



RENORBIO
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

**Avaliação e caracterização de insumos bioativos
da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com potencial
econômico para o desenvolvimento tecnológico de bioprodutos**

Maria Diana Cerqueira Sales

Vitória- ES
2013

MARIA DIANA CERQUEIRA SALES

**AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INSUMOS BIOATIVOS
DA AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) COM POTENCIAL
ECONÔMICO PARA O DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE
BIOPRODUTOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.
Orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura

Vitória- ES

2013

- S163a Sales, Maria Diana Cerqueira,
Avaliação e caracterização de insumos bioativos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com potencial econômico para o desenvolvimento tecnológico de bioprodutos / Maria Diana Cerqueira Sales. – Vitória, 2013.
134f. : il.
- Orientador: José Aires Ventura.
Coorientadora: Patrícia Machado Bueno Fernandes.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Vitória, 2013.
Ponto focal no Espírito Santo- Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.
Inclui referências e apêndice (s).
1. Tinturas vegetais e óleos essenciais. 2. Antioxidantes. 3. Fungicidas. 4. Plantas medicinais. 5. *Fusarium guttiforme*. 6. *Chalara paradoxa*. I. Ventura, José Aires, 1954-. II. Fernandes, Patricia Machado Bueno. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



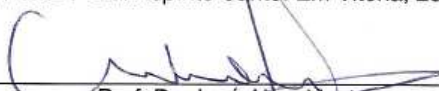
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

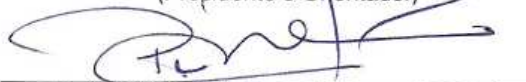
Universidade Federal do Espírito Santo

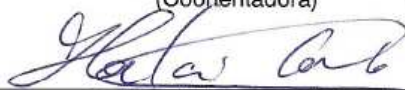
Av. Marechal Campos - Telefone: (027)3335-7447 - E-mail: renorbio@uece.br

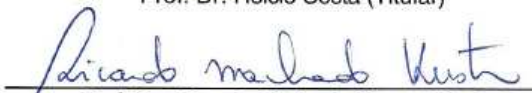
ATA – DEFESA DE TESE

Ata de Defesa de Tese de Doutorado da aluna Maria Diana Cerqueira Sales. Ao vigésimo dia do mês de Junho do ano de dois mil e treze, às 13h30 horas, reuniu-se a banca de Defesa de Tese composta pelos Professores Doutores José Aires Ventura, da Universidade Federal do Espírito Santo, como Presidente, e Patricia Machado Bueno Fernandes como Coorientadora, da Universidade Federal do Espírito Santo, Hércio Costa, do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper, como Titular, Ricardo Machado Kuster, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como Titular, Débora Dummer Meira, do Centro Universitário Norte do Espírito Santo, como Titular, Hildegardo Seibert França, do Instituto Federal do Espírito Santo, como Titular, perante a qual **Maria Diana Cerqueira Sales**, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal do Espírito Santo, defendeu, para preenchimento do requisito de doutor, sua Tese intitulada **“Avaliação e Caracterização de Insumos Bioativos da Aroeira (*Schinus Terebinthifolius Raddi*) com Potencial Econômico para o Desenvolvimento Tecnológico de Bioprodutos”**. A defesa da referida tese ocorreu, das 14:00 às 16:15 hs, tendo a doutoranda sido submetida à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a doutoranda APROVADA por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito SATISFATORIO. Eu, José Aires Ventura que presidi a Banca de Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Registre-se que esta é a décima Defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Espírito Santo. Em Vitória, 20 de junho de 2013.

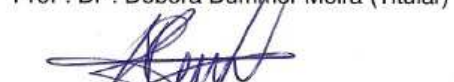

 Prof. Dr. José Aires Ventura
 (Presidente e Orientador)


 Prof.ª Dr.ª Patricia Machado Bueno Fernandes
 (Coorientadora)


 Prof. Dr. Hércio Costa (Titular)


 Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster (Titular)


 Prof.ª Dr.ª Débora Dummer Meira (Titular)


 Prof. Dr. Hildegardo Seibert França (Titular)

*Dedico este trabalho à minha família querida,
Jorge, Marina, Rodrigo, Carolina, Rilson e o
amado Leonardo...*

*... essência da minha vida, pelo amor
incondicional que eu sinto por vocês.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em todos os momentos.

À minha família, Jorge, Marina, Rodrigo, Carolina e sua querida família, Rilson e o amado, Leonardo e ao Tarcísio, pelo apoio e carinho nesta caminhada.

À minha querida mãe, Dorly e aos meus irmãos (Daniel e Dênys e familiares) pelo apoio e carinho recebido por todos estes anos. Dote, saiba que fiz a tese seguindo os seus passos... E à família de Jorge, pela consideração e carinho.

Ao professor José Aires Ventura, pela oportunidade de trabalhar com um profissional de alto gabarito, e que mesmo assim não esquece o verdadeiro sentido da pesquisa, trabalhar para a melhoria da qualidade de vida e do sistema em que vivemos!

À profa. Patrícia M. B. Fernandes, por acreditar no trabalho com plantas medicinais e permitir que o desenvolvêssemos no Laboratório de Biotecnologia da UFES, enriquecendo nossos conhecimentos e compartilhando ideias. Desta forma, também agradeço o prof. Alberto, pela atenção, por sua forma de gestão moderna e dinâmica.

Aos professores convidados, Patricia Fernandes, Hécio Costa, Ricardo Machado Kuster, Débora Meira Dummer, Hildegardo S. França, pelas valiosas reflexões críticas e sugestões ao trabalho. Em especial ao profs. Ricardo, pela gentileza e atenção ao realizar as análises de identificação dos metabólitos na UFRJ e à profa. Débora, pela disponibilidade e parceria na realização dos experimentos de avaliação da atividade antioxidante. Ao prof. Hildegardo, amigo e parceiro nas pesquisas, o agradecimento pela atenção aos nossos alunos e ao nosso trabalho e ao Dr. Hécio, pelo zelo ao revisar nosso trabalho.

A profa. Maria do Carmo Batitucci, a amiga Fabiana Ruas e aos alunos de Iniciação científica, Isabel Cristina, Eliza, Érica Santana, Malu e Mary, que tornaram possível a realização deste trabalho e acompanharam nosso trajeto.

Como não quero deixar ninguém de fora, aproveito e agradeço aos queridos amigos que, direta ou indiretamente, estiveram comigo durante a minha caminhada, no doutorado... desde 2009! Saibam que eu aproveitei cada momento

Às agências de fomento, FAPES, CNPq, ao Incaper, e instituições de ensino, UFES, EMESCAM e UNIVIX, pelo apoio na realização da pesquisa com plantas medicinais.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado...”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

SALES, M.D.C. Avaliação e caracterização de insumos bioativos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com potencial econômico para o desenvolvimento tecnológico de bioprodutos. 2013. 134f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo.

A aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é uma espécie de importância agroindustrial, devido à sua aplicação nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica. Considerando exigências da sociedade por produtos de qualidade, buscou-se, neste trabalho, identificar e avaliar insumos bioativos, quais sejam, tinturas-mãe (TM), extratos (EXT) e óleos essenciais (OE), obtidos a partir de folhas e frutos de genótipos da aroeira.

As TM foram obtidas de folhas de plantas hermafroditas (TMArFH), femininas (TMArFF), e masculinas (TMArFM) e de frutos, de plantas hermafroditas (TMArFrH) e de duas amostras de plantas femininas (TMArFrF1 e TMArFrF2). Foram preparados a partir do extrato vegetal (com adição de adjuvante natural) por maceração. Nos OE, obtidos de folhas (F01 A F04) e frutos (FR01 a FR07), foi utilizado o processo da hidrodestilação.

Foram realizadas análises físico-químicas das amostras de TM e para a identificação dos constituintes químicos, foram usadas as técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia de fase gasosa (CG) e acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). A atividade antioxidante das TM foi determinada pelo método do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e a avaliação da eficiência antifúngica realizada pelo método de difusão em ágar, para os fungos, *Fusarium guttiforme* e *Chalara paradoxa*, patógenos do abacaxizeiro.

As análises físico-químicas, apresentaram valores médios, de resíduo seco ($1,41\% \pm 0,13$), teor alcóolico ($67\% \pm 0,78$), pH ($5,6 \pm 0,78$) e densidade ($0,898\text{g.mL}^{-1} \pm 0,98$), dentro das especificações técnicas, indicando qualidade no processo de obtenção da TM. Os cromatogramas de frutos mostraram a presença de grupos fenólicos, com destaque, para o isolamento de dois importantes biflavonóides, agathisflavona e tetrahydroamentoflavona. Houve predominância monoterpênica, e a amostra FR01, apresentou o maior percentual de limoneno ($36,85\%$), que representou o maior teor relativo ($70,85\%$). Em relação à atividade antioxidante, a TMArFH ($250 \mu\text{g/ml}$) apresentou melhor disponibilidade para a captação do DPPH ($59,09\% \pm 0,004$). A TMArFH apresentou, juntamente com o fungicida tebuconazole a $0,1\%$, forte inibição do crescimento micelial, para *F. guttiforme* (PI = 82%) e eficiência antifúngica para *C. paradoxa* (PI= $42,86\%$). Pela primeira vez folhas e frutos da espécie *S.*

terebinthifolius, foram utilizados para obtenção de TM e constituem uma potencial matéria prima para o desenvolvimento de bioprodutos com atividade fungicida para o controle de fitopatógenos.

Palavras-chave: Tintura mãe; óleos essenciais; antioxidante; *Fusarium guttiforme*; *Chalara paradoxa*.

ABSTRACT

SALES, M.D.C. Evaluation and characterization of bioactive inputs of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) with economic potential for the technological development of bioproducts. 2013. 134f. Thesis (Doctoral in Biotechnology) - Post graduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) is an important plant mainly due its industrial application in the food industry, cosmetics and pharmaceuticals. Since society has been exigent to choice qualified products, in this work we aimed identification and evaluation of bioactive products, such as mother tinctures (MT), extracts (Eb) and essential oils (EO) from leaves and fruits of aroeira genotypes. The TM were obtained from the leaves of plants hermaphrodite (TMArFH), female (TMArFF), and male (TMArFM) and fruits from hermaphrodite plants (TMArFrH) and two samples of female plants (and TMArFrF1 TMArFrF2), were prepared from the plant extract (with natural adjuvant) by maceration. OE from leaves (F01-F04) and fruits (the FR01-FR07), were obtained from the hydrodistillation.

Analytical methods were used to perform physic-chemical analyses of MT and chemistry compounds identification were carried out by thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC) and gas chromatography-Mass spectrometry (GC/MS). The antioxidant activity of the different MT was evaluated using the stable free radical DPPH (1, 1- diphenyl-2-picryl-hydrazyl) method and, evaluation of antifungal efficiency of TM was performed by the agar diffusion method, for the fungi *Fusarium guttiforme* and *Chalara paradoxa*, pineapple pathogens.

The physico-chemical analysis showed average values of dry residue ($1.41 \pm 0.13\%$), alcohol content ($67\% \pm 0.78$), pH (5.6 ± 0.78) and density ($0.898 \text{ g. mL}^{-1} \pm 0.98$), within the technical specifications, indicating quality in the process and specifications to obtaining the TM. The chromatograms showed the presence of phenolic groups, especially, isolation of two important biflavonoids, agathisflavona and tetrahydroamentoflavona. Monoterpenes predominated, and the sample FR01, had the highest percentage of limonene (36.85%), which represented the highest relative content (70.85%). Regarding the antioxidant activity (AA), the TMArFH (250 $\mu\text{g/mL}$), showed better availability for uptake of DPPH (AA= 59.09%). In the antifungal test both TMArFH as tebuconazole fungicide at 0.1%, showed strong inhibition of the mycelial growth for *F. guttiforme* (PI= 82%) and a significant efficiency for *C. paradoxa* (PI= 42. 86%). This is the first report with the use of MT from leaves and fruits of *S. terebinthifolius* with potential feedstock for the development of bioproducts with fungicidal activity for control plant pathogens.

Key-words: Mother tincture; Essential oil; antioxidant; *Fusarium guttiforme*; *Chalara paradoxa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotografia de um exemplar de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi, da região de Pedro Canário, ES: a) arvoredo e b) detalhe das folhas e flores.....	27
Figura 2 -	Frutos maduros da espécie <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	28
Figura 3 -	Esquema básico do ciclo biossintético dos metabólitos secundários em espécies vegetais	29
Figura 4 -	Estruturas químicas básicas do núcleo flavan e do núcleo 4-oxo-flavonóide.....	31
Figura 5 -	Substâncias isoladas das folhas de <i>S. terebinthifolius</i> Raddi....	32
Figura 6 -	Estruturas químicas: apigenina (a) e naringina (b).....	33
Figura 7 -	Biflavonóide com acoplamento C-O-C (hidrohinoquiflavona)....	34
Figura 8 -	Estruturas químicas básicas dos taninos hidrolisáveis.....	35
Figura 9 -	Estrutura química da Epigallocatequina.....	36
Figura 10-	Formação cabeça- cauda dos esqueletos carbonados dos compostos mono- e sesquiterpenóides, constituintes majoritários dos óleos essenciais.....	37
Figura 11-	Componentes do óleo essencial de <i>S. terebinthifolius</i> : cardanol, α -felandreno, β - felandreno e δ -careno.....	38
Figura 12-	Aparelhos utilizados para extração de óleos (à quente): a) Soxhlet: compreende balão de fundo redondo, conectado ao extrator Soxhlet e condensador de refluxo e b) Clevenger: arraste por vapor d'água (hidrodestilação).....	40
Figura 13-	Extração por maceração: a) Coleta da TM, 15 dias após extração em recipiente fechado e b) filtração da solução extraída antes da estocagem em vidro âmbar.....	41
Figura 14-	Extração por percolação: a) coleta por gotejamento de TM extraída por percolação (8gts/min) e b) repouso por 48hs para armazenamento em vidro âmbar.....	43
Figura 15-	Cromatograma obtido em CLAE da Tintura-mãe de folha da planta hermafrodita (TMArFH), utilizando coluna C18 e sistema gradiente (0-100% de água: acetonitrila).....	80

Figura 16-	Cromatograma obtido em CLAE da Tintura-mãe de fruto da planta hermafrodita (TMArFH) da espécie <i>S terebinthifolius</i> , utilizando coluna C18 e sistema gradiente (0-100% de água: acetona).....	81
Figura 17-	Cromatograma obtido em CLAE/HPLC do Extrato bruto do fruto da espécie <i>S terebinthifolius</i> , utilizando coluna C18 e sistema gradiente (0-100% de água/ácido fórmico (0,05%): metanol).....	83
Figura 18-	Cromatograma obtido em CLAE/HPLC do Extrato bruto do fruto da espécie <i>S terebinthifolius</i> , utilizando coluna C18 e sistema gradiente (0-100% de água/ácido fórmico (0,05%): metanol).....	84
Figura 19-	Espectro UV do pico com tempo de retenção de 26,52 minutos.....	85
Figura 20-	Agathisflavona representando a classe de biflavonoides com acoplamento do tipo 6-8".....	85
Figura 21-	Estrutura da (2S 2"S)-2,3,2",3" – tetrahydroamentoflavona.....	86
Figura 22-	Concentração relativa total de monoterpenos em óleos essenciais (OE) obtidos de frutos (FR01 a FR07) e folhas (F01 a F04) de diferentes genótipos de <i>Schinus terebinthifolius</i>	90
Figura 23-	Estruturas monoterpênicas presentes em óleos essenciais de frutos e folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	93
Figura 24-	Estrutura do DPPH e reação antioxidante (indicando a capacidade sequestradora de radical livre).....	102
Figura 25-	Porcentagem de atividade antioxidante de tinturas-mães (TM) da espécie <i>S. terebinthifolius</i> de TMGb: TM <i>Ginkgo biloba</i> ; TMArFH: Tintura-mãe da Aroeira folha (planta hermafrodita); TMArFF: TM Aroeira folha (planta fêmea); TMArFM: TM Aroeira folha (planta macho); TMArFrH: TM Aroeira fruto (planta hermafrodita); TMArFrF ₁ : TM Fr fêmea-1; TMArFrF ₂ : TM Fr fêmea-2.....	104
Figura 26-	Avaliação da atividade fungicida das tinturas-mãe a partir das folhas, da planta hermafrodita (TMArFH), fêmea (TMArFF), e macho (TMArFM) e obtidas dos frutos, da planta hermafrodita (TMArFrH) e de duas amostras da planta fêmea (TMArFrF1 e TMArFrF2) para os fungos, <i>F. guttiforme</i> <i>C. paradoxa</i> ,	

determinada pelo halo de inibição no método de difusão em meio de cultura. TEBU= fungicida tebuconazole a 0,1%; TEST = Testemunha: sol. EtOH 70% (v/v)..... 112

Figura 27- Eficiência antifúngica de TM obtida de folhas (TMArFH) e frutos (TMArFrH) da planta hermafrodita da espécie *S. terebinthifolius*, sobre o crescimento micelial *in vitro* dos fungos: *F. guttiforme* (Fgt) (A - D) e *C. paradoxa* (Cpa) (E - H), comparados ao controle positivo (TEBU), fungicida tebuconazole a 0,1% (C e G) à testemunha, (TEST), sol. EtOH 70% (D e H)..... 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Principais características dos solventes utilizados na extração de drogas vegetais.....	44
Tabela 2-	Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários, através de um sistema de cromatografia para TM's de folhas e frutos de <i>S. terebinthifolius</i> Raddi (aroeira).....	63
Tabela 3-	Sistema de gradiente da fase móvel do cromatograma realizado para TMArFH e TMArFrH.....	65
Tabela 4-	Determinação de Resíduo sólido (R. sol. (%), Teor EtOH (%) e Vol.TM (mL) final a partir de amostras de droga vegetal (DV) de <i>S. terebinthifolius</i> (aroeira).....	68
Tabela 5-	Resultados das análises físico-químicas de tinturas-mãe (TM) preparadas a partir de folhas e frutos da espécie <i>S. terebinthifolius</i> Raddi (aroeira).....	71
Tabela 6-	Determinação do perfil cromatográfico por CCD, para ácido gálico/catequinas, de tinturas-mãe (TM) preparadas a partir de folhas da espécie <i>S. terebinthifolius</i>	73
Tabela 7-	Determinação do perfil cromatográfico por CCD, para saponinas, de tinturas-mãe (TM) preparadas a partir de folhas da espécie <i>S. terebinthifolius</i>	74
Tabela 8-	Determinação do perfil cromatográfico por CCD, para terpenos, de tinturas-mãe (TM) preparadas a partir de folhas da espécie <i>S. terebinthifolius</i>	75
Tabela 9-	Determinação do perfil cromatográfico por CCD, para flavonóides, de tinturas-mãe (TM) preparadas a partir de folhas da espécie <i>S. terebinthifolius</i>	76
Tabela 10-	Determinação do perfil cromatográfico por CCD, de tinturas-mãe (TM) preparadas a partir de frutos da espécie <i>S. terebinthifolius</i> Raddi (aroeira).....	77
Tabela 11-	Classes do grupo dos flavonoides e colorações apresentadas pelas zonas cromatográficas.....	78
Tabela 12-	Concentração relativa (%) dos principais monoterpenos identificados pela análise do OE de <i>Schinus terebinthifolius</i> ,	

	por Cromatografia em fase gasosa acoplada à	92
	Espectrometria de Massas (CG/EM).....	
Tabela 13-	Valores da solução DPPH ¹ e etanol (EtOH)	99
Tabela 14-	Atividade antioxidante (%) de TM de folhas e frutos da espécie <i>S. terebinthifolius</i> , obtida pelo método do radical estável DPPH [*] , definida pelas médias e desvio padrão.....	103
Tabela 15-	Atividade antifúngica de TM de folhas e frutos da espécie <i>S. terebinthifolius</i> , para os fungos <i>F. guttiforme</i> e <i>C. paradoxa</i> , pelo método de difusão em ágar, com orifício.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	(2,2') azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BDA	Agar Dextrose Batata
BHA	Butil- hidroxí- anisol
BHT	Butil- hidroxí- tolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG	Cromatografia em fase Gasosa
CG/EM	Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas
DPPH	(1,1) difenil-2-picril-hidrazil
E-203	Número de acesso de <i>Fusarium guttiforme</i> (sin.: <i>F. subglutinans</i> f. sp. <i>ananas</i>) na coleção micológica do Incaper.
E- 411	Número de acesso do <i>Chalara paradoxa</i> na coleção micológica do Incaper.
Eb	Extrato bruto etanólico
EtOH	Etanol
FRAP	<i>Ferric Reducing/Antioxidant Power</i>
FRAR	Amostra Óleo essencial a partir do fruto da aroeira
FAR	Amostra Óleo essencial a partir da folha da aroeira
GPS	<i>Global Positioning System</i>
KI	Índice de Kovacs
NPA	<i>Natural Products Association</i>
OE	Óleo essencial
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacit</i>
PEG 4000	Polietilenoglicol 4000
PNPM	Política Nacional de Plantas medicinais
PNPMF	Programa Nacional de Plantas medicinais de Fitoterápicas
PN	Produto Natural: -2- aminoetil- difenil- borinato
RENAFITO	Relação Nacional de Fitoterápicos
R. sol.	Resíduo sólido

R.S	Resíduo seco (%p/p)
STTM	Solução Teste de Tintura Mãe
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substance</i>
TBHQ	Butil-hidroxi-quinonas
TM	Tintura- mãe
TMArFH	TM Aroeira Folha planta Hermafrodita
TMArFF	TM Aroeira Folha planta Fêmea
TMArFM	TM Aroeira Folha planta Macho
TMArFrH	TM Aroeira Fruto planta Hermafrodita
TMArFF1	TM Aroeira Fruto planta Fêmea 1
TMArFF2	TM Aroeira Fruto planta Fêmea 2
TMGb	TM Ginkgo biloba
TOSC	<i>Total Oxyradical Scavenging Capacity</i>
TRAP	<i>Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter</i>
α	Alfa
β	Beta
D ou Δ	Delta
t	tempo de retenção
p/p	Ponderal/ponderal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	25
2.2 AROEIRA (<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi).....	26
2.2.1 Estudos fitoquímicos	28
2.2.2 Compostos fenólicos	30
2.2.2.1 Flavonóides	31
2.2.2.2 Biflavonóides	34
2.2.2.3 Taninos	35
2.2.3 Terpenóides	37
2.3 OBTENÇÃO DE INSUMOS BIOATIVOS- TINTURA- MÃE (TM) e ÓLEOS.....	38
2.3.1 Extração a quente em sistemas fechados	39
2.3.1.1 Soxhlet	39
2.3.1.2 Clevenger: arraste por vapor d'água	40
2.3.2 Extrações a frio	41
2.3.2.1 Maceração.....	41
2.3.2.2 Percolação.....	42
2.3.3 Características dos solventes utilizados na extração	44
2.4 CARACTERIZAÇÃO DE INSUMOS BIOATIVOS DE INTERESSE	45
2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	47
2.5.1 Antioxidantes sintéticos	48
2.5.2 Antioxidantes naturais	48

2.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	50
2.6.1 Extratos vegetais com atividade antimicrobiana	50
2.6.2 Triagem <i>in vitro</i> de insumos bioativos, com atividade antifúngica	53
2.6.2.1 Métodos de avaliação da atividade antifúngica.....	53
3. OBJETIVOS.....	56
3.1 OBJETIVO GERAL.....	56
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
4 CAPÍTULO 1	
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E FITOQUÍMICA DE INSUMOS BIOATIVOS FITOTERÁPICOS DA AROEIRA (<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi).....	58
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1.1 Material vegetal.....	58
4.1.1.1 Tratamento prévio da droga vegetal.....	59
4.1.1.2 Determinação do resíduo sólido (R.sol.) do vegetal fresco.....	59
4.1.1.3 Determinação do teor líquido extrator (EtOH).....	59
4.1.2 Extração.....	60
4.1.2.1 Preparação de Tintura-mãe (TM) e obtenção de insumos bioativos .	60
4.2.2.1.1 Preparação da Solução Teste de Tintura Mãe (STTM).....	60
4.1.2.2 Preparação de Extrato bruto e obtenção de insumos bioativos.....	60
4.1.2 Determinações físicas e físico-químicas da TM	61
4.1.3.1 Avaliação qualitativa da Cor e aspecto da Tintura-mãe.....	61
4.1.3.2 Determinação do Resíduo seco (R.S.).....	61
4.1.3.3 Determinação do título etanólico da Tintura-mãe.....	62
4.1.3.4 Determinação do pH.....	62

4.1.3.5 Determinação da Densidade	62
4.1.4 Determinação do perfil cromatográfico.....	63
4.1.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	63
4.1.4.2 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC).....	64
4.1.4.2.1 Identificação de constituintes químicos em insumos ativos: TM folhas e frutos <i>S. terebinthifolius</i>	64
4.1.4.2.2 Identificação de constituintes químicos em insumos ativos: EbAr de folhas e frutos <i>S. terebinthifolius</i>	65
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.2.1 Obtenção de Insumos Bioativos: Tinturas- Mãe (TMs) a partir de folhas e frutos de genótipos de <i>S. terebinthifolius</i> Raddi	66
4.2.1.1 Tratamento prévio da droga vegetal.....	66
4.2.1.2 Obtenção de Tinturas-mãe (TM) de <i>S. terebinthifolius</i>	67
4.2.1.3 Preparação da Solução Teste de Tinturas-mãe (STTM)	70
4.2.2 Realização de análises físico-químicas de TM	70
4.2.3 Determinação do perfil cromatográfico para <i>S. terebinthifolius</i>....	72
4.2.3.1 Perfil por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de classes metabólicas presentes na TM.....	72
4.2.3.2 Perfil por CLAE e identificação de constituintes químicos em TM de <i>S. terebinthifolius</i>	79
4.2.3.3 Perfil por CLAE e identificação de constituintes químicos em extratos (EXT) de <i>S. terebinthifolius</i>	83
 5 CAPITULO 2	
CONSTITUENTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE AROEIRA (<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi).....	88
5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	88
5.1.1 Material vegetal.....	88
5.1.2 Obtenção do óleo essencial (OE) a partir de frutos e folhas	88

5.1.3 Identificação dos constituintes químicos do OE	89
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
5.2.1 Obtenção e identificação dos constituintes químicos do Insumo OE da espécie <i>S. terebinthifolius</i>	90
 6 CAPÍTULO 3	
AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i>, DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA TINTURA- MÃE (TM) DE DIFERENTES GENÓTIPOS DA ESPÉCIE DA AROEIRA (<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi)	98
6.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	98
6.1.1 Material vegetal	98
6.1.1.1 Preparação de Tintura-mãe (TM) e obtenção de insumos bioativos	98
6.1.1.2 Preparação da Solução Teste de Tintura Mãe (STTM)	98
6.1.2 Avaliação, <i>in vitro</i>, da atividade antioxidante, pelo método do DPPH.....	99
6.1.2.1 Solução de DPPH 0,3 mM	99
6.1.2.2 Determinação da curva do DPPH	99
6.1.2.3 Avaliação da atividade antioxidante.....	100
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101
6.2.1 Determinação da curva de calibração do DPPH	101
6.2.2 Avaliação da atividade antioxidante	101
 7 CAPÍTULO 4	
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE INSUMOS BIOTIVOS (TINTURA-MÃE) DE AROEIRA (<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi).....	108
7.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	108

7.1.1 Material vegetal	108
7.1.1.1 Preparação de Tintura-mãe (TM) e obtenção de insumos bioativos	108
7.1.2 Avaliação da atividade antifúngica de insumos bioativos	108
7.1.2.1 Fungos	108
7.1.2.2 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	109
7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
8 CONCLUSÕES	117
9 REFERENCIAS	119
APÊNDICES	130
APÊNDICE A- Depósito de patente INPI	131

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais ou aromáticas são utilizadas visando principalmente o crescente mercado de produtos naturais a partir de fontes renováveis. Além de serem utilizadas como matérias primas para a indústria alimentícia, têm produtos do seu metabolismo primário e secundário destinados a outros setores, como a indústria farmacêutica e de cosméticos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; LUBBE; VERPOORTE, 2011).

Atualmente, os atributos de qualidade de produtos associados à segurança do alimento, boas práticas agrícolas e biotecnologia são temas presentes no setor agroindustrial (CONCEIÇÃO, 2012). O estímulo à geração de produtos agropecuários estratégicos, visando novos patamares de competitividade do agronegócio brasileiro, priorizando a biodiversidade do país, faz parte da Política de Desenvolvimento da Biotecnologia no País (BRASIL, 2007).

A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira vermelha), uma planta nativa da América do Sul, além de apresentar uma ampla plasticidade ecológica, compõe um importante grupo entre as espécies de plantas medicinais e aromáticas com valor econômico (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; LUBBE; VERPOORTE, 2011). No Brasil, através do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (PNPMF), que incentiva a pesquisa com plantas, exóticas adaptadas ou nativas, a espécie foi incluída na Relação Nacional de Fitoterápicos (RENAFITO), por evidências de segurança e eficácia do uso de suas cascas (BRASIL, 2009).

Estudos descrevem a utilização de diversas formas extrativas da aroeira e suas atividades farmacológicas, as mais diferenciadas, destacando-se a antioxidante (DEGÁSPARI; WASCZYNSKY; dos SANTOS, 2004; VELÁSQUEZ et al., 2003) e antimicrobiana e inseticida (DEGÁSPARI; WASCZYNSKY; PRADO, 2005; LIMA et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 1996; MELO-JÚNIOR et al., 2002). Estas atividades estão relacionadas à presença de flavonoides (principalmente nos frutos, de biflavonóides), taninos, ácidos triterpênicos e, de mono e sesquiterpenos no óleo essencial de frutos e folhas da espécie (BARBOSA et al., 2007; CERUKS et al.,

2007; CORREIA et al., 2006; OLIVEIRA, 2012), com aplicação nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Na prática de uma agricultura econômica competitiva, a intervenção para o controle de doenças é realizada geralmente através do uso de defensivos agrícolas, principalmente os fungicidas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000). O uso intensivo e indiscriminado de agrotóxicos na agricultura tem causado diversos problemas de ordem ambiental como, contaminação de alimentos, do solo, da água e dos animais, além da intoxicação de agricultores e a resistência de patógenos (MORANDI; BETTIOL, 2009; STANGARLIN; SCHWAN-ESTRADA, 2008).

A busca por produtos naturais que apresentem propriedades antioxidantes associadas a propriedades antimicrobianas vem sendo investigada nos últimos anos. Estudos, envolvendo a identificação de espécies vegetais cujos produtos extrativos apresentem substâncias bioativas com ação biológica contra fitopatógenos, também têm sido realizados (GARCIA et al., 2008; KUSTER; ARNOLD; WESSJOHANN, 2009; SALES, 2009; STANGARLIN; SCHWAN-ESTRADA, 2008).

Entretanto não foram encontrados relatos em literatura sobre a obtenção e identificação de insumos bioativos, como as tinturas- mãe (TM), a partir de folhas e frutos da aroeira. Logo, não existem parâmetros pré-definidos para identificação de grupos ativos, sendo imprescindível o estabelecimento das condições físico-químicas e cromatográficas ideais para seletividade e validação de um método factível para tinturas-mãe hidroetanólicas. Vale ressaltar que a triagem destas formas extrativas objetivam a validação destes insumos no controle de microorganismos, principalmente produtos com potencial atividade antifúngica.

