	-0,1505	0,1505
<i>S. mitis</i>	0,2634	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,1881	0,1881	0,1505	0,1505
<i>S. sanguis</i>	-0,0376	0,0000	-0,1003	-0,1003	-0,3010	-0,1505	-0,1003	-0,1129	-0,1129	-0,1505	-0,1505

Delta: $\Delta = M_{\text{CIM}} - \log_{10}(\text{CIM})$

NA: não avaliado.

Figura 18: Atividade antimicrobiana média gerada com os valores de delta, resultantes de um conjunto de valores de CIM_{OE}, para estimar a atividade antimicrobiana diferencial das frações do OE_{CPQBA} de *S. terebinthifolius* frente aos micro-organismos testados.

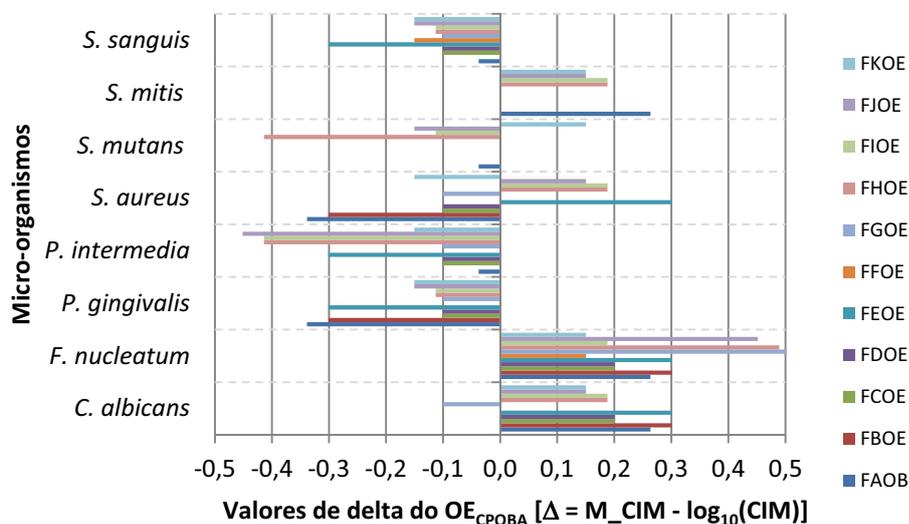
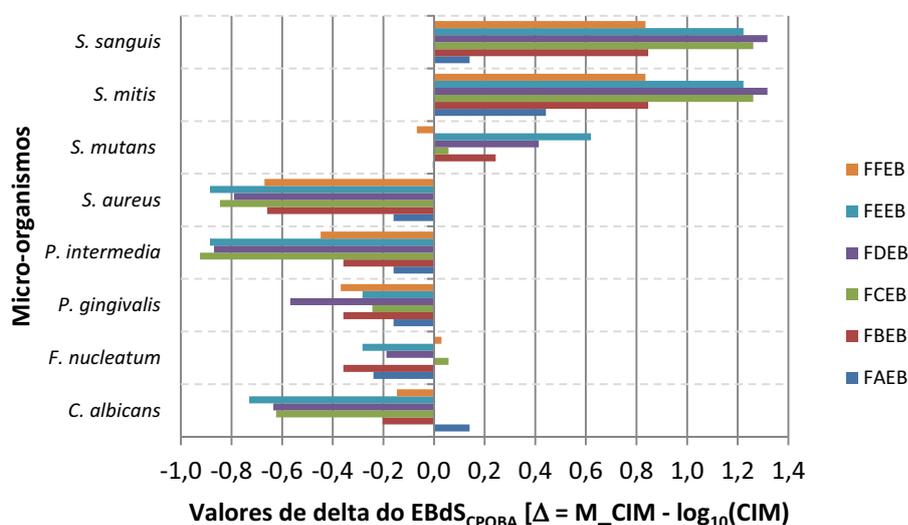


Tabela 15: Valores de delta, resultantes de um conjunto de valores de CIM_{EBdS}, para estimar a atividade antimicrobiana diferencial das frações do EBdS_{CPQBA} de *S. terebinthifolius* frente aos micro-organismos testados.

Micro-organismos	Delta das frações do EBdS _{CPQBA}					
	FA _{EB}	FB _{EB}	FC _{EB}	FD _{EB}	FE _{EB}	FF _{EB}
<i>C. albicans</i>	0,1410	-0,2031	-0,6238	-0,6349	-0,7299	-0,1468
<i>F. nucleatum</i>	-0,2392	-0,3580	0,0574	-0,1877	-0,2828	0,0293
<i>P. gingivalis</i>	-0,1600	-0,3580	-0,2436	-0,5679	-0,2828	-0,3686
<i>P. intermedia</i>	-0,1600	-0,3580	-0,9248	-0,8690	-0,8848	-0,4478
<i>S. aureus</i>	-0,1600	-0,6591	-0,8457	-0,7898	-0,8848	-0,6696
<i>S. mutans</i>	-0,0051	0,2440	0,0574	0,4143	0,6203	-0,0676
<i>S. mitis</i>	0,4421	0,8461	1,2615	1,3174	1,2224	0,8355
<i>S. sanguis</i>	0,1410	0,8461	1,2615	1,3174	1,2224	0,8355

Delta: $\Delta = M_CIM - \log_{10}(CIM)$

Figura 19: Atividade antimicrobiana média gerada com os valores de delta, resultantes de um conjunto de valores de CIM_{EBdS} , para estimar a atividade antimicrobiana diferencial das frações do $EBdS_{CPQBA}$ de *S. terebinthifolius* frente aos micro-organismos testados.



A organização e apresentação dos gráficos foram planejados para otimizar efeitos específicos, sendo um acessório útil para o conceito de comparação. A análise comparativa dos dados apresentados requer uma compreensão do gráfico de atividade antimicrobiana média, uma forma de representação de resultados do ensaio *in vitro* desenvolvido para enfatizar os efeitos diferenciais das amostras testadas frente aos diversos micro-organismos avaliados. O gráfico é um padrão criado por uma delimitação de valores de delta - positivos e negativos - gerados a partir do conjunto de valores da CIM. Os valores positivos e negativos traçados ao longo da linha vertical representam a resposta média de todos os micro-organismos testados para a amostra em estudo. Os valores positivos projetados para a direita, da linha vertical, representam a sensibilidade do micro-organismo que excede a média. Os valores negativos projetados para a esquerda representam a sensibilidade do micro-organismo que se faz inferior ao valor da média (PAULL et al., 2013a). Assim, uma barra saliente para a direita indica que a CIM para esse micro-organismo ocorre a uma concentração menor do que a concentração média necessária para os demais micro-organismos testados.

Pela análise comparativa dos dados apresentados (Figuras 18 e 19) enfatizando os efeitos diferenciais, que representam a resposta dos micro-organismos aos derivados vegetais de folhas de *S. terebinthifolius* analisados, observa-se respostas diferentes quanto a sensibilidade de alguns micro-organismos para frações do OE_{CPQBA} e do $EBdS_{CPQBA}$, destacando-se, de uma forma geral, uma melhor atividade das frações do $EBdS_{CPQBA}$ em relação as do OE_{CPQBA} .

A análise comparativa e interpretação dos dados apresentados (Tabela 14 e Figura 18) das frações do OE_{CPQBA} de folhas de *S. terebinthifolius* analisadas evidenciaram os efeitos diferenciais das amostras testadas indicando a sensibilidade dos micro-organismos avaliados. De maneira geral, a análise comparativa das F_{OE} indicou uma maior sensibilidade (valor de delta maior) das cepas de *F. nucleatum* e *C. albicans*, além de revelar uma sensibilidade moderada para *S. aureus*, *S. mitis* e *S. mutans*. Porém, quando se analisa a atividade sobre cada micro-organismo, é possível verificar que a fração FG_{OE}, apresentou seletividade para a cepa de *F. nucleatum* ($\Delta = 0,5017$), enquanto as frações FH_{OE} e FJ_{OE} mantiveram a seletividade para a cepa de *F. nucleatum* ($\Delta = 0,4892$ e $0,4515$, respectivamente) e passaram a ser seletiva para as cepas de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mitis* ($\Delta = 0,1881$ e $0,1505$, respectivamente). Cabe ressaltar a atividade da fração FB_{OE} com seletividade semelhante para cepas de *C. albicans* e *F. nucleatum* ($\Delta = 0,3010$), e da fração FE_{OE}, que manteve a seletividade, semelhante, para as cepas de *C. albicans* e *F. nucleatum* ($\Delta = 0,3010$) e passou a ser seletiva para *S. aureus* ($\Delta = 0,3010$).

Já a análise comparativa e interpretação dos dados apresentados (Tabela 15 e Figura 19) das frações do EBdS_{CPQBA} de folhas de *S. terebinthifolius* analisadas evidenciaram os efeitos diferenciais das amostras testadas indicando a sensibilidade dos micro-organismos avaliados. De maneira geral, a análise comparativa das F_{EB} indicou uma maior sensibilidade (valor de delta maior) das cepas de *S. mitis* e *S. sanguis*, além de evidenciar uma sensibilidade moderada para *S. mutans*, e também uma certa sensibilidade para *F. nucleatum* e *C. albicans*. Quando se analisa a atividade sobre cada micro-organismo, é possível verificar que a fração FD_{EB} apresentou seletividade semelhante para *S. mitis* e *S. sanguis* ($\Delta = 1,3174$) e para *S. mutans* ($\Delta = 0,4143$). Da mesma forma, a fração FE_{EB} apresentou seletividade semelhante para *S. mitis* e *S. sanguis* ($\Delta = 1,2224$) e para *S. mutans* ($\Delta = 0,6203$), enquanto a FC_{EB} manteve a seletividade para *S. mitis* e *S. sanguis* ($\Delta = 1,2615$) e para *S. mutans* ($\Delta = 0,0574$), e passou a ser seletiva para *F. nucleatum* ($\Delta = 0,0574$). Cabe salientar a atividade da fração FB_{EB} com seletividade semelhante para cepas de *S. mitis* e *S. sanguis* ($\Delta = 0,8461$) e para *S. mutans* ($\Delta = 0,2440$), e da fração FF_{EB}, que manteve a seletividade para *S. mitis* e *S. sanguis* ($\Delta = 0,8355$), e passou a ser seletiva para *F. nucleatum* ($\Delta = 0,0293$). Além da FA_{EB}, que foi seletiva para *S. mitis* ($\Delta = 0,4421$) e para *S. sanguis* e *C. albicans* ($\Delta = 0,1410$), semelhantemente.

A diferença na composição (Capítulo II, Figuras 11.B e 13.B) e concentração dos compostos presentes nas frações pode explicar a diferença na efetividade das amostras frente aos micro-organismos testadas.

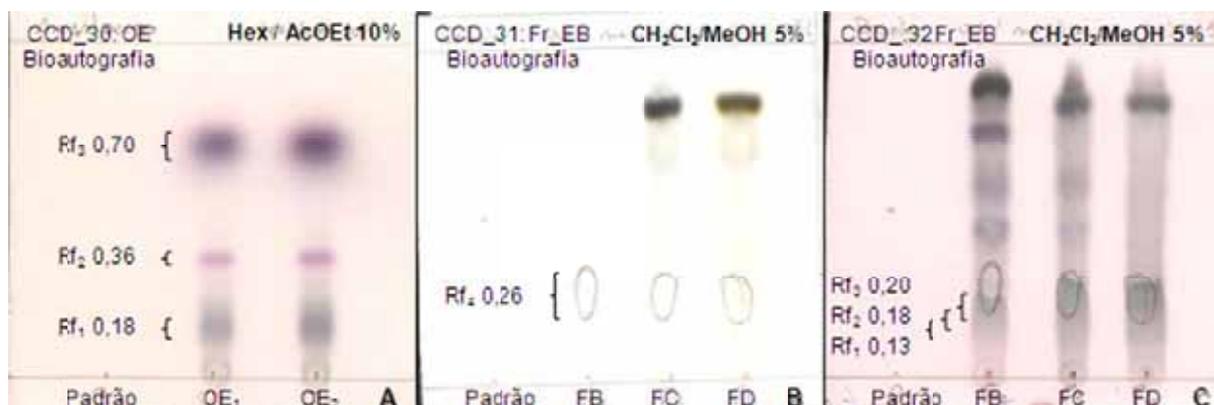
3.3. Determinação da atividade antimicrobiana por método de bioautografia, em placas de CCD

A bioautografia é uma técnica utilizada para detecção, que avalia qualitativamente e quantitativamente substâncias de origem natural quanto à atividade antimicrobiana, particularmente, sobre um micro-organismo específico inoculado em um recipiente específico com meio de cultura adequado distribuído sobre uma placa de CCD após eluição da mistura a ser avaliada em eluente específico, na qual se avalia a zona de inibição, se houver, à luz natural e/ou após a aplicação de um corante específico. Esta técnica é utilizada devido a sua sensibilidade e facilidade de visualização dos resultados de inibição do crescimento de micro-organismos (BETINA, 1973; LUND; LYON, 1975; DIDRY et al., 1990; SAXENA et al., 1995; GOMES et al., 2010).

Os testes de bioautografia em placas de CCD foram realizados conforme descritos na metodologia para a avaliação da atividade antimicrobiana (item 2.1.9.) As amostras avaliadas foram representadas pelo óleo essencial (OE) e pelas frações FB_{EB} , FC_{EB} e FD_{EB} , do extrato bruto diclorometânico ($EBdS_{CPQBA}$) de *S. terebinthifolius* obtidos conforme a metodologia descrita no Capítulo II.

Para a execução dos testes foi necessário a realização de ajustes e padronização das condições do ensaio, conciliando o fenômeno físico de difusão e os fenômenos biológicos relacionados ao micro-organismo. A polaridade da fase móvel foi ajustada utilizando-se hexano:acetato de etila (90:10) para a eluição das cromatoplas com o OE e CH_2Cl_2 :MeOH (95:05) para a eluição das cromatoplas com as frações do $EBdS_{CPQBA}$. A observação dos compostos foi obtida sob luz visível e ultravioleta e com solução de anisaldeído, o que proporcionou a visualização de bandas individuais e a obtenção de valores de índice de retenção (Rf) para determinadas bandas (Figura 20). As demais cromatoplas foram submetidas aos ensaios de bioautografia.

Figura 20: Perfil cromatográfico por CCD, para a determinação da atividade antimicrobiana, por método de bioautografia, para os derivados vegetais de *S. terebinthifolius*, com valores especificados de Rf para as determinadas bandas.



A) Amostras de OE, nas concentrações de 60 µg para OE₁ e 90 µg para OE₂. Fase móvel: hexano:acetato de etila (90:10). Detecção: luz visível e UV e sol. anisaldeído. B e C) Amostras de frações, FB_{EB}, FC_{EB} e FD_{EB}, na concentração de 100 µg. Fase móvel: CH₂Cl₂:MeOH (95:05). Detecção: luz visível e UV (B) e solução de anisaldeído (C).

Nos ensaios bioautográficos realizados com o OE de *S. terebinthifolius*, foi verificado nas placas em estudo (após período de incubação), se havia presença de zonas de inibição de crescimento ao redor das bandas individuais. Com a interpretação dos resultados obtidos, zonas de inibição puderam ser observadas, revelando perfis de susceptibilidade de certos micro-organismos às bandas ativas da amostra vegetal analisada.

Os resultados referentes ao perfil de susceptibilidade dos micro-organismos às bandas ativas do OE de folhas de *S. terebinthifolius* podem ser observados na Figura 21 e, as zonas de inibição de crescimento estão expressas na Tabela 16, juntamente com o valor da medida do halo de inibição correspondente.

Figura 21: Determinação da atividade antimicrobiana, por método de bioautografia em CCD, do OE de folhas de *S. terebinthifolius* bioautografado, nas concentrações de 60 µg para OE₁ e 90 µg para OE₂, com destaque as zonas de inibição de crescimento, frente aos micro-organismos testados, como segue: A) *C. albicans*, B) *F. nucleatum*, C) *P. gingivalis*, D) *P. intermedia*, E) *S. aureus*, F) *S. mutans*, G) *S. mitis* e H) *S. sanguis*.

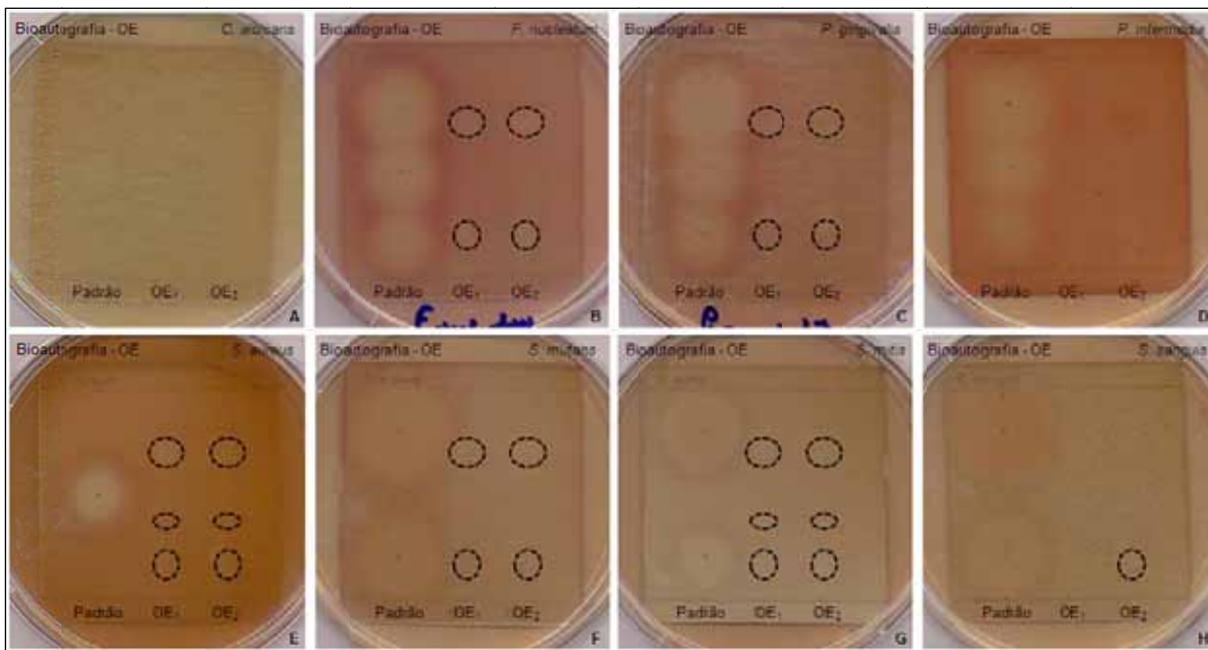


Tabela 16: Atividade antimicrobiana, por bioautografia em CCD, de acordo com as zonas de inibição de crescimento em relação ao Rf das bandas individuais e medida do halo de inibição do OE de folhas de *S. terebinthifolius* bioautografado.