Considerando exigências cada vez maiores da sociedade e dos mercados consumidores por produtos qualificados buscou-se, neste trabalho, identificar e avaliar insumos bioativos, Tinturas-mãe (TM) e Óleos essenciais (OE), obtidos a partir de folhas e frutos em genótipos da espécie *Schinus terebinthifolius*, como potencial matéria prima para o desenvolvimento de bioprodutos com atividade fungicida para o controle de fitopatógenos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

O Brasil é o país de maior biodiversidade em plantas medicinais do mundo. Entretanto, apenas em 2006, foram publicadas políticas governamentais voltadas para o setor, como a Política Nacional de Plantas medicinais (PNPM). Essas políticas trazem como diretrizes, dentre outras ações, a elaboração/ adequação do marco regulatório e incentivo à pesquisa para plantas medicinais, priorizando a biodiversidade do país o desenvolvimento de tecnologias e inovações nas diversas fases da cadeia produtiva (BRASIL, 2006; SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, 2002).

O Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicas (PNPMF) incentiva a pesquisa com plantas, exóticas adaptadas ou nativas, incluídas na Relação Nacional de Fitoterápicos (RENAFITO), subsidiada por estudos e pesquisas em desenvolvimento e inovação de produtos principalmente no setor agroindustrial (BRASIL, 2009). Os critérios, para inclusão na RENAFITO, são: i) ser uma espécie da flora brasileira não ameaçada de extinção; ii) ter distribuição por diversos biomas brasileiros; iii) possuir evidências de segurança e eficácia; iv) registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); v) ser fitoterápicos de uso na atenção básica e vi) ser produzido com plantas exóticas adaptadas ou nativas (BRASIL, 2006; BRASIL, 2009).

O Decreto nº 6041, de 08 de fevereiro de 2007, que instituiu a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia no País, apresenta como diretriz o estímulo à geração de produtos agropecuários estratégicos visando novos patamares de competitividade e a segurança alimentar, mediante a diferenciação de produtos que viabilizem a conquista de novos mercados, tendo como alvos, dentre eles, a pesquisa de insumos bioativos, priorizando a biodiversidade do país, com potencial eficiência no controle de microrganismos (BRASIL, 2007).

2.2 AROEIRA (*SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI)

A família Anacardiaceae é de ocorrência pantropical, incluindo poucos representantes em regiões temperadas. Compreendem aproximadamente 70 gêneros e 600 espécies de árvores ou arbustos conhecidas pela sua importância como frutíferas, como manga (*Mangifera indica* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.), serigüela (*Spondias mombin* L.), pistache (*Pistacia vera* L.), aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) (DUARTE et al., 2006; LORENZI; MATOS, 2002; PIO CORRÊA, 1984). Tradicionalmente, as espécies desta família, são empregadas na medicina popular como, cicatrizante, estomáquicas e antidiarréicas, pela presença de taninos e óleo-resinas (DUARTE et al., 2006).

Esta família se destaca pelo número de investigações relativas à composição química de suas espécies e atividades biológicas de seus extratos e metabólitos (CORREIA et al., 2006; COWAN, 1999). Os estudos destas espécies possibilitaram verificar a ocorrência de flavonóides (principalmente, biflavonóides), terpenos, esteróides, xantonas e, principalmente, dos lipídios fenólicos e derivados. A atividade antioxidante ampla e elevada e a atividade antifúngica estão entre os resultados mais promissores até o momento (CORREIA et al., 2006).

No Brasil, a aroeira é o nome comum de várias espécies da família Anacardiaceae, como as espécies: i) *Astronium fraxinifolium* Schott & Spreng., nativa dos cerrados do Brasil central, conhecida como aroeira-do-campo, aroeira-vermelha, gonçalo-alves; ii) *Lithraea molleoides* (Vell) Engl., nativa de várias formações do sul e sudeste, conhecida como aroeira-branca, aroeira-brava, aroeira-do-brejo, aroeira-da-capoeira; iii) *Myracrodruon urundeuya* Allemão, nativa da caatinga e do cerrado, desde o Ceará até o Paraná, conhecida como aroeira-do-campo, aroeira-da-serra; iv) *Schinus molle* L. DC., nativa do Ceará até o estado do Paraná e Mato Grosso do Sul, é conhecida como aroeira salsa, aroeira salso, aroeira, aroeira folha de salso, aroeira mole, corneiba, corneita, anacauíta, fruto de sabiá, aroeira periquita, pimenteiro, terebinto, bálsamo; e, v) *Schinus terebinthifolius*, nativa de várias formações vegetais do nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do Brasil, conhecida por diferentes nomes populares, como aroeira, aroeira-mansa, aroeira-vermelha, aroeira-precoce, aroeira-pimenteira, aroeira-do-sertão, cambuí, coração-de-bugre e

fruto-de-sabiá (DI-STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI, 2002; LORENZI; MATOS, 2002).

A espécie *Schinus terebinthifolius*, é uma planta perenifólia, de caule tortuoso, nativa da América do Sul, especialmente no Brasil, Paraguai e Argentina (DUARTE et al., 2006; LORENZI; MATOS, 2002), podendo atingir de 5 a 10 metros (Figura 1a). As folhas são verde-escuras, compostas, oblongas a elípticas e com nervura proeminente na parte de cima do limbo e o florescimento ocorre, geralmente, nos meses de setembro a janeiro. As flores, brancas ou de cor amarela (Figura 1b), são pequenas e agrupadas em inflorescências do tipo cacho (DUARTE et al., 2006; LORENZI, 2002), possuem sexos numa mesma árvore ou em árvores diferentes.



Figura 1 Exemplar de *Schinus terebinthifolius*, no município de Pedro Canário- ES, Brasil: a) arvoredo e b) detalhe das folhas e flores.

Os frutos são do tipo drupa e têm coloração verde no início e depois se tornam vermelhos (Figura 2); podem ser colhidos de janeiro a julho e a casca de tronco a qualquer época do ano (BORNHAUSEN, 2012).

Em relação às propriedades alimentícias, os frutos maduros, adocicados e aromáticos destacam-se dentre as muitas especiarias existentes e que são utilizadas essencialmente para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária universal (DEGÁSPARI, 2004).



Figura 2 Frutos maduros da espécie *Schinus terebinthifolius*. Fonte: DEGÁSPARI, 2004.

No caso das propriedades antioxidantes, a investigação não se restringe à área alimentícia sob o ponto de vista tecnológico. A procura por alimentos com poder antioxidante tem se mostrado muito difundida no meio científico. A investigação e comprovação desta propriedade de forma efetiva conferem a estes produtos o título de “alimento funcional” (DEGÁSPARI, 2004). Suplementos ou complementos alimentares estão ganhando reconhecimento substancial como agentes quimioproláticos (quimiopreventivos), devido a sua capacidade de atuar através de diversos mecanismos (PAN; HO, 2008).

2.2.1 Estudos fitoquímicos

Os estudos fitoquímicos compreendem as etapas de extração, fracionamento, isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, responsáveis - ou não - pela ação biológica. Esses conhecimentos permitem identificar a espécie vegetal e, conjuntamente com ensaios de atividade biológica, analisar e caracterizar frações ou substâncias bioativas (SONAGLIO et al., 2010).

A análise fitoquímica, quando trabalhamos com uma forma extrativa nova, como TM, como no caso da espécie *S. terebinthifolius*, consiste na caracterização de grupos

(constituintes) químicos ativos, pertencentes a classes metabólicas, presentes nas formas extrativas vegetais, desenvolvidas a partir do processo extrativo padronizado com a utilização de um solvente adequado e *posteriori* caracterização dessas substâncias no produto tecnologicamente transformado.

Os produtos do metabolismo secundário, não estão diretamente ligados à manutenção da vida do vegetal, porém, conferem vantagens à sua sobrevivência (SANTOS, 2010; TAIZ; ZAIGER, 2009). Com raras exceções, os metabólitos secundários têm em comum a sua biossíntese, originada da rota do ácido chiquímico ou chiquimato, que origina compostos aromáticos, ligninas, neolignanas e cumarinas; aminoácidos de onde derivam alguns alcaloides e a rota do acetato, malonato e mevalonato (TAIZ; ZAIGER, 2009).



Figura 3 Esquema básico do ciclo biossintético dos metabólitos secundários de espécies vegetais. Fonte: SANTOS, 2010.

Este último pode ser redirecionado em outras três vias: ciclo do ácido cítrico, mevalonato e condensação (Figura 3). A via do mevalonato é responsável pela síntese dos isoprenóides, que dão origem aos terpenos, cujos monoterpenos e sesquiterpenos podem ser componentes dos óleos essenciais. Por meio da condensação são originados os ácidos graxos e acetogliconas. Há também compostos derivados da ligação entre a rota do ácido chiquímico e a do acetato, gerando uma rota sintética mista. Estes são os flavonóides, alguns taninos e antraquinonas (SANTOS, 2010).

Estudos fitoquímicos efetuados, especificamente, com espécies do gênero *Schinus*, evidenciaram a presença de constituintes químicos do metabolismo secundário, como compostos fenólicos, tipo flavonóides esteróides, triterpenos, antraquinonas e saponinas, especialmente na espécie *S. terebinthifolius* (LIMA et al., 2006).

2.2.2 Compostos fenólicos

As plantas produzem uma grande diversidade de produtos secundários que contêm um grupo fenol. Os fenólicos vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo e apresentam uma variedade de funções nos vegetais. Muitos agem como compostos de defesa contra herbívoros, e patógenos, enquanto outros têm função como atrativos de polinizadores ou dispersores de frutos, na proteção contra a radiação ultravioleta, no suporte mecânico ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes (SANTOS, 2010; TAIZ; ZAIGER, 2009).

A rota do ácido chiquímico participa na biossíntese da maioria dos fenólicos vegetais, tendo a fenilalanina como intermediária na biossíntese da maioria dos compostos fenólicos, por meio da eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido cinâmico, mediada pela enzima PAL (Fenilalanina amônia liase). Esta enzima (amplamente estudada) é aumentada por fatores abióticos (ambientais) e bióticos (infecção por fungos) (TAIZ; ZAIGER, 2009). De uma forma simples, os compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides (CARVALHO et al., 2007).

2.2.2.1 Flavonóides

Os flavonóides são formados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético (CARVALHO et al., 2007), especialmente os derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico (Figura 3), dentre estes cita-se: as antocianinas, as flavonas, os flavonóis, as catequinas e as isoflavonas, nas quais estão frequentemente presentes (TAIZ; ZAIGER, 2009; ZUANAZZI; MONTANHA, 2010). Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas, dentre elas: a) proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; b) atração de animais com finalidade de polinização; c) antioxidantes; d) controle da ação de hormônios vegetais; e) agentes alelopáticos; e f) inibidores de enzimas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010).

Podem-se encontrar flavonóides em diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas “fenilas” ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (C6-C3-C6). Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C (Figura 4).

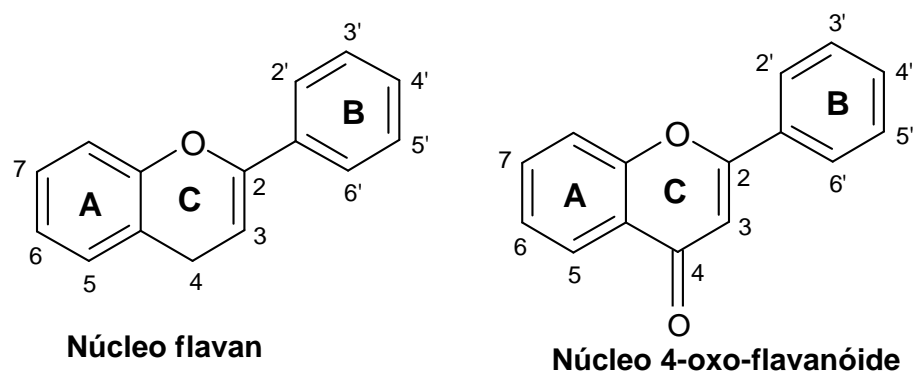


Figura 4 Estruturas químicas básicas do núcleo flavan e do núcleo 4-oxo-flavanóide.

Os flavonóides são classificados em grupos diferentes, de princípio pelo grau de oxidação da cadeia de três carbonos. O esqueleto básico de carbono dos flavonóides pode ter vários substituintes. Os grupos hidroxila estão normalmente

presentes nas posições 4, 5 e 7, mas também podem ser encontrados em outras posições. Os açúcares são também muito comuns; de fato, a maioria dos flavonóides ocorre naturalmente como glicosídeos. Enquanto os grupos hidroxila e açúcares aumentam a solubilidade em água dos flavonóides, outros substituintes, tais como éter metílico ou unidades isopentil modificadas, tornam os flavonóides lipofílicos (hidrofóbicos) (TAIZ; ZAIGER, 2009).

Estudos (CERUKS et al., 2007) descrevem a ocorrência de componentes de baixa e média polaridade da espécie *S. terebinthifolius*, da fase em acetato de etila, oriunda do extrato etanólico das folhas da espécie, com potencial anti-radicalar, através de ensaio em CCD/DPPH, o qual conduziu ao isolamento de galato de etila (1), miricetrina (2), quercitrina (3), galato de metila (4) e miricetina (5) (Figura 5).

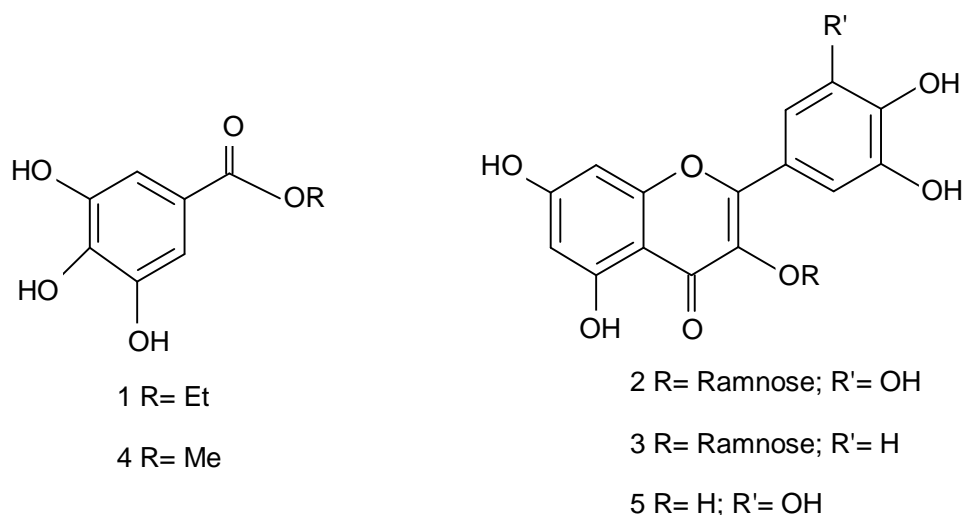


Figura 5 Substâncias isoladas das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Queires e colaboradores (2006) quantificaram as substâncias fenólicas totais presentes nos órgãos de *S. terebinthifolius*, com a justificativa de que muitas das atividades desta planta são atribuídas aos polifenóis que pertencem a sua constituição estrutural. Os autores observaram uma distribuição irregular dos compostos entre os órgãos da planta, sendo que dentre os órgãos vegetativos da planta, as folhas apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos, o que demonstra a importância da utilização da porção correta da árvore para a obtenção

de determinada atividade e na identificação de compostos do metabolismo secundário.

Em um estudo (DEGÁSPARI; WASCZYNSKY; PRADO, 2005), com extratos alcoólico e aquoso, do fruto da aroeira foi demonstrado por CLAE que o extrato alcoólico possui quantidade significativa de: flavona apigenina e o extrato aquoso apresentou uma pequena quantidade da flavanona naringina (Figura 6).

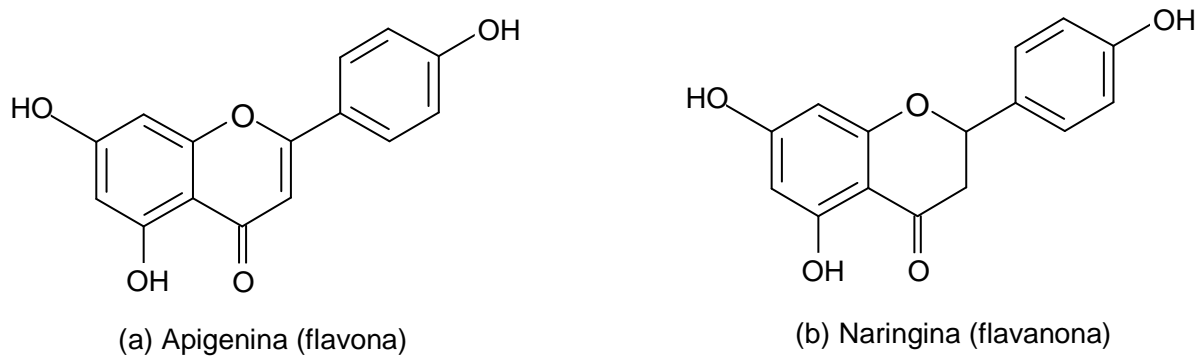


Figura 6 Estruturas químicas básicas, encontradas nos frutos aroeira: apigenina (a), naringina (b).

2.2.2.2 Biflavonóides

Constituem uma classe de flavonóides diméricos, diferenciando-se de outros oligômeros como as proantocianidinas, devido à sua origem biogenética comum. A maioria dos biflavonóides de ocorrência natural é dímera de flavonas e flavanonas (raramente chalconas). Os monômeros podem ser iguais ou de diferentes tipos: flavona-flavona, flavanona-flavanona ou flavona-flavanona (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010). Certos grupamentos hidroxilas podem apresentar-se metoxilados. Os biflavonóides mais abundantes apresentam a ligação C-C entre C-3' e C-8''. A amentoflavona e seus éteres metilas são o exemplo desta classe. Outras ligações identificadas são os carbonos 6-8'' (agatisflavona), 8-8'' (cupressoflavona) e 6-3'' (robusflavona). O grupamento mais abundante dos C-O-C é a série das hinoquiflavonas, com ligação entre os carbonos 6-4'' (Figura 7).

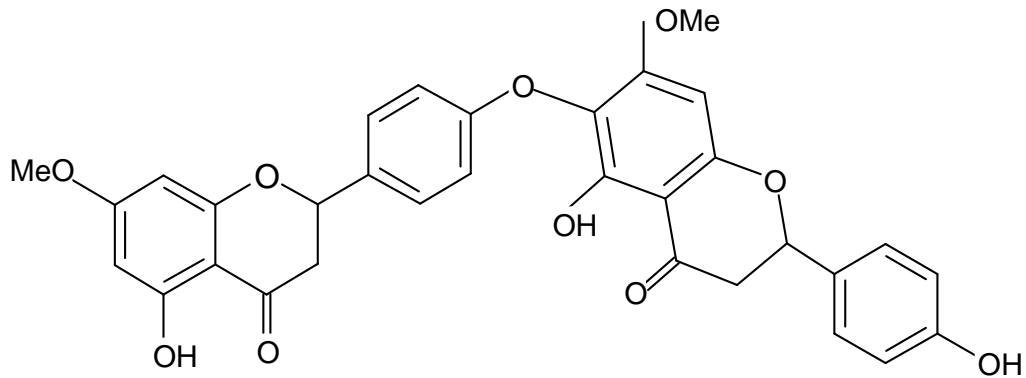


Figura 7 Biflavonóide com acoplamento C-O-C (Dimetiltetrahidroquercetina).

Os biflavonóides são encontrados em grandes quantidades em diferentes plantas e em muitos tecidos vegetais. Apesar disso seu papel biológico não é claro. A função mais importante seria a de agir como antifúngico ou alimento dissuasivo para insetos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010). Dentro da classe dos flavonoides, os biflavonoides são encontrados com mais frequência nas plantas da família Anacardiaceae (CORREIA et al., 2006). O gênero *Rhus* é o maior representante desta família, e estudos fitoquímicos realizados até o presente momento têm demonstrado que as espécies deste gênero são ricas em flavonóides, principalmente biflavonóides. Dentre estes, se destacam hinokiflavona, amentoflavona, agathisflavona, robustaflavona, rhusflavanona, succedaneaflavanona e rhusflavona.

No estudo de Oliveira (2012), o processo de isolamento e purificação do extrato bruto etanólico dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius*), permitiu o isolamento a partir da fração acetato de etila, de dois biflavonoides que foram devidamente identificados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas como sendo a tetrahydroamentoflavona e a agathisflavona. Neste mesmo estudo, na avaliação da atividade sobre a replicação do vírus Mayaro, o biflavonóide tetrahydroamentoflavona (fração acetato de etila) e o extrato bruto de *Punica granatum* apresentaram o maior potencial antiviral.

2.2.2.3 Taninos

Os taninos são classificados em dois grupos principais, hidrolisáveis e condensados, cujas estruturas são muito diferentes entre si, embora todos tenham molécula polihidroxifenóis ou seus derivados. Os pertencentes ao primeiro grupo são denominados taninos hidrolisáveis, que incluem galitaninos e os elagitaninos, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico (SANTOS; MELLO, 2010) (Figura 8).

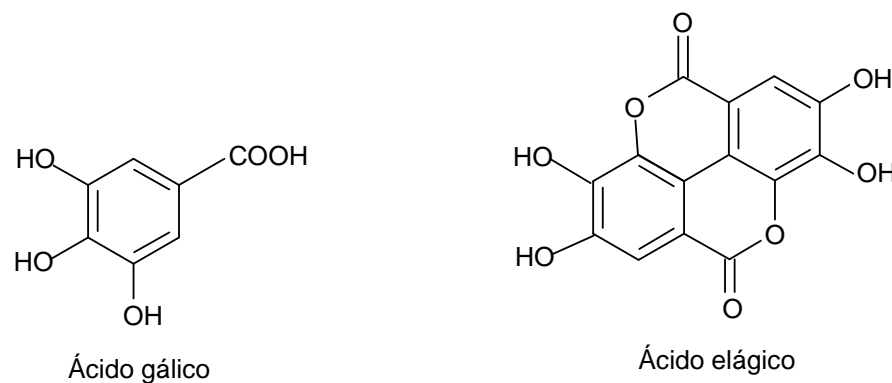


Figura 8 Estruturas químicas básicas dos taninos hidrolisáveis. Fonte: Santos e Mello (2010).

O outro tipo de taninos é denominado de taninos condensados e são encontrados em maior quantidade e de maior importância em alimentos. Apresentam uma estrutura semelhante aos flavonóides, com coloração variando do vermelho ao marrom.

Estudos mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais livres, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radical estável como, por exemplo, nas seguintes situações: o bloqueio da peroxidação de lipídeos, o bloqueio da lipooxigenase e a repressão da formação de radicais de ânion superóxido assim como dos radicais 1,1- difenil-2- picrilhidrazil (DPPH). Dessa forma, os taninos teriam uma possível importância na prevenção e tratamento de doenças causadas pela peroxidação de lipídeos (HASLAM, 1996; SANTOS; MELLO, 2010).

Estudos mostraram que os taninos têm efeitos inibitórios sobre bactérias e fungos. Existem três hipóteses para o mecanismo de ação antimicrobiana. A primeira hipótese pressupõe a inibição das enzimas de bactérias e fungos e/ou a

complexação dos substratos dessas enzimas; a segunda seria a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microorganismos, modificando o seu metabolismo. Finalmente, a terceira hipótese menciona a complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo, assim, a disponibilidade destes elementos essenciais para o metabolismo dos microorganismos (CASTILLO et al., 2011; SANTOS; MELLO, 2010).

Os complexos formados entre taninos e proteínas podem ser reversíveis e irreversíveis. Os reversíveis são estabelecidos via pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, enquanto que os irreversíveis ocorrem em condições oxidativas via ligações covalentes. Os complexos reversíveis podem ser solúveis ou insolúveis, dependendo da proporção tanino/proteína, do pH e da força iônica do meio. Os irreversíveis entre taninos e proteínas ocorrem na planta quando seus tecidos são danificados, por auto-oxidação ou oxidação catalisada por enzimas (HAGERMAN, 2011; HASLAM, 1996). Oxidações similares também acontecem *in vitro* quando os complexos reversíveis de tanino-proteína são expostos ao ar ou são mantidos em soluções de pH alto (HASLAM, 1996).

As catequinas (Figura 9) estão incluídas neste grupo metabólico, mas têm sua classificação, pela similitude estrutural, no grupo dos flavonoides, classe das flavanas, leuco e protoantocianidinas (que pertencem aos grupos de taninos e flavonoides).

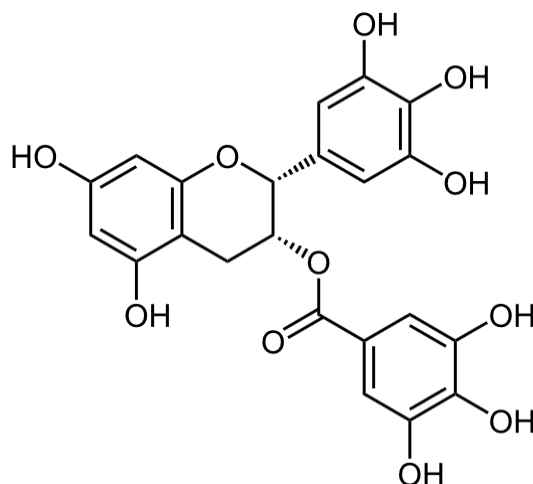


Figura 9 Estrutura química da Epigalocatequina. Fonte: Santos e Mello (2010).

2.2.3 Terpenóides

Constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo que este termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno. A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico (Figura 10). Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos e os sesquiterpenos. Outros terpenóides, como os diterpenos, são encontrados apenas em óleos voláteis extraídos com solventes orgânicos. Na planta, possui funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra perda d'água e aumento da temperatura (CAMPELLO, J. P.; MARSAIOLI, 1975; CASTILLO et al., 2011).

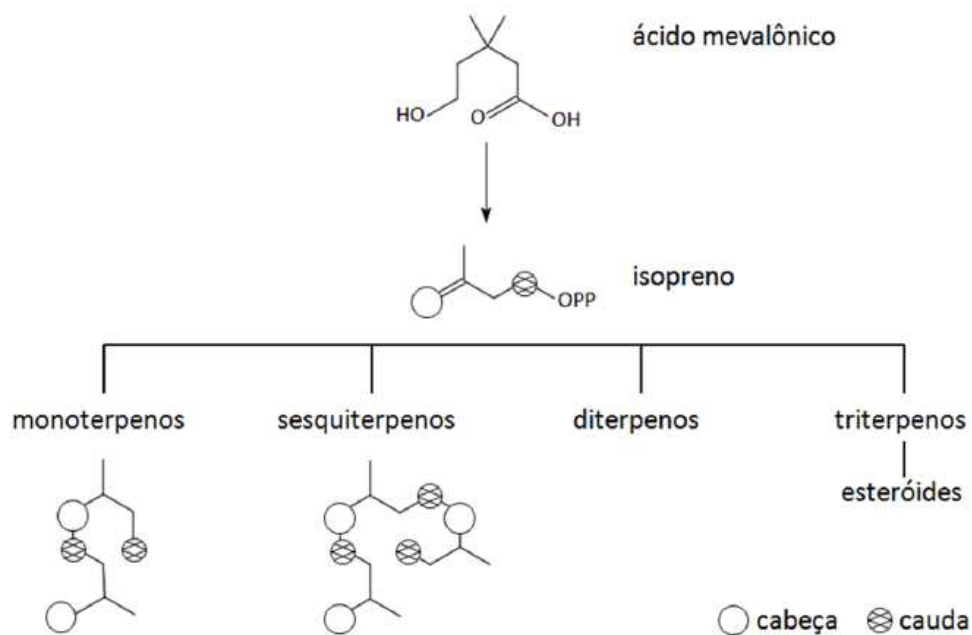


Figura 10 Formação cabeça- cauda dos esqueletos carbonados dos compostos mono- e sesquiterpenóides, constituintes majoritários dos óleos essenciais. Fonte: Simões e Spitzer (2010).

Estudos fitoquímicos registraram a presença de alto teor de ácidos triterpênicos nas cascas e de mono e sesquiterpenos no óleo essencial de frutos e folhas de *S. terebinthifolius* (CORREIA et al., 2006; LIMA et al., 2006; LORENZI, 1992), sendo que a maior parte das amostras de óleo essencial analisadas revelaram a presença monoterpênica em frutos de, α -pineno, δ 3-careno, α -felandreno, *p*-cimeno e D-

limoneno (BARBOSA et al., 2007). Todos de importância agroindustrial, pela sua potencial aplicação nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009), em especial o monoterpene limoneno, considerado um produto bioativo natural, visto que ensaios comprovam sua eficácia como substância antioxidante com potencial quimioprotetor (ATOUI et al, 2005; MURTHY; JAYAPRAKASHA; PATIL, 2012; QUEIRES et al., 2006).

Estudos demonstraram que, o cardanol em combinação com componentes do óleo essencial da aroeira, particularmente α -felandreno, β -felandreno e δ^3 -careno (Figura 11), como prováveis agentes causadores de dermatites (DUARTE et al., 2006), enquanto PIRES e colaboradores (2004) relataram que os frutos de *S. terebinthifolius*, consumidos como condimento, possuem baixa toxicidade oral aguda.

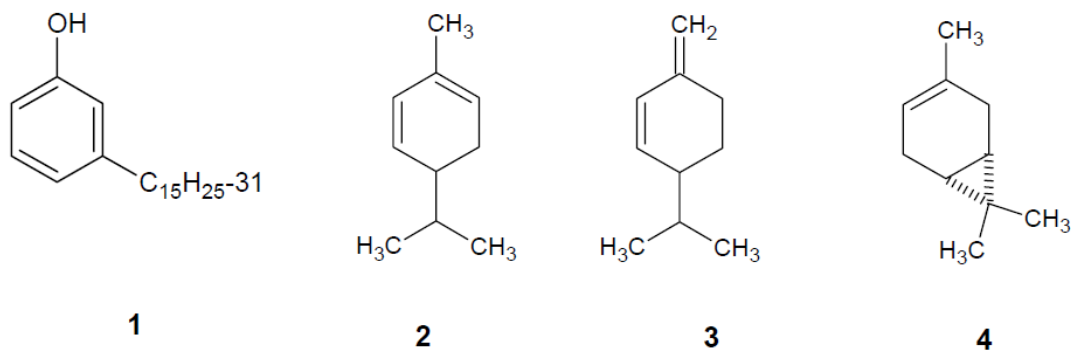


Figura 11 Componentes do óleo essencial de *S. terebinthifolius*: cardanol (1), α -felandreno (2), β -felandreno (3) e δ^3 -careno (4).

2.3 OBTENÇÃO DE INSUMOS BIOATIVOS- TINTURA- MÃE (TM) e ÓLEOS

Nos processos de extração da droga vegetal a partir de plantas medicinais, um procedimento preliminar, envolvendo metodologia analítica, representa um requisito importante no fluxo de padronização do desenvolvimento de fitoterápicos, principalmente em relação à segurança e reprodutibilidade.

O desenvolvimento de um trabalho envolvendo a colheita, extração e análise de extratos vegetais exige um levantamento de metodologia adequado, de forma a

minimizar os possíveis problemas inerentes das pesquisas com matéria-prima *in natura* (FERREIRA, 2010; HEINRICH et al.,2004).