Micro-organismos	OE ₁ (60 µg)		OE ₂ (90 µg)	
	Zona de inibição (Rf)	Halo de inibição (mm)	Zona de inibição (Rf)	Halo de inibição (mm)
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
<i>F. nucleatum</i>	+ (Rf ₁ e Rf ₃)	Rf ₁ = 5 e Rf ₃ = 8	+ (Rf ₁ e Rf ₃)	Rf ₁ = 5 e Rf ₃ = 8
<i>P. gingivalis</i>	+ (Rf ₁ e Rf ₃)	Rf ₁ = 5 e Rf ₃ = 8	+ (Rf ₁ e Rf ₃)	Rf ₁ = 5 e Rf ₃ = 8
<i>P. intermedia</i>	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+ (Rf ₁ , Rf ₂ e Rf ₃)	Rf ₁ = 5, Rf ₂ = 3 e Rf ₃ = 8	+ (Rf ₁ , Rf ₂ e Rf ₃)	Rf ₁ = 5, Rf ₂ = 3 e Rf ₃ = 8
<i>S. mutans</i>	+ (Rf ₁ e Rf ₃)	Rf ₁ = 5 e Rf ₃ = 8	+ (Rf ₁ e Rf ₃)	Rf ₁ = 5 e Rf ₃ = 8
<i>S. mitis</i>	+ (Rf ₁ , Rf ₂ e Rf ₃)	Rf ₁ = 5, Rf ₂ = 3 e Rf ₃ = 8	+ (Rf ₁ , Rf ₂ e Rf ₃)	Rf ₁ = 5, Rf ₂ = 3 e Rf ₃ = 8
<i>S. sanguis</i>	-	-	+ (Rf ₃)	Rf ₁ = 5

(+) Inibição do crescimento microbiano.

(-) Não houve inibição do crescimento microbiano.

Zona de inibição: localidade do ponto central de inibição em relação ao índice de retenção (Rf) para determinadas bandas da amostra bioautografada.

A comparação entre inibição e crescimento microbiano é visualmente diagnosticada, sendo que as regiões que não apresentam crescimento permanecem incolores, enquanto onde houve crescimento microbiano apresenta-se avermelhado, devido à presença do indicador CTT incorporado ao meio.

Pela análise dos resultados obtidos pela bioprospecção foi possível avaliar e comparar a ação antimicrobiana do OE bioautografado, com a averiguação de zonas de

inibição de crescimento em locais correspondentes a determinadas bandas do OE fracionado na cromatoplaça (Figura 21) e, dessa forma, delineou-se as bandas ativas do óleo frente aos micro-organismos testados, pela comparação das zonas de inibição dessas placas com a cromatoplaça revelada e seus valores de Rf (Figura 20.A).

Os resultados das análises de atividade inibitória do OE revelaram certa sensibilidade dos micro-organismos testados a amostras do óleo avaliadas, nas concentrações analisadas. Pode-se visualizar a formação de zonas de inibição correspondente às bandas de Rf₁ (0,18) e Rf₃ (0,70) do OE frente a *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *S. aureus*, *S. mutans* e *S. mitis* e à banda de Rf₂ (0,36) frente a *S. aureus* e *S. mitis* nas concentrações avaliadas e, também para a banda de Rf₁ (0,18) frente a *S. sanguis*, na maior concentração avaliada.

Os resultados referentes ao perfil de susceptibilidade dos micro-organismos às bandas ativas das frações FB_{EB}, FC_{EB} e FD_{EB} do EBdS_{CPQBA} folhas de *S. terebinthifolius* podem ser observados na Figura 22 e, as zonas de inibição de crescimento estão apresentadas na Tabela 17, juntamente com o valor da medida do halo de inibição, ou melhor, da região de inibição correspondente.

Figura 22: Determinação da atividade antimicrobiana, por método de bioautografia em CCD, das frações FB_{EB}, FC_{EB} e FD_{EB} do EBdS_{CPQBA} de folhas de *S. terebinthifolius* bioautografado, na concentração de 100 µg, com destaque as zonas de inibição de crescimento, frente aos micro-organismos testados, como segue: A) *C. albicans*, B) *F. nucleatum*, C) *P. gingivalis*, D) *P. intermedia*, E) *S. aureus*, F) *S. mutans*, G) *S. mitis* e, H) *S. sanguis*.

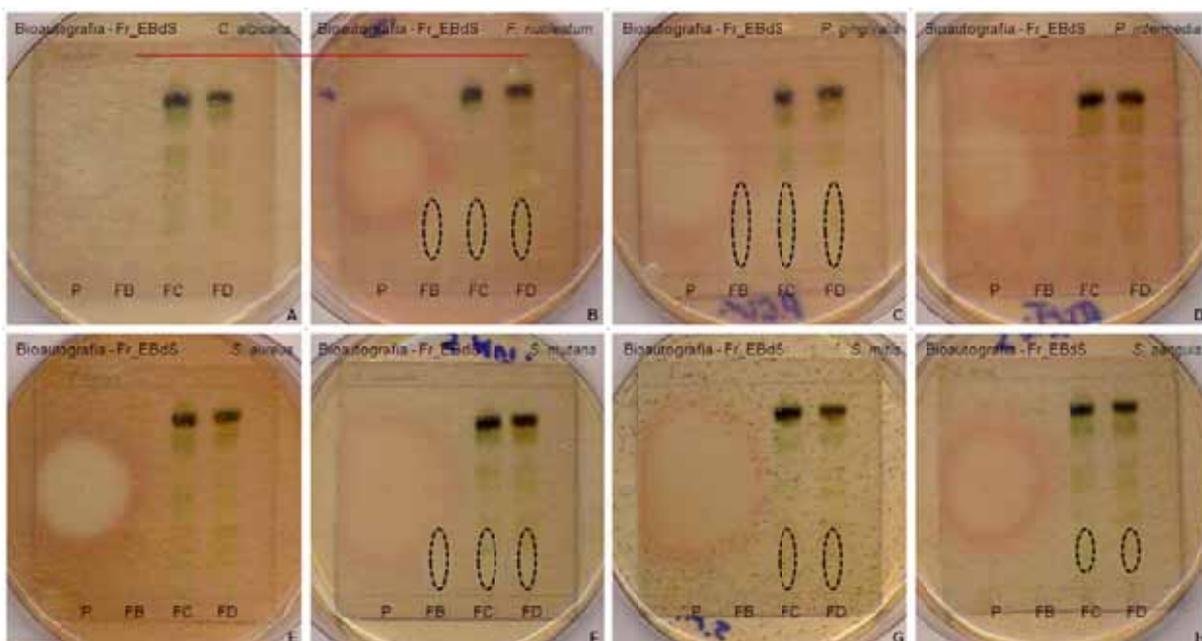


Tabela 17: Atividade antimicrobiana, por bioautografia em CCD, de acordo com as zonas de inibição de crescimento em relação ao Rf das bandas e medida da região de inibição das frações do EBdS_{CPQBA} de folhas de *S. terebinthifolius* bioautografado.

Micro-organismos	FB _{EB}		FC _{EB}		FD _{EB}	
	Zona de inibição (Rf)	Região de inibição (cm)	Zona de inibição (Rf)	Região de inibição (cm)	Zona de inibição (Rf)	Região de inibição (cm)
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>F. nucleatum</i>	+ (Rf ₁)	0,7 x 1,3	+ (Rf ₁)	0,7 x 1,3	+ (Rf ₁)	0,6 x 1,3
<i>P. gingivalis</i>	+ (Rf ₃)	0,7 x 2,0	+ (Rf ₃)	0,7 x 2,0	+ (Rf ₃)	0,7 x 2,0
<i>P. intermedia</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i>	+ (Rf ₁)	0,8 x 1,3	+ (Rf ₁)	0,8 x 1,3	+ (Rf ₁)	0,8 x 1,3
<i>S. mitis</i>	-	-	+ (Rf ₁)	0,6 x 1,3	+ (Rf ₁)	0,7 x 1,3
<i>S. sanguis</i>	-	-	+ (Rf ₂)	0,6 x 0,9	+ (Rf ₂)	0,6 x 0,9

(+) Inibição do crescimento microbiano.

(-) Não houve inibição do crescimento microbiano.

Zona de inibição: localidade do ponto central de inibição em relação ao índice de retenção (Rf) para determinadas bandas das amostras bioautografadas.

Região de inibição: não houve formação de halo de inibição propriamente dito, mas sim a presença de uma área (largura x altura) de inibição correspondente à disposição da amostra fracionada, de acordo à sua eluição na cromatoplaca.

Pela análise dos resultados obtidos foi possível avaliar e comparar a ação antimicrobiana das frações FB_{EB}, FC_{EB} e FD_{EB} do EBdS_{CPQBA} bioautografado, com a averiguação de zonas de inibição de crescimento em regiões correspondentes a determinadas bandas das amostras fracionadas na cromatoplaca (Figura 22) e, dessa forma, delineou-se as “bandas ativas” das frações frente aos micro-organismos testados, pela comparação das zonas de inibição dessas placas com a cromatoplaca revelada e seus valores de Rf (Figura 20.B e .C).

Os resultados das análises de atividade inibitória das frações do EBdS_{CPQBA} revelaram certa sensibilidade dos micro-organismos testados a amostras das frações FB_{EB}, FC_{EB} e FD_{EB} avaliadas, na concentração analisada. Pode-se visualizar a formação de zonas de inibição correspondente às bandas de Rf₁ (0,13) das frações FB_{EB}, FC_{EB} e FD_{EB} frente a *F. nucleatum* e *S. mutans* e também das frações FC_{EB} e FD_{EB} frente a *S. mitis*, da mesma forma, pode-se visualizar a formação de zonas de inibição correspondente às bandas de Rf₂ (0,20) das frações FC_{EB} e FD_{EB} frente a *S. sanguis* e de Rf₃ (0,20) das frações FB_{EB}, FC_{EB} e FD_{EB} frente a *P. gingivalis*, na concentração avaliada. De um modo em geral, os resultados revelaram zonas de inibição de crescimento microbiano ao longo do percurso de eluição das amostras das frações FB_{EB}, FC_{EB} e FD_{EB} bioautografadas nas regiões correspondente as bandas de Rf₁ (0,13) a Rf₄ (0,26) frente aos micro-organismos *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *S. mutans*, *S. mitis* e *S. sanguis*.

A utilização da bioautografia é de suma importância na avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias específicas presentes nos óleos essenciais e extratos de plantas medicinais, pois na cromatografia em camada delgada ocorre a separação de

componentes bioativos presentes no óleo essencial e extratos e a atividade antimicrobiana de cada componente é avaliada individualmente, pela formação ou não de zonas de inibição do crescimento microbiano. Através do uso desta técnica para a avaliação dos derivados vegetais apresentados neste trabalho, foi possível demonstrar a presença de componentes bioativos presentes, tanto no OE quanto nas frações do EBdS_{CPQBA}, responsáveis pela atividade antimicrobiana dos mesmos.

Paragrafando as palavras de Pereira e colaboradores (2009), para dar continuidade aos estudos é necessário identificar quimicamente os componentes, as frações e a diferença da composição entre o óleo essencial e o extrato gerados, utilizando-se para isso de métodos analíticos quantitativos e qualitativos, como cromatografia gasosa, cromatografia gasosa acoplada à massas e cromatografia líquida de alta eficiência. Assim, poderá-se apontar qual ou quais componentes presentes na planta são potenciais agentes antimicrobianos.

4. Conclusão

Os dados apresentados neste capítulo para a avaliação do potencial antimicrobiano das amostras vegetais foram apresentados como valores de CIM e serviram de referencia para a determinação da CBM, CFM e atividade antimicrobiana diferencial e revelaram perfis de susceptibilidade dos micro-organismos avaliados às amostras testadas.

Os resultados revelaram amostras com atividade antimicrobiana relevante (CIM inferior a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) que podem ser consideradas como candidatos a novos agentes antimicrobianos, apresentando de forma geral, uma melhor atividade do óleo essencial em relação aos extratos brutos, obtidos de folhas de *S. terebinthifolius*.

A análise do óleo essencial evidenciou atividade antimicrobiana contra *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. aureus* e *S. mutans*. Já a análise dos extratos brutos, diclorometânicos e etanólicos, evidenciou a atividade inibitória do EBetS_{UNESP} e EBetS_{CPQBA} contra *C. albicans*, do EBdS_{CPQBA} contra *C. albicans* e *S. mitis* e do EBetM_{UNESP}, EBdM_{CPQBA}, EBetM_{CPQBA}, EBetS_{UniPinhal} e EBetM_{UniPinhal} contra *C. albicans*.

O extrato EBdS_{CPQBA}, apesar de não ter sido o extrato mais ativo, foi o extrato selecionado para prosseguimento dos estudos devido ao conjunto de caracteres avaliados nesse trabalho.

O estudo das frações do extrato EBdS_{CPQBA} e do OE, obtidos no processo de fracionamento, evidenciou diversas frações ativas.

A análise comparativa das frações evidenciou os efeitos diferenciais das amostras testadas indicando a sensibilidade do micro-organismo avaliado. Observou-se respostas diferentes quanto a sensibilidade, destacando-se, de uma forma geral, uma melhor atividade das frações do EBdS_{CPQBA} em relação as do OE. Assim, a análise comparativa das F_{EB} indicou uma maior sensibilidade (valor de delta maior) das cepas de *S. mitis* e *S. sanguis*, além de evidenciar uma sensibilidade moderada para *S. mutans*, e também uma certa sensibilidade para *F. nucleatum* e *C. albicans*. Já a análise das F_{OE} indicou uma maior sensibilidade das cepas de *F. nucleatum* e *C. albicans*, além de revelar uma sensibilidade moderada para *S. aureus*, *S. mitis* e *S. mutans*.

Quanto a atividade, os dados apresentados para as F_{EB} revelaram melhor atividade, com uma atividade antimicrobiana promissora (CIM inferior a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), para as frações FC_{EB}, FD_{EB} e FE_{EB}, que podem ser consideradas como candidatas em potencial a novos agentes antimicrobianos. Quando se analisa a atividade sobre cada micro-organismo, é possível verificar que a fração FE_{EB} apresentou atividade e seletividade para *S. mitis*, *S. sanguis* e *S. mutans*, além da atividade sobre *F. nucleatum* e *P. gingivalis*, enquanto que a fração FD_{EB} apresentou atividade e seletividade para *S. mitis*, *S. sanguis* e *S. mutans*, e

atividade sobre *F. nucleatum*, e a fração FC_{EB} apresentou atividade e seletividade para *S. mitis*, *S. sanguis*, *F. nucleatum* e *S. mutans*, e atividade contra *P. gingivalis*.

Os resultados também revelaram, pela determinação da CBM, a ação bactericida das F_{EB} , e dessa forma, verificou-se como melhores resultados, a ação da fração FC_{EB} frente a *S. sanguis*, *F. nucleatum* e *S. mutans*, e das frações FD_{EB} e FE_{EB} frente a *S. sanguis* e *F. nucleatum*.

Em relação as F_{OE} , os dados revelaram melhor atividade, com atividade antimicrobiana promissora, para as frações FG_{OE} , FH_{OE} e FJ_{OE} , que também podem ser consideradas como candidatas em potencial a novos agentes antimicrobianos. Ao se analisar a atividade sobre cada micro-organismo, é possível verificar que a fração FG_{OE} apresentou atividade promissora e seletividade para *F. nucleatum*, além de certa atividade sobre *C. albicans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. aureus* e *S. sanguis*, enquanto que as frações FH_{OE} e FJ_{OE} mantiveram a atividade e seletividade para *F. nucleatum*, e passaram a ser seletivas, com certa atividade, sobre *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mitis*.

Os resultados das CBMs das F_{OE} revelaram a ação bactericida de algumas das frações, e dessa forma, verificou-se como melhores resultados, a ação da fração FG_{OE} frente a *S. aureus*, da fração FH_{OE} frente a *S. mitis*, e da fração FJ_{OE} frente a *F. nucleatum* e *S. mitis*.

Os resultados da atividade antimicrobiana obtidos pelo ensaio de bioautografia delinearam as bandas ativas da amostra testada. Dessa forma, a análise da atividade inibitória das frações do $EBdS_{CPQBA}$ revelou, de modo geral, zonas de inibição de crescimento microbiano ao longo do percurso de eluição das frações FB_{EB} , FC_{EB} e FD_{EB} nas regiões correspondente as bandas de Rf_1 (0,13) a Rf_4 (0,26) frente a *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *S. mutans*, *S. mitis* e *S. sanguis*. Já a análise da atividade inibitória do OE revelou a formação de zonas de inibição correspondente às bandas de Rf_1 (0,18) e Rf_3 (0,70) frente a *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *S. aureus*, *S. mutans* e *S. mitis* e à banda de Rf_2 (0,36) frente a *S. aureus* e *S. mitis* nas concentrações avaliadas e, também para a banda de Rf_1 (0,18) frente a *S. sanguis*, na maior concentração avaliada.

A diferença na composição e concentração dos compostos presentes nas frações pode explicar a diferença na efetividade das amostras frente aos micro-organismos testadas.

Os resultados obtidos demonstram o potencial de utilização das frações ativas como agentes antimicrobianos promissores. Supõe-se que os resultados desse estudo irão contribuir para a continuidade da pesquisa com a espécie vegetal em questão e, sugere-se a continuidade desse trabalho, com objetivo de identificar os princípios ativos e comprovar o

mecanismo de ação e a atividade *in vivo*. Dessa forma, será possível considerar o real potencial da espécie vegetal como um agente antimicrobiano.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

1. Introdução

O corpo humano vive em constante homeostase, fazendo com que todos os processos fisiológicos atuem em conjunto visando o bem estar geral do organismo. As células normais respondem a estímulos internos e externos, que regulam os seus processos de proliferação, diferenciação e morte celular (ALBERTS et al., 2002). O balanço entre divisão e morte celular é de importância fundamental para o desenvolvimento e manutenção dos organismos. Desordens nesse processo têm consequências patogênicas muito graves na embriogênese, nas doenças neuro-degenerativas e no câncer (BROKER et al., 2005).

O câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que se caracterizam pela perda de controle da proliferação celular, ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástases para tecidos distantes. Esta perda de controle é consequência direta de danos causados aos mecanismos de regulação do ciclo celular bem como, aos genes que nele atuam. Sendo assim, a malignidade de uma célula é resultado de mutações no material genético, que podem ser hereditárias ou adquiridas somaticamente pela exposição a uma variedade de fatores ambientais podendo ser estes químicos, físicos e biológicos. O aumento da expectativa de vida da população mundial representa também maior possibilidade de desenvolvimento dessa doença (MONTESANO; HALL, 2001).

As células tumorais apresentam alguns aspectos que as diferenciam das células normais, sendo elas não dependentes de fatores de crescimento, visto que são capazes de secretar seus próprios fatores de crescimento para estimular a proliferação (as células normais param de proliferar quando atingem certa densidade, mas as tumorais continuam a proliferar); são independentes de ancoragem, não requerendo contato com a superfície do meio extracelular para poderem crescer (em cultura, as células tumorais frequentemente crescem umas sobre as outras, sendo que as células normais possuem inibição por contato formando uma monocamada); as células tumorais são menos aderentes que as normais (MACDONALD; FORD, 2000).

As abordagens principais para o tratamento do câncer incluem excisão cirúrgica, radioterapia, quimioterapia e transplante de medula óssea, a imunoterapia tem sido empregada de forma promissora, e o papel de cada uma delas depende do tipo de tumor e de seu estágio de desenvolvimento, sendo em muitos casos, necessário combinar mais de uma modalidade (RANG; DALE; RITTER, 1995; ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2013). A

quimioterapia antineoplásica é um dos métodos mais utilizados, aumentando significativamente os índices de cura de alguns tumores, e consiste no uso de agentes citotóxicos e/ou anti-hormonais, que eliminam as células neoplásicas diminuindo assim o crescimento da massa tumoral e a proliferação desordenada das células, danificando-as ou matando-as. Tem-se se apresentado com uso crescente como adjuvante da cirurgia e/ou da radioterapia em vários tipos de tumor (MANS et al., 2000). A imunoterapia, apesar de promissora, é ainda uma técnica antineoplásica adjuvante, usada especialmente para destruir as células cancerosas residuais após intervenção cirúrgica ou outro tratamento (ALMEIDA et al., 2005).

Com o avanço crescente na área da quimioterapia antineoplásica verificado nas últimas décadas, tem-se atualmente, quimioterápicos mais ativos e menos tóxicos disponíveis para uso na prática clínica. A maioria dos agentes utilizados no tratamento do câncer interfere de algum modo na função e na proliferação celular, e conforme a sua atuação sobre o ciclo celular são classificados em: ciclo-inespecíficos (que atuam nas células que estão ou não no ciclo proliferativo); ciclo-específicos (que atuam somente nas células que se encontram em proliferação); e, fase-específicos (que atuam em determinadas fases do ciclo celular, como na fase S, fase G2 e fase M) (INCA, 2014).

Cabe ressaltar que a maior falha da quimioterapia antineoplásica é devida, além da toxicidade dos quimioterápicos por não atuarem exclusivamente sobre as células tumorais, à resistência aos fármacos, que ocorre ou porque as populações celulares desenvolvem nova codificação genética ou porque são estimuladas a desenvolver tipos celulares resistentes ao serem expostas aos fármacos (INCA, 2014). Consequentemente, torna-se evidente a necessidade de ensaios para a triagem de fármacos menos tóxicos, mais seletivos e eficazes para o tratamento dessa doença, além de um melhor conhecimento do comportamento do tumor a ser tratado, envolvendo a biologia celular e molecular dos mesmos (NAM; PARANG, 2003).

Com o aprimoramento da metodologia de cultura de células foi possível, no final da década de 80, o estabelecimento de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, possibilitando o desenvolvimento de protocolos para triagem *in vitro*, visando a pesquisa de novos compostos que inibam o crescimento dessas células (BOYD, 1989; SHOEMAKER, 2006).

Na busca de novos compostos com ação antiproliferativa, o National Cancer Institute (NCI-EUA), um dos mais importantes centros de estudos sobre o câncer, preconiza a utilização de um painel de células tumorais humanas a fim de verificar a atividade antiproliferativa *in vitro* (CHABNER; ROBERTS, 2005; SHOEMAKER, 2006). Tal

metodologia permite a avaliação de fármacos nos diversos tipos de células neoplásicas, com maior especificidade (BOYD, 1989).

Os testes de citotoxicidade *in vitro*, os quais direcionam a pesquisa para agentes com potencial de inibir o crescimento e/ou matar as células neoplásicas em cultura são os mais amplamente utilizados (SKEHAN et al., 1990; HOLBECK, 2004). Esse tipo de análise permite avaliar um grande número de substâncias em pouco tempo, o que aumenta a possibilidade de descoberta de novos fármacos anticâncer. Além disso, é uma técnica relativamente simples, barata, reproduzível e, ainda, evidencia um provável mecanismo de ação da droga (SUGGITT; BIBBY, 2005). Contudo, a atividade citotóxica e a seletividade sobre células cancerosas observada em modelos *in vitro* podem não se refletir necessariamente numa atividade *in vivo* (SMITH et al., 2005), mas contribuem para a seleção de derivados de plantas com potencial antineoplásico fornecendo dados preliminares às pesquisas (ITHARAT et al., 2004).

Segundo Harvey (2008), os produtos naturais representaram uma parcela significativa na pesquisa em fase clínica de novos fármacos, especialmente para área de oncologia. Um dos motivos que faz dos produtos naturais fontes ricas de compostos com potencial terapêutico é que grande parte deles são produzidos para defesa contra predação e também para comunicação, sendo muitas vezes tóxicos e, conseqüentemente apresentando-se, com potenciais antiproliferativos ou irritativos (CRAGG et al., 2009).

A busca por novos fármacos que exibem atividade em vários tipos de câncer é um dos assuntos mais interessantes no campo de pesquisa de produtos naturais (MESQUITA et al., 2009), sendo estes a mais produtiva fonte de novas moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos (HARVEY, 2008). Partindo do princípio que plantas e drogas derivadas de plantas têm uma impressionante variedade de estruturas e funções, está claro que podem ser a fonte de novos fármacos para a quimioterapia do câncer, pois, do total de fármacos introduzidos na terapêutica no período de 1981 a 2010, 75% são ou produtos naturais *per se* ou compostos, sintéticos ou semissintéticos, baseados em produtos naturais (PEZZUTO, 1997; CRAGG; NEWMAN, 2012).

A biodiversidade brasileira tornou-se uma fonte interessante para a seleção de novos compostos químicos que podem levar ao tratamento do câncer. Vários compostos citotóxicos de plantas têm sido encontrados nas plantas brasileiras, tais como os alcaloides (RANG; DALE; RITTER, 1995; SILVA et al., 2009), terpenoides (ROCHA et al., 2007), flavonoides (CAZAROLLI et al., 2008), naftoquinonas (ESTEVES-SOUZA et al., 2008), bem como poliacetilenos (BUSKUH et al., 2009). Segundo Kinghorn e colaboradores (2009), desde 1960 pequenas moléculas derivadas de produtos naturais (plantas e micro-organismos) têm fornecido um número significativo de quimioterápicos importantes. A

pesquisa de produtos naturais, seja como extratos padronizados ou como compostos puros, tem como um de seus objetivos, a investigação científica para a obtenção de produtos mais eficazes e com menor toxicidade.

2. Materiais e Métodos

2.1. Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

A atividade antiproliferativa foi determinada segundo avaliação do crescimento celular (MONKS et al., 1991), pelo ensaio da sulforrodamina B.

2.1.1. Extratos vegetais

Para o desenvolvimento dos estudos de atividade antiproliferativa foram utilizados os extratos brutos (EB) e óleo essencial (OE) e, posteriormente as frações do extrato (F_{EB}) e do óleo essencial (F_{OE}) vegetal de *S. terebinthifolius* obtidos conforme a metodologia descrita no Capítulo II.

2.1.2. Amostras celulares

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho são originárias de neoplasias humanas, provenientes de culturas mantidas pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/Unicamp, e que foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) dos Estados Unidos.

As linhagens celulares foram mantidas em frascos de manutenção de 25 cm³ (T²⁵), com 5 mL de RPMI/SFB (meio RPMI 1640/Gibco[®]) (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB/Gibco[®]) e, incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, em ambiente úmido.

2.1.3. Ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa

A avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada em dez linhagens celulares tumorais humanas, uma linhagem celular não tumoral humana e, uma linhagem celular não tumoral de camundongo, sendo dispostos 100 µL de células/compartimento, em placas de 96 compartimentos, em meio RPMI/SFB acrescido de 50 µg mL⁻¹ de gentamicina (RPMI/SFB/gentamicina), nas suas respectivas densidades celulares de inoculação (Tabela 18). Antes da adição das amostras, as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, em ambiente úmido.

Tabela 18: Linhagens de células tumorais humanas empregadas na avaliação da atividade antiproliferativa.

Tipo de linhagem celular	Linhagem de referência	Densidade celular de inoculação (células/mL)
Adenocarcinoma com fenótipo de resistência multifármaco: ovário	NCI-ADR/RES	5,0 x 10 ⁴
Adenocarcinoma: cólon	HT-29	4,0 x 10 ⁴
Adenocarcinoma: mama	MCF-7	6,0 x 10 ⁴
Adenocarcinoma: ovário	OVCAR-3	7,0 x 10 ⁴
Adenocarcinoma: próstata	PC-3	5,0 x 10 ⁴
Adenocarcinoma: renal	786-O	4,5 x 10 ⁴
Carcinoma: pulmão	NCI-H460	4,0 x 10 ⁴
Glioma	U251	4,0 x 10 ⁴
Queratinocito*	HaCat	4,0 x 10 ⁴
¹ Fibroblasto embrionário murino*	3T3	4,0 x 10 ⁴
Leucemia mieloide: medula óssea	K-562	6,0 x 10 ⁴
Melanoma: pele	UACC-62	5,0 x 10 ⁴

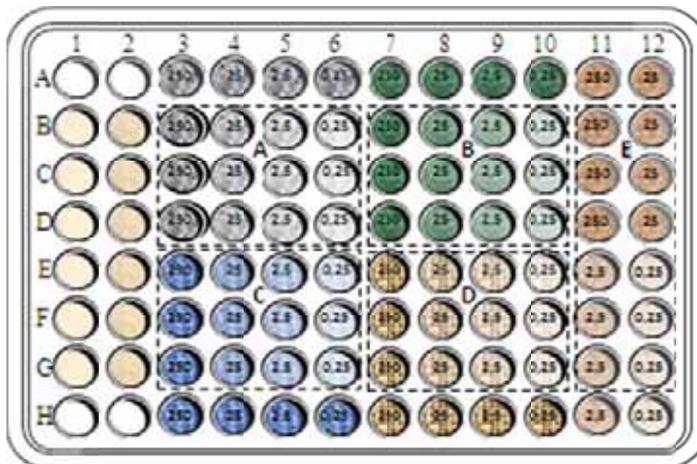
*Célula não tumoral.

¹Linhagem celular de camundongo.

2.1.3.1. Preparo das amostras vegetais (extratos brutos, óleo essencial e frações)

Os derivados vegetais - extratos brutos, óleo essencial e, posteriormente as frações - de *S. terebinthifolius* foram submetidos ao ensaio de atividade antiproliferativa, sendo diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g mL⁻¹, resultando em soluções estoques. Estas soluções foram diluídas 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina. Após a diluição, amostras de 100 µL/compartimento dos derivados vegetais a serem testadas, foram adicionadas a placas de 96 compartimentos, exceto na T₀ (placa controle), nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL⁻¹ (Figura 23). Neste momento, foi realizado a fixação da placa T₀, pela adição de 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50%, a qual permitiu determinar a quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram adicionadas. Para o controle positivo, foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025 a 25 µg mL⁻¹. As placas tratadas foram incubadas por 48 horas e, após este período, o experimento foi interrompido, para a fixação das células, pela adição de 50 µL/compartimento de TCA 50% seguida de incubação por 1 hora a 4 °C. Após esse período, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, sendo mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Figura 23: Esquema demonstrativo da microplaca de 96 orifícios, corada com SRB, apresentando a distribuição das linhas e colunas, utilizada para a avaliação antiproliferativa dos derivados vegetais.



Coluna 1: controle (branco) do meio de cultura. Coluna 2: controle (branco) da suspensão celular. Quadrantes A, B, C, D e E: disposição da suspensão celular em presença das amostras, em triplicata, nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Linhas A e H: controle (branco) das respectivas amostras teste.

2.1.3.2. Determinação da atividade antiproliferativa das amostras, pelo ensaio da sulforrodamina B (SRB), com leitura espectrofotométrica das microplacas

A avaliação do crescimento celular foi realizada por um método colorimétrico que estima indiretamente o número de células presentes, corando o total de proteína celular, utilizando a sulforrodamina B (SKEHAN et al., 1990).

Decorridos às 48 horas de tratamento, as células fixadas foram coradas com 50 μL /compartimento de SRB, um corante proteico, a 0,4% (m/v), dissolvido em ácido acético a 1% e, em seguida incubadas a 4 °C, por 30 minutos. Decorrido este período, as placas foram lavadas, por quatro vezes consecutivas, com uma solução de ácido acético 1% e, secas à temperatura ambiente. Sequencialmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado por adição de 150 μL /compartimento de com Trizma Base (10 μM e pH 10,5).

Ao término do procedimento, as microplacas foram submetidas à leitura espectrofotométrica da absorbância em leitor de microplacas (ELISA - Molecular Devices Versa Max Microplate Reader) a 540 nm.

A SRB é um corante proteico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (SKEHAN et al., 1990).

2.1.4. Análise dos resultados

Com os valores médios de absorbância, para cada concentração de cada amostra, obtidos na leitura espectrofotométrica, foi calculada a porcentagem de crescimento (%C), pelas médias das absorbâncias, descontadas de seus respectivos brancos.

Considerando-se:

Se $T > T_1$: a amostra apresenta estímulo de crescimento celular.

Se $T_1 > T \geq T_0$: a amostra apresenta atividade citostática e, a fórmula utilizada é:

$$\% C = 100x [(T - T_0)/(T_1 - T_0)]$$

Se $T \leq T_0$: a amostra apresenta atividade citocida e, a fórmula utilizada é:

$$\% C = 100x [(T - T_0)/(T_0)]$$

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada com a amostra;

T_1 = absorbância do controle de célula (branco);

T_0 = absorbância do controle das células no dia da adição das drogas.

Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada e, as concentrações efetivas denominadas GI_{50} , que representa a concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular, e TGI (*total growth inhibition*), que representa a concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular (0% de crescimento celular) (SHOEMAKER, 2006), foram calculadas por regressão não linear, tipo sigmoideal, utilizando-se *software* Origin[®] - versão 8, e classificadas quanto à atividade pelos valores de GI_{50} e, posteriormente, apresentado o TGI mais promissores das amostras mais ativas (FOUCHE et al., 2008). Esses valores foram utilizados para comparar a potência das amostras e evidenciando a seletividade.

3. Resultados e discussão

Os testes de atividade antitumoral foram realizados conforme descritos na metodologia para a avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*, em cultura de células tumorais e não tumorais humanas e não tumorais de camundongos (Tabela 18), em fase exponencial de crescimento, a diferentes concentrações das amostras, sendo a quantificação final de células realizada pelo ensaio da SRB.

A metodologia de triagem antiproliferativa *in vitro*, preconizada pelo NCI-EUA e utilizada neste trabalho, permite a avaliação da resposta biológica de amostras de origem vegetal, buscando a inibição seletiva de crescimento e/ou morte celular, na complexidade de uma dose-resposta produzida, frente a diversos tipos de células neoplásicas, ou para determinar se o padrão de resposta é único e não é semelhante ao de qualquer outra amostra, possibilitando a seleção de amostras com maior especificidade, rapidez, eficiência e reprodutibilidade (SKEHAN et al., 1990, SCREENING, 2013).

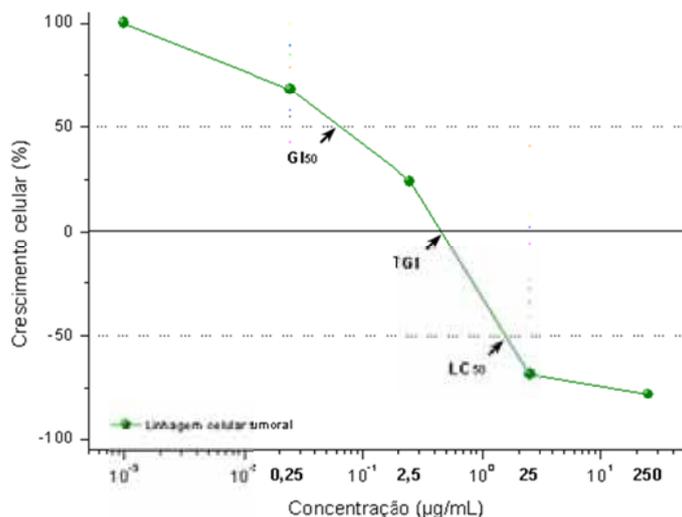
Diante dessa perspectiva, os extratos brutos diclorometânicos e etanólicos e o óleo essencial de *S. terebinthifolius* obtidos conforme a metodologia descrita no item 2.1.1. do Capítulo II foram avaliados. Posteriormente, pela análise dos resultados obtidos, o extrato que apresentou a melhor atividade antiproliferativa, assim como o óleo essencial, foi submetido ao processo de fracionamento, conforme item 2.1.4. do Capítulo II, para prosseguimento do estudo de atividade antiproliferativa.

A avaliação da influência dos extratos, óleo essencial e frações sobre a proliferação celular foi feita por método colorimétrico utilizando-se a SRB, o qual estima indiretamente o número de células presentes no meio. O ensaio da SRB é consideravelmente rápido, simples e apresenta sensibilidade comparável àquelas das metodologias fluorescentes e superior aos ensaios que utilizam outros corantes visíveis, mesmo em baixas concentrações celulares (SKEHAN et al., 1990).