O aproveitamento adequado dos princípios ativos de uma planta exige o preparo correto para cada parte a ser usada, grupo do princípio ativo a ser extraído ou doença a ser controlada (SHARAPIN et al., 2000). Existem formas específicas de preparo e uso mais adequados levando em consideração, a identidade botânica das plantas, a obtenção, a identificação, e a composição química de substâncias bioativas (princípios ativos), bem como a determinação da ação farmacológica e de propriedades tóxicas (ALONSO, 1998; SIMÕES et al., 2010). Apesar da crescente importância das plantas medicinais, relativamente poucos estudos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança.

Os cuidados com as amostras coletadas devem ser adotados desde o primeiro contato com a mesma. Logo após a retirada do vegetal, o processo de acondicionamento deve ser observado e padronizado. A definição do processo de extração dos princípios ativos do vegetal garante que as substâncias de interesse, ou seja, os compostos fenólicos sejam devidamente extraídos para uma posterior purificação, identificação e avaliação de propriedades (DEGASPARI, 2004).

A seletividade dos compostos ativos almejados durante o processo de isolamento vai depender em grande parte, das operações de transformação da matéria vegetal, técnicas de extração e, sobretudo, dos parâmetros de solubilidade na relação soluto/solvente (LIEBERMAN; LACHMAN; SCHWAZTZ, 1990; HEINRICH et al.,2004). Entre as técnicas extrativas priorizadas na busca de compostos ativos em plantas medicinais (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011a; ROCHA, 2000), destacam-se neste trabalho:

2.3.1 Extração a quente em sistemas fechados

2.3.1.1 Soxhlet

É utilizada, sobretudo, para extrair sólidos com solventes voláteis, exigindo o aparelho de Soxhlet (Figura 12). Em cada ciclo da operação, o material vegetal entra

em contato com o solvente renovado; assim, o processamento possibilita uma extração altamente eficiente, empregando uma quantidade reduzida do solvente, em comparação com as quantidades necessárias nos outros processos extrativos, para obter os mesmos resultados quantitativos.

2.3.1.2 Clevenger: arraste por vapor d'água

É utilizado para a extração de óleos voláteis. Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo por isso, arrastados pelo vapor d'água. O óleo volátil obtido, após separar-se da água deve ser seco com Na_2SO_4 anidro. Esse procedimento, embora clássico, pode levar à formação de artefatos em função da alta temperatura empregada. Preferencialmente, esse método é utilizado para extrair óleos de plantas frescas. A Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010) preconiza o uso de um aparelho tipo Clevenger (Figura 12), com modificações.

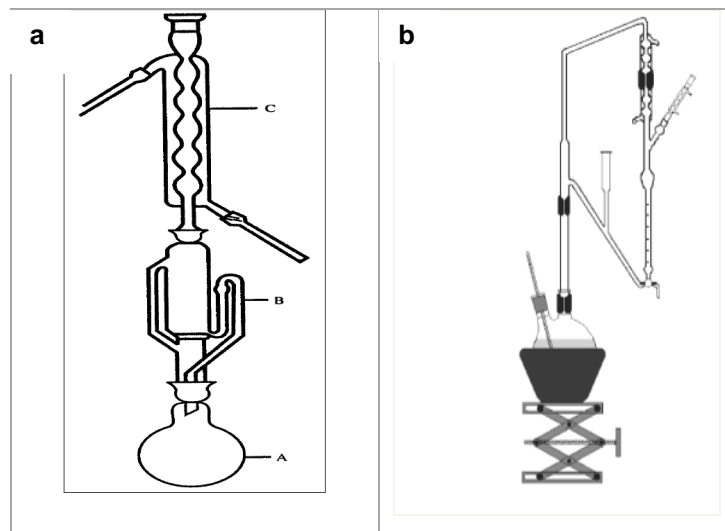


Figura 12 Aparelhos utilizados para extração de óleos (à quente): a) Soxhlet: compreende balão de fundo redondo (A), conectado ao extrator Soxhlet (B) e condensador de refluxo (C) e (b) Clevenger: arraste por vapor d'água (hidrodestilação). Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

Atualmente métodos como o CO_2 supercrítico permite recuperar os aromas naturais de vários tipos e não somente óleos voláteis, de modo bastante eficiente e, atualmente, é o método de escolha para extração industrial de óleos voláteis. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-se mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos.

2.3.2 Extrações a frio

2.3.2.1 Maceração

A maceração é a operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, como o percolador (Figura 13), em diversas temperaturas, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação e sem renovação do líquido extrator. Na preparação de tinturas mãe (TM) ou tinturas oficinais (TO), os líquidos extratores são o etanol e as soluções hidroetanólicas. Líquidos muito voláteis são raramente utilizados, não se recomendando, por outro lado, o emprego de água ou de misturas hidroalcoólicas com concentrações inferiores a 20%, dadas as circunstâncias favoráveis à proliferação microbiana. Consiste em deixar o vegetal fresco, devidamente dividido, por pelo menos 15 dias, em contato com o volume total do líquido extrator apropriado descrito na respectiva monografia, em ambiente protegido da ação direta de luz e calor (FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011a).

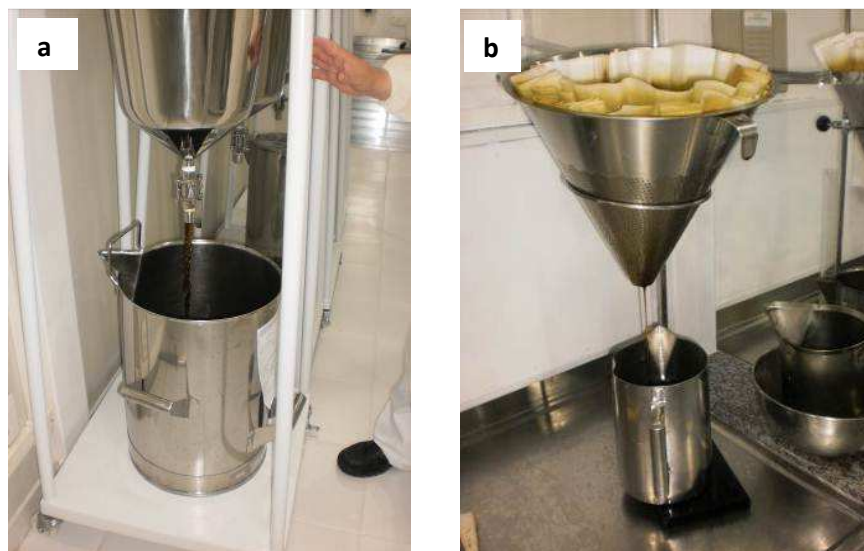


Figura 13 Extração por maceração: **a)** Coleta da TM, 15 dias após extração em recipiente fechado e **b)** filtração da solução extraída antes da estocagem em vidro âmbar.

Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. As drogas vegetais mais

indicadas para extração por maceração são aquelas ricas em substâncias ativas que não apresentam uma estrutura celular, como gomas, resinas e alginatos.

Os principais fatores que influenciam a eficiência de maceração estão vinculados ao material vegetal, ao líquido ou mistura de líquidos extratores e às condições do sistema em conjunto: a) fatores vinculados ao material vegetal, como quantidade, natureza, teor de umidade, tamanho das partículas e capacidade de intumescimento; b) fatores vinculados ao líquido extrator, como seletividade e quantidade e c) fatores vinculados ao sistema, como proporção droga no líquido extrator, temperatura, agitação, pH e tempo de extração (FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011a).

Diversas variações da maceração podem ser realizadas com a intenção, essencialmente, de aumentar a efetividade da extração como é o caso da digestão (maceração a quente), maceração dinâmica (feita sob agitação constante), maceração escalonada e remaceração (LIEBERMAN; LACHMAN; SCHWAZTZ, 1990; PRISTA; ALVES, 1990). Para TM, cujas monografias determinem o teor de marcador especificado, um ajuste de concentração deste marcador pode ser realizado por adição de etanol de mesmo teor que aquele utilizado para a preparação da TM.

2.3.2.2 Percolação

É o processo extrativo que consiste na passagem de solvente através da droga previamente macerada, mantida em percolador sob velocidade controlada (BRASIL, 2011). A percolação, ao contrário da maceração é um processo dinâmico, onde se faz o arrastamento do princípio ativo pela passagem contínua do líquido extrator, levando ao esgotamento da planta seca através do gotejamento lento do material em um recipiente cônico ou cilíndrico (percolador), de vidro ou de metal (Figura 14). Também permite obter soluções extrativas mais concentradas, gradiente de polaridade, economia do líquido extrator e tempo relativamente curto (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011a), com indicação para processos extrativos de substâncias

farmacologicamente, muito ativas, presentes em pequena quantidade ou pouco solúveis (FERREIRA, 2010).

Não é um processo indicado para drogas vegetais frescas e pouco recomendável para plantas com elevado teor de substâncias solúveis e as que aumentam a viscosidade durante o processo.

O procedimento usual de percolação, tal como descrito em diversas farmacopeias, caracteriza a percolação simples e a percolação fracionada. Consiste em colocar a droga vegetal dessecada, finamente dividida e tamisada em recipiente adequado. Adicionar o líquido extrator em quantidade suficiente para umedecer o pó e deixar em contato por 4 horas. Transferir cuidadosamente para percolador de capacidade ideal, de forma a se evitar a formação de canais preferenciais para o escoamento do solvente. Colocar volume suficiente de líquido extrator para cobrir toda a droga e para a obtenção da quantidade almejada de tintura-mãe.

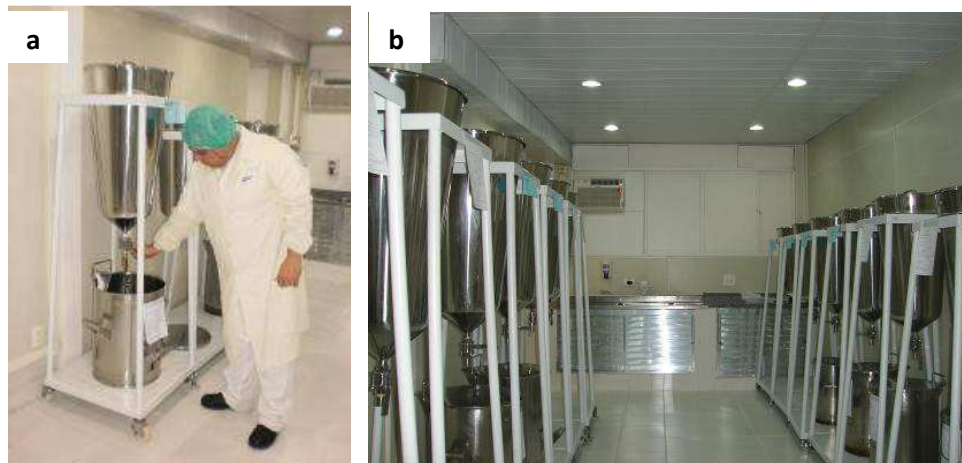


Figura 14 Extração por percolação: a) coleta por gotejamento de TM (8gts/min) e b) repouso por 48hs para armazenamento adequado. Foto: Laboratório Almeida Prado (SP).

Deixar em contato por 24 horas. Percolar à velocidade de oito gotas por minuto para cada 100 g da droga, repondo o solvente de forma a manter a droga imersa, até se obter o volume previsto de tintura-mãe. Deixar em repouso por 48 horas (Figura 14), filtrar e armazenar adequadamente (FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011).

2.3.2 Características dos solventes utilizados na extração

Uma das formas mais aceitas de classificar as operações de extração é, segundo a sua eficiência, permitindo reconhecer dois tipos: de extração parcial (sem esgotamento do material vegetal) e a exaustiva (esgotamento da matéria prima). A qualidade da extração está diretamente relacionada com o tipo de solvente adequado e específico (Tabela 2) para uma ou mais substâncias ativas de interesse (LIEBERMAN; LACHMAN; SCHWAZTZ, 1990; PRISTA; ALVES, 1990).

Apesar de uma ampla variedade de substâncias líquidas conhecidas, são poucas as utilizadas na extração de drogas vegetais (Tabela 1), sendo que esta limitação é devida a três aspectos principais: propriedades extrativas, adequação tecnológica e inocuidade fisiológica (SIMÕES et al., 2010).

Tabela 1 Principais características dos solventes utilizados na extração de drogas vegetais.

Solvente	Exemplos de extração
éter de petróleo <i>n</i> -hexano	Extração de substâncias altamente lipofílicas, lipídeos e óleos voláteis. Imiscíveis com água.
clorofórmio diclorometano eter etílico	Extração de substâncias lipofílicas, óleos fixos, ceras, agliconas, sapogeninas, alcalóides na forma de base livre. Imiscíveis com água.
etanol metanol	Extração de agliconas, ceras, sapogeninas, iridóides e sesquiterpenos. Miscível com água, em todas as proporções. O etanol forma azeótropo com a água. O metanol, não.
acetona metiletilacetona (MEC)	Extração de agliconas, ceras, sapogeninas, iridóides e sesquiterpenos. A acetona é miscível com água, em todas as proporções. A MEC, não. A MEC forma azeótropo com a água. A acetona, não.
acetato de etila	Extração de agliconas, ceras, sapogeninas, iridóides e sesquiterpenos. Imiscível com água. Características similares à MEC.
água acidificada e alcalinizada	Extração de alcalóides e saponinas, respectivamente.

Fonte: SIMÕES et al., 2010.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DE INSUMOS BIOATIVOS DE INTERESSE

À produção de fitoterápicos, pressupõe-se que estudos de desenvolvimento tenham sido realizados anteriormente, no sentido de estabelecer os procedimentos e etapas de processamento (monitoramento de processo tecnológico). As matérias-primas ativas de origem vegetal, devido a sua complexidade de composição, requerem cuidados especiais, tanto no armazenamento quanto durante a sua transformação. Os métodos analíticos permitem a avaliação da qualidade do produto fitoterápico, garantindo, assim, a constância de ação terapêutica e a segurança de utilização. Visto de forma pragmática, os métodos analíticos cumprem funções diferenciadas (SONAGLIO et al., 2010).

O estabelecimento de parâmetros quantitativos, para matérias-primas vegetais e, conseqüentemente, para suas formas extrativas, é normalmente determinado pelo teor de um conjunto de substâncias, preferencialmente correlacionadas com a finalidade de uso (BACCHI, 1996; SIMÕES et al., 2010). Para as plantas é estabelecido um teor mínimo, baseado em análises sistemáticas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010a).

Nos ensaios quantitativos devem ser consideradas as características químicas e físico-químicas dos constituintes, evitando-se erros analíticos ou problemas de abrangência analítica ou limites de aceitabilidade (FARIAS, 2010; CARDOSO, 2009), principalmente para espécies em estudo como a espécie *S. terebinthifolius* e para formas extrativas, como tinturas vegetais e tinturas-mães, mesmo que estas últimas tenham sua produção descrita em compêndios oficiais farmacopéicos.

A caracterização pode ser realizada diretamente em extratos vegetais, por ensaios cromáticos, cromatográficos, espectroscópicos ou fotométricos, pois permitem a avaliação simultânea de vários constituintes ativos. Por exemplo, flavonóides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos caules ou ramos, raízes ou frutos. O mesmo composto pode ocorrer em diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal em que se encontra.

O controle de qualidade e a padronização de fitoterápicos envolvem várias etapas (CALIXTO, 2000), iniciando com a análise da matéria prima, atentando-se principalmente para a identificação botânica (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). No caso das tinturas, devem passar por vários ensaios dentre eles: identificação, características organolépticas, densidade, resíduo seco, determinação do teor alcoólico (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010b; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011a) e doseamento de compostos marcadores (quando possível), para classes metabólicas de interesse, como flavonoides, taninos, saponinas, dentre outros (SHARAPIN et al., 2000). Todos estes ensaios são importantes para assegurar o padrão de qualidade, atendendo a uma especificação pré-estabelecida (ALVES, 2003; FARIAS, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011; PRISTA).

Dentre os métodos analíticos aplicados a análises de plantas, a cromatografia em camada delgada (CCD) é um método muito empregado uma vez que fornece dados para a identificação de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos derivados, dentre eles tinturas, extratos, óleos fixos e voláteis, entre outros (BACCHI, 1996; FARIAS, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011). Esta metodologia é de fácil e rápida execução, tem custo acessível, boa reprodutibilidade e consta em diversas monografias das Farmacopeias (ROCHA, 2000; WAGNER; BLADT, 1996).

Outro método, mais sensível, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), permite a separação de misturas complexas de substâncias orgânicas de plantas medicinais e fitoterápicas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; SIMÕES et al., 2010). Consiste em uma técnica versátil que possibilita a separação de classes metabólicas, com excelentes resultados. Embora possa separar uma ou mais classes, a técnica é mais utilizada na separação de substâncias de uma mesma classe estrutural e, através do tempo de retenção relativo, pode ser utilizada também na caracterização destes compostos (FARIAS, 2010).

A identificação de óleos voláteis exige a adoção de métodos cromatográficos mais sensíveis e sofisticados (para análise qualitativa e quantitativa e identificação da presença destes grupos do metabolismo secundário), como a análise por

Cromatografia em fase gasosa (CG) e acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) e até mesmo técnicas para elucidação estrutural como análise de óleos voláteis por ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN ^{13}C) (SIMÕES; SPITZER, 2010), quando for o caso.

A identificação dos constituintes fitoquímicos que compõe a classe dos metabólitos secundários, presentes em insumos ativos vegetais e sua elucidação estrutural é um passo importante para o estudo das atividades biológicas atribuídas a esta classe, como atividades antifúngica e antioxidante.

2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Em todos os sistemas biológicos, exceto em microrganismos anaeróbicos, desde os mais simples como os procariontes, até os mais especializados como os mamíferos e plantas, as espécies reativas de oxigênio (ERO), são produzidas nas mitocôndrias como um subproduto do metabolismo normal, durante a produção de energia (VASCONCELOS et al., 2007; VICENTINO; MENEZES, 2007). A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. Os exemplos de ERO mais comuns são os radicais superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}), peroxila (RO_2^{\cdot}), alkoxila (RO^{\cdot}) e hidroperoxila (HO_2). O óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o dióxido de nitrogênio (NO_2) são espécies reativas de nitrogênio (SOUSA et al., 2007). Outras moléculas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrato (ONOO^-) não são radicais livres, mas podem conduzir à formação deles através de reações químicas (VICENTINO; MENEZES, 2007).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que, presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (ATOUI et al, 2005). Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (HASLAM, 1996; SOUSA et al., 2007).

2.5.1 Antioxidantes sintéticos

Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, entre eles, o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT) e butil-hidroxi-quinonas (TBHQ), que atuam na inibição da oxidação lipídica como sequestradores de radicais livres (HASLAM, 1996; SOUSA et al., 2007).

Estudos têm demonstrado a possibilidade de, estes antioxidantes apresentarem efeitos tóxicos (SOUSA et al., 2007; ATOUI et al, 2005), motivo pelo qual estão sendo restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros males, como o efeito hepatotóxico (DURÁN; PADILLA, 1993; DEGÁSPARI; WASCZYNSKY; dos SANTOS, 2004).

2.5.2 Antioxidantes naturais

A determinação da atividade antioxidante de produtos naturais teve início com estudos em especiarias, ingredientes utilizados em alimentos desde os primórdios da história, não somente para melhorar ou ressaltar as características sensoriais dos alimentos, mas também, para preservá-los (DEGÁSPARI, 2004).

Espécies botânicas apresentam propriedades antioxidantes associadas a propriedades antimicrobianas, como o que ocorre especificamente na espécie, *Allium sativum*, que possui compostos químicos decorrentes do metabolismo secundário, derivados de aminoácidos (sintetizados após hidrólise), destacando-se a alicina que possui uma atividade antimicrobiana potente e juntamente com os outros componentes químicos do alho, têm ação como antirradicais livres onde os compostos sulfurados aliados aos bioflavonóides incrementam sua ação antifúngica e antibacteriana (SIMÕES et al., 2010; DEWICK, 2002; ROSS, 2001).

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico),

cumarinas, flavonóides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA et al., 2007; SIMÕES et al., 2010) e por sua ocorrência natural, têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (MENSOR et al., 2001; HASLAM, 1996; SOUSA et al., 2006).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química (capacidade de deslocar elétrons, conferindo a estes compostos propriedades oxidáveis). Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (DESZCZ; KOZUBEK, 2000; VICENTINO; MENEZES, 2007).

Ceruks e colaboradores (2007) registraram, em experimento com folhas de *S. terebinthifolius*, cinco compostos fenólicos: galato de etila, quercitrina, galato de metila e miricetina; supostamente responsáveis pela potente atividade antioxidante e antimicrobiana, desta espécie. Degáspari e colaboradores (2004), ao analisar a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos aquosos e alcóolicos, a partir de frutos da espécie, associando aos resultados obtidos para a quantificação de compostos fenólicos, constataram que o poder antioxidante de ambos os extratos foram significativos, quando comparados ao poder antioxidante, dos conhecidos e comumente empregados, BHA (butil-hidroxi-anisol) e BHT (butil-hidroxi-tolueno), visto que se trata de extratos vegetais, cujo poder antioxidante é, em geral, mais fraco que os antioxidantes artificiais.

Ensaio, para avaliação de atividade sequestradora de radical livre e atividade antioxidante da família Anacardiaceae e da espécie *S. terebinthifolius*, estão descritos na literatura (CAIEIRO; DEGÁSPARI; WASCZYNSKY; dos SANTOS, 2004; MARCUCCI, 2010; VICENTINO; SOUSA et al., 2007; MENEZES, 2007), principalmente o ensaio espectrofotométrico do radical, DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil). É um teste amplamente empregado, pois o DPPH é um radical livre estável,

não natural, cujas propriedades diferem dos radicais de oxigênio altamente reativos como os radicais hidroxil, alcoxil, superóxido, etc., que apresentam um importante papel nos processos oxidativos biológicos (DEGÁSPARI; WASCZYNSKY; dos SANTOS, 2004, MAKSIMOVIĆ, 2008; SOUSA et al., 2007). Inclusive métodos seletivos para as classes metabólicas de interesse, como, métodos de captura do radical peroxila, ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TOSC (*Total Oxyradical Scavenging Capacity*) e TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*), de poder de redução do metal, FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*), de captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), de captura do radical orgânico, ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-sulfônico) e DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), de quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios, TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substance*), Oxidação do LDL, Co-oxidação do β -caroteno) (SÁNCHEZ et al., 1998), dentre outros.

Várias séries de compostos químicos tem apresentado estreita correlação entre as atividades sequestradora de DPPH e antioxidante determinada em modelos biológicos e outros não biológicos.

2.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.6.1 Extratos vegetais com atividade antimicrobiana

Plantas, cujos produtos extrativos apresentem substâncias bioativas com ação biológica contra fitopatógenos (SALES, 2009; STANGARLIN; SCHWAN-ESTRADA, 2008), estão sendo avaliadas para o controle de doenças de plantas. Trabalhos desenvolvidos com diversidade de plantas medicinais têm indicado o potencial, em experimentos *in vitro* e *in vivo*, no controle de patógenos. As diferentes formas extrativas vegetais, tais como tinturas-mãe, extratos aquosos ou hidroetanólicos, resinas e outras formas extrativas, mostraram capacidade de inibição do desenvolvimento fúngico, principalmente pela presença de constituintes químicos ativos de plantas, sendo sua maioria produtos do metabolismo secundário (SALES, 2009).

Os principais grupos fitoquímicos com propriedades antimicrobianas extraídos de plantas incluem: terpenóides e óleos essenciais, alcalóides, lectinas e polipeptídios, e polifenóis, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides, taninos e cumarinas (CERUKS et al., 2007). Os autores registraram, em estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius*, o isolamento de cinco compostos fenólicos: galato de etila, quercitrina, galato de metila e miricetina; supostamente responsáveis pela potente atividade antioxidante e antimicrobiana desta espécie.

A bibliografia etnobotânica sobre plantas utilizadas para infecções fúngicas na medicina popular destaca o uso de *S. terebinthifolius* dentre 409 espécies de plantas (FENNER et al., 2006). Diversos trabalhos já confirmaram a atividade antimicrobiana de extratos como, na análise dos extratos, alcoólico e aquoso, do fruto da aroeira, no que diz respeito às suas propriedades antimicrobianas para uso em produtos alimentícios com relação aos compostos fenólicos, foi demonstrado que o extrato alcoólico possui quantidade significativa de: flavona apigenina, além de ácido elágico com ação antimicrobiana, para as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e do *Bacillus cereus* (ATCC 11778). O extrato aquoso apresentou uma pequena quantidade da flavanona naringina, que não apresentou efeito inibitório aos microrganismos testados (DEGÁSPARI; WASCZYNSKY; PRADO, 2005).

Os extratos de plantas apresentam especial potencial do tratamento de doenças de frutos (SILVA et al., 2006). Alguns metabólitos isolados ou frações de extratos também têm exibido atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*, como foi demonstrado por Garcia et cols. (2008), onde, dentre monoterpenos testados, o citral apresentou uma potente atividade fungicida para 3 fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium guttiforme*, causadores de doenças e perdas em pós-colheita de frutas).

Triagem, *in vitro*, pelo teste de difusão em ágar, com formas extrativas etanólicas de *Flourensia* spp. (*Flourensia microphylla*, *Flourensia cernua*, e *Flourensia retinophylla*) demonstrou que os três extratos apresentaram eficiência para *Alternaria* sp.,

Rhizoctonia solani e *Fusarium oxysporum*, na concentração de $10\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. Uma total inibição foi apresentada numa concentração maior de *F. cernua*, e *F. retinophylla* para *R. solani* (RODRÍGUEZ et al., 2007).

Tonial (2010) realizou estudo por CCD, com extrato bruto da espécie *S. terebinthifolius* e identificou, além de compostos fenólicos (principalmente flavonoides), e de terpenoides, a presença de antraquinonas, gerando uma nova hipótese de que as substâncias antimicrobianas associadas à aroeira possam estar vinculadas a este grupo de compostos. Outro estudo identificou as antraquinonas, além de fenóis e triterpenos, no extrato com atividade antimicrobiana da casca desta espécie, porém não foram observadas no extrato das folhas (LIMA et al., 2006). Ao contrário dos compostos fenólicos, ainda há poucos estudos a respeito das antraquinonas presentes em *S. terebinthifolius*. As quinonas, que incluem as antraquinonas, são compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos da oxidação de fenóis, e da mesma forma a redução de quinonas pode originar os correspondentes fenóis, o que leva a crer que ambas as classes podem ser importantes no desenvolvimento desta atividade antimicrobiana, tanto como precursoras como detentoras da atividade (FALKENBERG, 2010).

Um fato importante a ser considerado é a presença de fungos endofíticos em folhas (TONIAL, 2010) e sementes (STRAPASSON; SANTOS; MEDEIROS, 2002) da aroeira vermelha. No primeiro estudo, Tonial (2010), avaliou a atividade antimicrobiana e a composição química do extrato metanólico (e suas frações) e de fungos filamentosos e actinomicetos endofíticos das mesmas folhas da espécie *S. terebinthifolius* e sugere que, enquanto os metabólitos ativos da planta estejam relacionados com compostos fenólicos e/ou antraquinonas, a atividade antimicrobiana dos endófitos testados parece estar vinculada à produção de alcalóides, presente em todos os extratos ativos dos microrganismos. Dois extratos com atividade produzidos por endófitos também apresentaram antraquinonas e um terpenóides. Nas condições testadas não foi encontrada relação entre os compostos com atividade antimicrobiana extraídos das folhas de *S. terebenthifolius* com os extraídos dos fungos e actinomiceto isolados desta mesma planta.

No estudo realizado por Strapasson e colaboradores (2002), o fungo fitopatogênico, mais frequentemente encontrado nas amostras, foi o *Fusarium* sp., com uma frequência de 66%, demonstrando que a contaminação destas sementes por fungos fitopatogênicos e saprófitas, normalmente é decorrente de procedimentos inadequados nas fases de coleta, beneficiamento e armazenamento.

Normalmente as pesquisas se voltam para doenças de plantas que causam impactos econômicos na agricultura. Como na fruticultura, onde se destaca a cultura do abacaxi (*Ananas comosus* (L. Merrill) var. *comosus* (Coopens & Leal) que, apesar de sua importância, a produtividade desta cultura no Brasil ainda é considerada baixa, principalmente pela fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell (syn.: *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*, Ventura, Zambolim & Gilb). Esta doença em fase de produção e pós colheita, como a podridão negra, causada pelo fungo, *Chalara paradoxa*, são responsáveis por prejuízos elevados, tanto em frutos para consumo in natura, quanto naqueles destinados à indústria de processamento (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

2.6.2 Triagem *in vitro* de insumos bioativos, com atividade antifúngica

2.6.2.1 Métodos de avaliação da atividade antifúngica

Atualmente existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem o método de difusão em ágar, método de macro e micro diluição (OSTROSKY et al., 2008). A eficácia do método pode ser atribuída a vários fatores. Dentre eles, podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, a extração da planta (se foi utilizada planta fresca ou seca) e a quantidade do extrato testada (OSTROSKY et al., 2008; PINTO; KANEKO, 2003). Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais.

- Métodos de difusão em ágar

A técnica de difusão em meio de cultura, utilizada na triagem da avaliação do potencial fungicida de substâncias bioativas vegetais é considerada, por vários autores, uma técnica simples de realização e eficiente (ALVES et al., 2000; AYRES et al., 2008; OSTROSKY et al., 2008; PINTO; KANEKO, 2003; VALGAS et al., 2007), para diversos produtos da extração oficial de espécies vegetais. A sua aplicação se limita a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles anaeróbios ou aeróbios facultativos.

A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência e a zona ou halo de inibição de crescimento é medida partindo da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento do microrganismo. No método há necessidade do controle positivo, empregando-se um quimioterápico padrão, e como controle negativo, o solvente utilizado para a dissolução ou extração dos extratos (AYRES et al., 2008; OSTROSKY et al., 2008; PINTO; KANEKO, 2003).

As técnicas de aplicação de substância antimicrobiana, pelo método de difusão, são por meio de difusão em disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar (PINTO; KANEKO, 2003). A técnica de cilindros de aço consiste na aplicação de cilindros (contendo a solução do extrato vegetal em estudo) no meio de cultura já solidificado e inoculado. Para a técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio de cultura sólido, é realizada com auxílio de cilindros (ou outro artifício) que com 5-8mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível a aplicação das substâncias a serem analisadas (OSTROSKY et al., 2008; PINTO; KANEKO, 2003; SALES, 2009).

O método de difusão em meio de cultura sólido a partir de orifício/ poço (ALVES et al., 2000; AYRES et al., 2008; OSTROSKY et al., 2008; VALGAS et al., 2003) e o de inibição do crescimento micelial, possibilita grande sensibilidade na determinação da atividade antimicrobiana de produtos naturais (STANGARLIN; SCHWAN-ESTRADA, 2008; VALGAS et al., 2007).