O resultado obtido foi expresso graficamente com o crescimento celular em função da concentração da amostra. A leitura desse gráfico indica que valores positivos (acima de zero e abaixo de 100%) representam crescimento celular, enquanto que valores negativos (abaixo de zero) representam morte celular, pois neste caso, a quantidade de células (aferida pela absorbância no final do experimento) é menor do que a que iniciou o experimento (absorbância em T_0). As concentrações efetivas GI_{50} (concentração para inibir 50% do crescimento celular), TGI (concentração para inibir 100% do crescimento celular) e LC_{50} (concentração para que ocorra 50% de morte celular) são parâmetros utilizados para mensurar a atividade celular (Figura 24) (SERVAT, 2010). No presente trabalho, optou-se

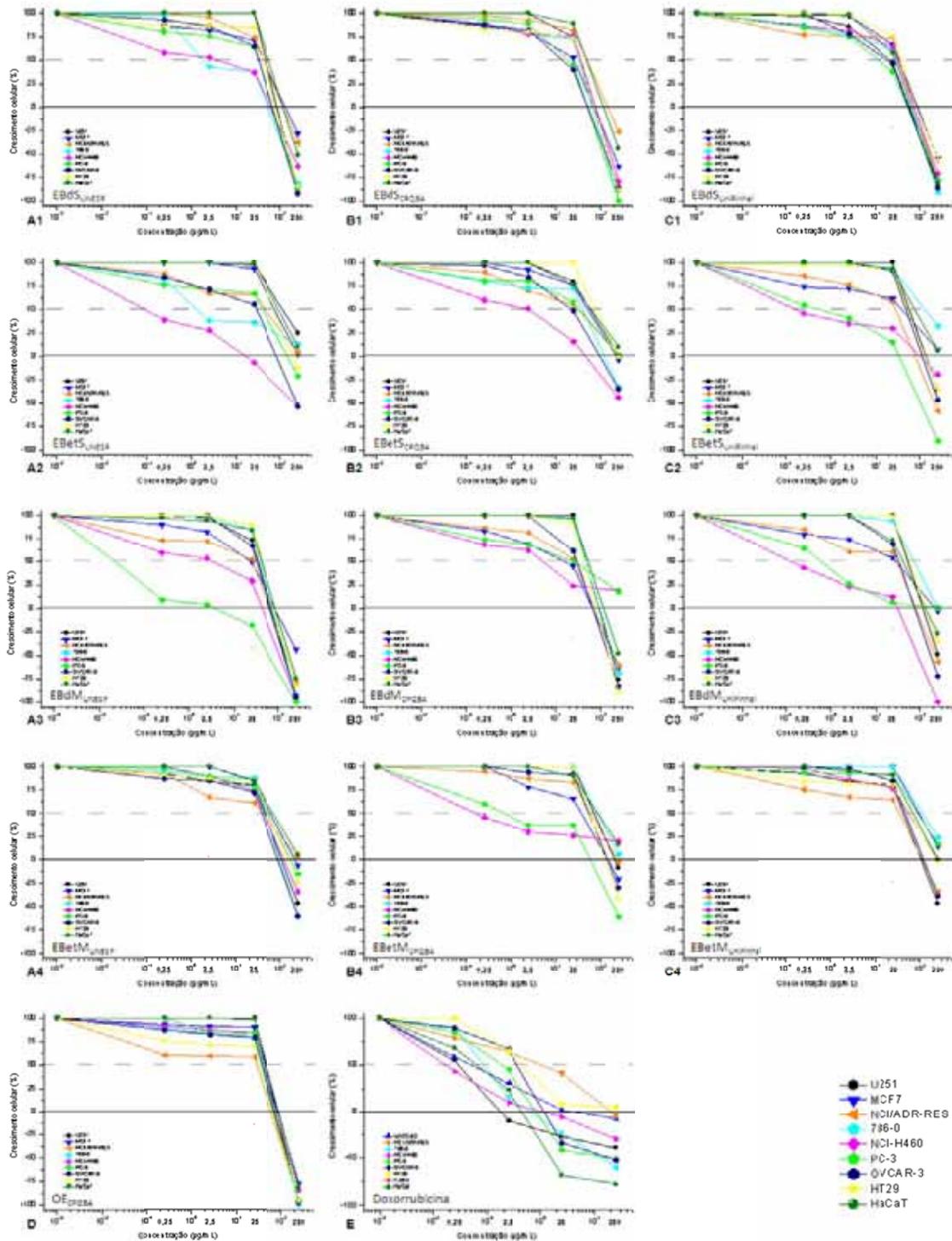
pelas concentrações efetivas GI_{50} e TGI, tendo em vista o perfil de atividade apresentado pelas amostras.

Figura 24: Relação de crescimento celular em função da concentração da amostra em destaque as concentrações efetivas GI_{50} (concentração para inibir 50% do crescimento celular), TGI (concentração para inibir 100% do crescimento celular) e LC_{50} (concentração para que ocorra 50% de morte celular).



Os resultados das análises de atividade antiproliferativa dos extratos brutos e óleo essencial vegetal testados foram avaliados, evidenciando perfis de seletividade das amostras vegetais (Figura 25) e, os valores das concentrações efetivas foram utilizados para comparar a potência das amostras vegetais (Tabelas 19 e 20). Como controle positivo, a doxorrubicina foi utilizada nos ensaios, para o monitoramento do perfil de resposta das linhagens empregadas.

Figura 25: Curvas de concentração-resposta dos derivados vegetais de *S. terebinthifolius*, para a avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*, pelo ensaio da sulforrodamina B, sobre as linhagens celulares, correlacionando a porcentagem de crescimento da célula à concentração do composto utilizado.



As curvas concentração-resposta em A, B e C representam os EB do Acesso 1 (Unesp), Acesso 2 (CPQBA) e Acesso 3 (UniPinhal) e, correspondentes em 1, 2, 3, e 4 para o EBdS, EBetS, EBdM e EBetM, respectivamente. A curva concentração-resposta em D representa o OE e, em E a Doxorrubicina (controle positivo).

Tabela 19: Valores da concentração efetiva GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) referente a atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos brutos e óleo essencial de *S. terebinthifolius*, frente às linhagens tumorais e não-tumorais.

Linhagem celular	Acesso 1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Acesso 2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Acesso 3 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM	OE	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM
U251	39,56	150,59	28,18	29,45	28,53	41,84	40,96	50,68	47,78	24,78	38,33	39,56	29,45
MCF-7	27,91	62,69	24,88	30,03	25,34	28,69	24,77	27,17	32,05	27,24	16,79	14,12	211,32
NCI/ADR-RES	28,35	21,22	25,21	19,45	29,59	16,05	25,35	30,32	25,99	28,38	25,99	26,28	27,03
786-0	2,64	2,76	30,35	30,97	28,19	28,06	29,95	196,88	29,08	26,52	152,41	31,78	224,07
NCI-H460	1,32	< 0,25	1,21	28,38	28,73	1,07	3,36	< 0,25	30,36	26,95	0,29	< 0,25	41,16
PC-3	26,81	27,39	< 0,25	28,88	24,41	21,93	12,56	0,78	30,35	23,30	0,57	0,56	100,25
OVCAR-3	25,41	25,66	27,23	28,04	24,28	24,96	26,38	32,82	29,29	24,51	32,42	27,54	30,61
HT29	30,60	40,42	32,06	30,54	28,36	52,86	32,39	38,53	27,71	28,71	33,13	51,23	30,84
HaCaT	40,23	205,09	30,36	58,70	31,65	55,20	34,82	92,89	38,33	25,97	76,30	28,25	42,74
M_ GI_{50}	24,76	<59,56	<22,19	31,60	27,68	30,07	25,62	<52,26	32,33	26,26	41,80	<24,40	81,94

Acessos: Acesso 1 (Unesp); Acesso 2 (CPQBA); Acesso 3 (UniPinhal).

EBdS: extrato bruto diclorometânico obtido por Soxhlet; EBetS: extrato bruto etanólico obtido por Soxhlet; EBdM: extrato bruto diclorometânico obtido por maceração; EBetM: extrato bruto etanólico obtido por maceração; OE: óleo essencial.

Linhagens: U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (côlon), HaCat (queratinócito).

M_ GI_{50} : média de GI_{50} .

Tabela 20: Valores da concentração efetiva TGI em $\mu\text{g mL}^{-1}$ referente a atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos brutos e óleo essencial de *S. terebinthifolius*, frente às linhagens tumorais e não-tumorais.

Linhagem celular	Acesso 1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Acesso 2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Acesso 3 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM	OE	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM
U251	197,0	> 250	58,5	118,6	63,7	> 250	208,4	245,9	178,9	51,3	222,1	226,0	118,6
MCF-7	139,1	> 250	82,5	224,4	67,5	229,6	57,4	151,4	95,9	92,2	> 250	268,3	> 250
NCI/ADR-RES	126,1	> 250	56,1	> 250	161,6	> 250	69,2	237,7	47,9	73,4	75,2	74,5	114,3
786-0	33,6	> 250	68,0	113,6	43,3	127,2	124,3	> 250	43,4	53,3	> 250	> 250	> 250
NCI-H460	37,3	9,6	24,5	132,4	75,4	35,1	> 250	> 250	78,9	72,4	105,0	7,6	> 250
PC-3	58,9	156,7	1,4	186,1	36,7	> 250	> 250	31,5	63,0	46,0	14,7	> 250	> 250
OVCAR-3	53,7	77,0	52,0	91,0	44,6	96,9	59,1	171,2	55,0	48,0	140,5	76,1	141,4
HT29	78,9	243,8	89,4	171,4	64,2	249,6	82,4	217,3	52,1	102,2	163,0	222,9	247,8
HaCaT	224,8	> 250	91,1	> 250	140,8	> 250	157,8	> 250	125,7	59,4	> 250	147,8	> 250
M_ TGI	105,5	>193,0	58,2	>170,8	77,5	>193,2	>139,8	>200,5	82,3	66,5	>163,4	>169,3	>208,0

Acessos: Acesso 1 (Unesp); Acesso 2 (CPQBA); Acesso 3 (UniPinhal).

EBdS: extrato bruto diclorometânico obtido por Soxhlet; EBetS: extrato bruto etanólico obtido por Soxhlet; EBdM: extrato bruto diclorometânico obtido por maceração; EBetM: extrato bruto etanólico obtido por maceração; OE: óleo essencial.

Linhagens: U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (côlon), HaCat (queratinócito).

> 250: inativo.

M_ TGI: média de TGI.

Pode-se dizer que, os derivados vegetais avaliados apresentaram certa atividade antiproliferativa em função da concentração sobre certas linhagens celulares testadas. As concentrações testadas para os extratos brutos e óleo essencial vegetal foram de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Pela análise das curvas concentração-resposta dos derivados vegetais sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento das células à

concentração de extrato utilizado, pôde-se apresentar o perfil de ação e a seletividade das amostras, sendo consideradas de atividade citostática as curvas que apresentaram valores de crescimento celular abaixo ou igual a 50% e, de atividade citocida as que apresentaram morte celular (valores abaixo de zero).

Os resultados das quatro doses analisadas foram apresentados como valores de GI_{50} e TGI (Tabelas 19 e 20). De maneira geral, os extratos diclorometânicos (EBd) foram um pouco mais ativos [valores médios de GI_{50} ($M_{GI_{50}}$) menores] do que os respectivos extratos etanólicos (EBet). Assim como observado nas CCDs (Capítulo II, Figura 9), não houve diferença significativa quanto à atividade antiproliferativa com relação ao método de extração utilizado para a preparação dos extratos EBd, considerando-se os valores médios de GI_{50} . Porém, quando se analisa a atividade sobre cada linhagem, é possível verificar que para o indivíduo coletado no Acesso 1, o extrato EBdS apresentou seletividade para as linhagens tumorais de rim (786-0, $GI_{50} = 2,64 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de pulmão (NCI-H460, $GI_{50} = 1,32 \mu\text{g mL}^{-1}$) enquanto o extrato EBdM manteve a seletividade para linhagem tumoral de pulmão (NCI-H460, $GI_{50} = 1,21 \mu\text{g mL}^{-1}$) e passou a ser seletivo para a linhagem tumoral de próstata (PC-3, $GI_{50} < 0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$). De maneira semelhante, os extratos EBdS dos indivíduos coletados no Acesso 2 e Acesso 3 apresentaram uma atividade antiproliferativa moderada ($M_{GI_{50}} = 27,68$ e $26,26 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) agindo de maneira semelhante em todas as linhagens tumorais. Já os extratos EBdM desses mesmos indivíduos (Acesso 2 e Acesso 3) apesar de grande semelhança química com os EBdS, apresentaram atividade antiproliferativa média um pouco mais potente ($M_{GI_{50}} = 25,62$ e $< 24,40 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) com seletividade para as linhagens tumorais de pulmão (NCI-H460, $GI_{50} = 3,36$ e $< 0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e de próstata (PC-3, $GI_{50} = 12,56$ e $0,56 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

Em relação aos extratos EBet, a análise por CCD (Capítulo II) evidenciou uma diferença na composição química (Figuras 7.A e .B, 9.B) que pode explicar a diferença observada na atividade antiproliferativa média frente ao painel de células tumorais humanas para os extratos etanólicos obtidos por Soxhlet (EBetS) e maceração (EBetM). Assim os extratos EBetS foram mais ativos ($M_{GI_{50}} = 30,07$ e $41,80 \mu\text{g mL}^{-1}$, para indivíduos do Acesso 2 e Acesso 3) do que os EBetM ($M_{GI_{50}} = < 52,26$ e $81,94 \mu\text{g mL}^{-1}$, para indivíduos do Acesso 2 e Acesso 3, respectivamente). A exceção foram os extratos EBet do Acesso 1, para qual o EBetS ($M_{GI_{50}} < 59,56 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi menos ativo do que o EBetM ($M_{GI_{50}} = 31,60 \mu\text{g mL}^{-1}$). Quanto a seletividade, o extrato EBetS do Acesso 1 foi seletivo para as linhagens tumorais de rim (786-0, $GI_{50} = 2,76 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de pulmão (NCI-H460, $GI_{50} < 0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto o EBetM, do mesmo Acesso, não apresentou seletividade significativa para nenhuma das linhagens avaliadas. Já o extrato EBetM do Acesso 2 inibiu

seletivamente a proliferação das linhagens tumorais de pulmão (NCI-H460, $GI_{50} < 0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de próstata (PC-3, $GI_{50} = 0,78 \mu\text{g mL}^{-1}$) sendo que o EBetS, do mesmo Acesso, foi seletivo para linhagem de pulmão (NCI-H460, $GI_{50} = 1,07 \mu\text{g mL}^{-1}$). Finalmente, o extrato EBetS do Acesso 3 também inibiu seletivamente a proliferação das linhagens de pulmão (NCI-H460, $GI_{50} = 0,29 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de próstata (PC-3, $GI_{50} = 0,57 \mu\text{g mL}^{-1}$) enquanto o EBetM, do mesmo Acesso, não apresentou seletividade para nenhuma das linhagens avaliadas. Enfim, o OE apresentou uma atividade antiproliferativa moderada ($M_GI_{50} = 32,33 \mu\text{g mL}^{-1}$) sem seletividade significativa.

De acordo à descrição de critérios, segundo Fouche e colaboradores (2008), para a classificação de amostras com atividade antiproliferativa, os resultados do ensaio dos derivados vegetais apresentados como valores de TGI podem ser separados em quatro categorias, a saber, inativo ($TGI > 50 \mu\text{g mL}^{-1}$), fraca atividade ($15 \mu\text{g mL}^{-1} < TGI < 50 \mu\text{g mL}^{-1}$), atividade moderada ($6,25 \mu\text{g mL}^{-1} < TGI < 15 \mu\text{g mL}^{-1}$) e, atividade potente ($TGI < 6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$). Circunstancial a este critério e, de acordo com os resultados dos valores de TGI obtidos (Tabela 20), foi possível classificar a atividade das amostras analisadas sobre cada linhagem, com relação ao método de extração utilizado para a preparação dos extratos EBd, sendo que para o indivíduo coletado no Acesso 1, o extrato EBdM apresentou uma atividade potente sobre a linhagem tumoral de próstata (PC-3, $TGI = 1,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) e uma atividade fraca sobre a linhagem de pulmão (NCI-H460, $TGI = 24,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para o indivíduo coletado no Acesso 3, o extrato EBdM apresentou uma atividade moderada sobre a linhagem tumoral de pulmão (NCI-H460, $TGI = 7,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). De maneira semelhante, o extrato EBdS do indivíduo coletado no Acesso 1 apresentou uma atividade fraca sobre as linhagens tumorais de rim (786-0, $TGI = 33,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) e pulmão (NCI-H460, $TGI = 37,3 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto o extrato EBdS (Acesso 2) manteve a atividade para a linhagem tumoral de rim (786-0, $TGI = 43,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) e passou a ser seletivo, da mesma forma que o EBdS (Acesso 3), sobre as linhagens tumorais de próstata (PC-3, $TGI = 36,7$ e $46,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), e ovário (OVCAR-3, $TGI = 44,6$ e $48,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

Em relação aos extratos EBet, a análise dos valores de TGI obtidos (Tabela 20) evidenciou uma atividade moderada dos extratos EBetS dos indivíduos coletados no Acesso 1 e Acesso 3 sobre a linhagem tumoral de pulmão (NCI-H460, $TGI = 9,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de próstata (PC-3, $TGI = 14,7 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente. Já para o indivíduo coletado no Acesso 2, o extrato EBetS apresentou uma atividade fraca sobre a linhagem tumoral de pulmão (NCI-H460, $TGI = 35,1 \mu\text{g mL}^{-1}$), da mesma forma que o EBetM, sobre a linhagem de próstata (PC-3 = $31,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). E, finalmente, com a análise dos valores de TGI obtidos para o OE, foi observada uma atividade fraca sobre as linhagens tumorais de rim (786-0, $TGI = 43,4$) e de ovário (NCI/ADR-RES, $TGI = 47,9$).

Outro parâmetro a ser mencionado refere-se a um método comparativo que pode ser realizado a partir dos valores das concentrações efetivas, gerados dos resultados dos testes de atividade antiproliferativa. Esta comparação permite avaliar as amostras testadas em condições idênticas, através de um gráfico criado por uma delineação de valores de delta - positivos e negativos - gerados a partir de um conjunto de valores de GI₅₀, TGI ou LC₅₀. Esta análise foi desenvolvida pela NCI para enfatizar efeitos diferenciais das amostras testadas em várias linhagens de células tumorais humanas (SPINDOLA et al., 2009; PAULL et al., 2013a e 2013b).

A partir dos valores obtidos das concentrações efetivas GI₅₀ e TGI dos derivados vegetais (Tabelas 19 e 20, respectivamente), obteve-se a atividade antiproliferativa diferencial pelos valores de delta obtidos, calculando-se o log₁₀(GI₅₀ e TGI) e a média dos os logaritmos do derivado vegetal (M_GI₅₀ e TGI), subtraindo-se o valor de log₁₀(GI₅₀ e TGI) de cada linhagem celular da média correspondente (PAULL et al., 2013a). O resultado referente à atividade antiproliferativa diferencial dos derivados vegetais de folhas de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas está apresentado nas Tabelas 21 e 22, e representado pelas Figuras 26 e 27.