- Métodos de diluição em meio de cultura líquido

O método da diluição em meio de cultura líquido considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção da densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano. O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. Sua desvantagem é a dificuldade de detecção de contaminação por microorganismos no meio. Podem ser empregadas a macrodiluição (laboriosa e requer mais tempo) ou a microdiluição (utiliza microplacas com 96 células poços (PINTO; KANEKO, 2003)).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade biológica e caracterizar os insumos bioativos da espécie *Schinus terebinthifolius* (aroeira vermelha), com potencial econômico para o desenvolvimento tecnológico de bioprodutos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO 1

- Padronizar um método de extração de folhas e frutos de diferentes genótipos de *S. terebinthifolius* na preparação de tinturas-mãe (TM), como insumos bioativos vegetais;
- Analisar as características físicas e fisico-químicas de TM de genótipos de *S. terebinthifolius*, para a garantia da qualidade do insumo bioativo desenvolvido;
- Determinar o perfil cromatográfico da TM e do Extrato bruto (Eb), a partir de folhas e frutos, de *S. terebinthifolius*, utilizando técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

CAPÍTULO 2

- Obter óleos essenciais a partir de frutos e folhas de diferentes genótipos de *S. terebinthifolius*, através da técnica de hidrodestilação;
- Identificar por Cromatografia de fase gasosa (CG) e Cromatografia de fase gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM), os principais constituintes químicos presentes nos óleos essenciais extraídos de *S. terebinthifolius*.

CAPÍTULO 3

- Avaliar a atividade antioxidante de TM de folhas e frutos de genótipos da espécie de *S. terebinthifolius*, pelo método fotolorimétrico do radical livre estável DPPH (1,1- difenil-2-picril-hidrazil).

CAPÍTULO 4

- Avaliar, *in vitro*, a atividade antifúngica de TM de folhas e frutos de genótipos da espécie *S. terebinthifolius* para os fungos fitopatogênicos, *Fusarium guttiforme* e *Chalara paradoxa*.

4 CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E FITOQUÍMICA DE INSUMOS BIOATIVOS FITOTERÁPICOS DA AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de obtenção de insumos bioativos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Emescam, em Vitória- ES e para identificação de seus constituintes químicos, no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (Núcleo de Biotecnologia) da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES e Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro- RJ, Brasil.

4.1.1 Material vegetal

Folhas e frutos frescos, de três genótipos, macho (M), fêmea (F) e hermafrodita (H), da espécie *Schinus terebinthifolius*, foram coletadas em fevereiro e maio de 2012, respectivamente, pelos técnicos do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), no município de Pedro Canário- ES, Brasil (latitude: -18° 01' 49"; longitude: - 40° 09' 02") – ES, Brasil. Todas as plantas foram georreferenciadas por GPS (*Global Positioning System*).

A identificação da espécie botânica foi realizada pelo Prof. Marcelo Simonelli Filho (IFES- Vitória, ES) e um exemplar desta espécie (exsicata) encontra- se depositado no herbário do Museu de Biologia Mello Leitão, localizado no município de Santa Tereza- ES, Brasil (catalogado e registrado sob o nº 41895).

4.1.1.1 Tratamento prévio do material vegetal*.

Após reservar material vegetal para cálculo do Resíduo sólido (R. sol.), folhas e frutos frescos, foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio (1%) e em seguida lavadas com água destilada esterilizada. Em seguida, a droga vegetal fresca passou por processo de tratamento prévio* à maceração, incluindo a utilização de um adjuvante técnico natural novo (AD1) no processo de extração, visando formação de uma biomassa vegetal estável.

4.1.1.2 Determinação do resíduo sólido (R. sol.) do vegetal fresco.

Folhas (10g) e frutos (10g) frescos (sem assepsia do material), foram fracionados em fragmentos reduzidos e colocados em estufa à T 100°C- 105°C, até peso constante. Foi realizado cálculo do teor de resíduo sólido (%R. sol./ vegetal “fresco”), onde a relação R. sol./volume final da TM, é de 1:10 (p/v). Os resultados foram expressos pela média de três determinações (FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011b).

4.1.1.3 Determinação do teor líquido extrator (EtOH)

Como a espécie *S. terebinthifolius*, não possui monografia de referência, o teor alcoólico do líquido extrator (EtOH), foi estipulado pela determinação do resíduo sólido (FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011): a) EtOH 90% (p/p) para R.sol. \leq 29% (para plantas com alto teor de água); b) EtOH 80% (p/p) para R.sol.: 30% - 39% (plantas com médio teor de água); c) EtOH 70% (p/p) para R.sol. igual \geq 40% (plantas com baixo teor de água). O volume de EtOH foi equivalente ao volume final de tintura-mãe a ser obtido subtraído do volume de água contido no vegetal fresco.

* Foi omitido o detalhamento de algumas informações deste trabalho com vistas à proteção intelectual, respaldada pela Lei de Inovação N° 10.973, de 2 de Dezembro de 2004, regulamentada pelo Decreto 5.563, de 11 de Outubro de 2005.

4.1.3 Extração

4.1.3.1 Preparação de Tintura-mãe (TM) e obtenção de insumos bioativos

Amostras de Tintura-mãe (TM) da espécie *S. terebinthifolius* foram preparadas a partir do material vegetal estabilizado pelo processo de tratamento prévio, de acordo com a técnica de maceração (FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011a), modificada pela autora. A biomassa foi deixada em maceração, com 85% (p/v) do volume total de EtOH por 20 dias, em temperatura ambiente, com agitação diária. O resíduo foi prensado e filtrado, e à biomassa formada foi adicionado q.s. de EtOH numa mistura homogênea, até volume desejado. O produto ficou em repouso por 48hs e a TM obtida foi conservada em recipiente de vidro âmbar, bem fechado, protegido do calor e da luz direta. As Tinturas-mãe (TM's) de cada genótipo, foram identificadas a partir de folhas da planta hermafrodita (TMArFH), fêmea (TMArFF), e macho (TMArFM) e de frutos, da planta hermafrodita (TMArFrH) e de duas amostras da planta fêmea (TMArFrF1 e TMArFrF2).

4.1.2.1.1 Preparação da Solução Teste de Tintura Mãe (STTM)

Uma alíquota de 10mL, de cada TM, foi levada ao Banho Maria (95° a 105°C), para evaporação do EtOH, por 40 a 60 min. Após evaporação do solvente, o resíduo foi reconstituído em 2.0 mL de EtOH (STTM) e aplicado em placas cromatográficas com auxílio de micropipetas ou capilares, nos quais foram dispensados 5µL e múltiplos deste volume. Cada STTM foi acondicionada em vidro âmbar de 5.0mL de capacidade, devidamente identificados e mantidos ao abrigo de luz e calor.

4.1.2.2 Preparação de Extrato bruto e obtenção de insumos bioativos

Frutos e folhas frescas da espécie *S. terebinthifolius*, no município de Pedro Canário, ES, foram triturados e submetidos à extração a frio (maceração) durante 15 dias com etanol como solvente extrator. Em seguida, a solução etanólica obtida da maceração foi concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se o extrato bruto a partir do fruto da planta fêmea (EArFr) e da folha de plantas fêmea e macho (EArF). O procedimento foi realizado no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN)/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

4.1.4 Determinações físicas e físico-químicas da TM

Análises físico-químicas, das TM a partir de folhas (TMArFH, TMArFF e TMArFM) e de frutos (TMArFrH, TMArFrF1 e TMArFrF2) de *S. terebinthifolius*, foram realizadas para determinação de cor e aspecto, resíduo seco, título etanólico da TM, pH e densidade (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010 ; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011; BACCHI, 1996). Todos os experimentos foram realizados com três repetições, em temperatura adequada ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.1.4.1 Avaliação qualitativa da Cor e aspecto da Tintura-mãe

Foram colocados 10 mL de cada amostra de TM, em tubos de ensaio de vidro transparente e fundo chato. Os tubos foram observados transversalmente contra fundo branco, sob luz difusa, nas mesmas condições. A TM analisada deve apresentar aspecto límpido e homogêneo, sem presença de resíduos sólidos ou partículas estranhas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; BACCHI, 1996).

4.1.4.2 Determinação do Resíduo Seco (R.S.)

Foi introduzida em cadinho de porcelana, previamente tarado, quantidade conhecida de cada amostra de TM. Após evaporação em banho-maria até secura, foram levadas à estufa (temperatura: $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$), por 2 horas. Cada tomada de peso foi antecedida de resfriamento em dessecador contendo agente dessecante (sílica gel), por 20 minutos. O resíduo foi colocado em estufa por mais uma hora até peso constante (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011b; BACCHI, 1996).

Os resultados foram expressos em porcentagem de resíduo seco (%p/p), pela média de três determinações. Como se trata de resíduo higroscópico, se torna necessário tampar o cadinho para efetuar a transferência da estufa para o dessecador e deste para a balança.

4.1.4.3 Determinação do título etanólico da Tintura-mãe

Foram colocados 500mL de cada amostra de TM, em uma proveta (previamente esterilizada), registrando-se a temperatura. Mergulhou-se no líquido o alcoômetro de Gay- Lussac (previamente aclimatado), imprimindo uma rotação de 360°, sentido anti-horário no alcoômetro. Após, o número da graduação do alcoômetro lido corresponde ao afloramento (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011b; BACCHI, 1996).

4.1.4.4 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada com potenciômetro calibrado, adicionando uma porção de aproximadamente 10mL de cada amostra de TM, a um béquer (com o eletrodo imerso na solução) e leitura direto no aparelho (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; BACCHI, 1996).

4.1.4.5 Determinação da Densidade

A densidade foi determinada pela razão entre a massa de um mesmo volume de água destilada e cada TM, à mesma temperatura (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; BACCHI, 1996). A amostra foi transferida para um picnômetro limpo e seco, com capacidade para 25 mL, previamente calibrado. Foram realizadas as pesagens dos picnômetros vazios e preenchidos com TMs empregando balança de precisão de 0,0001 g, com temperatura ajustada para 20 °C. O peso da amostra foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. O cálculo foi baseado na divisão da massa de TM pela massa de água, representado pela fórmula:

$$D_{TM} \text{ (g/mL)} = \frac{MP_{TM} - MP}{MP_{H_2O} - MP}$$

onde,

D_{TM} = Densidade da Tintura-mãe

MP_{TM} = Massa do Picnômetro contendo TM

MP_{H_2O} = Massa do Picnômetro contendo H₂O

MP = Massa do Picnômetro vazio

4.1.4 Determinação do perfil cromatográfico

4.1.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O experimento foi realizado no sistema de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando placas de alumínio de gel de sílica GF₂₅₄ (Merck®) e placas de vidro, DC- Fertiglatten® ADMANT para CCD (Marcherey Nagel®), segundo métodos descritos em literatura (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; WAGNER, BLADT, 1996; BRAZ et al., 2011; CARDOSO, 2009) e adaptado pela autora, para amostras reconstituídas de STTM, a partir de TM de *Schinus terebinthifolius*. Todos os cromatogramas foram desenvolvidos em câmara de exaustão. As fases móveis empregadas neste estudo foram selecionadas ou desenvolvidas de acordo com a STTM (Tabela 2).

Tabela 2 Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários, através de um sistema de cromatografia para TM de folhas e frutos de *S. terebinthifolius*.

Classe Metabolitos	Alíquotas (µL)	STTM ¹ (TMArFH, TMArFF, TMArFM, TMArFrH, TMArFrF1 TMArFrF2)	
		Sistema cromatográfico (PDA) ²	
		Sistema eluente (v/v)	Agente cromogênico
Ácido gálico	10.0/ 25.0 Placa 1 ⁽⁶⁾	1. Tolueno: Acetato de etila: Metanol: Ácido Fórmico (75:25:10:6).	A. Cloreto Férrico a 1% em metanol ³ .
Saponinas	10.0/ 25.0 Placa 1 ⁽⁶⁾	2. Clorofórmio: Ácido Acético: Metanol: Água (60:32:12:8).	B. Anisaldeído Sulfúrico + 105°C/5 min.
Terpenos	10.0/ 25.0 Placa 1 ⁽⁶⁾	3. Acetato de Etila: Tolueno (7:93)	C. Vanilina sulfúrica + 105°C/ 5min.
Flavonoides	5.0 Placa 2 ⁽⁷⁾	4. Acetato de Etila (100): Ácido Fórmico (11): Ácido Acético (11): Água (26).	D. PN/PEG 4000 ⁴ + UV 365nm ⁵ .

¹ STTM (Solução Teste Tintura-Mãe): TMArFH= TM Aroeira Folha Hermafrodita; TMArFF= Fêmea; TMArFM = Macho; TMArFrH= TM Aroeira Fruto Hermafrodita, TMArFF1= TM Aroeira Fêmea(1) e TMArFF2= TM Aroeira Fêmea (2).

² Fonte: PDA: WAGNER; BLADT, 1996.

³ Reagente: Fe₂Cl₃ a 1% em metanol (Braz et al., 2011) e em sol. aquosa (WAGNER; BLADT, 1996).

⁴ PN: Produto Natural: -2- aminoetil- difenil- borinato/ PEG: Polietilenoglicol 4000.

⁵ 365nm: Luz UV 365nm (câmara escura).

⁶ Placa 1: placas de vidro, DC- Fertiglatten® ADMANT para CCD (Marcherey Nagel®);

⁷ Placa 2: placas de alumínio de gel de sílica GF₂₅₄ (Merck®).

Alíquotas, de 5µL, 10µL e 25µL, foram aplicadas em uma placa com micropipetas volumétricas e capilares, ao longo de uma linha virtual situada a 10 mm a partir da borda inferior da placa. As manchas foram aplicadas a 10 mm de intervalo. Durante a aplicação, foi tomado cuidado para secar as manchas sob fluxo de ar, de modo que elas não excedessem a 10 mm de diâmetro. A placa foi desenvolvida a uma distância de 80 mm, à temperatura ambiente em capela de exaustão. Após o desenvolvimento da cromatografia e a evaporação dos solventes, as manchas foram visualizadas, sequencialmente com luz visível e em câmara escura (Clinlab[®]), para UV de 254 e 365 nm, e em seguida pulverizada com reagentes cromogênicos específicos de acordo com os grupos químicos analisados. A posição final de cada mancha foi designada pelo R_f (R_f = distância atingida pela mancha a partir da origem/ distância percorrida pelo solvente desde a origem).

4.1.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC)

4.1.4.2.1 Identificação de constituintes químicos em insumos ativos: Tintura mãe (TM) da folha e fruto de genótipos de *S. terebinthifolius*.

Para a determinação cromatográfica de alta eficiência, de cada amostra dos insumos: tinturas-mãe (TM) das folhas (TMArFH) e frutos (TMArFrH) da planta hermafrodita da espécie *S. terebinthifolius*, empregou-se o método descrito em literatura pertinente (BACCHI, 1996; CIMPAN; GOCAN, 2003; RENGER, 2000), adaptado pela autora. A cromatografia de fase reversa foi realizada em CLAE/ Shimadzu Proeminence LC20 AT. A coluna utilizada foi a C18 (Phenomenex: Phenosphere (Next 5µ) com fase reversa de sílica (250 mm x 4,6 mm) e os solventes de eluição foram: a) água: ácido acético (90: 10) e b) acetonitrila (CIMPAN; GOCAN, 2003). As amostras, eluídas em EtOH (PA), foram injetadas e submetidas a um gradiente 0- 100% de água/ac. acético: acetonitrila (0- 10min: 20%B, 10- 30min: 30%B, 30- 50min: 100%B), numa velocidade de fluxo de 0,6mL/min por 50 min de corrida (Tabela 3), monitorada pelo detector (SPD 20A) espectrofotométrico (UV/Vis), com leitura em dois comprimentos de onda, 220nm e 350nm, simultaneamente.

Tabela 3 Sistema de gradiente da fase móvel do cromatograma realizado para os insumos: a) TMArFH e TMArFrH e, b) EXTAr e EXTArF.

Insumos	T (min) ¹	Eluente (a) (%)	Eluente (b) (%)
TMArFH e TMArFrH ² VF: 0,6 mL/min.	0 – 10	80	20
	10 – 30	70	30
	30 – 50	0	100
EArFr ² VF: 0,7 mL/min.	0 – 10	55	45
	10 – 50	30	70
	50 – 60	0	100
EXTAr (6 amostras) ² VF: 0,7 mL/min.	0 – 60 a 65.	–	–

¹T: tempo de corrida; ²VF: velocidade de fluxo; ³TMArFH: TM Folha Aroeira Hermafrodita e TMArFrH: TM Fruto Aroeira Hermafrodita; EXTAr: Extrato bruto Fruto Aroeira; EXTArF: Extrato bruto Folha Aroeira.

4.1.4.2.2 Identificação de constituintes químicos em insumos ativos: Extrato bruto (EXT) do fruto e folha de genótipos de *S. terebinthifolius*.

Para a determinação cromatográfica de alta eficiência, de cada amostra dos insumos: Extrato bruto das folhas (EArF) e uma amostra do fruto (EXT) de genótipos da espécie *S. terebinthifolius*, a cromatografia de fase reversa foi realizada em CLAE Shimadzu CLASS- VP/ Detector espectrofotométrico (UV/Vis). A coluna utilizada foi a C18 (Next 5 μ) com fase reversa de sílica (250 mm x 4,6 mm) e os solventes de eluição foram: i) para a amostra do Extrato bruto do fruto de genótipo (fêmea) da Aroeira, (EArFr): (a) água/ácido fórmico (0,05%) e (b) metanol. As amostras eluídas foram injetadas e submetidas a uma gradiente de 0- 100% de água/ácido fórmico (0,05%): metanol (0- 10min: 45%b, 10- 50min: 70%b, 50- 60min: 100%b), numa velocidade de fluxo de 0,7mL/min por 60 min de corrida e ii) para as amostras de Extrato bruto a partir de folhas de genótipos (fêmea e macho) da Aroeira (EArF): (a) metanol e (b) água/ácido fórmico (0,05%). As 6 amostras eluídas foram injetadas e submetidas a uma gradiente de 0- 100% (em diferentes tempos), numa velocidade de fluxo de 0,7mL/min por 60 min de corrida (Tabela 3). Os procedimentos foram realizados no NPPN/ UFRJ.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Obtenção de Insumos Bioativos: Tintura- Mãe (TM) a partir de folhas e frutos de genótipos de *S. terebinthifolius*.

4.2.1.1 Tratamento prévio do material vegetal

A utilização de material vegetal fresco foi indispensável para a detecção de componentes específicos, visto que seu emprego traz a vantagem de evitar a presença de substâncias provenientes do metabolismo de fenecimento vegetal (SIMÕES et al., 2010). Segundo Chechinell e Yunes (1998) a qualidade do material vegetal quanto à garantia da presença de seus constituintes químicos é decorrente dos métodos e dos reagentes químicos utilizados para sua obtenção e reflete de sobremaneira na atividade biológica das espécies vegetais. Uma extração ineficiente e sem o rigor dos métodos analíticos de monitoramento, acarreta em perda dos princípios ativos presentes em plantas medicinais (YUNES; CALIXTO, 2001).

Antes de ser extraída pelo processo convencional de maceração, segundo métodos farmacopéicos, a droga vegetal fresca, selecionada a partir de folhas e frutos, de *S. terebinthifolius*, passou por um processo de tratamento prévio com utilização de um adjuvante natural novo (AD1)*, logo após procedimentos de seleção e assepsia das partes coletadas, visando à padronização do processo de obtenção de tinturas-mãe (TM) vegetais. AD1 é um glicol alternativo, 100% natural, aprovado pelo Ecocert™ e certificado pela *Natural Products Association* (NPA). E Além disso, não é derivado do petróleo, apresentando elevada pureza.

A seleção do adjuvante novo foi necessária, considerando, em primeiro lugar, as especificações adequadas para sua finalidade na extração da droga vegetal e o seu emprego na formulação exigiu critérios de qualidade, condicionados a sua função de

* Foi omitido o detalhamento de algumas informações com vistas à proteção intelectual, respaldada pela Lei de Inovação N° 10.973, de 2 de Dezembro de 2004, regulamentada pelo Decreto 5.563, de 11 de Outubro de 2005.

auxiliar no processo de estabilidade do produto final, TM a partir da folha e fruta da aroeira. Em segundo lugar, auxiliou na biodisponibilidade do insumo ativo fitoterápico, logo, similar a especificações de qualidade farmacopéicas, adicionado das características do ciclo de processamento (SONAGLIO et al., 2010; FARIAS, 2010). Na literatura, existem relatos técnicos oficiais de preparação de extratos moles, que seriam a condensação dos extratos fluidos hidroetanólicos produzidos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PRISTA; ALVES, 1990; FARIAS, 2010), o que não caberia ao processo de tratamento prévio proposto.

O procedimento estratégico de tratamento da droga vegetal fresca juntamente com a utilização do adjuvante, no processo de extração botânica, foi de vital importância na manutenção da estabilidade da droga vegetal, pois possibilitou a manutenção da integridade físico-química vegetal necessária para a realização da técnica de maceração por esgotamento, ou seja, extensão do tempo de maceração de três dias para 15 a 20 dias de extração a partir de vegetal fresco.

A utilização do adjuvante adequado à extração exerceu influência na atividade biológica que pode estar relacionada com o aumento da solubilidade das porções fenólicas nas regiões lipídicas, nas quais é requerida proteção contra degradação biológica ou oxidação química (GENNARO, 1995). Bertoldi (2006) obteve resultados dez vezes maiores na atividade antioxidante de extratos a partir de frutos da aroeira, alterando o solvente de extração, de acetona para água, permitindo um enriquecimento da amostra com constituintes com maior atividade antioxidante, no caso do estudo, compostos fenólicos.

4.2.1.2 Obtenção de Tintura-mãe (TM) de *S. terebinthifolius*

Foi realizado procedimento de extração da droga vegetal fresca, em suas partes: frutos (maduros) e folhas, frescos, adotando o procedimento de maceração otimizada, pela realização de tratamento prévio da droga vegetal fresca e pela determinação do resíduo sólido, teor do EtOH e volume final de cada amostra de TM. Do material vegetal da aroeira coletado em 2012, folhas e frutos foram

selecionados, dentro dos parâmetros de qualidade para processo de colheita e preparação do material para extração.

Os valores obtidos e apresentados na tabela 4 estabelecem as determinações farmacopéicas contidas nas normas de extração de matéria prima vegetal e dos processos técnicos de obtenção de tinturas vegetais, principalmente para tinturas-mães (BACCHI, 1996; FARIAS 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011a; HPSUS, 2000).

Tabela 4 Determinação de Resíduo sólido (R. sol. (%), Teor EtOH (%) e Vol.TM (mL) final a partir de amostras de material vegetal (MV) de *S. terebinthifolius* (aroeira).

Partes da planta MV (g)	Amostra ¹ (g)	R. sol.(%) / Dp ²	R.sol. total ³ (g)	Teor EtOH ⁴ (%)	Vol.TM (mL)
Folhas (março 2012) MV: 930g	ArFH 300	32 ± 1.05	96	80	960
	ArFF 350	29 ± 0.58	101.5	90	1160
	ArFM 280	26 ± 2.52	72.8	90	728
	Frutos (maio 2012) MV: 270g	ArFrH 90	49 ± 0.52	44.1	70
	ArFrF ₁ 80	42 ± 1.15	33.6	70	336
	ArFrF ₂ 100	47 ± 1.08	47	70	470

¹ ArFH: Aroeira folha hermafrodita; ArFF: Aroeira folha fêmea; ArFM: Aroeira folha macho; ArFrH: Aroeira fruto hermafrodita; ArFrF1: Aroeira fruto fêmea 1; ArFrF2: Aroeira fruto fêmea 2.

² R. sol.(%): resíduo sólido (%); Média de 3 repetições e cálculo de DP: Desvio padrão.

³ R. sol. total: resíduo sólido total do vegetal (g)

⁴ Teor EtOH (%): título EtOH: determinado pelo teor resíduo sólido.

⁵ Vol. TM (mL): Volume final da TM (10 vezes o resíduo

Das folhas da espécie *S. terebinthifolius*, coletadas em fevereiro de 2012, (peso total material vegetal: 930g), foram obtidos 960 mL de tintura mãe (TM) a partir de 300g da planta hermafrodita (TMArFH) (com concentração de 32 mg.mL⁻¹), 1160 mL de TM a partir de 350g da planta fêmea (TMArFF) (com concentração de 29 mg.mL⁻¹) e 728 mL de TM a partir de 280g da planta macho (TMArFM) (com concentração de 26 mg. mL⁻¹).

Dos frutos, coletados em maio de 2012, (peso total droga vegetal: 270g), foram obtidos 441 mL de tintura mãe (TM) a partir de 90g da planta hermafrodita (TMArFrH) (com concentração de 49 mg.mL⁻¹), 336 mL de TM a partir de 80g da

planta fêmea 1 (TMArFrF1) (com concentração de 42 mg.mL⁻¹) e 470 mL de TM a partir de 100g da planta fêmea 2 (TMArFF2) (com concentração de 47mg. mL⁻¹). Uma parte (100 mL), de cada tintura preparada, foi utilizada para determinação do resíduo sólido (R. sol) e o restante foi reservado para utilização em bioensaios e preparação da solução este de Tintura-mãe (STTM), utilizada na técnica de CCD.

As médias para resíduos sólidos (R. sol.), não foram significativas e estão dentro dos limites permitidos pela legislação (BACCHI, 1996; PRISTA; ALVES, 1990), o que possibilitou a determinação do teor EtOH (%) de cada amostra da TM analisada. Houve uma diferença nos resultados apresentados na determinação do teor do líquido extrativo (EtOH) para cada genótipo da espécie, determinada pela parte utilizada na preparação da TM. As folhas das plantas hermafroditas e fêmeas, que possuem médio e alto teor de água, respectivamente, demandaram um teor alcóolico para o líquido extrator (EtOH), entre 80 e 90%. Valor este, maior que o teor do EtOH (70%) utilizado na extração dos frutos que, como era de conhecimento, possuem um baixo teor de água.

O emprego do metanol na fase de extração de drogas vegetais, embora seja considerado o melhor solvente para compostos fenólicos (SIMÕES et al., 2010) e para metabólitos com média e pouca polaridade (GENNARO, 1995), seria uma indicação, principalmente para a extração e identificação da aroeira. Entretanto, não foi utilizado devido à sua toxicidade (LIEBERMAN; LACHMAN; SCHWAZTZ, 1990; PRISTA; ALVES, 2003). Além do mais, caso fosse utilizado, o mesmo deveria ser totalmente removido depois da extração para que fosse empregado como veículo da TM, o que dificultaria ou inviabilizaria todo o processo (DEGÁSPARI, 2004; FARIAS, 2010).

A padronização da técnica de preparação da TM a partir de folhas e frutos da espécie, *S. terebinthifolius*, pelo tratamento prévio do material vegetal com o devido uso de adjuvante adequado para extração, apresentou aspectos peculiares e relevantes, evidenciados pelos resultados nas análises físico-químicas, além do desenvolvimento de novas metodologias para estabilização do produto final.

4.2.1.3 Preparação da solução teste de Tintura-mãe (STTM)

A preparação da STTM, a partir de cada TM, foi executada de acordo com metodologia proposta pela autora. A reconstituição da TM condensada mostrou rapidez de execução e rendimento maior, por trabalhar com alíquotas pequenas (10 ml) de tintura-mãe, quando comparado ao processo de condensação de extratos hidroetanólicos, por evaporador rotatório, normalmente utilizado em processos de obtenção de extratos vegetais.

4.2.2 Realização de análises físico-químicas de TM

Os resultados das análises físico-químicas das amostras das TM padronizadas a partir de folhas e frutos da espécie *S. terebinthifolius* Raddi, apresentaram valores médios e cálculo de desvio padrão (Tabela 5), para determinação de resíduo seco ($1.41\% \pm 0.13$), teor alcóolico ($67\% \pm 0.78$), pH (5.6 ± 0.78) e densidade ($0.898\text{g.mL}^{-1} \pm 0.98$), das tinturas- mães (TM), dentro das especificações técnicas propostas pela literatura apropriada, quando disponível (BRASIL, 2004; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; GENNARO, 1995; HPSUS, 2002).

Os valores médios ($1,41\% \pm 0,13$), da análise de resíduo seco, apresentados pelas amostras de TM da *S. terebinthifolius* (Tabela 5), revelaram que não há diferença significativa entre as amostras. Segundo procedimentos de análise e interpretação de resultados de metodologia analítica (BRASIL, 2010; LIEBERMAN; LACHMAN; SCHWAZTZ, 1990; PRISTA; ALVES, 1990), toda vez que na descrição de uma droga vegetal não for indicada a percentagem da perda por dessecação, é tolerado um máximo de cinco por cento (BRASIL, 2010; GENNARO, 1995; PRISTA; ALVES, 1990). A determinação do resíduo seco é um parâmetro fundamental e preliminar quando se objetiva alcançar a eficácia de uma formulação fitoterápica (SHARAPIN et al., 2000; CARDOSO, 2009), pois este ensaio implica na quantificação das substâncias extraídas da planta através da eliminação do solvente extrator, sendo assim, esse percentual é um indicativo da concentração da tintura (BRASIL, 2010; PRISTA; ALVES, 1990).

Tabela 5 Resultados das análises físico-químicas de tinturas-mãe (TM) preparadas a partir de folhas e frutos da espécie *S. terebinthifolius* Raddi (aroeira).

Forma Extrativa ¹	Cor/ Aspecto	R. s (%) ± dp ²	T. EtOH ± dp ³	pH ± dp ⁴	Dens. ± dp ⁵ (g/mL)
TMArFH	Verde/Característico	0.82 ± 0.06	68 ± 0.50	5,01 ± 0.21	0.895 ± 0.58
TMArFF	Verde/Característico	1.14 ± 0.21	69 ± 0.35	5,38 ± 0.32	0.889 ± 0.54
TMArFM	Verde/Característico	0.89 ± 0.20	70 ± 0.62	5,10 ± 0.51	0.894 ± 0.98
TMArFrH	Castanho avermelhado/ Característico	1.57 ± 0.08	65 ± 0.87	5,88 ± 0.81	0.902 ± 1.18
TMArFrF1	Castanho avermelhado/ Característico	2.04 ± 0.16	65 ± 1.12	5,89 ± 0.88	0.902 ± 1.25
TMArFrF2	Castanho avermelhado/ Característico	1.99 ± 0.09	65 ± 1.14	6,01 ± 1.92	0.901 ± 1.32
md ± dp⁶	-	1.41 ± 0.13	67 ± 0.78	5.6 ± 0.78	0.898 ± 0.98

¹ Formas extrativas: TMArFH: Tintura-mãe (TM) aroeira folha hermafrodita; TMArFF: TM aroeira folha fêmea; TMArFM: TM aroeira folha macho; TMArFrH: TM aroeira fruto hermafrodita; TMArFrF1: TM aroeira fruto fêmea 1; TMArFrF2: TM aroeira fruto fêmea 2.

² R. s (%) / dp: Média da determinação do Resíduo seco da TM;

³ T. EtOH /dp(TM) (%) Final/ Dp: Média da determinação do teor alcóolico (final) da TM;

⁴ pH/dp: média da determinação do potencial Hidrogeniônico da TM; ⁵ Dens.: Média da determinação da densidade da TM;

⁶ média ± dp: média e cálculo de desvio padrão.