Tabela 21: Valores de delta, resultantes de um conjunto de valores da concentração efetiva GI₅₀, para estimar a atividade antiproliferativa diferencial dos derivados vegetais de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas.

Linhagem celular	Delta do Acesso 1				Delta do Acesso 2					Delta do Acesso 3			
	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM	OE	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM
U251	-0,38	-0,85	-0,38	0,01	-0,01	-0,29	-0,28	-0,45	-0,18	0,02	-0,41	-0,55	0,29
MCF-7	-0,23	-0,47	-0,33	0,00	0,04	-0,13	-0,06	-0,18	0,00	-0,02	-0,05	-0,10	-0,57
NCI/ADR-RES	-0,23	0,00	-0,33	0,19	-0,03	0,12	-0,07	-0,23	0,09	-0,03	-0,24	-0,37	0,32
786-0	0,80	0,88	-0,41	-0,01	-0,01	-0,12	-0,14	-1,04	0,04	-0,01	-1,01	-0,46	-0,60
NCI-H460	1,10	<1,92	0,99	0,03	-0,02	1,30	0,80	1,85	0,02	-0,01	1,71	1,65	0,14
PC-3	-0,21	-0,11	<1,67	0,02	0,05	-0,01	0,23	<1,36	0,02	0,05	1,41	<1,29	-0,25
OVCAR-3	-0,19	-0,09	-0,36	0,03	0,06	-0,07	-0,09	-0,26	0,04	0,03	-0,34	-0,39	0,27
HT29	-0,27	-0,28	-0,44	0,00	-0,01	-0,39	-0,18	-0,33	0,06	-0,04	-0,35	-0,66	0,27
HaCaT	-0,39	-0,99	-0,41	-0,29	-0,06	-0,41	-0,21	-0,72	-0,08	0,00	-0,71	-0,40	0,12

Delta: $\Delta = M_{GI_{50}} - \log_{10}(GI_{50})$

Acessos: Acesso 1 (Unesp); Acesso 2 (CPQBA); Acesso 3 (UniPinhal).

EBdS: extrato bruto diclorometânico obtido por Soxhlet; EBetS: extrato bruto etanólico obtido por Soxhlet; EBdM: extrato bruto diclorometânico obtido por maceração; EBetM: extrato bruto etanólico obtido por maceração; OE: óleo essencial.

Linhagens: U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon), HaCaT (queratinócito).

Figura 26: Atividade antiproliferativa média gerada com os valores de delta, resultantes de um conjunto de valores da concentração efetiva GI₅₀, para estimar a atividade antiproliferativa diferencial dos derivados vegetais de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas.

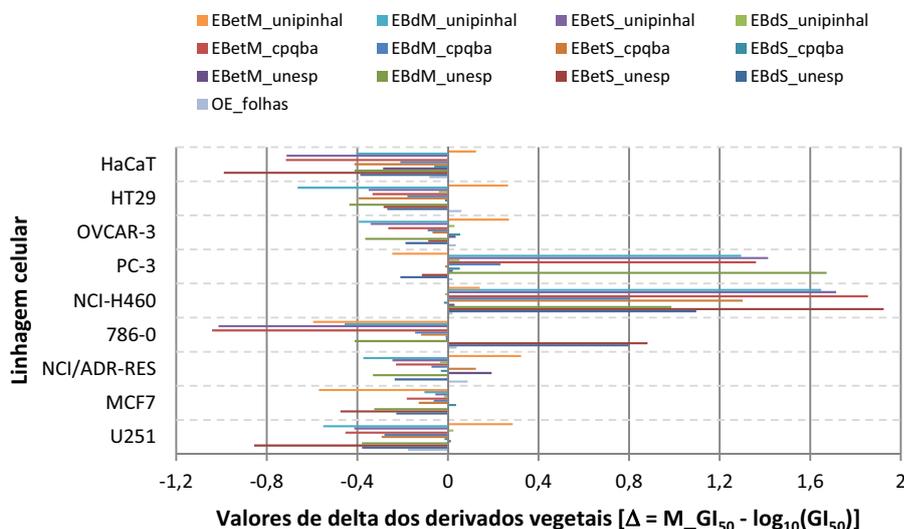


Tabela 22: Valores de delta, resultantes de um conjunto de valores da concentração efetiva TGI, para estimar a atividade antiproliferativa diferencial dos derivados vegetais de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas.

Linhagem celular	Delta do Acesso 1				Delta do Acesso 2					Delta do Acesso 3			
	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM	OE	EBdS	EBetS	EBdM	EBetM
U251	-0,36	IN	-0,17	0,13	0,03	IN	-0,24	-0,15	-0,39	0,10	-0,24	-0,27	0,22
MCF-7	-0,21	IN	-0,32	-0,14	0,01	-0,14	0,32	0,07	-0,11	-0,16	IN	-0,35	IN
NCI/ADR-RES	-0,17	IN	-0,15	IN	-0,37	IN	0,24	-0,13	0,19	-0,06	0,23	0,21	0,24
786-0	0,41	IN	-0,23	0,15	0,20	0,12	-0,02	IN	0,23	0,08	IN	IN	IN
NCI-H460	0,36	1,18	0,21	0,08	-0,04	0,68	IN	IN	-0,03	-0,05	0,09	1,20	IN
PC-3	0,16	-0,04	1,47	-0,06	0,27	IN	IN	0,75	0,07	0,14	0,94	IN	IN
OVCAR-3	0,20	0,27	-0,11	0,25	0,19	0,23	0,31	0,01	0,13	0,13	-0,04	0,20	0,15
HT29	0,03	-0,23	-0,35	-0,03	0,03	-0,18	0,16	-0,09	0,15	-0,20	-0,10	-0,27	-0,10
HaCaT	-0,42	IN	-0,36	IN	-0,31	IN	-0,12	IN	-0,23	0,03	IN	-0,09	IN

Delta: $\Delta = M_TGI - \log_{10}(TGI)$

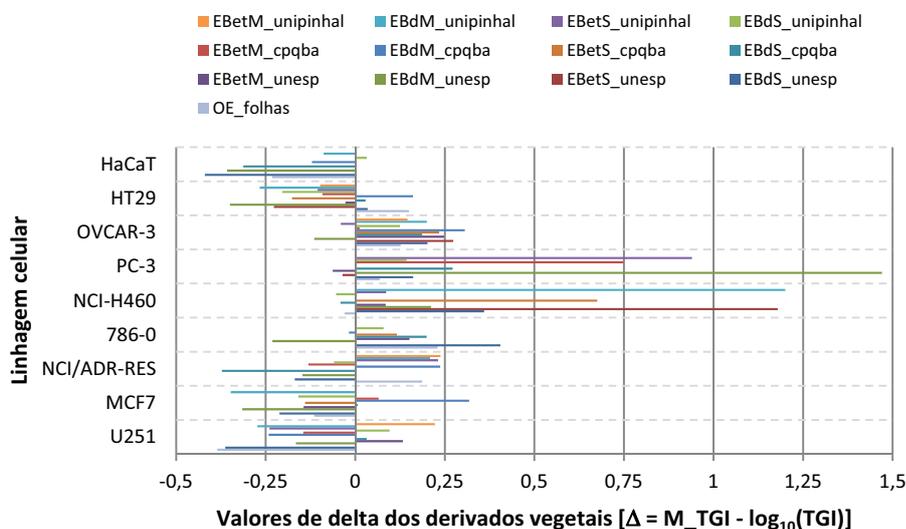
Acessos: Acesso 1 (Unesp); Acesso 2 (CPQBA); Acesso 3 (UniPinhal).

EBdS: extrato bruto diclorometânico obtido por Soxhlet; EBetS: extrato bruto etanólico obtido por Soxhlet; EBdM: extrato bruto diclorometânico obtido por maceração; EBetM: extrato bruto etanólico obtido por maceração; OE: óleo essencial.

Linhagens: U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon), HaCaT (queratinócito).

IN: inativo.

Figura 27: Atividade antiproliferativa média gerada com os valores de delta, resultantes de um conjunto de valores da concentração efetiva TGI, para estimar a atividade antiproliferativa diferencial dos derivados vegetais de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas.



A análise comparativa dos dados apresentados requer uma compreensão do gráfico de atividade antiproliferativa média. Os valores positivos e negativos traçados ao longo da linha vertical representam a resposta média de todas as linhagens celulares testadas para a amostra em estudo. Os valores positivos projetados para a direita, da linha vertical, representam a sensibilidade celular que excede média. Os valores negativos projetados para a esquerda representam a sensibilidade celular inferior ao valor da média (SPINDOLA et al., 2009; PAULL et al., 2013a). A organização e apresentação dos dados foram planejados para otimizar efeitos específicos, para listar linhagens de células por tipo de doença, sendo um acessório útil para o conceito de comparação (PAULL et al., 2013a).

A análise comparativa e interpretação dos dados apresentados (Figuras 26 e 27) para GI_{50} e TGI para os derivados vegetais de folhas de *S. terebinthifolius* analisados corrobora com os resultados já descritos quanto à seletividade para as linhagens celulares tumorais de pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3) e rim (786-O), além de evidenciar também uma seletividade moderada para linhagens de ovário (NCI-ADR/RES e OVCAR-3).

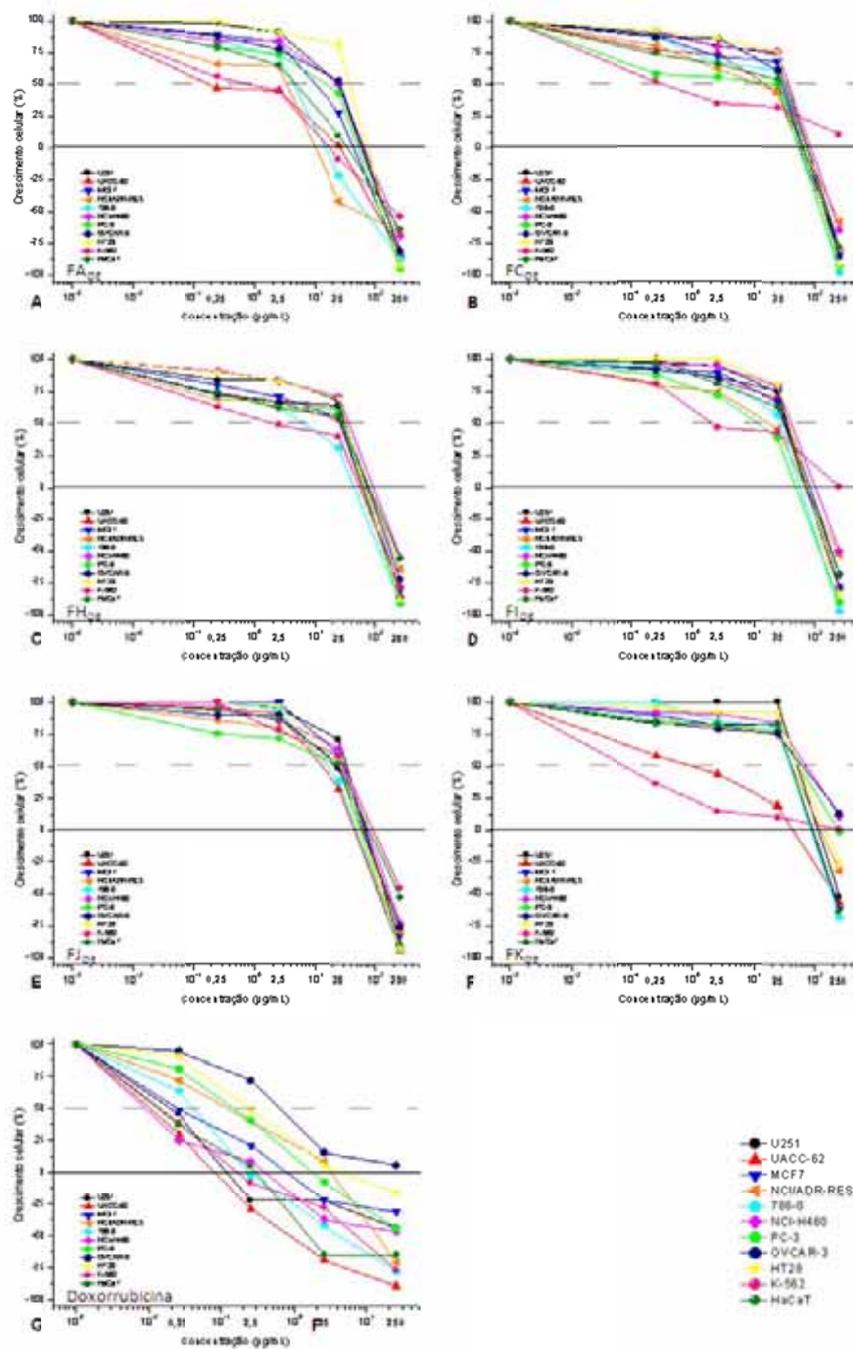
Os resultados indicaram ainda uma melhor atividade dos extratos brutos em relação ao óleo essencial, obtido de folhas de *S. terebinthifolius*. Uma diferença na composição e concentração dos compostos presentes nos derivados vegetais pode explicar a diferença na efetividade das amostras frente às linhagens celulares testadas.

Dando continuidade ao estudo fitoquímico, o extrato EBdS_{CPQBA} (Acesso 2) foi selecionado para fracionamento, uma vez que, apesar de não ser o mais ativo dentre os extratos diclorometânico avaliados, foi o que apresentou bons rendimentos no processo de

extração, bons resultados nas avaliações de caracterização físico-química, além de atividade antimicrobiana promissora e grande semelhança de perfil químico com o extrato diclorometânico do indivíduo coletado no Acesso 3 (EBdS_{UniPinhal}). Além disso, o OE também foi submetido ao fracionamento por seu perfil químico. Assim as frações do óleo essencial (FA_{OE}, FB_{OE}, FC_{OE}, FD_{OE}, FE_{OE}, FF_{OE}, FG_{OE}, FH_{OE}, FI_{OE}, FJ_{OE} e FK_{OE}) e aquelas obtidas a partir do extrato bruto EBdS_{CPQBA}, (FA_{EB}, FB_{EB}, FC_{EB}, FD_{EB}, FE_{EB} e FF_{EB}), foram submetidas à avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*, frente ao painel de células tumorais.

Os resultados referentes às atividades das frações do OE (F_{OE}) de folhas de *S. terebinthifolius*, evidenciando os perfis de seletividade das frações, estão representados na Figura 28, e seus valores de concentração efetiva correspondentes a GI_{50} e TGI estão apresentados nas Tabelas 23 e 24, respectivamente.

Figura 28: Curvas concentração-resposta das frações do OE de *S. terebinthifolius*, para a avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*, pelo ensaio da sulforrodamina B, sobre as linhagens celulares, correlacionando a porcentagem de crescimento da célula à concentração do composto utilizado.



As curvas concentração-resposta em A, B, C, D, E, F e G correspondem às frações FA_{OE} , FC_{OE} , FH_{OE} , FI_{OE} , FJ_{OE} , FK_{OE} e Doxorubicina (controle positivo), respectivamente.

Tabela 23: Valores da concentração efetiva GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) referente a atividade antiproliferativa *in vitro* das frações do OE de *S. terebinthifolius*, frente às linhagens tumorais e não-tumorais.

Linhagem celular	Frações do óleo essencial vegetal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	FA _{OE}	FC _{OE}	FH _{OE}	FI _{OE}	FJ _{OE}	FK _{OE}
U251	25,00	28,37	27,39	28,52	25,97	40,12
UACC-62	0,39	24,25	25,34	27,70	22,57	0,77
MCF-7	9,94	27,40	25,60	27,24	26,11	26,02
NCI/ADR-RES	2,69	5,18	26,55	24,51	24,78	28,76
786-0	2,85	26,39	3,66	25,53	23,33	28,16
NCI-H460	25,00	28,73	27,88	29,22	26,81	68,94
PC-3	24,96	25,00	26,39	24,43	25,00	38,70
OVCAR-3	25,04	26,38	26,83	28,72	24,97	54,55
HT29	29,68	28,71	27,55	29,47	25,25	32,32
K-562	0,60	0,34	1,43	3,89	26,00	< 0,25
HaCaT	3,65	25,49	25,75	26,67	25,17	30,15
M_ GI_{50}	13,62	22,39	22,21	25,08	25,09	< 31,70

Linhagens: U251 (glioma), UACC-62 (pele), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (côlon), K-562 (leucemia), HaCat (queratinócito).
M_ GI_{50} : média de GI_{50} .

Tabela 24: Valores da concentração efetiva TGI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) referente a atividade antiproliferativa *in vitro* das frações do OE de *S. terebinthifolius*, frente às linhagens tumorais e não-tumorais.

Linhagem celular	Frações do óleo essencial vegetal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	FA _{OE}	FC _{OE}	FH _{OE}	FI _{OE}	FJ _{OE}	FK _{OE}
U251	50,59	74,45	60,67	69,39	59,49	224,81
UACC-62	12,21	50,22	52,79	70,75	36,84	25,82
MCF-7	37,74	64,41	57,10	67,30	58,51	101,76
NCI/ADR-RES	10,94	55,43	73,65	66,89	52,46	135,22
786-0	15,71	46,09	34,84	44,42	39,46	93,49
NCI-H460	60,91	91,04	95,32	114,10	69,94	> 250
PC-3	42,11	47,10	53,31	42,49	46,91	> 250
OVCAR-3	55,21	57,60	69,77	87,14	55,82	> 250
HT29	63,56	60,93	60,41	74,39	46,88	178,84
K-562	15,64	> 250	32,30	> 250	89,74	> 250
HaCaT	29,06	57,25	69,54	73,11	76,74	100,93
M_TGI	35,79	> 77,68	59,97	> 87,27	57,53	> 169,71

Linhagens: U251 (glioma), UACC-62 (pele), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (côlon), K-562 (leucemia), HaCat (queratinócito).

> 250: inativo.

M_TGI: média de TGI.

As F_{OE} avaliadas apresentaram certa atividade antiproliferativa em função da concentração sobre certas linhagens celulares testadas, e pela análise das curvas concentração-resposta das F_{OE} sobre as linhagens, relacionando a porcentagem de crescimento das células à concentração da amostra utilizada (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), apresentou-se o perfil de ação e a seletividade das frações.

Os resultados das quatro doses analisadas foram apresentados como valores de GI_{50} e TGI (Tabelas 23 e 24). De maneira geral, a fração FA_{OE} foi mais ativa [valor médio de GI_{50} menor ($M_{GI_{50}} = 13,62 \mu\text{g mL}^{-1}$)] do que as demais frações do OE, e a FK_{OE} foi a menos ativa ($M_{GI_{50}} < 31,70 \mu\text{g mL}^{-1}$). Do mesmo modo, as frações FI_{OE} e FJ_{OE} apresentaram uma atividade antiproliferativa moderada ($M_{GI_{50}} = 25,08$ e $25,09 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Já as frações FC_{OE} e FH_{OE} apresentaram uma atividade um pouco mais potente ($M_{GI_{50}} = 22,39$ e $22,21 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Assim como observado na CCD (Capítulo II, Figura 13.B), há uma diferença na composição química que pode explicar a diferença observada na atividade antiproliferativa média frente ao painel de células tumorais para as F_{OE} . Quando se analisa a atividade sobre cada linhagem, é possível verificar que a FA_{OE} e a FK_{OE} , apesar da diferença química e de valores de GI_{50} , apresentaram seletividade semelhantes para as linhagens tumorais de pele (UACC-62, $GI_{50} = 0,39$ e $0,77 \mu\text{g mL}^{-1}$), mama (MCF-7, $GI_{50} = 9,94$ e $26,02 \mu\text{g mL}^{-1}$), ovário (NCI/ADR-RES, $GI_{50} = 2,69$ e $28,76 \mu\text{g mL}^{-1}$), rim (786-0, $GI_{50} = 2,85$ e $28,16 \mu\text{g mL}^{-1}$) e leucemia (K-562, $GI_{50} = 0,60$ e $< 0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e para a linhagem não tumoral de queratinócito (HaCaT, $GI_{50} = 3,65$ e $30,15 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Já a fração FC_{OE} apresentou seletividade para as linhagens tumorais de leucemia (K-562, $GI_{50} = 0,34 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de ovário (NCI-ADR/RES, $GI_{50} = 5,18 \mu\text{g mL}^{-1}$) enquanto a fração FH_{OE} manteve a seletividade para linhagem tumoral de leucemia (K-562, $GI_{50} = 1,43 \mu\text{g mL}^{-1}$), e passou a ser seletiva para a linhagem tumoral de rim (786-O, $GI_{50} = 3,66 \mu\text{g mL}^{-1}$). Enfim, a fração FI_{OE} inibiu seletivamente a proliferação das linhagens tumorais de ovário (NCI-ADR/RES, $GI_{50} = 24,51 \mu\text{g mL}^{-1}$), próstata (PC-3, $GI_{50} = 24,43 \mu\text{g mL}^{-1}$) e leucemia (K-562, $GI_{50} = 3,89 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto que a fração FJ_{OE} manteve a seletividade para as linhagens tumorais de ovário (NCI/ADR-RES e OVCAR-3, $GI_{50} = 24,78$ e $24,97 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e de próstata (PC-3, $GI_{50} = 25,00 \mu\text{g mL}^{-1}$), e passou a ser seletiva para as linhagens tumorais de pele (UACC-62, $GI_{50} = 22,57 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de rim (786-0, $GI_{50} = 23,33 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Os resultados, do ensaio das F_{OE} , apresentados como valores de TGI foram classificados segundo Fouche e colaboradores (2008), e circunstancial a esse critério de classificação e, de acordo com os valores de TGI obtidos (Tabela 24), foi possível descrever a atividade das amostras analisadas sobre cada linhagem. Dessa forma, a fração FA_{OE} apresentou uma atividade moderada sobre a linhagem tumoral de ovário (NCI-ADR/RES, TGI = $10,94 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de pele (UACC-62, TGI = $12,21 \mu\text{g mL}^{-1}$) e uma atividade fraca sobre a linhagem de leucemia (K-562, TGI = $15,64 \mu\text{g mL}^{-1}$), rim (786-0, TGI = $15,71 \mu\text{g mL}^{-1}$), queratinócito (HaCaT, TGI = $29,06 \mu\text{g mL}^{-1}$), mama (MCF-7, TGI = $37,74 \mu\text{g mL}^{-1}$) e próstata (PC-3, TGI = $42,11 \mu\text{g mL}^{-1}$). De maneira semelhante, as frações FC_{OE} e FI_{OE} apresentaram uma atividade fraca sobre as linhagens tumorais de rim (786-0, TGI = $46,09$ e

44,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e de próstata (PC-3, TGI = 47,10 e 42,49 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), enquanto a fração FJ_{OE} manteve a atividade para as linhagens tumorais de rim (786-0, TGI = 39,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e de próstata (PC-3, TGI = 46,91 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e passou a ser seletiva para pele (UACC-62, TGI = 36,84 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e cólon (HT-29, TGI = 46,88 $\mu\text{g mL}^{-1}$), da mesma forma que a fração FK_{OE} manteve a atividade para linhagem de pele (UACC-62, TGI = 25,82 $\mu\text{g mL}^{-1}$), a fração FH_{OE} apresentou atividade para as linhagens tumorais de leucemia (K-562, TGI = 32,30) e de rim (86-0, TGI = 34,84 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

A partir dos valores obtidos das concentrações efetivas GI₅₀ e TGI das F_{OE} (Tabelas 23 e 24, respectivamente), obteve-se a atividade antiproliferativa diferencial pelos valores de delta, segundo método comparativo (PAULL et al., 2013a) para enfatizar os efeitos diferenciais das amostras testadas em várias linhagens de células tumorais. O resultado referente à atividade antiproliferativa diferencial das frações do OE de folhas de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas está apresentado nas Tabelas 25 e 26, e representado pelas Figuras 29 e 30.

Tabela 25: Valores de delta, resultantes de um conjunto de valores da concentração efetiva GI₅₀, para estimar a atividade antiproliferativa diferencial das F_{OE} de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas.

Linhagem celular	Delta das frações do óleo essencial vegetal					
	FA _{OE}	FC _{OE}	FH _{OE}	FI _{OE}	FJ _{OE}	FK _{OE}
U251	-0,59	-0,26	-0,21	-0,10	-0,02	-0,39
UACC-62	1,21	-0,19	-0,17	-0,09	0,05	1,33
MCF-7	-0,19	-0,25	-0,18	-0,08	-0,02	-0,20
NCI/ADR-RES	0,38	0,48	-0,19	-0,03	0,00	-0,24
786-0	0,35	-0,23	0,67	-0,05	0,03	-0,24
NCI-H460	-0,59	-0,27	-0,21	-0,11	-0,03	-0,62
PC-3	-0,59	-0,21	-0,19	-0,03	0,00	-0,37
OVCAR-3	-0,59	-0,23	-0,20	-0,10	0,00	-0,52
HT29	-0,67	-0,27	-0,21	-0,11	0,00	-0,29
K-562	1,03	1,65	1,08	0,77	-0,02	1,82
HaCaT	0,24	-0,22	-0,18	-0,07	0,00	-0,26

Delta: $\Delta = M_{GI_{50}} - \log_{10}(GI_{50})$

Linhagens: U251 (glioma), UACC-62 (pele), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon), K-562 (leucemia), HaCaT (queratinócito).

Figura 29: Atividade antiproliferativa média gerada com os valores de delta, resultantes de um conjunto de valores da concentração efetiva GI₅₀, para estimar a atividade antiproliferativa diferencial das F_{OE} de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas.

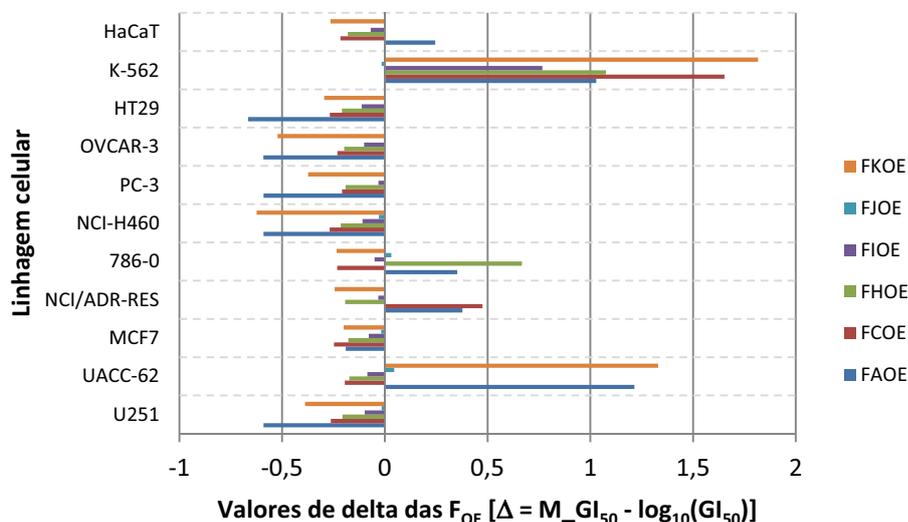


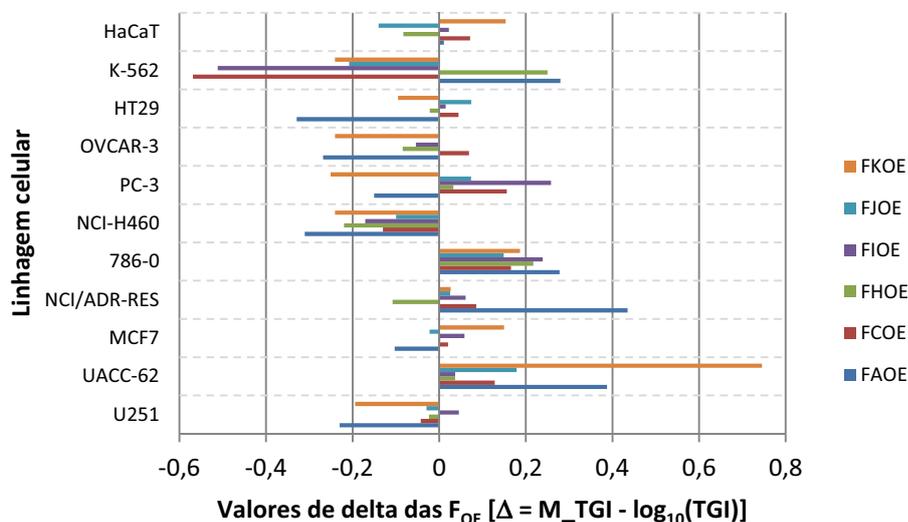
Tabela 26: Valores de delta, resultantes de um conjunto de valores da concentração efetiva TGI, para estimar a atividade antiproliferativa diferencial das F_{OE} de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas.

Linhagem celular	Delta das frações do óleo essencial vegetal					
	FA _{OE}	FC _{OE}	FH _{OE}	FI _{OE}	FJ _{OE}	FK _{OE}
U251	-0,23	-0,04	-0,02	0,05	-0,03	-0,19
UACC-62	0,39	0,13	0,04	0,04	0,18	0,75
MCF-7	-0,10	0,02	0,00	0,06	-0,02	0,15
NCI/ADR-RES	0,44	0,09	-0,11	0,06	0,03	0,03
786-0	0,28	0,17	0,22	0,24	0,15	0,19
NCI-H460	-0,31	-0,13	-0,22	-0,17	-0,10	-0,24
PC-3	-0,15	0,16	0,03	0,26	0,07	-0,25
OVCAR-3	-0,27	0,07	-0,08	-0,05	0,00	-0,24
HT29	-0,33	0,04	-0,02	0,01	0,07	-0,10
K-562	0,28	-0,57	0,25	-0,51	-0,21	-0,24
HaCaT	0,01	0,07	-0,08	0,02	-0,14	0,15

Delta: $\Delta = M_TGI - \log_{10}(TGI)$

Linhagens: U251 (glioma), UACC-62 (pele), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (côlon), K-562 (leucemia), HaCat (queratinocito).

Figura 30: Atividade antiproliferativa média gerada com os valores de delta, resultantes de um conjunto de valores da concentração efetiva TGI, para estimar a atividade antiproliferativa diferencial das F_{OE} de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas.



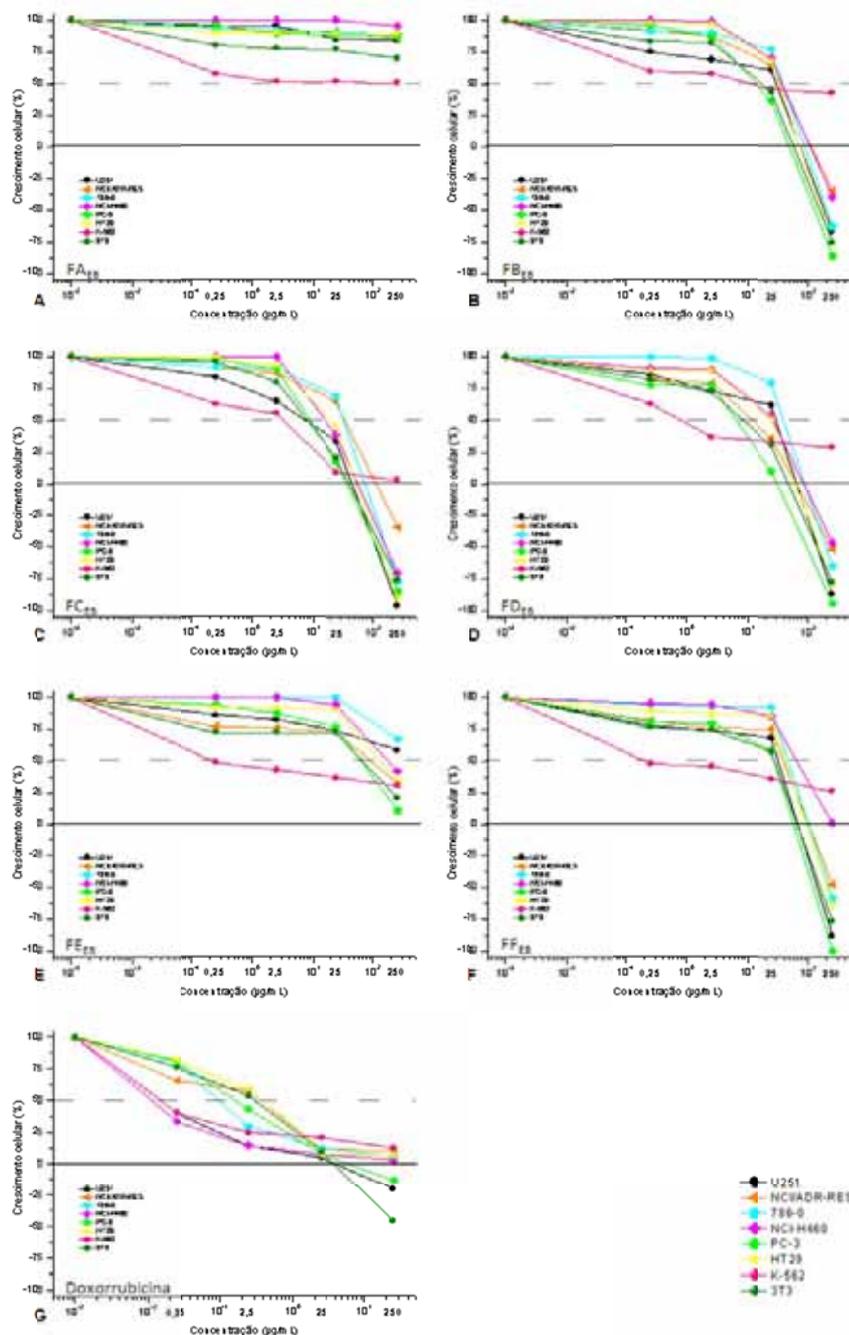
Conforme já mencionado, os valores de delta traçados representam a resposta média de todas as linhagens celulares testadas para a amostra em estudo, evidenciando dessa forma a sensibilidade celular.

A análise comparativa e interpretação dos dados apresentados (Figuras 29 e 30) para GI_{50} e TGI para as F_{OE} de folhas de *S. terebinthifolius* analisados, quanto a sensibilidade celular, corrobora com os resultados já descritos quanto à seletividade para as linhagens celulares tumorais de leucemia (K-562), pele (UACC-62), rim (786-O) e ovário (NCI-ADR/RES), além de evidenciar também uma sensibilidade moderada para linhagens de queratinócito (HaCaT), próstata (PC-3) e mama (MCF-7).

Os resultados das análises de bioprospecção das F_{OE} revelaram certas diferenças tanto para a seletividade das frações às linhagens tumorais testadas, quanto para a sensibilidade das linhagens responsivas a ação da amostra em estudo. Os resultados indicaram uma melhor atividade da fração FA_{OE} em relação às demais frações testadas, apresentando seletividade com atividade moderada sobre as linhagens tumorais de ovário (NCI-ADR/RES) e de pele (UACC-62) e uma atividade fraca sobre as linhagens de leucemia (K-562), rim (786-0), queratinócito (HaCaT), mama (MCF-7) e próstata (PC-3). A diferença na composição e concentração dos compostos presentes nas frações do OE pode explicar a diferença na efetividade das amostras frente às linhagens celulares testadas.

Os resultados referentes às atividades das frações do EBdS_{CPQBA} (F_{EB}) de folhas de *S. terebinthifolius*, evidenciando os perfis de seletividade das frações, estão representados na Figura 31, e seus valores de concentração efetiva correspondentes a GI₅₀ e TGI estão apresentados nas Tabelas 27 e 28, respectivamente.

Figura 31: Curvas concentração-resposta das frações do EBdS_{CPQBA} de *S. terebinthifolius*, para a avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*, pelo ensaio da sulforrodamina B, sobre as linhagens celulares, correlacionando a porcentagem de crescimento da célula à concentração do composto utilizado.



As curvas concentração-resposta em A, B, C, D, E, F e G correspondem às frações FA_{EB}, FB_{EB}, FC_{EB}, FD_{EB}, FE_{EB}, FF_{EB} e Doxorubicina (controle positivo), respectivamente.

Tabela 27: Valores da concentração efetiva GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) referente a atividade antiproliferativa *in vitro* das frações do EBdS_{CPQBA} de *S. terebinthifolius*, frente às linhagens tumorais e não-tumorais.

Linhagem celular	Frações do EBdS _{CPQBA} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	FA _{EB}	FB _{EB}	FC _{EB}	FD _{EB}	FE _{EB}	FF _{EB}
U251	> 250	26,41	4,93	26,53	> 250	27,40
NCI/ADR-RES	> 250	26,96	26,96	10,22	81,91	28,58
786-0	> 250	28,90	27,54	27,71	> 250	32,80
NCI-H460	> 250	27,67	24,42	25,47	196,38	47,81
PC-3	> 250	23,30	9,88	5,27	57,69	25,98
HT29	> 250	27,39	24,55	25,22	143,87	30,62
K-562	> 250	15,06	1,43	1,00	< 0,25	0,29
3T3	> 250	24,36	7,28	6,32	38,00	25,85
M_ GI_{50}	> 250	25,01	15,87	15,97	> 127,26	27,42

Linhagens: U251 (glioma), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT-29 (côlon), K-562 (leucemia), 3T3 (fibroblasto embrionário murino).