Os valores médios de pH e densidade, revelaram que não houve diferença significativa entre as amostras e o padrão permitido pela legislação. Para a determinação do pH das amostras de TM, primeiramente, para uma melhor reprodutibilidade da análise, o valor do pH da água destilada também foi verificado ($5,32 \pm 0,03$), devido ao fato desta ser utilizada no procedimento para a obtenção da solução extrativa. O valor apresentado na realização do método ($5,6 \pm 0,78$), dentro dos limites permitidos (BRASIL, 2004; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PRISTA; ALVES, 1990), foram compatíveis com o da água, não apresentando níveis de acidez. Em soluções aquosas, os ácidos dissociam-se parcialmente em íons, e essa acidez pode ser medida pela concentração dos hidrogênios na solução (COSTA, 2001). A presença de água, além do limite permitido, leva a erros na determinação do teor do líquido extrator e permite 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 (PRISTA; ALVES, 1990; LIEBERMAN; LACHMAN; SCHWAZTZ, 1990).

A média dos resultados das análises desenvolvidas com TM, apresentou o valor médio de densidade de $0,898\text{g.mL}^{-1} \pm 0,98$, o qual se manteve dentro do limite

preconizado para tinturas, 0,87 e 0,98 g.mL⁻¹ (BRASIL, 2010; PRISTA; ALVES, 1990). Vale ressaltar que tal ensaio constitui-se numa exigência estabelecida pela Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, RDC nº 14/2010 (BRASIL, 2010) e os resultados apresentados para as amostras, de TM da aroeira, analisadas sinalizaram para uma padronização no processo de extração da espécie, de acordo com a avaliação de características físico-químicas dos produtos tecnologicamente transformados.

Os resultados apresentados nas análises físico-químicas indicaram qualidade no processo de extração do material vegetal, provavelmente garantida pela realização dos procedimentos executados antes da maceração, pelo tratamento prévio e adição de um novo adjuvante, no material vegetal, o que proporcionou resultados promissores na determinação do perfil cromatográfico das amostras analisadas.

4.2.3 Determinação do perfil cromatográfico para *S. terebinthifolius*.

4.2.3.1 Perfil por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de classes metabólicas presentes na TM.

O sistema cromatográfico adotado na triagem de amostras das Soluções Teste de Tinturas-mãe (STTM) de folhas (TMArFH; TMArFF; TMArFM) e frutos (TMArFrH; TMArFrF1; TMArFrF2) de *S. terebinthifolius*, permitiu a detecção de zonas cromatográficas de classes metabólicas majoritárias, identificadas, quando possível, com dados apresentados na literatura pertinente, principalmente pelas colorações das manchas apresentadas e respectivos valores de R_f (BRAZ et al., 2011; NUNES et al., 2009; WAGNER; BLADT, 1996).

As classes metabólicas de interesse foram selecionadas mediante relatos da presença de grupos químicos ativos na espécie *S. terebinthifolius* e foram detectados neste trabalho, pela visualização de zonas cromatográficas típicas de compostos fenólicos, caracterizados por colorações que variaram do laranja-esverdeado ao amarelo (NUNES et al., 2009; WAGNER et al., 1996), saponinas e terpenos, caracterizados pela coloração laranja- amarronzadas a arroxeadas,

respectivamente bem como presença de ácido gálico e catequina que foram, de princípio, diferenciados pelo índice de retenção (Rf), quando possível e aplicável (BRAZ et al., 2011; WAGNER et al., 1996).

As amostras de STTM, de cada parte (folha ou fruto) analisada, não apresentaram, entre os genótipos (hermafrodita, fêmea e macho), diferença significativa para o perfil cromatográfico proposto. Os resultados para CCD das amostras STTM de folhas (Tabelas 6 a 9) e frutos (Tabela 10) da espécie *S. terebinthifolius*, permitiram a visualização de zonas cromatográficas, com colorações típicas das classes metabólicas analisadas e referidas (quando comparadas aos seus respectivos padrões).

O perfil cromatográfico, para detecção de ácido gálico nas amostras de STTM a partir das folhas (TMArFH, TMArFF e TMArFM), revelou manchas relevantes em A1 (Rf ~ 0,22), A2 e B1 (Rf ~ 0,38 – 0,40) e B2 (Rf ~ 0,87), que nos permitiram sugerir a presença de ácido gálico ou derivados em A1 (10µL de STTM) e de catequinas na mancha em B2 (Tabela 6), com aplicação de 25µL da STTM.

Tabela 6 Determinação do perfil cromatográfico por CCD, para ácido gálico/catequinas, de tinturas-mãe (TM) preparadas a partir de folhas da espécie *S. terebinthifolius* (aroeira).

Sistemas cromatográficos	TMArF de <i>S. terebinthifolius</i> ¹						Literatura (padrão placa) ²	
	TMArFF		TMArFH		TMArFM			
Ácido Gálico	A	B	A	B	A	B		
SE: (1)		B2						
AC: (A)								Catequina
Rf:								Rf=0.81
A1 – 0.22								
A2 – 0.38	A2							
B1 – 0.38		B1						
B2 – 0.87								
Literatura ² : Aroeira. BRAZ et al., 2011	A1						Ác Gálico Rf=0.20	
	10µL	25µL	10µL	25µL	10µL	25µL	BRAZ ³	BRAZ ³

¹TMArF: Tintura-mãe de folhas aroeira. ²Literatura: WAGNER; BLADT, 1996; BRAZ et al., 2011.

Estes resultados apresentaram significativa semelhança com manchas detectadas por Braz e colaboradores (2011) utilizando o padrão de ácido gálico (Rf= 0,20) e de

catequina (Rf= 0,81), na identificação de metabólitos presentes no extrato da casca da aroeira. Outros estudos confirmaram a presença de compostos ativos presentes nas folhas, como no fracionamento cromatográfico do extrato etanólico, que resultou no isolamento de constituintes químicos ativos como, galato de etila, galato de metila, miricetrina, quercitrina, miricetina (CERUKS et al., 2007) e na identificação de compostos fenólicos como, o ácido caféico, ácido cumárico, ácido elágico, ácido gálico e catequina (EL-MASSRY et al., 2009).

Nos sistemas cromatográficos para saponinas das STTM para folhas e frutos, somente foram detectadas duas manchas representativas desta classe, no cromatograma das STTM a partir das folhas (Tabela 7).

Tabela 7 Determinação do perfil cromatográfico por CCD, para saponinas, de tinturas-mãe (TM) preparadas a partir de folhas da espécie *S. terebinthifolius* (aroeira).

Sistemas cromatográficos	TMArF de <i>S. terebinthifolius</i> ¹						Literatura (padrão placa) ²	
	TMArFF		TMArFH		TMArFM			
Saponinas S.E: (2) A.C.: (B) Rf: C – Não houve corrida significativa. D1 – 0.12 D2 – 0.50 D3 – 0.82 Literatura ² : (PDA) WAGNER; BLADT, 1996	C	D	C	D	C	D	PDA ³	PDA ³
	10µL	25µL	10µL	25µL	10µL	25µL		Sapogeninas Rfs 0.20 - 0.75


¹TMArF: Tintura-mãe de folhas aroeira. ²Literatura: WAGNER; BLADT, 1996; BRAZ et al., 2011.

Uma zona cromatográfica de cor violácea tênue em D2 (Rf ~0,50), não se mostrou conclusiva para a presença de metabólitos, entretanto o resultado apresentado pela zona cromatográfica em D3, possivelmente poderia ser uma das manchas apresentadas como “zonas de saponinas” (sapogeninas), que segundo literatura para identificação de saponinas, de Wagner e Bladt (1996), são caracterizadas pela presença de manchas “amarelo-amarronzadas” (Rfs que variam de 0,20- 0,75), de acordo com o núcleo fundamental da aglicona, como saponinas esteroidais e saponinas triterpênicas. Pode ter ocorrido uma mescla nas manchas apresentadas

para saponinas e terpenos, entretanto as saponinas apresentam Rf menor que os terpenos (COSTA, 2001).

Triterpenos são facilmente encontrados na natureza, entretanto quando se utilizam as técnicas cromatográficas usuais, raramente consegue-se o isolamento destes triterpenos puros, sendo estes, portanto, obtidos quase sempre em misturas de difícil resolução. As zonas cromatográficas que mostraram-se compatíveis com os dados da literatura consultada (WAGNER; BLADT, 1996), para terpenos, foi a F4 (Rf ~ 0,41) para folhas e F2 (Rf ~ 0,42) para frutos, foram detectadas com maior evidência para a amostra TMArH, representante da planta hermafrodita da espécie, apresentando coloração azul, ainda que tênue, sugerindo uma similitude com a zona cromatográfica apresentada pelo padrão Citral (coloração típica azul violeta) e Rf= 0,42 (Tabela 8). Entretanto estes dados não são critérios de exclusão para as outras amostras, pois o perfil cromatográfico para terpenos e óleos sofre uma série de interferências na extração, principalmente pela volatilização de constituintes.

Tabela 8 Determinação do perfil cromatográfico por CCD, para terpenos, de tinturas-mãe (TM) preparadas a partir de folhas da espécie *S. terebinthifolius* (aroeira).

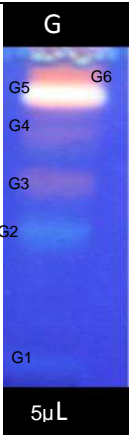


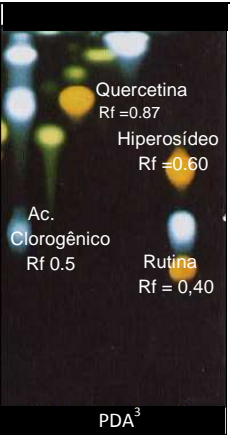
Sistemas cromatográficos	TMArF de <i>S. terebinthifolius</i> ¹						Literatura (padrão placa) ²
	TMArFF		TMArFH		TMArFM		
Terpenos	E	F	E	F	E	F	 Citral Rf =0.42 PDA ³
S.E.: (3)							
A.C.: (C)							
Rf:		F5					
E1 – 0.16							
E2 – 0.22							
F1 – 0.16							
F2 – 0.22		F4					
F3 – 0.32		F3					
F4 – 0.41		F2					
F5 – 0.84		F1					
Literatura ² : (PDA)							
WAGNER; BLADT, 1996	10µL	25µL	10µL	25µL	10µL	25µL	

¹TMArF: Tintura-mãe de folhas aroeira. ²Literatura: WAGNER; BLADT, 1996; BRAZ et al., 2011.

Finalmente, resultados com forte evidencia para detecção de compostos fenólicos, tipo flavonóides nas amostras de STTM (TMArFH, TMArFF e TMArFM), a partir de folhas de *S. terebinthifolius* (Tabela 9), mostraram zonas cromatográficas nítidas com cinco Rfs de interesse. Para a mancha G1 (Rf ~0,12), não foram encontradas

referências na literatura consultada. Em G2 (Rf ~0,47), foi detectada uma mancha de coloração fluorescente azul, atribuída a possível presença de derivados do ácido benzoico, em particular, do ácido clorogênico (Rf= 0,50), identificado na literatura consultada (WAGNER; BLADT, 1996; NUNES et al., 2009; DEGÁSPARI, 2004).

Tabela 9 Determinação do perfil cromatográfico por CCD, para flavonóides, de tinturas-mãe (TM) preparadas a partir de folhas da espécie *S. terebinthifolius* (aroeira).

Sistemas cromatográficos	TMArF de <i>S. terebinthifolius</i> ¹			Literatura (padrão placa) ²
	TMArFF	TMArFH	TMArFM	
Flavonóides S.E.: (4) A.C.: (D) G1 – 0,12 G2 – 0,47 G3 – 0,62 G4 – 0,75 G5 – 0,87 G6 – 0,94 Literatura²: Wagner; Bladt, 1996				
	5µL	5µL	5µL	PDA ³

¹TMArF: Tintura-mãe de folhas aroeira. ²Literatura: WAGNER; BLADT, 1996; BRAZ et al., 2011.

Nunes e colaboradores (2009), em análise por CCD para tintura de calêndula, identificaram, para o mesmo sistema adotado neste trabalho (acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água; revelador NP/PEG), utilizando padrão rutina (Rf=0,40), três zonas cromatográficas fluorescentes azuis que podem ser atribuídas aos ácidos clorogênico, caféico e isoclorogênico com os respectivos valores de Rfs (0,5 - 0,75 - 0,85).

Pela análise do perfil cromatográfico para os grupos fenólicos tipo flavonoides, apresentado na Tabela 10, para STTM a partir dos frutos de *S. terebinthifolius* (TMArFrH, TMArFrF1 e TTMArFrF2), não foram detectadas zonas cromatográficas com evidência como das folhas.

Tabela 10 Determinação do perfil cromatográfico por CCD, de tinturas-mãe (TM) preparadas a partir de frutos da espécie *S. terebinthifolius* (aroeira).

Sistemas cromatográficos	TMArF de <i>S. terebinthifolius</i> (Tintura-mãe de frutos aroeira.)						Literatura (padrões)	
	TMArFrH(A)		TMArFrF1		TTMArFrF2		² Literatura: WAGNER; BLADT, 1996; BRAZ et al., 2011.	
<p>Ácido Gálico</p> <p>SE: (1) AC: (A)</p> <p>A1 – 0,19 B1 – 0,19</p> <p>Literatura²: Aroeira. BRAZ et al., 2011</p>								
<p>Saponinas</p> <p>S.E: (2) A.C.: (B)</p> <p>C1 – 0,19 C2 – 0,69</p> <p>D1 – 0,19 D2 – 0,69 D3 – 0,59 D4 – 0,75</p> <p>Literatura²: (PDA) WAGNER; BLADT, 1996</p>								
<p>Terpenos</p> <p>S.E.: (3) A.C.: (C)</p> <p>E1 – 0,19</p> <p>F1 – 0,19 F2 – 0,44 F3 – 0,69 F4 – 0,87</p> <p>Literatura²: (PDA) WAGNER; BLADT, 1996</p>								
<p>Flavonóides</p> <p>S.E.: (4) A.C.: (D)</p> <p>G1 – 0,87 quercetina</p> <p>Literatura²: (PDA) WAGNER; BLADT, 1996</p>								

Na detecção de ácido gálico nas amostras de STTM a partir dos frutos da espécie (TMArFrH, TMArFrF1 e TTMArFrF2). Entretanto uma zona cromatográfica, em A1 e B1 ($R_f \sim 0,19$) sugere de forma atenuada, a presença de ácido gálico (ou derivados). Entretanto para flavonóides nas amostras citadas, a partir de frutos, foi detectada apenas uma zona cromatográfica de interesse em G1 ($R_f \sim 0,87$), uma mancha similar ao resultado apresentado para CCD de TMs de folhas, referindo-se a presença de uma mancha amarelada, em $R_f \sim 0,875$, sugestiva da presença de quercetina, muito embora possua coloração mais azulada, diferente do esperado para a substância fenólica (Tabela 10).

As condições do sistema cromatográfico propostas para flavonoides apresentaram os seguintes resultados (Tabela 11): para UV 254nm, todos os flavonóides possíveis apresentaram coloração fluorescente e para UV 365nm, dependendo do tipo estrutural, os flavonóides podem se apresentar com coloração amarelo escura, verde ou azul fluorescente, o que pode ser intensificado ou modificado utilizando-se diferentes reagentes reveladores (WAGNER; BLADT, 1996). As colorações apresentadas pelas zonas cromatográficas (Luz UV 254 e 365nm/ câmara escura) podem revelar, basicamente, duas classes do grupo dos flavonoides, os flavonóis e as flavonas.

Tabela 11 Classes do grupo dos flavonoides e colorações apresentadas pelas zonas cromatográficas.

Grupos	Principais substâncias	Escala de cor
Flavonóis	quercetina, miricetina e seus glicosídeos.	Laranja a amarelo
	canferol, isoramnetina e seus glicosídeos.	Amarelo a verde
Flavonas	luteolina e seus glicosídeos.	Laranja
	apigenina e seus glicosídeos.	Amarelo a verde

Fonte: Quadro Adaptado de Wagner e Bladt (1996)

As cores para flavonoides variaram do branco ao amarelo (Tabela 11), sendo identificados em quase todo reino vegetal. Os heterosídeos flavonóidicos mais comuns são 3-rutinosídeo quercetina (rutina) e 7- glicosídeo luteolina. A rutina (3-rutinosídeo quercetina) pertence à classe dos flavonóis (R= OH) e seus O-heterosídeos, que fazem parte de um grande grupo de flavonoides, juntamente com as flavonas (R= H). As geninas mais comumente associadas a açúcares são apigenina e luteolina nas flavonas e quercetina, canferol e miricetina nos flavonóis.

Estudos respaldam a presença de estruturas fenólicas, em compostos isolados da espécie *S. terebinthifolius* Raddi, como a flavona apigenina, o ácido elágico, a flavanona naringina, o galato de etila, o galato de metila, a miricetrina, a miricetina, a quercitrina, a rutina, a isoquercitrina e os lipídeos fenólicos (CERUKS et al., 2007; DEGÁSPARI; WASCZYNSKY; PRADO, 2005; QUEIRES et al., 2006).

4.2.3.2 Perfil por CLAE e identificação de constituintes químicos em TM de *S. terebinthifolius*

A realização da CLAE no experimento permitiu a separação por partição dos constituintes químicos presentes nas TMs padronizadas, de folhas (TMArFH) e frutos (TMArFrH) da planta hermafrodita da espécie *S. terebinthifolius*, pelos resultados apresentados por estas tinturas nas análises físico-químicas e perfil cromatográfico, principalmente para o grupo fenólico dos flavonoides. A técnica de modificação contínua dos solventes da fase móvel (água: acetonitrila) no sistema gradiente proposto mostrou eficiência durante a corrida cromatográfica em relação a separação das amostras, TMArFH e TMArFrH, principalmente para separação de misturas complexas de constituintes nas tinturas-mãe com diferentes polaridades, onde a afinidade de uma classe de constituintes químicos pela fase estacionária e, conseqüentemente, seu tempo de retenção na coluna, foi controlado pela polaridade da fase móvel.

Foi utilizado como parâmetro qualitativo, a leitura de um intervalo no tempo de retenção (t) no cromatograma de cada amostra analisada, para uma possível identificação de constituintes quimicamente ativos presentes na aroeira. A comparação com os resultados do CCD configurou-se em mais um parâmetro utilizado para a confirmação da seletividade do método, uma vez que apresentaram

leituras compatíveis. A Figura 15 apresenta leituras dos intervalos no tempo de retenção(t) das amostras da espécie hermafrodita, tinturas-mães de folha (TMArFH): F1 (t~ 4,8-5,2), F2 (t~ 6,5-7,0), F3 (t~ 8,7-9,0), F4 (t~ 10,8-11,2), F5 (t~ 13,2-13,5), F6 (t~ 14,0-14,3), F7 (t~ 20,9- 21,5) e fruto (TMArFrH): Fr1 (t~ 2,8 a 3,2), Fr2 (t~ 6,8-7,2), Fr3 (t~ 27,5- 28,1), Fr4 (t~ 29,4- 29,6), Fr5 (t~ 30,0- 30,5).

Com embasamento no intervalo do tempo de retenção, significância de pico (pela concentração do composto químico na amostra), o cromatograma (Figura 15) para tintura-mãe de folhas (TMArFH) detectou grupos metabólicos aqui identificados como F₁ a F₇ com intervalo no tempo de retenção (t), de 4,8 a 21,5 min de um modo geral sugestivo para compostos fenólicos do tipo flavonoides, considerando a polaridade hidrofílica da TMArFH analisada.

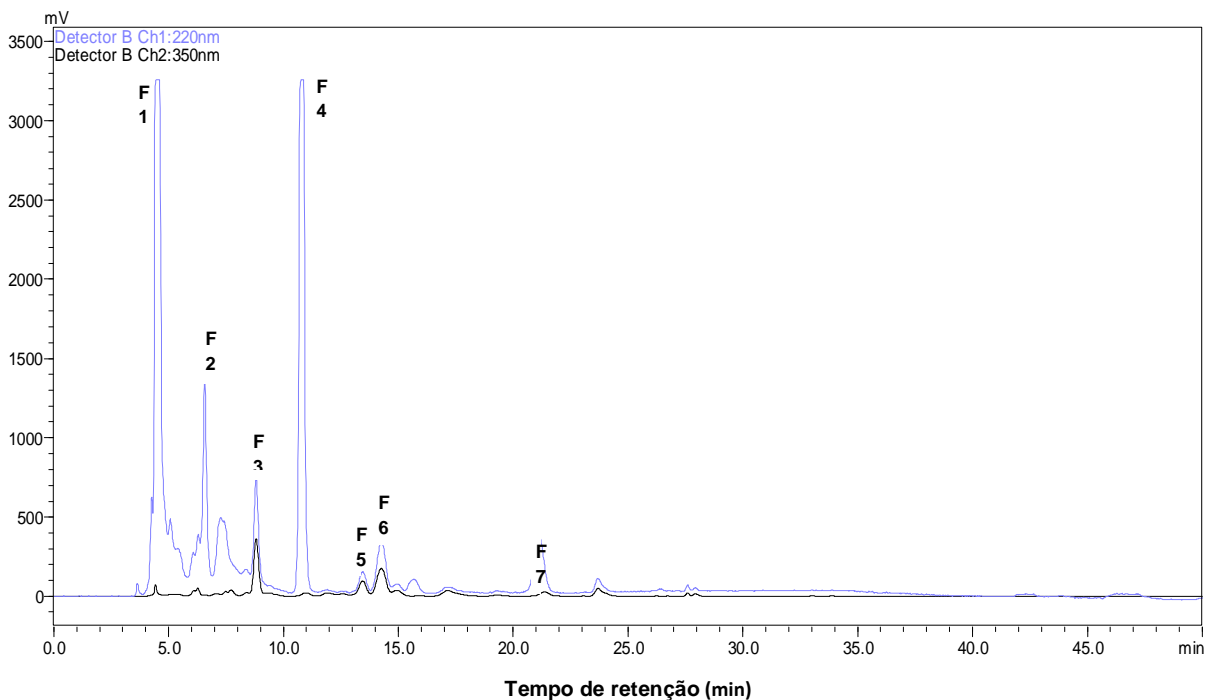


Figura 15 Cromatograma obtido em CLAE da Tintura-mãe de folha da planta hermafrodita (TMArFH): amostras F1 a F7, da espécie *S. terebinthifolius*, utilizando coluna C18 e sistema gradiente (0-100% de água: acetonitrila), com velocidade de fluxo (VF): 0,6 ml/min por 50 min.

Medidas de intervalo no tempo de retenção (t) entre 4,8 e 9,0 min., e no cromatograma da amostra, tintura mãe da folha (TMArFH) da planta hermafrodita (Figura 15), para os picos apresentados por F₁ (t~5,0), F₂ (t~6,8) e F₃ (t~8,85), permitiram sugerir a presença de compostos hidrofílicos, como catequinas, para um sistema de corrida inicial, de 80% de água ácida e 20% de acetonitrila. Estes

resultados foram respaldados pelo perfil cromatográfico por CCD para tintura de folhas e frutos (TMArF e TMArFr), com a detecção de uma zona cromatográfica sugestiva da presença de catequinas ($R_f \sim 0,81$).

A amostra F_4 apresentou tempo de retenção variando de 10,8 – 11,2 min, sugestivo para a presença de flavonóides glicosilados (como hesperidina, naringina e rutina), o que foi evidenciado por estudos de análise qualitativa por CLAE/UV, da tintura de *Calendula officinalis* L., utilizando o padrão rutina, detectou um tempo de retenção para este marcador da classe dos flavonóis, de $t = 11,33$ (NUNES et al., 2009). Contudo, os resultados e o perfil comparativo com outros estudos, ainda não nos permite associar a um constituinte químico específico.

O cromatograma desenvolvido para tintura-mãe de frutos da planta hermafrodita (TMArFrH), detectou grupos metabólicos, aqui identificados como Fr_1 a Fr_5 , com tempo de retenção (t), variando de 2,8 a 30,5 min, de um modo geral sugestivo para compostos fenólicos (Figura 16).

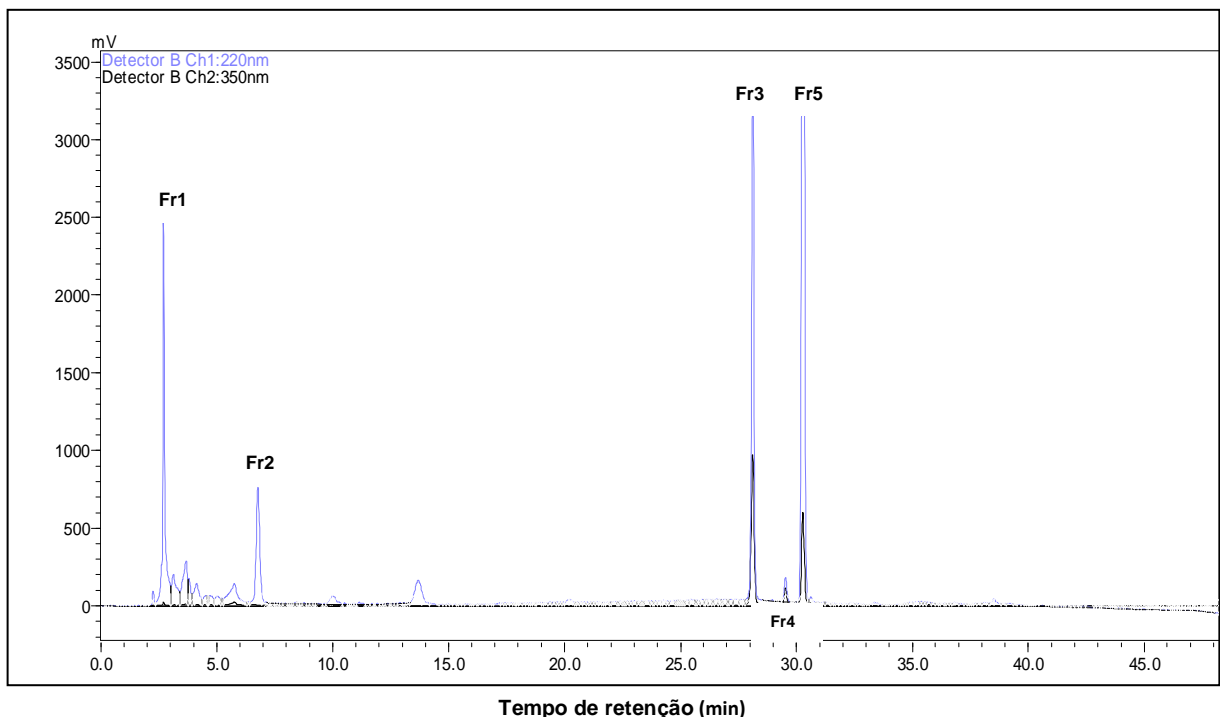


Figura 16 Cromatograma obtido em HPLC da Tintura-mãe do fruto da planta hermafrodita (TMArFH), amostras Fr_1 a Fr_5 , da espécie *S terebinthifolius*, utilizando coluna C18 e sistema gradiente (0-100% de água: acetonitrila), com velocidade de fluxo (VF): 0,6 ml/min por 50 min.

A faixa do tempo de retenção para a corrida de 50 min. foi maior que a apresentada no cromatograma de folhas, até porque após o $t = 30$ min. a 50min., a fase móvel tem como solvente somente a acetonitrila, proporcionando um meio de caráter apolar e permitindo a eluição de substâncias também de caráter apolar. As amostras, Fr₃ e Fr₄, apresentaram tempo de retenção variando numa faixa de 27,5 – 28,1 min. e 29,4 – 29,6 min., respectivamente (Figura 16). Considerando as propriedades físico-químicas apresentadas, para a fase móvel e para a estacionária, com uma característica de apolaridade e os tempos de retenção apresentados, sugerimos que, estes grupos metabólicos pertençam à classe das flavonas (possivelmente, as geninas, como a luteolina e a apigenina).

Resultados similares foram apresentados por Degáspari e colaboradores (2004; 2005), com relação à análise de CLAE, verificou-se que a amostra obtida a partir do extrato alcoólico de frutos da *S. terebenthifolius*, apresentou a presença da flavona apigenina (quatro picos) nos tempos de retenção de 25 a 27 minutos, o que justifica a sua coloração amarelada. Os quatro picos de apigenina são em tempo de retenção diferentes, devido ao fato de estarem ligadas a açúcares distintos ou em posições diferentes. Apresentou também um pico de ácido elágico no tempo de retenção de 14 min.

Medidas de tempo de retenção (t) acima de 27 min., no cromatograma de frutos (Figura 16), para os picos apresentados por Fr₃ ($t \sim 27,8$), Fr₄ ($t \sim 29,5$) e Fr₅ ($t \sim 30,3$), poderiam sugerir a presença de saponinas e de heterosídeos cardiotônicos (caracterizada pela presença de esteroides e triterpenoides); presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis), galotaninos (união entre unidades de ácido gálico via ligações meta-depsídicas) e taninos do ácido elágico.

Considerando os resultados apresentados, fatores físico-químicos poderiam ter influenciado na separação cromatográfica dos constituintes majoritários da aroeira por CLAE, os quais dependem da natureza química dos grupos metabólicos separados, como grupos fenólicos da espécie *S. terebinthifolius*. Variações nas características físico-químicas apresentadas pela material, vegetal são principalmente em decorrência da polaridade do extrato vegetal, da composição e

vazão da fase móvel escolhida, da composição e área superficial da fase estacionária (BACCHI, 1996; FARIAS, 2010; RENGER, 2000).

Quanto aos fatores físico-químicos para flavonoides, fica uma observação importante em relação à solubilidade, que pode ter influenciado sobremaneira nos resultados dos cromatograma por CLAE. Enquanto os heterosídeos são geralmente solúveis em água e em álcoolis diluídos, mas insolúveis nos solventes orgânicos habituais, as respectivas agliconas são normalmente solúveis em solventes orgânicos apolares (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; LIEBERMAN; LACHMAN; SCHWAZTZ, 1990). As flavonas e os flavonóis são pouco solúveis em água, enquanto os di-hidroflavonóis são mais solúveis (3-hidroxi flavanos (catequinas) e os 3,4- flavanodióis). As hidrólises, alcalina e ácida facilitam a identificação dos núcleos flavônicos (COSTA, 2001; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

4.2.3.3 Perfil por CLAE e identificação de constituintes químicos em extratos de *S. terebinthifolius*.

A análise por CLAE confirmou a presença de constituintes químicos no extrato bruto etanólico (EXT) do fruto da espécie *S. terebinthifolius* (Figuras 17 a 19), respaldando a presença de grupos fenólicos, especificamente flavonóides, sugeridos em análise anterior por CLAE da amostra, TMArFrH, também do fruto da aroeira.