> 250: inativo.

M_ GI_{50} : média de GI_{50} .

Tabela 28: Valores da concentração efetiva TGI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) referente a atividade antiproliferativa *in vitro* das frações do EBdS_{CPQBA} de *S. terebinthifolius*, frente às linhagens tumorais e não-tumorais.

Linhagem celular	Frações do EBdS _{CPQBA} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	FA _{EB}	FB _{EB}	FC _{EB}	FD _{EB}	FE _{EB}	FF _{EB}
U251	> 250	70,75	38,08	56,84	> 250	59,86
NCI/ADR-RES	> 250	117,60	117,60	59,34	> 250	108,39
786-0	> 250	94,22	70,93	95,06	> 250	125,21
NCI-H460	> 250	117,70	52,19	86,25	> 250	> 250
PC-3	> 250	42,88	33,40	27,06	> 250	40,84
HT29	> 250	71,10	45,07	55,93	> 250	104,35
K-562	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
3T3	> 250	52,41	36,38	40,14	> 250	60,61
M_ TGI	> 250	> 102,08	> 80,46	> 83,83	> 250	> 124,91

Linhagens: U251 (glioma), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT-29 (côlon), K-562 (leucemia), 3T3 (fibroblasto embrionário murino).

> 250: inativo.

M_ TGI: média de TGI.

As F_{EB} avaliadas apresentaram certa atividade antiproliferativa em função da concentração sobre certas linhagens celulares testadas, e pela análise das curvas concentração-resposta das F_{EB} sobre as linhagens, relacionando a porcentagem de crescimento das células à concentração da amostra utilizada (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), apresentou-se o perfil de ação e a seletividade das frações.

Os resultados das quatro doses analisadas foram apresentados como valores de GI_{50} e TGI (Tabelas 27 e 28). De maneira geral, as frações FC_{EB} e FD_{EB} foram as mais ativas [valor médio de GI_{50} menor (M_ GI_{50} = 15,87 e 15,97 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente)]. De maneira semelhante, as frações FB_{EB} e FF_{EB} apresentaram uma atividade antiproliferativa moderada (M_ GI_{50} = 25,01 e 27,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Já a fração FE_{EB} apresentou uma

atividade média fraca ($M_{GI_{50}} = 127,26 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a FA_{EB} mostrou-se inativa ($M_{GI_{50}} < 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) às linhagens tumorais avaliadas. Assim como observado na CCD (Capítulo II, Figura 11.B), há uma diferença na composição química que pode explicar a diferença observada na atividade antiproliferativa média frente ao painel de células tumorais para as F_{OE} . Quando se analisa a atividade sobre cada linhagem, é possível verificar que as frações FB_{EB} , FC_{EB} , FD_{EB} , FE_{EB} e FF_{EB} , apesar da diferença química e de valores de GI_{50} , apresentaram seletividade semelhantes para as linhagens tumorais de próstata (PC-3, $GI_{50} = 23,30, 9,88, 5,27, 57,69$ e $25,98 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de leucemia (K-562, $GI_{50} = 15,06, 1,43, 1,00, < 0,25$ e $0,29 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e para a linhagem não tumoral de fibroblasto embrionário murinho (3T3, $GI_{50} = 24,36, 7,28, 6,32, 38,00$ e $25,85 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Já as frações FC_{EB} e FF_{EB} passaram a ser seletivas para a linhagem tumoral de glioma (U251, $GI_{50} = 4,93$ e $27,40 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e as frações FD_{EB} e FE_{EB} para a linhagem de ovário (NCI-ADR/RES, $GI_{50} = 10,22$ e $81,91 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Por fim, a fração FA_{EB} não apresentou nenhum perfil de ação e seletividade para nenhuma das linhagens avaliadas.

Os resultados, do ensaio das F_{EB} , apresentados como valores de TGI foram classificados segundo Fouche e colaboradores (2008), e circunstancial a esse critério de classificação e, de acordo com os valores de TGI obtidos (Tabela 28), foi possível descrever a atividade das amostras analisadas sobre cada linhagem. Dessa forma, a fração FC_{EB} apresentou uma atividade fraca sobre as linhagens tumorais de próstata (PC-3, TGI = $33,40 \mu\text{g mL}^{-1}$), glioma (U251, TGI = $38,08$) e cólon (HT-29, TGI = $45,07 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sobre a linhagem não tumoral de fibroblasto embrionário murinho (3T3, TGI = $36,38 \mu\text{g mL}^{-1}$). De maneira semelhante, as frações FB_{EB} , FD_{EB} e FF_{EB} apresentaram atividade fraca sobre a linhagem tumoral de próstata (PC-3, TGI = $42,88, 27,06$ e $40,84 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), e a FD_{EB} apresentou também, fraca atividade sobre a linhagem não tumoral de fibroblasto embrionário murinho (3T3, TGI = $40,14 \mu\text{g mL}^{-1}$). Por fim, as frações FA_{EB} e FE_{EB} foram consideradas inativas sobre as linhagens avaliadas.

A partir dos valores obtidos das concentrações efetivas GI_{50} e TGI das F_{EB} (Tabelas 27 e 28, respectivamente), obteve-se a atividade antiproliferativa diferencial pelos valores de delta, segundo método comparativo (PAULL et al., 2013a). O resultado referente à atividade antiproliferativa diferencial das frações do $EBdS_{CPQBA}$ de folhas de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas está apresentado nas Tabelas 29 e 30, e representado pelas Figuras 32 e 33.

Tabela 29: Valores de delta, resultantes de um conjunto de valores da concentração efetiva GI_{50} , para estimar a atividade antiproliferativa diferencial das F_{EB} de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas.

Linhagem celular	Delta das frações do $EBdS_{CPQBA}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	FA_{EB}	FB_{EB}	FC_{EB}	FD_{EB}	FE_{EB}	FF_{EB}
U251	IN	-0,03	0,35	-0,40	-0,66	-0,20
NCI/ADR-RES	IN	-0,04	-0,39	0,02	-0,18	-0,22
786-0	IN	-0,07	-0,40	-0,42	-0,66	-0,28
NCI-H460	IN	-0,05	-0,34	-0,38	-0,56	-0,45
PC-3	IN	0,02	0,05	0,30	-0,02	-0,18
HT29	IN	-0,05	-0,35	-0,38	-0,42	-0,25
K-562	IN	0,21	0,89	1,03	2,34	1,77
3T3	IN	0,00	0,18	0,23	0,16	-0,18

Delta: $\Delta = M_{GI_{50}} - \log_{10}(GI_{50})$

Linhagens: U251 (glioma), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT-29 (côlon), K-562 (leucemia), 3T3 (fibroblasto embrionário murino).

IN: inativo

Figura 32: Atividade antiproliferativa média gerada com os valores de delta, resultantes de um conjunto de valores da concentração efetiva GI_{50} , para estimar a atividade antiproliferativa diferencial das F_{EB} de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas.

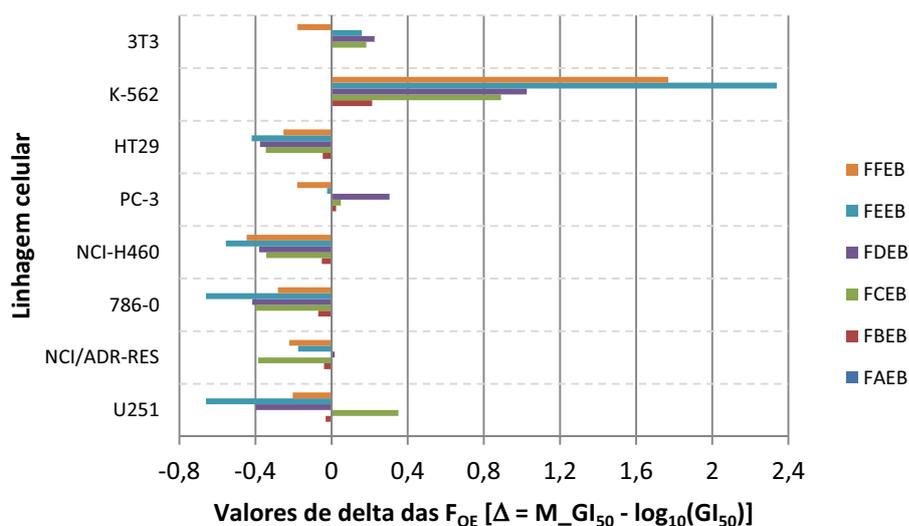


Tabela 30: Valores de delta, resultantes de um conjunto de valores da concentração efetiva TGI, para estimar a atividade antiproliferativa diferencial das F_{EB} de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas.

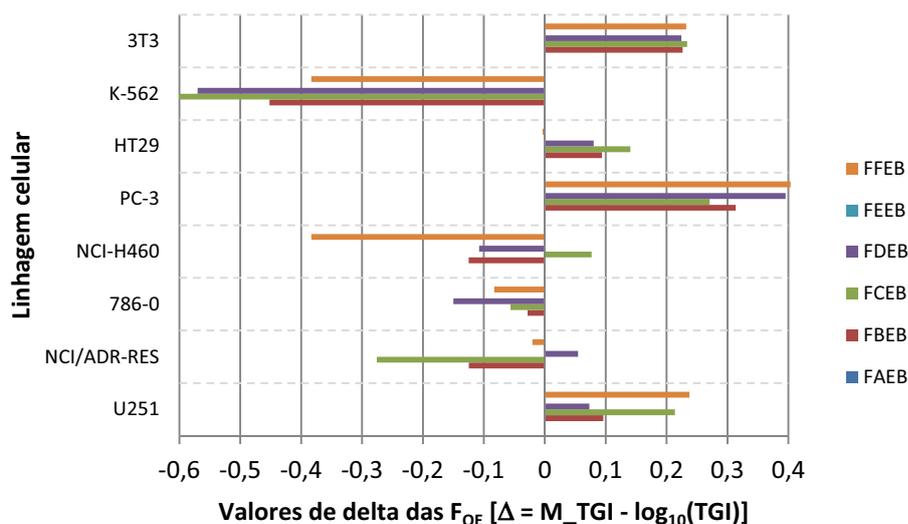
Linhagem celular	Delta das frações do EBdSCPQBA					
	FA_{EB}	FB_{EB}	FC_{EB}	FD_{EB}	FE_{EB}	FF_{EB}
U251	IN	0,10	0,21	0,07	IN	0,24
NCI/ADR-RES	IN	-0,12	-0,28	0,05	IN	-0,02
786-0	IN	-0,03	-0,06	-0,15	IN	-0,08
NCI-H460	IN	-0,12	0,08	-0,11	IN	-0,38
PC-3	IN	0,31	0,27	0,40	IN	0,40
HT29	IN	0,09	0,14	0,08	IN	0,00
K-562	IN	-0,45	-0,60	-0,57	IN	-0,38
3T3	IN	0,23	0,23	0,22	IN	0,23

Delta: $\Delta = M_TGI - \log_{10}(TGI)$

Linhagens: U251 (glioma), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT-29 (côlon), K-562 (leucemia), 3T3 (fibroblasto embrionário murino).

IN: inativo

Figura 33: Atividade antiproliferativa média gerada com os valores de delta, resultantes de um conjunto de valores da concentração efetiva TGI, para estimar a atividade antiproliferativa diferencial das F_{EB} de *S. terebinthifolius* frente às linhagens celulares testadas.



Conforme mencionado anteriormente, os valores de delta traçados representam a resposta média de todas as linhagens celulares testadas para a amostra em estudo, evidenciando dessa forma a sensibilidade celular.

A análise comparativa e interpretação dos dados apresentados (Figuras 32 e 33) para GI_{50} e TGI para as F_{EB} de folhas de *S. terebinthifolius* analisados, quanto a sensibilidade celular, corrobora com os resultados descritos quanto à seletividade para as linhagens celulares tumorais de leucemia (K-562), próstata (PC-3) e glioma (U251) e para a

linhagem não tumoral de fibroblasto embrionário murinho (3T3), além de evidenciar também uma sensibilidade moderada para a linhagem tumoral de cólon (HT-29) para TGI.

Os resultados das análises de bioprospecção das F_{EB} revelaram certas diferenças tanto para a seletividade das frações às linhagens tumorais testadas, quanto para a sensibilidade das linhagens responsivas a ação da amostra em estudo. Os resultados indicaram uma melhor atividade, embora classificada como atividade fraca, da fração FD_{EB} , com seletividade sobre a linhagem tumoral de próstata (PC-3). A diferença na composição e concentração dos compostos presentes nas frações do $EBdS_{CPQBA}$ pode explicar a diferença na efetividade das amostras frente às linhagens celulares testadas.

4. Conclusão

Os dados apresentados neste capítulo para a bioprospecção e avaliação do potencial quimioterapêutico das amostras vegetais avaliadas foram apresentados como valores de GI_{50} e TGI, valores estes que foram utilizados para comparar a potência das amostras e evidenciar sua seletividade.

Os resultados revelaram amostras que podem ser consideradas como possíveis candidatos a novos agentes com elevada seletividade para o câncer, apresentando de forma geral, uma melhor atividade dos extratos brutos em relação ao óleo essencial, obtidos de folhas de *S. terebinthifolius*.

A análise comparativa dos derivados vegetais de folhas de *S. terebinthifolius* evidenciaram os efeitos diferenciais das amostras testadas indicando a sensibilidade celular das linhagens tumorais de pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3) e rim (786-O), além de revelar uma sensibilidade moderada para linhagens de ovário (NCI-ADR/RES e OVCAR-3).

Em relação aos extratos, o EBdM_{UNESP} (Acesso 1) apresentou uma potente atividade antiproliferativa, com seletividade para a linhagem tumoral de próstata (PC-3) e uma atividade fraca sobre a linhagem de pulmão (NCI-H460). O EBdM_{UniPinhal} (Acesso 3) e o EBetS_{UNESP} (Acesso 1) apresentaram atividade moderada com seletividade para a linhagem tumoral de pulmão (NCI-H460), enquanto o EBetS_{UniPinhal} (Acesso 3) apresentou atividade semelhante para a linhagem de próstata (PC-3). Já o OE apresentou uma fraca atividade com seletividade para as linhagens tumorais de rim (786-0) e de ovário (NCI/ADR-RES).

O EBdS_{CPQBA} (Acesso 2) apesar de não ter sido o extrato mais ativo, apresentando uma atividade fraca com seletividade para a linhagem tumoral de próstata (PC-3), rim (786-0) e ovário (OVCAR-3), foi o extrato selecionado para prosseguimento dos estudos devido ao conjunto de caracteres avaliados nesse trabalho.

O estudo das frações do extrato EBdS_{CPQBA} e do OE, obtidos no processo de fracionamento, evidenciou diversas frações ativas.

A análise comparativa das frações evidenciou os efeitos diferenciais das amostras testadas indicando a sensibilidade celular das linhagens avaliadas. Assim, a análise comparativa das F_{OE} indicaram a sensibilidade celular das linhagens tumorais de leucemia (K-562), pele (UACC-62), rim (786-O) e ovário (NCI-ADR/RES), além de revelar uma sensibilidade moderada para linhagens de queratinócito (HaCat), próstata (PC-3) e mama (MCF-7). Já a análise das F_{EB} indicou sensibilidade celular das linhagens tumorais de leucemia (K-562), próstata (PC-3) e glioma (U251) e para a linhagem não tumoral de fibroblasto embrionário murinho (3T3), além de evidenciar também uma sensibilidade moderada para a linhagem tumoral de cólon (HT-29), em relação ao TGI.

Quanto a atividade, os dados apresentados para as F_{OE} revelaram melhor atividade para a fração FA_{OE} , que se destacou pela atividade antiproliferativa moderada com seletividade para a linhagem tumoral de ovário (NCI-ADR/RES) e de pele (UACC-62), além de evidenciar uma atividade fraca sobre as linhagens de leucemia (K-562), rim (786-0), queratinocito (HaCaT), mama (MCF-7) e próstata (PC-3). Já os dados apresentados para as F_{EB} revelaram melhor atividade, apesar de considerada como fraca, para as frações FC_{EB} e FD_{EB} , com seletividade semelhante para a linhagem tumoral de próstata (PC-3) e para a linhagem não tumoral de fibroblasto embrionário murinho (3T3), enquanto a FC_{EB} ainda apresentou seletividade para as linhagens de glioma (U251) e de cólon (HT-29).

Uma diferença na composição e concentração dos compostos presentes nos derivados vegetais pode explicar a diferença na efetividade das amostras frente às linhagens celulares testadas.

Os resultados obtidos demonstram o potencial de utilização das frações ativas como agentes quimioterápicos. Porém a atividade e seletividade sobre as células cancerosas observada nos modelos *in vitro* pode não refletir necessariamente numa atividade *in vivo*, o que sugere a continuidade desse trabalho, com objetivo de identificar os princípios ativos e comprovar o mecanismo de ação e a atividade *in vivo*. Recomenda-se o estudo combinado desses fatores (SMITH et al., 2005) indicados para uma conclusão mais fundamentada a respeito da atividade de novas substâncias com potencial anticâncer.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O interesse pelo estudo das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi surgiu primeiramente pelo fato de 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.

Os dados apresentados neste trabalho demonstraram que o perfil químico obtido de folhas de *S. terebinthifolius* induziu a atividade antimicrobiana e antiproliferativa *in vitro*. Estas descobertas sugerem que os derivados vegetais de aroeira podem ser uma fonte promissora de compostos ativos, com potencial para um futuro agente quimioterápico, para fins terapêuticos inovadores e/ou estratégias de prevenção de doenças, em particular contra micro-organismos e câncer. Diante desses dados, a droga vegetal originada de folhas de aroeira pode vir a ser utilizada como matéria-prima para o desenvolvimento e produção de produtos farmacêuticos, entretanto ela deve ser caracterizada e, cumprir todas as determinações regulatórias em relação a qualidade da matéria-prima, em conformidade com os requisitos legais.

Os resultados obtidos neste estudo podem ser considerados como ponto de partida para novas pesquisas para identificar especificamente os compostos responsáveis pelas atividades biológicas, sendo necessários outros estudos *in vitro* e *in vivo* para estabelecer mecanismos farmacológicos, toxicidade e viabilidade de produção. Podem orientar e subsidiar futuras investigações sobre o potencial da espécie *S. terebinthifolius* Raddi, e colaborar com estudos voltados para plantas medicinais e drogas vegetais, visando a obtenção e estudo de novos fitoterápicos.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 1313-1362.
- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 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. 416 p.
- ALMEIDA, V.L. de; LEITÃO A.; REINA, L. del C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28 (1), p. 118-129, 2005.
- AMOSTRAGEM. Métodos de análise de drogas vegetais. Métodos de farmacognosia. In: FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1, 196 p.
- 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/aroeria.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2009.
- AROEIRA. Monographias sobre as drogas vegetais e animais. In: PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Ed. Nacional, 1929. p. 100-101.
- 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. **Bol. 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. 205 p.
- BANDONI, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina: **Editorial de La Universidad Nacional de La Plata**, 2000. 417 p.
- BETINA, V. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. **J. Chromatogr. A.**, v. 78, p. 41-51, 1973.
- BIOTA/FAPESP Disponível em:<<http://www.biota.org.br/info/saopaulo/index>>. Acesso em: 17 jul. 2004.
- BOYD, M.R. Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screen. **Princ. & Practice of Oncol.**, v. 10, p. 1-12, 1989.
- BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.
- BRAGA, R.A. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960. 540 p.

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. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em: 22 set. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Leis, decretos, etc... Resolução nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 mar. 2010.

BROKER, L.E.; KRUYT, F.A.E.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n. 9, p. 3155-3162, 2005.

BUFAINO, E.M. Phytotherapy in Brazil: recovering the concepts. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 23, n. 1, p. 22-27, jan./feb. 2013.

BUSKUHL, H.; FREITAS, R.A.; DELLE MONACHE, F.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; CORILO, Y.E.; EBERLIN, M.N.; BIAVATTI, M.W. A new polyacetylene from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) and its *in vitro* antitumoral activity, **J. Brazil. Chem. Soc.**, v. 20, p. 1327-1333, 2009.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic Agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, M.C.R.D.; BARCA, F.N.T.V.; AGNEZ-LIMA, L.F.; MEDEIROS, S.R.B. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 42, n. 3, p. 185-191. 2003.

CAVALHER-MACHADO, S.C.; ROSAS, E.C.; BRITO, F. de A.; HERINGE, A.P.; OLIVEIRA, R.R. de; KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES, M. das G.M. de 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.

CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R. Flavonoids: prospective drug candidates, **Mini. Rev. Med. Chem.**, v. 8, p. 1429-1440, 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.

CHABNER, B.A.; ROBERTS JR, T.G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, 2005.

CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M7-A6. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. 6. ed. Pennsylvania: NCCLS, 2005.

CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A2. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. 2. ed. Pennsylvania: NCCLS, 2002.

CONSERVATION International. The biodiversity hotspots. Disponível em: <http://www.conservation.org/where/south_america/brazil/pages/brazil.aspx>. Acesso em: 22 set. 2013.

CORDELL, G.A. Biodiversity and drug discovery: a symbiotic relationship. **Pytochemistry**, v. 55, p. 463-480, 2000.

CORRÊA, A.P.R.; RODRIGUES, A.G.; BARBANO, D.B.A. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Ministério da Saúde, Secretária de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

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: 15 jul. 2013.

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. v. 3, p. 303, 308-309.

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

COX, P.A. The ethnobotanical approach to drug discovery: strenghs and limitation. In: CHADWICK, D.J.; MARSH, J. CIBA Foundation Symposium 185 - Ethnobotany and the search for new drugs. John Wiley & Sons, 1994. p. 25-41.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chem. Rev.**, v. 109, n. 7, p. 3012-3043, 2009.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 311-335, 2012.

CROMATOGRÁFIA em camada delgada. Métodos físicos e físico-químicos. In: FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1, 105 p.

CROMATOGRÁFIA em coluna. Métodos físicos e físico-químicos. In: FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1, 107 p.

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. 110 p.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* 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-químico. In: FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1, 92 p.

DETERMINAÇÃO da perda por dessecação. Métodos físicos e físico-químicos. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. 1, V.2.9 p.

DETERMINAÇÃO da perda por dessecação. Métodos físicos e físico-químico. In: FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1, 91 p.

DETERMINAÇÃO de água em drogas vegetais. Métodos de farmacognosia. In: FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1, 194 p.

DETERMINAÇÃO de cinzas insolúveis em ácido. Métodos de farmacognosia. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. 1, V.4.2.5 p.

DETERMINAÇÃO de cinzas insolúveis em ácido. Métodos de farmacognosia. In: FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1. 195 p.

DETERMINAÇÃO de cinzas totais. Métodos de farmacognosia. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. 1, V.4.2.4 p.

DETERMINAÇÃO de cinzas totais. Métodos de farmacognosia. In: FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1, 195 p.

DETERMINAÇÃO de substâncias extraíveis. Métodos de farmacognosia. In: FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1, 199 p.

DETERMINAÇÃO do pH. Métodos físicos e físico-químicos. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. 1, V.2.19 p.

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.1, X-1 p.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. New procedure for direct bioautographic TLC assay as applied to a tincture of *Ranunculus bulbosus*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 29, n. 3, p. 283-290, 1990.

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, n. 12, p. 5265-5270, 2009.

ESTEVES-SOUZA, A.; LUCIO, K.A.; CUNHA, A.S. da; CUNHA, P.A. da; SILVA LIMA, E.L.; CAMARA, C.A.; VARGAS, M.D.; GATTASS, C.R. Antitumoral activity of new polyamine-naphthoquinone conjugates, **Oncol. Rep.**, v. 20, p. 225-231, 2008.

EVANS, W.C. **Trease and Evans' pharmacognosy**, 15th ed. London: W.B. Saunders; 2002. 28 p.

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**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. da UFSC, 2010. p. 229-244.

FARAG, S.F. Polyphenolic compounds from the leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Bull. Pharm. Sci.**, Assiut University, v. 31, pt. 2, p. 319-329, 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. 38 p.

FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. 1, p. V.2.9., V.2.11., V.2.19., V.4.2.1., V.4.2.3., V.4.2.4., V.4.2.5.

FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1.

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

FOUCHE, G; CRAGG, G.M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J; SENABE, J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 119, p. 455-461, 2008.

GAZZANEO, 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.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 21, n. 2, p. 263-277, 2004.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N.P Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, F.S.; PROCÓPIO, T.F.; LIMA, T.A.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Isolation and antimicrobial activity of lectin from *Schinus terebinthifolius* leaves. **J. Biotechnol.**, Special Abstracts, 150S, p. S453, 2010.

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 un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Rev. Cubana Plant. Med.**, v. 5, p. 23-25, 2000.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, p.19-20, 894-901, 2008.

HAYASHI, T.; NAGAYAMA, K.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N.; FERRO, E.; BASUALDO, I.; BERGANZA, L.H. Pentagalloylglucose, a xanthine oxidase inhibitor from a *Paraguayan crude drug*, "Molle-i" (*Schinus terebinthifolius*). **J. Nat. Prod.**, v. 52, n. 1, p. 210-211, 1989.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E. M. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy.** London: Elsevier, 2007.

HOLBECK, S.L. Update on NCI in vitro drug screen utilities. **Eur. J. Cancer**, v. 40, p. 785-793, 2004.

HURTADO, I. Poisonous Anacardiaceae of South America. **Clinics in Dermatology**, v. 4 (2), p 183-190, 1986.

HUSSAIN, A.; ZIA, M.; MIRZA, B. Cytotoxic and antitumor potential of *Fagonia cretica* L. **Turk. J. Biol.**, v. 31, p. 19-24, 2007.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Câncer. Tratamento do câncer Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>>. Acesso em: 07 jan. 2013.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Quimioterapia. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101>. Acesso em: 02 jan. 2014.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P.; AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.; RAMAN, A. *In vitro* cytotoxic activity of that medicinal plants used traditionally to treat cancer. **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, p. 33-39, 2004.

JAIN, M.K.; YU, B.-Z.; ROGERS, J.M.; SMITH, A.E.; BOGER, E.T.A.; OSTRANDER R.L.; RHEINGOLD, A.L. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A₂ from berries of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 537-547, 1995.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M.G.; DONNICI, C.L. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, n. 4, p. 632-637. 2007.

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.

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.

KINGHORN, A. D.; CHIN, Y. W.; SWANSON, S. M.; STEVEN, M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.**, v. 12, n. 2, p. 189-96, 2009.

KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, p. 58-60, 2001.

LAMOUNIER, K.C.; CUNHA, L.C.S.; MORAIS, S.A.L.de; AQUINO, F.J.T.de; CHANG, R.; NASCIMENTO, E.A.do; SOUZA, M.G.M.de; MARTINS, C.H.G.; CUNHA, W.R. Chemical analysis and study of phenolics, antioxidant activity, and antibacterial effect of the wood and bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

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

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. 137-147, 2006.

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

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

LUCENA, P.L.H. de; FILHO, J.M.R.; MAZZA, M.; CZECZKO, N.G.; DIETZ, U.A.; NETO, M.A.C.; HENRIQUES, G.S.; SANTOS, O.J. dos; CESCHIN, Á.P.; THIELE, E.S. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 46, n. 21, supl. 2, 2006.

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,

LUND, B.M.; LYON, G.D. Detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *E. Herbicola* on thin-layer chromatograms. **J. Chromatogr. A.**, v. 110, n. 1, p. 193-196, 1975.

MACDONALD, F.; FORD, C.H.J. **Molecular biology of cancer**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000. p. 1-34.

MALIK, M.S.; MAHMUD, S.; SATTER, A. Studies on the essential oil of *Schinus terebinthifolius*. **Sci. Int.**, Lahore, v. 6, p. 351-352, 1994.

MANS, D.R.; ROCHA, A.B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **Oncologist**, v. 5, p. 185-98, 2000.

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

McCHESNEY, J.D.; VENKATARAMAN, S.K.; HENRI, J.T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.

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.

MESQUITA, M.L. de; PAULA, J.E. de; PESSOA, C.; MORAES, M.O. de; COSTA-LOTUFO, L.V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L.S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines, **J. Ethnopharmacol.**, v. 123, p. 439-445, 2009.

MINISTÉRIO da Saúde, 2006. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>>. Acesso em: 09 jul. 2013.

MINISTÉRIO da Saúde, 2009a. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS_2010.pdf>. Acesso em: 22 set. 2013.

MINISTÉRIO da Saúde, 2009b. Portaria nº 2.982, de 26 de novembro de 2009. Aprova as normas de execução e de financiamento da Assistência Farmacêutica na Atenção Básica. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2982_26_11_2009_rep.html>. Acesso em: 22 set. 2013.

MINISTÉRIO da Saúde, 2012a. Portaria nº 533, de 28 de março de 2012. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Diário Oficial da União. nº 62, 29 mar. 2012. Seção 1, p. 96. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/CONITECPORTARIAMS5332012.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2013.

MINISTÉRIO da Saúde, 2012b. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). Anexo I. Relação Nacional de Medicamentos do Componente Básico da Assistência Farmacêutica. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/CONITECANEXOSRENAME.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2013.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEKAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D. feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 83, p. 757-66, 1991.

MONTESANO, R; HALL, J. Environmental causes of human cancer. **Europ. J. of Cancer**, v. 37, p. 67-67, 2001.

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.

NAM, N.H.; PARANG, K. Current targets for anticancer drug discovery. **Curr. Drug Target**, v. 4, p. 159-79, 2003.

NCI. National Cancer Institute. Developmental therapeutics program NCI/NIH. Compare methodology. Disponível em: <http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare_methodology.html>. Acesso em: 12 jan. 2013.

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

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. 66 p.

PAULL, K.D.; HAMEL, E.; MALSPEIS, L. Methodology. DTP - COMPARE. In: National Cancer Institute. **Developmental therapeutics program NCI/NIH: screening**. Disponível em: <http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare_methodology.html>. Acesso em: 12 jul. 2013a.

PAULL, K.D.; HAMEL, E.; MALSPEIS, L. Prediction of biochemical mechanism of action from the in vitro antitumor screen of the National Cancer Institute. Introduction. DTP - COMPARE. In National Cancer Institute. **Developmental therapeutics program NCI/NIH: screening**. Disponível em: <http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare_intro.html>. Acesso em: 11 jul. 2013b.

PEREIRA, M.A.A.; FALCÃO, M.A.; MILÃO, D.; CASSEL, E. Avaliação da atividade antimicrobiana por bioautografia indireta dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* L. e *Rosmarinus officinalis* L. extraídos pelos métodos de arraste à vapor e extração por CO₂ supercrítico. In: IV MOSTRA DE PESQUISA DA PÓS-GRADUAÇÃO PUCRS, 2009. Disponível em: <http://www.pucrs.br/edipucrs/IVmostra/IV_MOSTRA_PDF/Engenharia_e_Tecnologia_de_Materiais/71993-MARCOS_AURELIO_ALMEIDA_PEREIRA.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2013.

PEZZUTO, J.M. Plant-derived anticancer agents. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, p. 121-133, 1997.

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

PILAN, P.C.P.; GONZALEZ, A.B.; BAGIO, B.; MUNARO, D.; AGOSTINI, F.; PAULETTI, G.F. Estudo do óleo de diferentes populações de aroeira vermelha. ENCONTRO DE JOVENS PESQUISADORES, 19., nov. 2011. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.

PIO CORRÊA, M.; **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. 1.

QUEIRES, L.C.S.; FAUVEL-LAFÈVE, F.; TERRY, S.; LA TAILLE, A. de; KOUYOUMDJIAN, J.C.; CHOPIN, D.K., VACHEROT, F.; RODRIGUES, L.E.A.; CRÉPIN, M. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. **Anticancer Res.**, v. 26, p. 379-388, 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.

QUEIROZ, EF.; ROBLOT, F.; LAPRÉVOTE, O; SERANI, L.; CAVÉ, A. HOCQUEMILLER, R. A new monothetrahydrofuran acetogenin from the roots of *Annona spinesces*. **Nat. Prod. Let.**, v. 13, p. 21, 1999.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Cancer chemotherapy, In: **Pharmacology**. 3. ed. New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 696-717.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon.**, v. 39, p. 603-613. 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.

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.

RICHTER, R.; REUß, S.H.v.; KÖNIG, W.A. Spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1371-1374, 2010.

ROCHA, G.G.; SIMOES, M.; LUCIO, K.A., OLIVEIRA, R.R.; COELHO KAPLAN, M.A.; GATTASS, C.R., Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, p. 7355-7360, 2007.

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. 42 p.

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

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

SANTANA, J.S.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H.G. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Quim. Nova**, v. 35, n. 11, p. 2245-2248, 2012.

- SANTOS, A.C.A. dos; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SANTOS, P.L. dos; SERAFINI, L.A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Rev. Bras. Biocienc.**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1011-1013, jul. 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. Pharmacogn.**, v. 19, n. 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.
- SAXENA, G.; FARMER, S.; TOWERS, G. H. N.; HANCOCK, R. E. W. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. **Phytochem. Anal.**, v. 6, n. 3, p. 125-129, 1995.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 1875-1883, 1991.
- 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.
- SCREENING services. *In vitro* testing. In: National Cancer Institute. **Developmental therapeutics program NCI/NIH: screening**. Disponível em: <<http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>>. Acesso em: 14 jul. 2013.
- SERVAT, L. Atividade antinociceptiva e anticâncer *in vitro* de microencapsulados produzidos com extrato bruto e vouacapanos obtidos das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. Piracicaba, 2010. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, 2010. 54 p.
- 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.
- SHOEMAKER, R.H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, p. 813-23, 2006.
- SILVA, D.B. da; TULLI, E.C.; MILITAO, G.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; ALBUQUERQUE, S.; SIQUEIRA, J.M. de, The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*, **Phytomedicine**, v. 16, p. 1059-1063, 2009.
- SINGH, A.K.; SINGH, L.; GUPTA, K.C.; BROPHY, J.J. Essential oil of leaves and inflorescence of *Schinus terebinthifolius*: an exotic plant of India. **J. Essent. Oil Res.**, v. 10, p. 697-699, 1998.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n. 13, p. 1107-1118, 1990.
- SLUSARENKO, A.J.; LONGLAND, A.C.; WHITEHEAD, I.M. Convenient, sensitive and rapid assay for antibacterial activity of phytoalexins. **Botan. Helvet.**, v. 99, n. 2, p. 203-207, 1989.
- SMITH, J.A.; NGO, H.; MARTIN, M.C.; WOLF, J.K. An evaluation of cytotoxicity of the taxane and platinum agents combination treatment in a panel of human ovarian carcinoma cell lines. **Gynecol. Oncol.**, v. 98, p. 141-145, 2005.
- 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. 224 p.

SPINDOLA, H.M.; CARVALHO, J.E. de; RUIZ, A.L.T.G.; RODRIGUES, R.A.F.; DENNY, C.; SOUSA, I.M. de O.; TAMASHIRO, J.Y.; FOGGIO, M.A. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* benth with selective *in vitro* anticancer activity for prostate cell line. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 20, n. 3, 2009.

STAHL, E.; KELLER, K.; BLINN, C. Cardanol, a skin irritant in ink pepper. **Planta Med.**, v. 48, p. 5-9, 1983.

STANIFORTH, J. Análise do tamanho de partícula. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005a. p. 164-165.

STANIFORTH, J. Redução de tamanho da partícula. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005b. p. 177-178.

SUGGIT, M.; BIBBY, M.C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, p. 971-981, 2005.

VAN VUUREN, S.F. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 119, n. 3, p. 462-472, 2008.

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.

VIVEIRO Ipê. Mudaz: Aroeira-pimenteira. Disponível em: <http://www.viveiroipe.com.br/wp-content/uploads/2012/05/Viveiro_ipe_aroeira_pimenteira_005.jpg>. Acesso em: 10 jun. 2013.

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. 320 p.

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.

ZÖLLNER, T.; SCHWARZ, M. Herbal reference standards: applications, definitions and regulatory requirements. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 23, n. 1, p. 1-21, jan./feb. 2013.

ZUCCHI, M.I. Variabilidade genética e química entre e dentro de populações de *Casearia sylvestris*. In: Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Cadeia de Produção de Aromáticas, Medicinais e Óleos Essenciais. Disponível em: <<http://www.apta.sp.gov.br/vercadeiapolo.php?id=12&Cadeia=Cadeia%20de%20Produ%E7%E3o%20de%20Arom%E1ticas,%20Medicinais%20e%20D3leos%20Essenciais>>. Acesso em: 22 set. 2013.