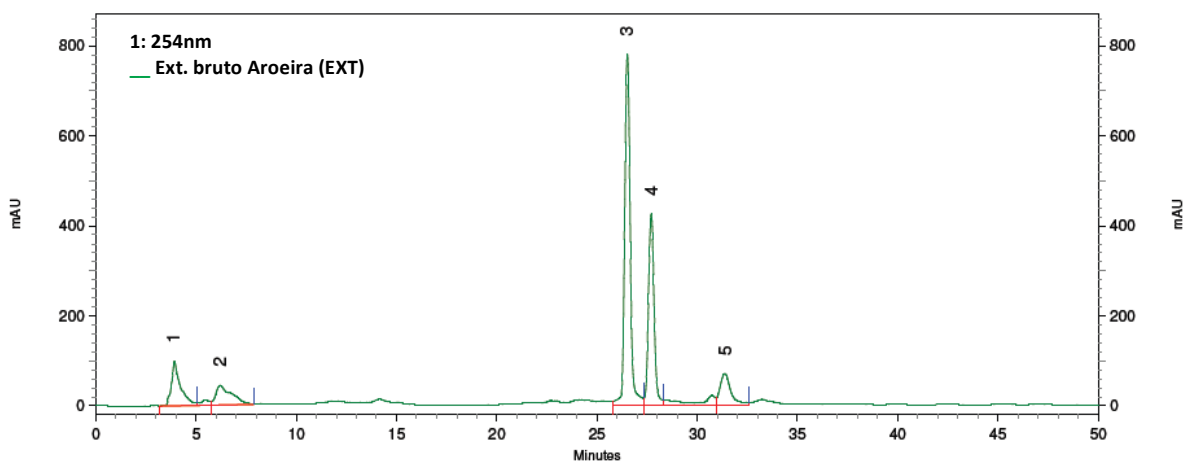


Figura 17 Cromatograma obtido em CLAE/HPLC do Extrato bruto do fruto (EXT) da espécie *S. terebinthifolius*, utilizando coluna C18 e sistema gradiente (0-100% de água/ácido fórmico (0,05%): metanol), com velocidade de fluxo (VF): 0,7 ml/min por 50 min. Canal 1: 254nm, 8nm.

O extrato bruto etanólico do fruto da aroeira (EXT) foi submetido à análise por CLAE/UV, no canal de 254nm e 365nm, com o objetivo de confirmar a presença de grupos dos flavonóides, especificamente, flavonas e flavanonas, presentes nas análises por CCD e CLAE de TMs de folhas e frutos da espécie. O cromatograma, no canal de 254nm (Figura 17) revelou a presença de dois picos majoritários com tempos de retenção (t) de 26,52 e 27,71 minutos e o cromatograma no canal 365nm, confirmou a presença do pico majoritário, ainda em 26 minutos (Figura 18).

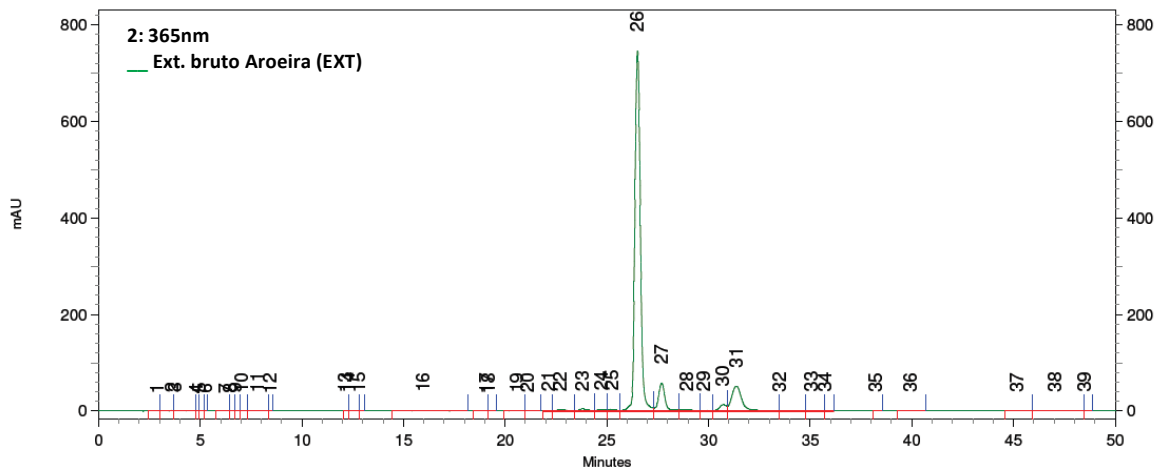


Figura 18 Cromatograma obtido em CLAE/HPLC do Extrato bruto do fruto (EXT) da espécie *S terebinthifolius*, utilizando coluna C18 e sistema gradiente (0-100% de água/ácido fórmico (0,05%): metanol), com velocidade de fluxo (VF): 0,7 ml/min por 50 min. Canal 2: 365nm, 8nm.

A análise dos espectros UV, dos dois picos majoritários demonstrou um perfil característico do núcleo flavona e flavanona (Figura 19), indicativo para o grupo dos biflavonoides.

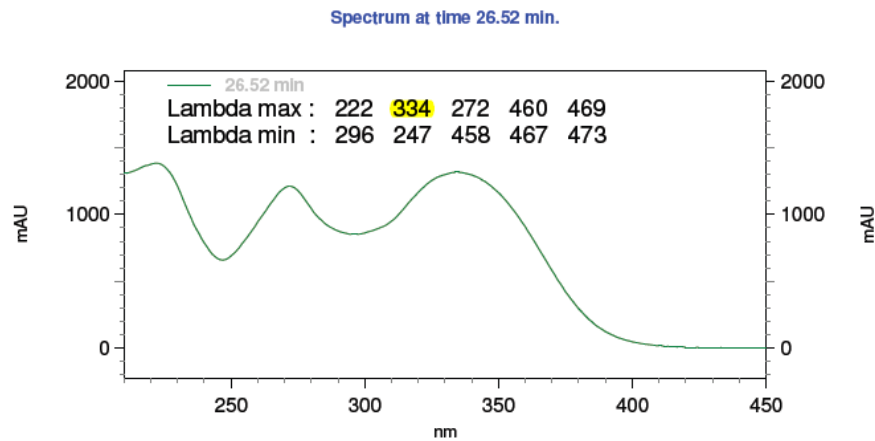


Figura 19 Espectro UV do pico com tempo de retenção de 26,52 minutos.

O pico 3 na Figura 17 (Canal 1: 254nm), no tempo de retenção de 26,52 minutos, correspondendo ao tempo de retenção do pico aos 26 minutos da Figura 18 (Canal 2: 365nm), permitiu inferir a presença de dois importantes biflavonóides, a biflavona, Agathisflavona (Figura 20) e no pico foi detectada a presença da biflavanona, Tetrahydroamentoflavona (Figura 21).

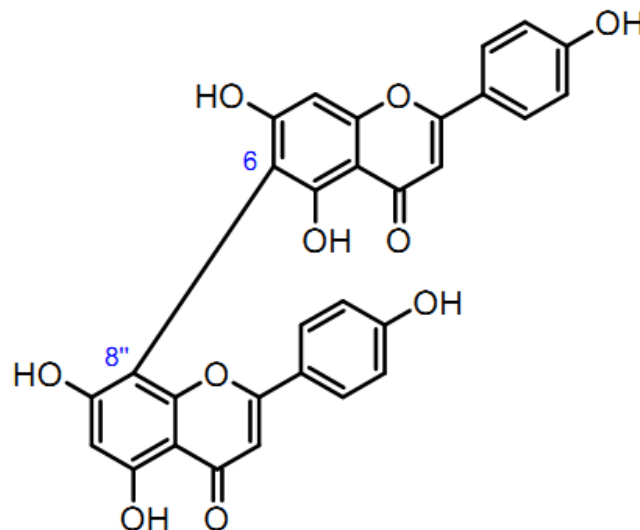


Figura 20 Agathisflavona representando a classe de biflavonoides com acoplamento do tipo 6-8''.
Fonte: OLIVEIRA (2012).

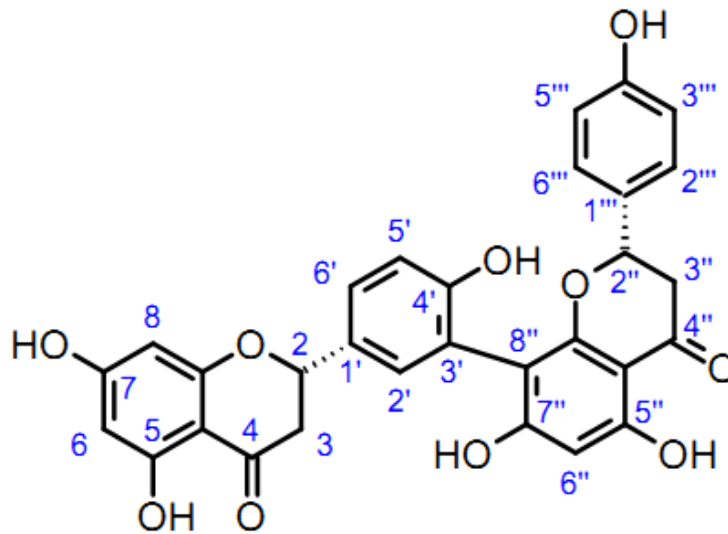


Figura 21 Estrutura da (2S,2'S)-2,3,2'',3'' – tetrahydroamentoflavona. Fonte: OLIVEIRA (2012).

A identificação foi respaldada por Oliveira (2012), que realizou o processo de isolamento e purificação do extrato bruto etanólico dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius*), permitindo o isolamento a partir da fração acetato de etila, destes dois biflavonoides que foram devidamente identificados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

Dentro da classe dos flavonoides, os biflavonoides são encontrados com mais frequência nas plantas da família Anacardiaceae (CORREIA et al., 2006), na qual está inserida a espécie *S. terebinthifolius*. Apesar disso seu papel biológico não é claro. A função mais importante seria a de agir como antifúngico ou alimento dissuasivo para insetos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010).

Dentro desta família e comprovando a presença de biflavonóides, como presença responsável pela atividade biológica, o gênero *Rhus* é o maior da família Anacardiaceae. Estudos fitoquímicos também demonstraram a presença da flavona, agatisflavona e amentoflavona, dentre outros. Na medicina tradicional, algumas espécies do gênero *Rhus* são usadas como antimicrobianos ou mesmo por suas propriedades citotóxica e inseticida (AHAMED et al., 2001; CORREIA et al., 2006). Entretanto, espécies deste gênero também são conhecidas por provocarem

dermatite alérgica de contato (DAC) muito severa, contraída por manuseio ou ingestão de partes das plantas (CORREIA et al., 2006).

O biflavonóide, tetrahydroamentoflavona, detectado no fruto da aroeira, teve também sua presença comprovada, na semente (rica em biflavonóides) da espécie *Semecarpus anacardium* L., pertencente à família Anacardiaceae, sendo considerado o principal componente responsável pela atividade antiinflamatória desta espécie (AHAMED et al., 2001; CORREIA et al., 2006). O ginkgo (*Ginkgo biloba* L., família Ginkgoaceae), uma das plantas medicinais mais estudadas mundialmente, por sua atividade antioxidante, é uma mistura complexa padronizada com teor de 24% de flavonóides e 6% de terpenos, os quais são considerados os principais constituintes ativos, destacando-se glicosídeos flavônicos (flavonóides e bioflavonóides), lactonas terpênicas (ginkgolídeos A, B, C; bilabolídeo) (SUZUKI, 2002).

Espécies da família Anacardiaceae, de outras famílias, com registros de presença de metabólitos secundários, da classe de flavonóides, como os biflavonóides, estão envolvidas com atividades distintas. Entretanto a atividade antioxidante associada a propriedades antimicrobianas induz a sugerir que estes metabólitos em concentrações ideais, em relação aos substratos oxidáveis (como radicais livres), inibem ou atrasam significativamente os processos oxidativos podendo ser divididos em enzimáticos, solúveis, nutricionais e sequestradores de metais de transição (VICENTINO; MENEZES, 2007).

As amostras neste estudo são do mesmo genótipo da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, pertencente ao grupo de plantas coletadas em fevereiro e maio de 2012, no município de Pedro Canário – ES e serviram de ponto de partida para obtenção das TM e dos Extratos das folhas e frutos de genótipos da espécie e para os testes realizados no nosso trabalho.

5 CAPITULO 2

CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE AROEIRA (*SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI).

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de obtenção de insumos bioativos foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade Brasileira- Univix, em Vitória- ES e para identificação de seus constituintes químicos, Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN)/UFRJ).

5.1.1 Material vegetal

Frutos (maduros) e folhas frescas, de diferentes genótipos da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, foram coletados no município de Pedro Canário (latitude: -18° 01' 49"; longitude: -40° 09' 02") – ES, Brasil, em maio de 2011 (por técnicos do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensões Rurais (Incaper) e identificadas a partir dos frutos como, FRAR (FR01 a FR07) e, das folhas FAR (F01 A F04). A identificação da espécie botânica foi realizada pelo Prof. Marcelo Simonelli Filho (IFES- Vitória, ES) e um exemplar desta espécie (exsicata) encontra-se no herbário do Museu de Biologia Mello Leitão, devidamente catalogado e registrado sob o nº 41895.

5.1.2 Obtenção do Óleo Essencial (OE) a partir de frutos e folhas *S. terebinthifolius*.

O óleo essencial (OE) foi obtido por hidrodestilação, a partir de frutos e folhas frescas, utilizando o aparelho de Clevenger (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; RENGER, 2000; SHARAPIN et al., 2000), durante 4 horas de aquecimento (mantido na temperatura mínima necessária à ebulição), em circuito fechado, para evitar as perdas de óleo por evaporação. Previamente à extração, as amostras, contendo os frutos de aroeira, FRAR (FR01 a FR07), foram trituradas com água purificada. A

mistura triturada foi colocada no balão volumétrico juntamente com água, e aquecida até a ebulição. O mesmo procedimento foi executado para as amostras das folhas da aroeira, FAR (F01 A F04). Ou seja, as amostras foram colocadas em balão volumétrico juntamente com água, e aquecida até a ebulição e mantidas por 4 horas de aquecimento (mantido na temperatura mínima necessária à ebulição). Assim, os óleos foram carregados com o vapor d'água e posteriormente condensados. Após o tempo de extração, o óleo essencial (OE) de cada amostra, junto com a água, foi recolhido no funil de separação, onde foram separados por decantação devido à diferença de densidades. O OE obtido foi armazenado em recipiente hermeticamente fechado e mantido sob refrigeração a 5°C até a utilização nas análises.

5.1.3 Identificação dos constituintes químicos do OE

A composição química dos óleos essenciais foi obtida em análises de amostras de OEs da aroeira, por Cromatografia de fase gasosa (CG) e Cromatografia em fase gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM), segundo literatura consultada (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; ADAMS, 2001), utilizando cromatógrafo a gás (HP6890) acoplado a espectrômetro de massa (HP5973, operando a 70 eV), coluna ZB5-MS (Zebron) com fase estacionária de 5% fenilmetilsiloxano, comprimento de 30m, diâmetro interno 0.25mm, espessura da fase 0.25 micrômetros, com a seguinte condição de análise: injetor na temperatura 260°C, interface na temperatura 200°C e programação 60°C a 290°C, numa rampa de 3°C/min. O gás carreador foi o hélio, com pressão constante de 5 psi, fluxo de 1ml/min. Padrões de n-alcanos foram injetados nas mesmas condições da análise. A identificação dos constituintes químicos das amostras foi realizada por comparação de seus espectros de massas das substâncias eluídas, com aqueles presentes em biblioteca NIST 05 e através do índice de Kovats (KI) calculado a partir da série de n-alcanos (de C7- C30) (ADAMS, 2001).

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Obtenção e identificação dos constituintes químicos do Insumo OE

A extração do OE a partir de frutos e folhas da espécie *S. terebinthifolius*, por hidrodestilação mostrou-se eficaz, o que condiz com a literatura consultada, para escolha de métodos (BARBOSA et al., 2007).

Os principais constituintes químicos, dos Óleos Essenciais (OE) foram identificados pelos índices de retenção (IK) e por comparação dos espectros de massas dos constituintes do óleo com os espectros do banco de dados existentes na biblioteca NIST, com os dados disponíveis na literatura (ADAMS, 2001). A análise comparativa dos óleos essenciais permitiu a identificação e quantificação, principalmente pela concentração relativa total de monoterpenos presentes nos frutos (maduros) e folhas frescos (Figura 22).

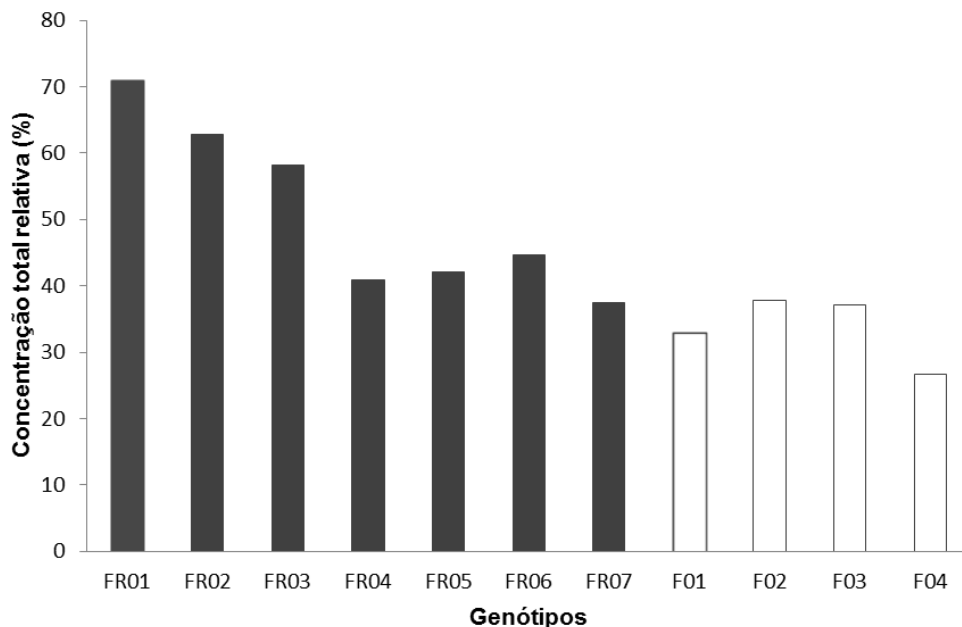


Figura 22 Concentração relativa total de monoterpenos em óleos essenciais (OE) obtidos de frutos (FR01 a FR07) e folhas (F01 a F04) de diferentes genótipos de *Schinus terebinthifolius*.

Na figura 22, observamos que a concentração de monoterpenos nas amostras de OE de frutos (média de 51,0%) foram maiores quando comparadas aos teores apresentados pelas amostras de OE de folhas (média de 33,60%). Estudo comprobatório realizado, sobre a variação sazonal do óleo essencial a partir de frutos (maduros) e folhas frescas da aroeira (*S. terebinthifolius*) mostrou um maior teor de metabólitos secundários sesquiterpênicos em folhas (90,40%) do que em frutos (78,00%) e em contrapartida, foi identificada uma predominância monoterpênica em frutos de 90,0% (BARBOSA et al., 2007). O período de floração ou frutificação da planta acarreta um aumento ou diminuição de monoterpenos e de sesquiterpenos. Monoterpenos se encontram em maior concentração nos frutos, o que sugere que o metabolismo de classes metabólicas possa estar interligado (SIMÕES; SPITZER, 2010), ou seja, um aumento no teor de monoterpenos é acompanhado de uma diminuição no de sesquiterpenos, e vice-versa.

Foram detectadas diferenças, na concentração de monoterpenos, entre as 11 amostras de OE, apresentando maior rendimento para os óleos obtidos a partir dos frutos: FR01 (70,85%), FR02 (62,77%), FR03 (58,15%), FR04 (40,96 %), FR05 (42,14%), FR06 (44,64%) e FR07 (37,45%), do que a partir das folhas: F01 (32,82%), F02 (37,85%), F03 (37,08%) e F04 (26,60%) (Figura 22).

Todas as amostras de OE de frutos e folhas apresentaram, em diferentes concentrações, os monoterpenos D-limoneno, α -pineno, *p*-cimeno e β -mirceno. Foi possível identificar todos os nove monoterpenos nas amostras de OE a partir dos frutos, FR02 e FR03, onde foi detectado um alto teor relativo de β -mirceno (26,73% e 26,03%, respectivamente). A amostra de OE a partir de frutos da aroeira, FR01, apresentou o maior percentual relativo de D-limoneno (36,85%) e representou a amostra de maior teor relativo de monoterpenos (70,85%). O menor rendimento para concentração relativa total de monoterpenos foi detectada na amostra F04 (26,6%).

A variabilidade dos constituintes químicos majoritários nas amostras da espécie estudada sugere o envolvimento de fatores genéticos, geográficos e do *habitat* ou sistema de cultivo das plantas (Tabela 12).

Tabela 12 Concentração relativa (%) dos principais monoterpenos identificados pela análise do OE de *Schinus terebinthifolius*, por Cromatografia em fase gasosa (CG) e Cromatografia em fase gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM).

Monoterpenos e Concentrações relativas (%)										
OE ¹	TOTAL	α -PIN	β -PIN	β -MIR	α -PHE	β -PHE	3-CAR	P-CIM	D-LIM	α -TER
FR01	70,85	4,32	-	7,36	15,17	-	-	6,19	36,85	0,96
FR02	62,77	2,30	2,65	26,73	7,59	2,78	3,69	4,86	11,21	0,96
FR03	58,15	1,98	1,86	26,03	6,64	2,49	3,44	4,56	10,32	0,83
FR04	40,96	5,80	-	2,85	3,57	-	2,02	5,53	21,19	-
FR05	42,14	2,56	-	3,05	-	-	14,63	3,59	18,31	-
FR06	44,64	5,79	-	3,53	-	3,57	17,46	5,75	8,54	-
FR07	37,45	9,33	1,00	2,75	7,65	1,88	-	8,20	6,64	-
F01	32,82	1,49	-	1,91	-	-	13,94	2,75	12,25	0,48
F02	37,85	3,34	-	2,80	4,92	-	2,08	8,46	16,25	-
F03	37,08	1,10	-	17,93	2,34	1,11	3,31	4,91	6,39	-
F04	26,60	4,35	0,53	2,21	7,00	1,29	-	5,80	4,68	0,65

¹ Amostras (OE): Óleo Essencial: **FR01 A FR07: OE** Fruto da Aroeira; **F01 A F04: OE** Folha da Aroeira.

² α -PIN: α -pineno; β -PIN: β -pineno; β -MIR: β -mirceno; α -PHE: α -felandreno; β -PHE: β -felandreno; 3-CAR: 3-careno; P-CIM: P-cimeno; D-LIM: D-limoneno; α -TER: α -terpinoleno. Traços (-): ausência.

Entre os principais monoterpenos identificados (Figura 23) pela análise cromatográfica (CG/EM) nos OE de frutos e folhas da aroeira, destacaram-se, pelo maior percentual de concentração relativa, em amostras de frutos: o (8) D- limoneno (36,85%), o (3) β -mirceno (26,73%), o (6) δ 3-careno (17,46%), o (4) α -felandreno (15,17%) e o (1) α -pineno (9,33%) e em amostras de folhas: o (7) p.cimeno (8,43%). Os monoterpenos, (2) β - pineno, (5) β - felandreno e (9) α -terpinoleno apresentaram-se em concentrações inferiores a 4%, sendo que α -terpinoleno foi o monoterpeno de menor teor relativo detectado em algumas amostras.

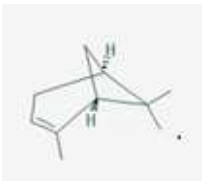
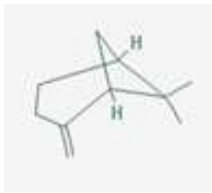
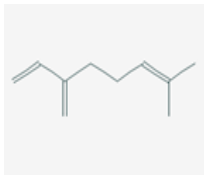
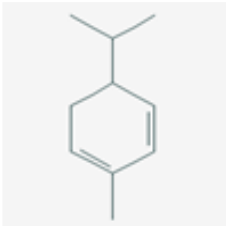
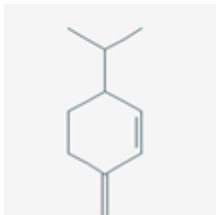
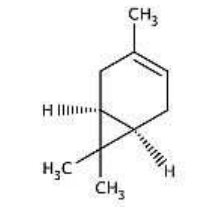
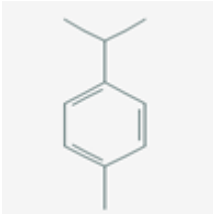
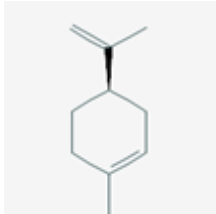
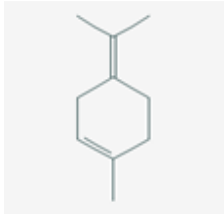
Constituinte	Estrutura	Constituinte	Estrutura	Constituinte	Estrutura
α -Pinoeno (1) $C_{10}H_{16}$		β -Pinoeno (2) $C_{10}H_{16}$		β -Mirceno (3) $C_{10}H_{16}$	
α -Fellandreno (4) $C_{10}H_{16}$		β -Fellandreno (5) $C_{10}H_{16}$		δ 3-Careno (6) $C_{10}H_{16}$	
<i>p</i> -Cimeno (7) $C_{10}H_{16}$		D-Limoneno (8) $C_{10}H_{16}$		α -Terpinoleno (9) $C_{10}H_{16}$	

Figura 23 Estruturas monoterpênicas presentes em óleos essenciais de frutos e folhas de *Schinus terebinthifolius*. (Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi>).

Além da variabilidade química entre o OE de cada amostra, a variação do teor de constituintes monoterpênicos do OE de um mesmo exemplar, gerou uma constatação no mínimo intrigante. O alto teor relativo apresentado pelo D- Limoneno, tanto no OE de frutos como de folhas de *S. terebinthifolius*, coincidiu com um decréscimo (ou até mesmo nulidade) na produção de α -terpinoleno, sugerindo que o metabolismo, devido a notável semelhança estrutural molecular (posição da dupla ligação na “cauda isoprênica”) entre os dois constituintes monoterpênicos monocíclicos (Figura 23) poderia estar interligado, ou seja, um aumento na produção de um deles, demandada por fatores bióticos ou abióticos, acarretaria na diminuição na produção de outro, considerando a via metabólica de síntese do constituinte químico.

Segundo Thaiz e Zaiger (2009), a variação química qualitativa e quantitativa de constituintes é determinada geneticamente (quimiotipos), sendo geralmente

específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento. Entretanto as variações significativas na concentração relativa total de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente, de acordo com a época da coleta, condições climáticas e de solo (SOUZA, 2012; TAIZ; ZAIGER, 2009), sugerindo que o teor do óleo essencial seria mais influenciado pelas condições ambientais do que pela composição química do óleo.

A diferenciação genética refere-se à distribuição da variabilidade entre e dentro de populações e subpopulações naturais como resultado da ação de forças evolutivas que atuam dentro do contexto de cada espécie. A diversidade genética promove a matéria prima para a adaptação, a evolução e a sobrevivência dos indivíduos e das espécies, sendo fundamental para a sustentabilidade do ecossistema para sua conservação (SOUZA, 2012).

A variabilidade química, quanto à concentração relativa dos constituintes majoritários identificados nas nossas amostras do óleo essencial de genótipos da espécie *S. terebinthifolius*, foi evidenciada em relatos de outros estudos envolvendo a espécie, em diferentes estados do território nacional.

Roveda et al. (2009) identificaram 18 constituintes químicos com predominância de monoterpenos de óleos de frutos coletados em Dourados (MS), destacando-se como majoritário o α -pineno (22,56%), sendo que os demais constituintes em maiores concentrações foram o sabineno (15,78%), z-salveno (10,69%), β -pineno (10,52%), α -funebreno (8,82%) e o limoneno (5,52%).

No estudo de Barbosa et al. (2007), após extração de 3 horas, foram identificados como monoterpenos predominantes em óleo de folhas e frutos na cidade de Viçosa (MG), o δ 3-careno (5,82%), o α - felandreno (2,88%), o β - felandreno (4,49%) e o 4-terpeniol (2,24%). Gehrke et al. (2008), observaram que os principais compostos encontrados no óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul foram os monoterpenos, δ 3-careno e o α -pineno representando aproximadamente 40% dos constituintes.

Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com a predominância, do monoterpeneo Limoneno, na maioria dos estudos com aroeira. De acordo com estudos de Santos et al. (2007), a composição química do óleo essencial dos frutos maduros de *S. terebinthifolius* da cidade de Caxias do Sul (RS), constituiu de 17 constituintes, destacando em maior proporção os monoterpeneos, o δ -3-careno, o D-limoneno e α -phellandreno com 60,41% do total de compostos identificados. Estudo a partir da análise por CG/MS, do óleo essencial de frutos (imaturos e maduros) coletados da espécie *S. terebinthifolius* em uma região da mata atlântica de Pernambuco, identificou principalmente monoterpeneos em frutos maduros, tendo como constituinte majoritário, o limoneno (31,8%), seguido por α -phellandreno (11,9%), thujeno (21,7%) e sabineno (15,8%).

Estudos (Barbará et al., 2008), evidenciaram a predominância monoterpênica de constituintes químicos no OE de frutos da espécie *S. terebinthifolius*, nativa do estado do Espírito Santo e identificaram a presença de 10 monoterpeneos no OE de frutos de uma exemplar da região Sul do estado, entre eles o α -pineno (35,6%) como composto majoritário, seguido do D-limoneno (28,9%).

Outro estudo recente (AFFONSO et al., 2012), com espécie *S. terebinthifolius*, no estado do ES, numa região próxima ao município de Pedro Canário, onde realizamos a coleta do nosso material vegetal (folhas e frutos), apresentaram evidência da presença majoritária do limoneno, por cromatografia em fase gasosa. Os autores identificaram a presença de β -pineno (10,11%), β -mirceno (9,30%), α -phellandreno (14,94%), limoneno (20,81%) e isosilvestreno (13,87%), como os principais constituintes químicos monoterpênicos do OE a partir de frutos de uma exemplar obtida na Reserva Florestal Rio Doce S/A, Linhares (latitude: -19° 23' 28"; longitude: -40° 04' 20")- ES.

Foi possível observar que, na literatura consultada sobre composição do óleo essencial da espécie *S. terebinthifolius*, há uma predominância dos constituintes monoterpênicos, δ 3-careno e/ou pineno, intercalando em alguns trabalhos, com α -phellandreno e mirceno. Entretanto nos estados de Pernambuco e no outro extremo, Rio Grande do Sul, os resultados para a predominância de limoneno foi a mesma,

sendo que em Recife (mata atlântica) não houve o registro da presença de δ 3-careno e/ou α -pineno, tão comumente apresentados em outros estudos.

Os estudos que utilizaram espécies nativas de *S. terebinthifolius* do Espírito Santo, identificaram principalmente para amostras de OE de exemplares da espécie, uma predominância monoterpênica, não somente para o Δ 3-careno, mas também, o D-limoneno, o β -mirceno e o α -felandreno e o α -pineno.

Os diferentes resultados com predomínio de diferentes compostos no óleo essencial obtido a partir de exemplares de uma mesma espécie (quimiotipos) é frequentemente devido à alta complexidade química dos óleos essenciais (ROVEDA et al., 2010; SANTOS et al., 2007). Entretanto existe um consenso entre estudos realizados com a espécie *S. terebinthifolius*, quanto à predominância monoterpênica nos óleos essenciais, principalmente provenientes da extração de frutos da espécie estudada.

Como os metabólitos de defesa das plantas, em resposta a fatores bióticos e abióticos são, em grande parte, ativados a partir de tais eventos (TAIZ; ZAIGER, 2009), foi observada neste estudo, uma variação química significativa na composição química do óleo essencial, extraído de frutos e folhas da espécie *S. terebinthifolius*. Existem quimiotipos bem definidos para cada região de coleta, principalmente aqui caracterizados pelos seus constituintes químicos majoritários, identificados no OE da amostra analisada da espécie *S. terebinthifolius*. Ficou evidenciado um possível Quimiotipo (QT), na planta fêmea FR01, que deve ser estudado no futuro, quanto à produção de limoneno como um potencial produtor de insumos ativos para o desenvolvimento de produtos bioativos fitoterápicos.

Foi de suma importância o registro da presença majoritária do limoneno (1-metil-4-isopropenilciclohex-1-eno) no óleo essencial do genótipo FR01 (identificada por técnicos do Incaper, como uma planta fêmea), pois este monoterpeneo, com caráter lipofílico, naturalmente encontrado nas cascas das frutas cítricas e de alguns pinheiros, tem adquirido uma importância fundamental devido a sua demanda como solvente biodegradável, precursor de novos fármacos (como a carvona) e na

indústria farmacêutica e alimentícia, como adjuvante flavorizante e complemento alimentar (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; LACHMAN et al., 2001).

Suplementos ou complementos alimentares (Nutracêuticos) estão ganhando reconhecimento substancial como agentes quimioprolifáticos (quimiopreventivos), devido a sua capacidade de atuar através de diversos mecanismos (PAN AND HO, 2008). Estudos (ATOUI et al, 2005; MILLER et al., 2011; MURTHY et al., 2012; QUEIRES *et al.*, 2006) se referem ao Limoneno como um produto bioativo natural, visto que ensaios comprovam sua eficácia como substância antioxidante com potencial quimioprolifático.

Entre os constituintes voláteis de óleos cítricos e de outras plantas em potencial, como foi apresentado neste estudo pela espécie *S. terebinthifolius* Raddi, a presença predominante do monoterpene limoneno e a possibilidade de desenvolvimento de seus metabólitos ativos (ácido, aldeído e álcool perílico), evidencia a vantagem farmacológica de apresentar modelos de indução de citotoxicidade de células cancerígenas (MILLER et al., 2011), por mecanismos multifatoriais (entre eles, o uso de tensoativos/surfactantes) e estimula estudos de pesquisa e desenvolvimento de agentes quimioterapêuticos fitoterápicos.

6 CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO *IN VITRO*, DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA TINTURA-MÃE (TM) DE DIFERENTES GENÓTIPOS DA ESPÉCIE DA AROEIRA (*SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI).

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (Núcleo de Biotecnologia) da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES e no Laboratório oficial de Tecnologia Farmacêutica da Emescam, em Vitória- ES.

6.1.1 Material vegetal

6.1.1.1 Preparação de Tintura-mãe (TM) e obtenção de insumos bioativos

As Tinturas-mãe (TM), a partir de folhas e frutos da *S. terebinthifolius* Raddi, foram preparadas, por técnica de maceração (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011a), descrita no Capítulo 1. As tinturas-mãe (TM's) de cada genótipo, foram identificadas a partir de folhas da planta hermafrodita (TMArFH), fêmea (TMArFF), e macho (TMArFM) e de frutos, da planta hermafrodita (TMArFrH) e de duas amostras da planta fêmea (TMArFrF1 e TMArFrF2), foram utilizadas na avaliação da atividade antioxidante.

6.1.1.2 Preparação da Solução Teste de Tintura Mãe (STTM)

Uma alíquota de 10 mL, de cada TM, foi levada ao Banho Maria (95° a 105°C), por 40 a 60 min, para evaporação do EtOH. Após evaporação do solvente, o resíduo foi reconstituído em qsp de EtOH (PA), para formar 10mL de soluções de cada TM, nas concentrações de, 25, 75, 125 e 250µg/ mL. Cada STTM foi acondicionada em vidro âmbar de 5,0mL de capacidade (devidamente identificados e mantidos ao abrigo de luz e calor), até utilização nos testes de avaliação antioxidante.

6.1.2 Avaliação, *in vitro*, da atividade antioxidante, pelo método do DPPH

6.1.2.1 Solução de DPPH 0,3 mM

Foram dissolvidos 0,0118g de DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl- Sigma® Aldrich Inc.) em EtOH e completado o volume para 100 mL em um balão volumétrico com EtOH. A solução foi homogeneizada e estocada em frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado, em temperatura ambiente e utilizada no dia de realização do experimento.

6.1.2.2 Determinação da curva do DPPH

A partir da solução inicial de DPPH (0,3 mM), foram preparadas em tubos de ensaio de 5,0 mL, soluções variando a concentração de 0,03 mM a 0,3 mM, conforme Tabela 10. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de, aproximadamente, 4mL de cada solução de DPPH (0,03mM, 0,06mM, 0,12mM, 0,18mM, 0,24mM e 0,30mM) para cubetas de vidro e posterior leitura em espectrofotômetro (Biomate3 Thermospectronic®) a 517 nm. Foi utilizado o EtOH PA, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As concentrações de DPPH (mM) foram plotadas no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y, como o intuito de calcular a equação da reta e, por conseguinte, traçar a curva de calibração do DPPH (Tabela 13).

Tabela 13 Valores da solução DPPH¹ e etanol (EtOH) .

Sol. DDPH (mL)	EtOH (mL)	[DDPH] Final (mM)
0.0	5.0	0.00
0.5	4.5	0.03
1.0	4.0	0.06
2.0	3.0	0.12
3.0	2.0	0.18
4.0	1.0	0.24
5.0	0.0	0.30

¹DPPH: 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl.

6.1.2.3 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picrylhidrazil), de acordo com literatura consultada (VICENTINO; MENEZES, 2007; SOUSA et al., 2007; MENSOR et al., 2001), adaptado para cada TM. Foi preparada uma solução 0,3 mM de DPPH em etanol. As amostras, a base de STTM de *S. terebinthifolius* (folha e fruto) em diluições padronizadas, foram preparadas adicionando-se 1,0mL da solução de DPPH a 2,5 mL de soluções das TM's, diluídas em etanol (STTM) a concentrações de 25, 75, 125 e 250 µg/ mL. Nos brancos, ao invés do DPPH, adicionou-se apenas 1 mL de etanol às tinturas diluídas nas mesmas concentrações das amostras. Como controle positivo foi utilizada a amostra TM de *Ginkgo biloba* (Laboratório Almeida Prado- SP), que possui alta capacidade antioxidante. A solução de DPPH possui uma coloração roxa intensa e a ação antioxidante de uma tintura-mãe, na forma de solução de STTM, pode ser visualizada pelo progressivo “descoloramento” da solução, ao final do qual a mesma torna-se amarelada. Trinta minutos após a adição de DPPH às amostras, é feita a leitura em espectrofotômetro de Ultravioleta, UV-vis, Biomate3 Thermospectronic® 517 nm. Todas as leituras foram realizadas com três repetições e, com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorbância entre a amostra e o branco. Os valores de absorbância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela equação:

$$AA = 100 - (\Delta ABS / ABS_{cont} \times 100) \dots\dots\dots$$

onde:

AA = Atividade Antioxidante (%)^{*}.

ΔABS = é a diferença de absorbância entre a amostra e o branco;

ABS_{cont} = é o valor de absorbância encontrado para o controle.

* Porcentagem de atividade antioxidante para cada uma das concentrações após a média de três repetições.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 Determinação da curva de calibração do DPPH

A curva-padrão, construída com os parâmetros absorvância em UV (517 nm) e concentração (mM), apresentou linearidade e boa correlação com coeficiente de correlação de 0,997. O estudo da especificidade do método analítico foi avaliado pela adição da solução padrão do DPPH às amostras de TM da aroeira.

6.2.2 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante de cada TM da aroeira foi investigada, na forma de solução de tintura (STTM) pelo método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre estável, segundo literatura consultada, adaptado, para testes com TM (VICENTINO; MENEZES, 2007; SOUSA et al., 2007; MENSOR et al., 2001; TRIGUI et al., 2012). O tipo de solvente e a otimização da extração do material vegetal com a utilização de um polímero natural como adjuvante na obtenção da TM (a partir de folha e fruto da aroeira), determinou o potencial antioxidante dos insumos obtidos, uma vez que o comportamento estrutural e a bioatividade dos constituintes químicos presentes na TM dependem da diversidade de polaridades encontradas.

O ensaio fundamentou-se na propriedade do radical DPPH apresentar uma forte absorção no espectro visível, comprimento de onda de 517nm, caracterizado por uma coloração violácea intensa, devido à presença de elétrons livres (VICENTINO; MENEZES, 2007; SOUSA et al., 2007). Quando o DPPH foi colocado em presença de substâncias antioxidantes presentes nas amostras de cada TM, capazes de sequestrar radicais livres, a absorção foi inibida, resultando em uma descoloração estequiométrica em relação ao número de elétrons retirados e independente de qualquer atividade enzimática (SOUSA et al., 2007).

O grau de descoloração indicou a capacidade sequestradora de radical livre, por TM analisada. A ação antioxidante de cada tintura-mãe, na forma de STTM ($\mu\text{g/ml}$), foi visualizada pelo progressivo descoloramento da solução, ao final do qual a mesma torna-se amarelada (Figura 24).

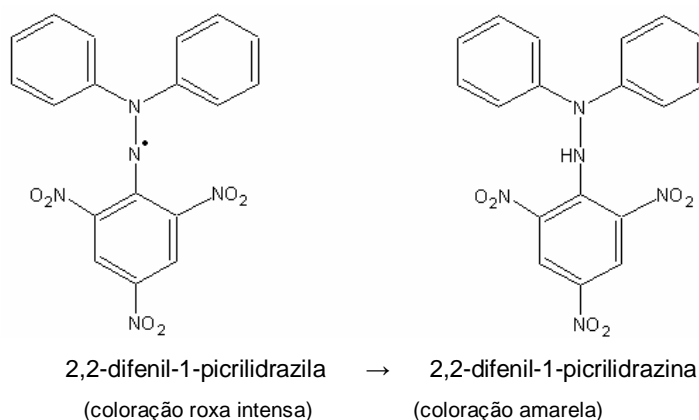


Figura 24 Estrutura do DPPH e reação antioxidante (indicando a capacidade sequestradora de radical livre).

Todas as leituras foram realizadas em comprimento de onda a 517nm, 30 minutos após a adição de DPPH às amostras e com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorbância entre a amostra e o branco e as atividades antioxidantes percentuais (MENSOR et al., 2001). Resultados apresentados, na tabela 14, representam o potencial de tinturas-mãe (de folhas e frutos) de *S. terebinthifolius*, na captação de radicais livres e indicaram uma forte atividade antioxidante para as TMs avaliadas. Foi observado que a atividade anti-radical livre apresentou-se proporcional ao aumento da concentração da TM na solução teste (dose dependente).

Tinturas-mãe da espécie *S. terebinthifolius* apresentaram uma porcentagem de atividade antioxidante (AA) variando entre 48,18% ± 0.012 a 59,09% ± 0.004, na presença de 250 µg/ml de TMArFrH e TMArFH, respectivamente. Na menor concentração avaliada, de 25 µg/ml, as tinturas-mãe apresentaram atividade antioxidante (variando de 26,82 a 31,70%) maior que o próprio controle positivo (24,39%), tintura-mãe de *Ginkgo biloba* (TMGb), com exceção da TMArFH, que apresentou a menor atividade (19,02%) (Tabela 14).

As amostras de tinturas a partir de folhas, TMArFF e TMArFM, na concentração de 75 µg/ml, apresentaram expressiva atividade, 43,75% e 35,44%, respectivamente, enquanto as amostras, TMArFrH e TMArFF2, não diferiram da TMGb, em relação a

atividade antioxidante (31,25%). Entretanto, TMGb foi a melhor resposta para atividade anti-radicalar em 125 µg/ml e 250 µg/ml (Tabela 14).

Tabela 14 Atividade antioxidante (%) de TMs de folhas e frutos da espécie *S. terebinthifolius*, obtida pelo método do radical estável DPPH, definida pelas médias e desvio padrão ($x \pm dp$).

TINTURAS-MÃE ¹	Avaliação Antioxidante (%) ²			
	25 µg/ml	75 µg/ml	125 µg/ml	250 µg/ml
TMGb²	24,39 ± 0.018	31,25 ± 0.010	71,42 ± 0.026	80,03 ± 0.008
TMArFH	19,02 ± 0.017	29,16 ± 0.005	52,01 ± 0.006	59,09 ± 0.004
TMArFF	31,70 ± 0.006	43,75 ± 0.068	54,76 ± 0.012	58,18 ± 0.015
TMArFM	26,82 ± 0.012	35,44 ± 0.021	50,03 ± 0.027	52,10 ± 0.010
TMArFrH	29,23 ± 0.014	31,25 ± 0.023	38,09 ± 0.016	48,18 ± 0.012
TMArFrF1	26,82 ± 0.015	29,16 ± 0.015	40,47 ± 0.027	49,09 ± 0.021
TMArFrF2	29,26 ± 0.012	31,25 ± 0.013	42,85 ± 0.014	50,90 ± 0.019

¹ **TMArFH**: TM Aroeira folha (planta hermafrodita); **TMArFF**: TM Aroeira folha (planta fêmea); **TMArFM**: TM Aroeira folha macho; **TMArFrH**: TM Aroeira fruto hermafrodita; **TMArFrF1**: TM fruto fêmea 1; **TMArFrF2**: TM fruto fêmea 2; **TMGb**: TM de *Ginkgo biloba*, nas mesmas concentrações que os extratos (Controle positivo).

² Porcentagem de atividade antioxidante para cada uma das concentrações após a média de três repetições.

A solução padrão (controle positivo), TM de *Ginkgo biloba* (TMGb), foi utilizada por sua alta capacidade como produto antioxidante (antiradicalar), pois possui alto teor de flavonóides e terpenos. O Extrato de *G. biloba* (EGb[®]), possui 24% de flavonóides e 6% de terpenos (SUZUKI, 2002), os quais são considerados os principais constituintes ativos e responsáveis pela reconhecida atividade antioxidante desta espécie (CAIEIRO; MARCUCCI, 2010; MENSOR et al. 2001).

Como a própria TMGb (padrão), as amostras de tinturas da aroeira (TMAr) apresentaram um comportamento diferenciado de acordo com a parte utilizada na preparação da TM, folha ou fruto, e decorrentes da composição química de cada insumo (TM), pela presença de constituintes majoritários com atividade antioxidante e do perfil de atividade em cada concentração testada (25 µg/mL, 75 µg/mL, 125 µg/mL e 250 µg/mL) (Figura 25).

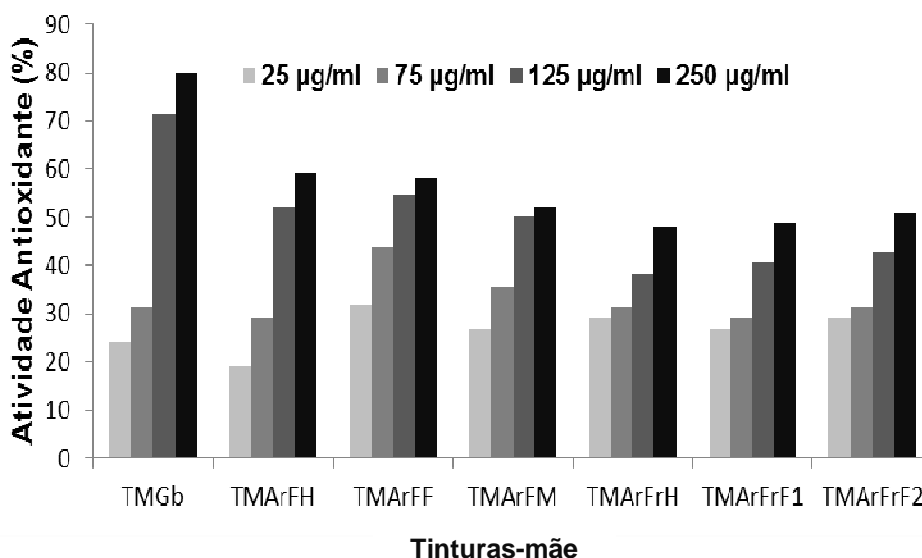


Figura 25 Porcentagem de atividade antioxidante de tinturas-mães (TM's) da espécie *S. terebinthifolius* de **TMGb**: TM *Ginkgo biloba*; **TMArFH**: tintura-mãe da Aroeira folha (planta hermafrodita); **TMArFF**: TM Aroeira folha (planta fêmea); **TMArFM**: TM Aroeira folha (planta macho); **TMArFrH**: TM Aroeira fruto (planta hermafrodita); **TMArFrF1**: TM Fr fêmea-1; **TMArFrF2**: TM Fr fêmea-2.

Em relação à capacidade sequestrante de radicais-livres, apresentada pelas tinturas-mãe de TMArFH (folha) e da TMArFrH(fruto), na menor concentração do experimento (25 µg/ml), a disponibilidade de substâncias para a captação de radicais livres no DPPH, foi maior para a TM preparada a base do fruto (AA= 29,23% ± 0,014) do que a da folha (AA= 19,02% ± 0,017), sendo que na maior concentração (250 µg/ml), a melhor resposta para a atividade ante radical livre, aconteceu para TM da folha, TMArFH (AA= 59,09% ± 0,004) em detrimento da menor atividade nesta concentração, para TMArFrH (AA= 48,18% ± 0,012). As demais amostras de TM, na concentração de 250 µg/mL, apresentaram atividade antioxidante superior a 50%, atingindo valores abaixo somente do controle positivo, TMGb, 80,03% ± 0.008 (Figura 25).

Estes resultados geraram uma hipótese de que, constituintes químicos antioxidantes, presentes nas tinturas-mães da *S. terebinthifolius*, e especificamente, em maior concentração, nas folhas (QUEIRES et al., 2006), contribuíram particularmente e mais efetivamente para a ação sequestradora de radicais livres, de acordo com sua estrutura química (SOUSA et al., 2007) e, por conseguinte, sua disponibilidade de captação destes radicais (HASLAM, et al., 1996; SOUSA et al.,

2007), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente à sua estrutura química (SOUSA et al., 2007), podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais). Alguns estudos *in vitro* demonstram que a atividade antioxidante dos flavonoides é maior que a das vitaminas E e C (HAGERMAN, 2011; RICE-EVANS; DIPLOCK, 1992).

Estudos demonstraram que a interação de uma substância antioxidante em potencial com o radical DPPH[•] depende da sua conformação estrutural. O número de moléculas de DPPH[•] que seriam reduzidas parece estar correlacionado com o número de grupos hidroxilas disponível na molécula antioxidante (MENSOR et al., 2001).

Este estudo nos permitiu relacionar a atividade apresentada pela TM, tanto para folhas quanto para os frutos da espécie, *S. terebinthifolius*, com o caráter hidrofílico (polar) destas formas extrativas (SALES, 2009), provavelmente devido à presença de grupos hidroxilas (fenólicos ou não).

Este requisito estrutural poderia estar relacionado com a presença de grupos metabólicos, tipo flavonoides (principalmente biflavonóides), lipídeos fenólicos e taninos que têm ocorrência conhecida na família Anacardiaceae (CORREIA et al., 2006), a qual pertence à espécie *S. terebinthifolius*. Estudos fitoquímicos efetuados, especificamente, com espécies do gênero *Schinus* identificaram fenóis, flavonóides, esteróides, triterpenos, antraquinonas e saponinas na espécie (LIMA et al., 2006; VELASQUEZ et al., 2003).

Dentre os compostos isolados da espécie *S. terebinthifolius*, com estruturas fenólicas, e comprovada atividade antioxidante encontramos, a partir do extrato etanólico dos frutos: a flavona apigenina, o ácido elágico e a flavanona naringina (DEGÁSPARI et al., 2005), a partir do extrato etanólico das folhas (fase em acetato de etila): o galato de etila, o galato de metila, a miricetrina, a miricetina e a quercitrina (CERUKS et al., 2007), a rutina e a isoquercitrina (QUEIRES et al., 2006),

visto que ésteres do ácido gálico e flavonóides derivados da miricetina e quercetina apresentam elevado potencial anti-radicalar (KIKUZAKI et al., 2002).

Considerando que produtos naturais padronizados de origem vegetal, como tinturas-mãe (TM), podem ser utilizados na agricultura como quimioprotetores, através da potencial atividade antioxidante em processos fitopatológicos, decorrentes de diversos processos de estresse oxidativo, os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos para identificar, quantificar e avaliar a atividade antioxidante de substâncias isoladas da espécie *S. terebinthifolius*, com marcadores químicos próprios (padrão para grupos metabólicos de interesse).

Na realidade o método da captura do radical orgânico, DPPH, mostrou-se um método bastante conveniente para este primeiro *screening* antioxidante de pequenas moléculas, uma vez que a reação pode ser observada visualmente.

Contudo, estudos ainda devem ser realizados para elucidar e identificar quais constituintes químicos das TM de frutos e folhas da espécie *S. terebinthifolius*. Segundo Bertoldi (2006), não existe um único método que consiga avaliar satisfatoriamente a atividade antioxidante de uma amostra, visto que ela depende da técnica utilizada, do tipo e concentração do substrato, dos constituintes presentes no extrato avaliado, parâmetros metodológicos com tempo e temperatura do ensaio, fenômeno de partição, entre outros. Assim, recomenda-se que sejam avaliados mais de dois parâmetros na determinação da atividade antioxidante de extratos vegetais.

Entretanto para dar continuidade aos nossos resultados preliminares promissores, com a avaliação da atividade antioxidante de TM de genótipos da aroeira, um ponto importante a ser considerado para fundamentar a pesquisa, seria a identificação do perfil cinético da atividade através do cálculo do DPPH^{*} remanescente e da CE₅₀ (ou ED₅₀), onde é possível relacionar a porcentagem de atividade antioxidante (AA) obtida pela quantidade de DPPH^{*} consumida com a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em até 50%. Esta concentração é representada pelo CE₅₀ (ou ED₅₀), a qual é também reconhecida por ser uma concentração inibitória (CI₅₀).

Outra atividade imprescindível e complementar à investigação de insumos como TM com potencial antioxidante, é a determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de TM hidroetanólica, devido à variabilidade e a complexidade de constituintes químicos presentes nestas formas extrativas, que têm implicações diretas nas propriedades antioxidantes da matéria prima.

7 CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE INSUMOS BIOTIVOS (TINTURA-MÃE) DE AROEIRA (*SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI).

7.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (Núcleo de Biotecnologia) da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES e no Laboratório oficial de Tecnologia Farmacêutica da Emescam, em Vitória- ES.

7.1.1 Material vegetal

7.1.1.1 Preparação de Tintura-mãe (TM) e obtenção de insumos bioativos

As Tinturas-mãe (TM), descritas no Capítulo 1, a partir de folhas e frutos da *S. terebinthifolius* Raddi foram preparadas, pela adaptação da técnica de maceração (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011). As Tinturas-mãe (TM), obtidas a partir de folhas de cada genótipo, foram identificadas como, a partir da planta hermafrodita (TMArFH), fêmea (TMArFF), e macho (TMArFM) e obtidas dos frutos como, da planta hermafrodita (TMArFrH) e de duas amostras da planta fêmea (TMArFrF1 e TMArFrF2), foram utilizadas nos experimentos de avaliação antifúngica.

7.1.2 Avaliação da atividade antifúngica de insumos bioativos

7.1.2.1 Fungos

Culturas dos fungos filamentosos, *Fusarium guttiforme* (E-203) e *Chalara paradoxa* (E-411), foram obtidas da micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Incaper, situado no município de Domingos Martins- ES, Brasil e cultivadas em meio de cultura Batata Dextrose Agar (PDA- Acumedia Laboratories, Michigan, USA) e

incubados a 25 °C. As matrizes dos fungos foram pre servadas para a utilização nos experimentos através do método de Castellani (ALFENAS; MAFIA, 2007).

7.1.2.2 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

A atividade antifúngica de amostras de TM da aroeira foi avaliada através de *screening* para os fungos *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell (syn.: *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*, Ventura, Zambolim & Gilb) e *Chalara paradoxa*, utilizando a técnica de difusão em meio de cultura BDA (ALVES et al., 2000; AYRES et al., 2008; VALGAS et al., 2007). A suspensão dos fungos foi padronizada para 10^6 conídios.mL⁻¹ em solução salina estéril (0,85%). Foram adicionados 100 µL de cada suspensão fúngica e espalhados, com alça de Drigalski, na superfície das placas de Petri e decorridos 10 minutos de repouso, foram feitos orifícios de 5 mm de diâmetro, que foram preenchidos com 100 µL das amostras, das TM (TMArFH, TMArFF, TMArFM, TMArFrH, TMArFrF1 e TTMArFrF2), previamente preparadas. Como controles (testemunhas), para cada experimento, utilizou-se a solução hidroetanólica a 70% (v/v) e o fungicida tebuconazole 0,1%. No experimento, cada forma extrativa foi avaliada com três repetições e a avaliação realizada ao final de 72h, medindo-se o diâmetro do halo de inibição do crescimento micelial dos fungos (SALES, 2009).

A porcentagem de inibição (PI) foi determinada pela inibição do crescimento micelial, comparando os tratamentos realizados com as TM, o fungicida de referência (tebuconazole) e a testemunha (solução hidroetanólica), sendo calculada pela equação:

$$PI = [(I_{TRAT} - I_{TEST}) / I_{TEBU}] \times 100 \dots\dots\dots$$

onde,

PI= Porcentagem de inibição.

I_{TRAT}= Inibição do crescimento micelial pelos tratamentos.

I_{TEST}= Inibição pela Testemunha (Sol. EtOH 70% (v/v)).

I_{TEBU}= Inibição pelo fungicida (tebuconazole 0,1%).

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram valores representativos de atividade antifúngica para *Fusarium guttiforme* e *Chalara paradoxa*, sendo que as TM's preparadas a partir de folhas e frutos, TMArFH, TMArFF, TMArFrH, TTMArFrF2, apresentaram eficiência com halo de inibição igual ou maior de 20 mm (Porcentagem de inibição-PI \geq 50%), para o fungo *F. guttiforme* (Tabela 12).

Todas as amostras de TM de folhas e frutos da espécie *S. terebinthifolius* diferiram da testemunha (controle negativo), constituída de EtOH 70% (v/v) e apresentaram inibição do crescimento tanto para *F. guttiforme*, quanto para *C. paradoxa*, entretanto foram mais eficientes para o controle do *F. guttiforme*, com média de inibição maior do que as apresentadas para o fungo *C. paradoxa* (Tabela 15).

Tabela 15 Atividade antifúngica da Tintura –mãe (TM) de folhas e frutos da espécie *S. terebinthifolius*, para os fungos *F. guttiforme* e *C. paradoxa*, pelo método de difusão em ágar, com orifício.

Tratamentos ¹	Atividade antifúngica			
	<i>F. guttiforme</i>		<i>C. paradoxa</i>	
	Inibição (mm)	PI (%) ²	Inibição (mm)	PI (%) ²
TEBU	33,3 \pm 1,53	98,0 a ³	37,3 \pm 2,52	97,3 a ³
TMArFH	28,0 \pm 1,0	82,2 ab	17,0 \pm 2,0	42,9 b
TMArFrF ₂	22,7 \pm 2,08	66,2 bc	12,3 \pm 0,58	30,3 c
TMArFrH	22,7 \pm 2,52	65,9 bc	12,0 \pm 1,0	29,5 cd
TMArFF	20,0 \pm 2,0	57,9 cd	9,3 \pm 1,16	22,2 de
TMArFM	15,3 \pm 1,53	43,9 de	9,0 \pm 1,0	21,4 e
TMArFrF ₁	12,3 \pm 2,52	35,1 e	10,0 \pm 1,0	24,1 cde
TEST	0,67 \pm 0,15	0,0 f	1,0 \pm 0,44	0,0 f
CV (%)		10,97		8,41

¹Tintura-mãe a partir das folhas da planta hermafrodita (TMArFH), fêmea (TMArFF), e macho (TMArFM) e obtidas dos frutos como, da planta hermafrodita (TMArFrH) e de duas amostras da planta fêmea (TMArFrF1 e TMArFrF2); TEBU: controle positivo: Fungicida Tebuconazole a 0,1%; TEST: testemunha: EtOH 70%(v/v).

² PI (%): Porcentagem de inibição em relação aos tratamentos controle.

³ Médias de três repetições. As médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A amostra de TM, da folha da planta hermafrodita (TMArFH), apresentou, juntamente com o fungicida tebuconazole a 0,1%, forte inibição antifúngica para o fungo, *F. guttiforme*, com as respectivas porcentagens de inibição, 82,00% e 98,0%. A amostra, TMArFH, apresentou eficiência antifúngica para *C. Paradoxa*, com porcentagem de inibição, de 42,86%; entretanto ficou aquém do resultado apresentado pelo controle positivo (Tabela 15).

Neste caso o fungo *C. Paradoxa* se mostrou menos susceptível que o *F. guttiforme*, aos constituintes químicos ativos presentes nas folhas da aroeira, considerando as particularidades físico- químicas, em relação à estrutura de cada microrganismo em questão e principalmente a especificidade química e estrutural do princípio ativo com atividade antifúngica, presente na tintura-mãe. De qualquer forma, TMArFH apresentou o melhor resultado para *C. paradoxa*, quando comparada às outras amostras de TM avaliadas. Segundo Sales (2009), a baixa ou mesmo a ausência de atividade inibitória de algumas amostras sobre os fungos testados, *F. guttiforme* e *C. paradoxa*, pode também estar relacionada com as características bioquímicas destes microrganismos que podem dificultar a ação dos componentes bioativos investigados. A padronização do inóculo se faz, portanto, necessária e a quantidade inoculada deverá ser estabelecida para cada método de avaliação.

Outra suposição pode ser em função das substâncias potencialmente ativas estarem presentes em concentrações muito baixas, ou mesmo a ausência de metabólito ativo, especificamente sobre os fungos testados (VALGAS et al., 2007). Sabe-se que, a constituição química de um extrato é decorrente dos métodos e dos reagentes químicos utilizados para sua obtenção e, geralmente, os componentes ativos encontram-se em baixas concentrações em extratos brutos, sendo que nas tinturas estes podem estar ainda mais diluídos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; SALES, 2009).

A amostra TMArFrH, agora a partir do fruto da aroeira, apresentou resultados menos expressivos para o fungo *C. paradoxa*, com PI= 29,46%, do que para *F. guttiforme*, PI= 66,0%. As tinturas-mãe, TMArFF e TMArFM apresentaram os menores valores de porcentagem de inibição para *C. paradoxa*, 22,32% e 21,43%, respectivamente.

O mesmo não ocorrendo, para o fungo *F. guttiforme*, em relação a apresentação de atividade antifúngica da TMArFF, com uma porcentagem de inibição de 58,0%, ficando acima das amostras de TM, a partir de folhas da planta macho (TMArFM), com inibição de 43,9% e a partir do fruto do primeiro exemplar da planta fêmea (TMArFr1), que apresentou uma porcentagem de inibição de 34,9% (Figura 26).

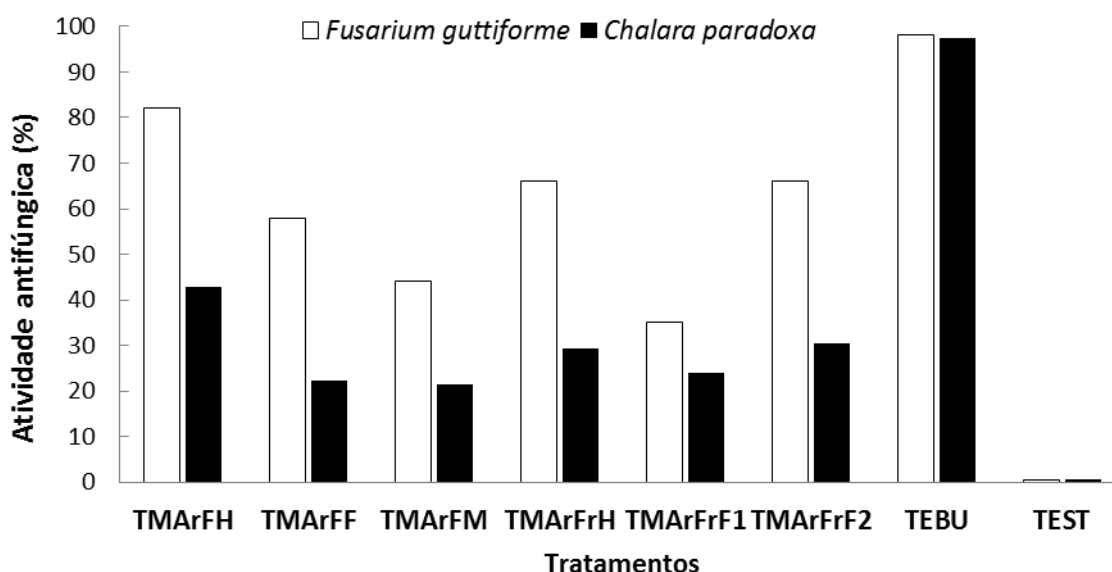


Figura 26 Avaliação da atividade fungicida das tinturas-mãe a partir das folhas, da planta hermafrodita (TMArFH), fêmea (TMArFF), e macho (TMArFM) e obtidas dos frutos, da planta hermafrodita (TMArFrH) e de duas amostras da planta fêmea (TMArFrF1 e TMArFrF2) para os fungos, *F. guttiforme* e *C. paradoxa*, determinada pelo halo de inibição no método de difusão em meio de cultura. TEBU= fungicida tebuconazole a 0,1%; TEST = Testemunha: sol. EtOH 70% (v/v).

O fungicida comercial de referência, ao contrário do perfil apresentado pelas TM da aroeira, apresentou inibição antifúngica maior para *C. paradoxa*. Os resultados estão de acordo com os apresentados por Sales (2009), no *screening* com TM de diferentes espécies de plantas, que mostrou as tinturas-mãe das espécies, *Glycyrrhiza glabra*, *Myroxylon balsamum* e *Allium sativum*, na dose de $100\mu\text{L. mL}^{-1}$, apresentaram maior atividade antifúngica para *F. guttiforme* do que para *C. paradoxa*.

Os resultados apresentados pelo teste de difusão em ágar com orifício permitem afirmar que, possivelmente, os constituintes químicos fenólicos, principalmente do tipo flavonoides, foram responsáveis, pela eficiência antifúngica apresentada para *F.*

guttiforme e *C. paradoxa*. A Figura 27, apresenta os melhores resultados para as tinturas-mãe, a partir de folhas (TMArFH) e a partir dos frutos (TMArFrH) da planta hermafrodita em relação ao controle positivo, fungicida tebuconazole a 0,1%, frente aos fungos *F. guttiforme* e *C. paradoxa*.

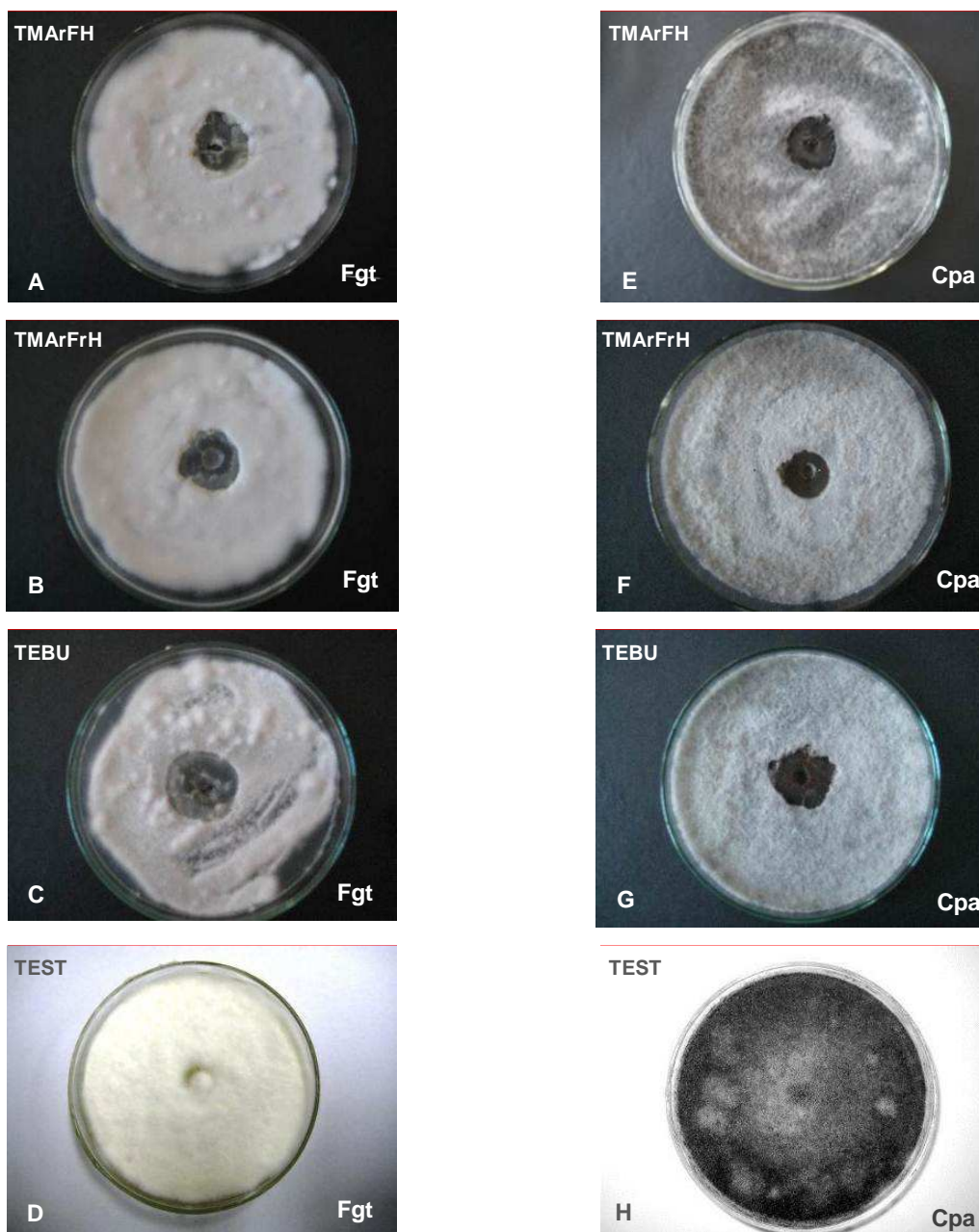


Figura 27 Eficiência antifúngica de TM obtida de folhas (TMArFH) e frutos (TMArFrH) da planta hermafrodita da espécie *S. terebinthifolius*, sobre o crescimento micelial *in vitro* dos fungos: *F. guttiforme* (Fgt) (A - D) e *C. paradoxa* (Cpa) (E - H), comparados ao controle positivo (TEBU), fungicida tebuconazole a 0,1% (C e G) à testemunha, (TEST), sol. EtOH 70% (D e H).

As tinturas-mãe (TM) de diferentes genótipos da espécie *S. terebinthifolius*, apresentaram resultados diferentes, tanto para atividade antioxidante como na antifúngica, mostrando a existência de variabilidade dentro das espécies, que se reflete na biossíntese de constituintes químicos do metabolismo secundário. A planta, “macho”, não apresentou níveis de atividade antifúngica tão expressivos como as plantas, “hermafrodita” e “fêmea”.

Os diferentes resultados, tanto para porcentagem de inibição (PI) (Tabela 12), como para o perfil de inibição de cada TM (Figuras 27), foram marcantes não somente pelos diferentes tipos de plantas, como também para as partes testadas (folhas e frutos) e principalmente para sensibilidade apresentada pelos fungos testados, *F. guttiforme* e *C. paradoxa*.

Estes resultados são de grande importância estratégica na seleção da matéria prima para a preparação da tintura mãe (TM), o que certamente reflete em preço e valor agregado para o produtor.

O perfil de atividade apresentado, pelas tinturas-mãe a partir de folhas e frutos, é decorrente da presença de constituintes químicos ativos, na sua maioria originários do metabolismo secundário da espécie, *S. terebinthifolius*. Estudos desenvolvidos atribuem aos compostos fenólicos, como os flavonoides (principalmente os biflavonoides), taninos e terpenoides, as atividades antioxidante e antimicrobiana desta espécie (BORNHAUSEN, 2002; CERUKS et al., 2007; DEGÁSPARI et al., 2005; EL-MASSRY et al., 2009; LIMA, 2006; QUEIRES et al., 2006; TONIAL, 2010).

Dentre a classe de polifenóis, constituintes já isolados da espécie *S. Terebinthifolius*, que tiveram a atividade antimicrobiana comprovada, estão: a apigenina (DEGÁSPARI et al., 2005), o ácido elágico (DEGÁSPARI et al., 2005; EL-MASSRY et al., 2009; MARTINEZ et al., 1996), a naringina (DEGÁSPARI et al., 2005), o galato de etila (CERUKS et al., 2007), o galato de metila (CERUKS et al., 2007; KIKUZAKI et al., 2002), a miricetrina (CERUKS et al., 2007), a miricetina (CERUKS et al., 2007), a rutina (NUNES et al., 2009), saponinas esteroidais e saponinas

triterpênicas (SIMÕES et al. 2007), ácido gálico e catequina (EL-MASSRY et al., 2009; BRAZ et al., 2011).

Atualmente, os lipídeos fenólicos, presentes na família Anacardiaceae, detentores de potente atividade antioxidante, estão sendo elencados como uma fonte promissora de ativos com atividade antiparasitária e antifúngica (CORREIA et al., 2006; KOZUBEK, 1999). Segundo COWAN (1999) a atividade antimicrobiana da espécie *S. terebintholius*, estaria associada à classe dos terpenóides, presentes no óleo-resina, terebintina, apresentando na sua composição aproximadamente 75% de α e β pineno, 10% de δ 3-careno, além de limoneno, dipenteno, β pironeno, borneol e acetato de bormila.

Apesar da extração, das folhas e frutos da espécie, ter sido realizada com solvente EtOH (70- 90%), não tão apropriada para compostos com caráter lipofílico, possivelmente a extração por esgotamento proposta neste trabalho, com caráter hidrofílico da mistura de líquido extrator, pode ter garantido a presença desta classe de metabólitos e garantido um aumento na atividade biológica dos constituintes, por um aumento na biodisponibilidade. O mecanismo de ação antimicrobiana de terpenos não está totalmente elucidado, mas pode estar relacionados com a ruptura da membrana pelos compostos lipofílicos, presentes na espécie microbiana (COWAN, 1999).

A ação antimicrobiana dos flavonóides, principalmente presentes nas folhas, provavelmente está relacionada à capacidade de complexar proteínas extracelulares e solúveis, bem como estruturas da parede celular (SOUSA et al., 2007), sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOUSA et al., 2007). Flavonóides, mais lipofílicos, podem atuar provocando o rompimento de membranas microbianas (SIMÕES et al., 2010).

O mecanismo de ação de taninos para a atividade antimicrobiana, sobre bactérias e fungos, está muito bem documentado na literatura que, pressupõe os taninos inibindo enzimas de bactérias e fungos e/ou complexando os substratos dessas enzimas; a segunda hipótese seria que os taninos agem sobre as membranas celulares dos microorganismos, modificando o seu metabolismo; e a terceira

hipótese menciona a complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo, assim, a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo dos microrganismos (HASLAM, 1996; HAGERMAN, 2011).

Propriedades farmacológicas estão bem estabelecidas para espécies como *S. terebinthifolius*, rica em óleos voláteis. Dentre elas e, especificamente para o citral, predomina a ação antisséptica, com inibição de bactérias e fungos, devido a presença de compostos fenólicos, aldeídos e álcoois. Os compostos citral, geraniol, linalol e timol têm um alto poder antisséptico, superior ao do próprio fenol (KOZUBEK, 1999; SIMÕES et al., 2010). Estudo de Garcia e colaboradores, (2008) mostrou que, dentre monoterpenos comerciais testados, o citral apresentou uma potente atividade fungicida para 3 fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium guttiforme*, causadores de doenças e perdas em pós-colheita de frutas tropicais.

A preocupação da sociedade, com o impacto do uso de pesticidas no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com agrotóxicos, vem alterando o cenário agrícola, resultando na presença de segmentos de mercado ávidos por produtos diferenciados, portadores de selos que garantam que esses alimentos sejam produzidos em sistemas ambientalmente equilibrados (BETTIOL: GHINI, 2003).

O trabalho de pesquisa ora desenvolvido, de forma multidisciplinar, buscou o desenvolvimento tecnológico no sentido de prover o mercado com insumos bioativos naturais, como TM a partir de genótipos da espécie *S. terebinthifolius*, com ação fitoprotetora ou como fitoterapêutica, subsidiada pela presença de constituintes fitoquímicos, identificados com potencial eficiência antifúngica, com aplicações fitossanitárias, associando os benefícios de um produto seguro e economicamente viável.

8 CONCLUSÕES

Pela primeira vez, insumos ativos, como TM de espécies vegetais, foram preparados por maceração, a partir de folhas e frutos da aroeira (*S. terebinthifolius*), utilizando um polímero 100% natural, de extração botânica, como um novo adjuvante no processo de tratamento prévio do material vegetal.

As análises físico-químicas das amostras das tinturas-mãe apresentaram valores médios, para determinação de resíduo seco, teor alcóolico, pH e densidade, dentro das especificações técnicas, indicando qualidade no processo de obtenção dos insumos obtidos. A garantia da estabilidade no produto final proporcionou resultados promissores na determinação do perfil cromatográfico das amostras analisadas.

As tinturas-mãe, TMArFH, TMArFF e TMArFM, obtidas de folhas de *S. terebinthifolius*, apresentaram nítidas zonas cromatográficas fluorescentes em CCD, características da classe de flavonoides, e análise por HPLC (TMArFrH), possibilitou a separação destes metabólitos, sugestivos de flavonóis (folhas) e de flavonas (frutos).

O cromatograma (HPLC/UV) para o extrato bruto etanólico do fruto da aroeira (EArFr) revelou a presença de dois picos majoritários com tempos de retenção (t) de 26,52 e 27,71 minutos, o que nos permitiu confirmar a presença de dois importantes biflavonóides: a agathisflavona (biflavona: acoplamento C-C do tipo 6-8" (I-6, II-8) e a tetrahydroamentoflavona (biflavanona: acoplamento C-C do tipo 3'-8 (I-3', II-8), com estudos para amentoflavona, apigeninil-(I-3', II-8)- apigenina). Podemos associar as atividades apresentadas neste trabalho aos estudos sobre biflavonóides, que conferem à estes constituintes, potencial atividade antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, citotóxica e inseticida, peculiar da família Anacardiaceae.

Na identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de frutos e folhas, houve predominância monoterpênica do limoneno, α -pineno, *p*.cimeno e β -mirceno, sendo que as amostras a partir dos frutos dos genótipos, FR02 e FR03, apresentaram alto teor relativo de β -mirceno (26,73% e 26,03%, respectivamente). Contudo, FR01 representou a amostra de maior teor relativo de monoterpenos

(70,85%), tendo como componente majoritário, o limoneno (36,85%). O limoneno se apresenta como um produto bioativo natural, visto que estudos comprovam sua eficácia como substância antioxidante com potencial quimioprolático e quimioterapêutico.

A TM, a partir de folhas, da planta hermafrodita (TMArFH), na concentração de 250 µg/ml, apresentou melhor disponibilidade para a captação do radical livre, DPPH (1,1- difenil-2-picril-hidrazil). Entretanto, na menor concentração do experimento (25 µg/ml), o melhor resultado para a atividade antioxidante foi para a amostra da TM da folha da planta fêmea, TMArFF, em detrimento do próprio controle positivo, TM da espécie *Ginkgo biloba* (TMGb), que apresentou o menor valor para esta atividade.

A amostra TMArFH, da folha da planta hermafrodita, apresentou juntamente com o fungicida tebuconazole a 0,1%, o melhor resultado para a inibição do crescimento micelial para o fungo, *F. guttiforme*. A mesma tintura-mãe apresentou significativa eficiência antifúngica para *C. paradoxa*, mas não foi tão significativa como o fungicida. TMArFF e TMArFM apresentaram os menores resultados de inibição, para os dois fungos.

A identificação de constituintes químicos em insumos bioativos, tinturas- mães e óleos essenciais da espécie *S. terebinthifolius*, com potencial antioxidante e antifúngico, abre um campo para realização de um estudo interdisciplinar com a seleção e/ou recuperação de quimiotipos em genótipos com potencial econômico para as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, promovendo necessidade de registro, pela primeira vez, de cultivares da aroeira no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), contribuindo na busca de novas alternativas no agronegócio e preservação dos recursos naturais.

9 REFERENCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadruple mass spectroscopy**. Carol Stream: USA, Allured, Baylor University, 2001.

AFFONSO C.R.G.; FERNANDES, R.M.; DE OLIVEIRA, J.M.G; CARVALHO E MARTINS, M.C.; LIMA, S.G.; SOUSA JÚNIOR, G.R.; FERNANDES, M.Z.L.C.M.; ZANINI, S.F. Effects of the Essential Oil from Fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) on Reproductive Functions in Male Rats. **J. Braz. Chem. Soc.**, Campinas, v. 23, n.1, p.180-185, 2012.

AHAMED, M. S.; GALAL, A. M.; ROSS, S. A.; FERREIRA, D.; ELSOHLY, M. A.; IBRAHIM, A. R. S.; MOSSA, J. S.; EL-FERALY, F. S. A weakly antimalarial biflavanone from *Rhus retinorrhoea*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 58, p. 599-602, 2001

ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. 382p.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis, 1998, p. 186-9.

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

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 89, p.27–36, 2005.

AYRES, M.M.M.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brasília, v.18 n.1, p. 90-97, 2008.

BACCHI, E.M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: Di Stasi, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, p.169-186, 1996.

BARBARÁ, J.A.; ALVES, G.H.; OLIVEIRA, D.H. DE; FARIAS, A.M.; SANTOS, M.A.Z. DOS; RODRIGUES, M.R.A. Identificação dos constituintes químicos do óleo de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) por cromatografia gasosa (GC/FID). In: XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul), **FURB**, Anais..., Curitiba, 2008.

BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D.; DE PAULA, V.F.; ISMAIL, F.M.D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi, **Quim. Nova**, Curitiba, v. 30, n.8, p.1959-1965, 2007.

BERTOLDI, M.C. **Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica das óleos resinas e do óleo essencial da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. 96f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, MG, 2006.

BETTIOL, W. GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003, p.80-96.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, Curitiba, v. 32, n. 3, p.588-594, 2009.

BORNHAUSEN, R. **Ervas do Sítio**. Disponível em: <http://www.ervasdositio.com.br/enciclopedia/enciclopedia.asp>>. Acesso em: 24 ago.2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, ANVISA: Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 14, de 05 de abril de 2010. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. ANVISA: Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico**, Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Decreto nº 6041**, de 08 de fevereiro de 2007. Institui a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia e cria o Comitê Nacional de Biotecnologia. Brasília, 2007.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto no. 5813 de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico e dá outras providências. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 2006.

BRAZ, R.; WOLF, L.G.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P DE. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. 2011. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 22, n. 5, Oct. 2012. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2012000500024&lng=en&nrm=iso . Access on 26 Nov. 2012

CAIEIRO, D. M.; MARCUCCI, M. C. Composição Química e Atividade Antioxidante de Formulações Comerciais contendo *Ginkgo biloba* L. **Revista Fitos**, São Paulo, v.5, n.03, p. 64- 70, 2010.

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

CAMPELLO, J. P.; MARSAIOLI, A. J. Terebenthifolic acid and bauerenone, new triterpenoid ketones from *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v.14, 2300-2302, 1975.

CARDOSO, C.M.Z. **Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral**. 1. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2009.

CARVALHO, J.C.T; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. 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: UFRS, p. 519-535, 2007.

CASTILLO, F.; HERNÁNDEZ D.; GALLEGOS, G., RODRÍGUEZ R.; AGUILAR, C.N. Antifungal Properties of Bioactive Compounds from Plants. In: DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. **Fungicides for Plant and Animal Diseases**. InTech Books and Journals, 2011.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica: obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. eds. **Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, p.47-75 2001.

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

CIMPAN, G.; GOCAN, S. Analysis of medicinal plants by HPLC. Recents approachs. **Phytochem. Anal.**, v.14, p. 119–126, 2003.

CONCEIÇÃO, J.C.P.R. O papel do Estado na certificação dos produtos agrícolas. **Revista Desafios do Desenvolvimento**, Brasília, ano 9, n.73, 2012.

CORREIA, S. de J.; JUCENI P. DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, Curitiba, v. 29, n. 6, 2006.

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

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, p. 564–582, 1999.

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

DEGÁSPARI, C. H.; WASCZYNSKY, J.N.; dos SANTOS, R.J. Atividade antioxidante de Extrato de Fruto de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). **Visão acadêmica**, Lavras, v.5, n. 2, p. 83-89, 2004.

DEGÁSPARI, C. H. **Propriedades Antioxidantes e Antimicrobianas dos Frutos da Aroeira (*Schinus Terebenthifolius* Raddi)**. 2004. 118p. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2004.

DESZCZ, L.; KOZUBEK, A. Higher cardol homologs (5-alkylresorcinols) in rye seedlings. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1483, P. 241- 250, 2000.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. England: British Library, 2002. 512p.

DI-STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002. p. 340-50.

DUARTE, M.R.; TOLEDO, M.G.; OLIVEIRA, R.B. Diagnose morfoanatômica de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi, Anacardiaceae). **Visão Acadêmica** (Impresso), Curitiba, v. 7, n. 2, p. 1- 14, 2006.

DURÁN, R.M.; PADILLA, R.B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**. Sevilla, v. 44, n. 2, p. 101-106, 1993.

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.**, Washington, v. 57, p. 5265–5270, 2009.

FALKENBERG, M. DE B. Quinonas. 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: UFRS, 2010. p. 263-288.

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**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRS, 2010. p. 263-288.

FARMACOPEIA BRASILEIRA (FB), 5ed., vol. 1. **Métodos Físicos e físico-químicos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010, p. 81-159.

FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA (FHB), 3ed. **Método de preparação da Tintura-mãe**: preparação de tinturas-mãe a partir de plantas frescas. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2011a, p. 53- 86.

FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA (FHB), 3ed. **Métodos de análises e ensaios**: determinações físicas e físico-químicas (3- 9.1). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2011b, p.38-44.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FERREIRA, A.O. **Guia prático de Farmácia magistral**. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2010.

GARCIA, R.; ALVES, E.S.S.; SANTOS, M.P.; AQUILE, G.M.F.; FERNANDES, A.A.R.; SANTOS, R.B.; VENTURA, J.A; FERNANDES, P.M.B. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 163-168, 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. In: **30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008.

GENNARO, A. R. **Remington: a ciência e a prática da Farmácia**, 20. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

HAGERMAN, A.E. **The Tannin Handbook**, Copyright 1998, 2002, 2011. Disponível na internet no site: <http://www.users.muohio.edu/hagermae>, capturado como tanninchemistry.pdf. Acesso: 01 jun. 2013.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, New York City, v. 59, n. 2, p. 205-15, 1996.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E.M. **Pharmacognosy and phytotherapy**. 1. ed. London: Churchill livingstone, 2004.

HPSUS- **The Homeopathic Pharmacopeia of the United States** (HPUS). 9. ed. Boston: *American Institute of Homeopathy*, 2002.

KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H.; Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 7, p. 2161-8, 2002.

KOZUBEK, A.; TYMAN, J. H. P. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. **Chemical Reviews**, Washington, v. 99, n. 1, 1999.

KUSTER, R.M.; ARNOLD, N.; WESSJOHANN, L. Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Edimburgo, v. 37, p. 63-65, 2009.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

LENZI, M.; ORTH, A.I. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, Florianópolis, v.17, n. 2, p. 67-89, 2004.

LIEBERMAN, N. H. A.; LACHMAN, L.; SCHWAZTZ, J. B. (Eds.). **Pharmaceutical dosage forms**. 2. ed. New York: Maecel de Kiker, v. 2, p.30-57, 1990.

LIMA, L. B. **Avaliação Toxicológica Pré-clínica de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Farmácia, Recife. 2009.

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

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Ed. Plantarum, 1992, p. 8.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa, Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2002. 512p.

LUBBE, A.; VERPOORTE, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. **Industrial Crops and products**, Amsterdam, v. 34, p. 785- 801, 2011.

MAKSIMOVIC, M. In vitro antioxidant activity of ragweed (*Ambrosia artemisifolia* L., Asteraceae) herb. **Industrial crops and products.**, Amsterdam, v. 28, p. 356–360, 2008.

MARTINEZ, M.J.; ALONSO, N.G.; BETANCOURT, J.B. Actividad antimicrobiana del *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Rev. cub. plantas med.**, Havana, v.1, n.3, p. 37-39, 1996.

MATOS, A.P. **Manejo integrado da podridão-negra do fruto do abacaxizeiro**. Abacaxi em Foco. Santa Cruz das Almas (BA): EMBRAPA, v. 34, 2005.

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, Munich, v. 9, p. 109-16, 2002.

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

MILLER, J.A.; THOMPSON, P.A.; HAKIM, I.A.; CHOW, H.-H. S.; THOMSON, C.A. d-Limonene: a bioactive food component from citrus and evidence for a potential role in breast cancer prevention and treatment. **Oncol. Rev.**, Pavia, v.5, p.31–42, 2011.

MURTHY, K.N.C.; JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells. **Life Sciences**, Amsterdam, v.91, p.429–439, 2012.

NASCIMENTO JR., J.M.; COSTA, K.S.; TORRES, K.R.; SILVA ALVES, R.M.; Política nacional de medicamentos fitoterápicos. **Revista de Administração Hospitalar e inovação em saúde**, Brasília, v. 5, n. 4, p. 42-9, 2010.

NUNES, K.M.; BARBOSA, W.L.R; OZELA, E.F.; SILVA JUNIOR, J.O.C. Padronização da Tintura de *Calendula officinalis* L. para seu Emprego em Formulações Semi-sólidas Fitoterápicas. **Lat. Am. J. Pharm.**, Buenos Aires, v. 28, n. 3, p. 344-50, 2009.

OLIVEIRA, D.M. **Estudo químico e biológico de Frutos de Plantas de interesse econômico: *Punica granatum* e *Schinus terebinthifolius***. 135f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2012.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brasília, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

PAN M.; HO C. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. **Chem. Soc. Rev.**, London, v.37, p.2558–74, 2008.

PINTO, T.J.A; KANEKO T.M. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 325 p.

PIRES, O. C.; TAQUEMASA, A. V. C.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; ARAÚJO, C. E. P. Preliminary comparative analysis of the acute toxicity and median lethal dose (LD₅₀) of the fruit of the Brazilian black pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) and black pepper (*Piper nigrum* L.). **Acta Farm. Bonaerense**, La Plata, v. 23, n. 2, p. 176-82, 2004.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. - Técnica farmacêutica e farmácia galênica. 3 ed, v. II . Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian., 1990, p. 183-207.

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

RENGER, B. System performance and variability of chromatography techniques used in pharmaceutical quality control. **J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v. 746, p. 167-76, 2000.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T. Free Radical. **Biol. Med.**, Baltimore, v. 15, n. 77, 1992.

ROCHA, L. M.; LUCIO, E.M.A.; FRANÇA, H.S.; SHARAPIN, N. (IN MEMORIAM). *Mikania glomerata* Spreng: desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Rev. bras. farmacogn.** Curitiba, v. 18, 2008.

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.163-164.

RODRÍGUEZ, D.J. DE; DE HERNANDEZ-CASTILLO, D., ANGULO-SANCHEZ, J.L., RODRÍGUEZ-GARCÍA, R., QUINTANILLA, J.A.V., LIRA-SALDIVAR, R.H. Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. **Industrial crops and products**, Amsterdam, v. 25, p.111–116, 2007.

ROSS, I.A. Medicinal Plants of the World- Chemical Constituents, traditional and modern medicinal uses. **Humana Press**. Totowa, New Jersey, v. 2, 2001. 487p.

ROVEDA, L.M.; FORMAGIO, A.S.N.; BALDIVIA, D. DA S.; DOS SANTOS, L. A.C; VIEIRA, M. DO; CARDOSO, C. A.L; FOGLIO M.A.; CARVALHO, J.E. DE; FORMAGIO NETO, F. Composição química e avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (ANACARDIACEAE). 10º Simpósio Brasil- Japão- Sustentabilidade: um desafio da humanidade, **Anais...** Campo Grande- MS, 2010.

SALES, M.D.C. **Triagem e avaliação da eficiência antifúngica de formas extrativas de espécies vegetais com aplicação no controle da fusariose do abacaxizeiro**. 121f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Vitória, ES, Brasil, 2009.

SANCHEZ, M. C.; LARRAURI, J. A.; SAURA, C. F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v.76, p.270–276, 1998.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 403- 434, 2010.

SANTOS, C.S.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 615-656, 2010.

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, **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1011-1013, 2007.

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.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F; STANGARLIN, O.J.K.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, p.129-137, 2000.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia Racional**. São Paulo: Ed. Manole, 2002, 400p.

SILVA, M.M.S.; ROSA, M.M.; BRASILEIRO, B.G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C.C. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENZON, M.; PAULA JUNIOR, T.J.; PALLINI, A. (Orgs). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM: UFV, 2006. p. 221-246.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2010, p. 467- 488.

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: UFRS, 2010.

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**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRS, cap. 13, 2010, p. 290- 326.

SOUSA, C.M.M.; HILRIS ROCHA E SILVA, H.R.S.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; MARCELA S. BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, Curitiba, v. 30, n. 2, p.351-355, 2007.

SOUZA, D.C.L. **Diversidade genética, produção de frutos e composição química em *Schinus terebinthifolius* Raddi**. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas), Programa de Pós-graduação em Agrossistemas, Universidade Federal de Sergipe (UFS), SE, 2012.

SOUZA, S. A. M. **Biotestes na Avaliação da Fitotoxicidade de Extratos Aquosos de Plantas Medicinais Nativas do Rio Grande do Sul**. Monografia (Monografia de Conclusão de Curso) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

STANGARLIN, O.J.K.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Porto Alegre, v. 16, p. 265-304, 2008.

STRAPASSON, M.; SANTOS, A.F. DOS; MEDEIROS, A.C.S. Fungos associados à semente da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*). **Bol. Pesq. Fl.**, Colombo, n. 45, p. 131- 135, 2002.

SUZUKI, S.F.O. Mercado de Medicamentos Fitoterápicos no Brasil. In: SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia Racional**. Ed. Manole, São Paulo, p.363-369, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Arned, 2009. 849p.

TONIAL, F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira)**. Dissertação de Mestrado (Mestre em Microbiologia). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2010.

TRIGUI, M.; HSOUNA, A.B.; TOUNSI, S.; JAOUA, S. Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 41, p. 150– 157, 2012.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA-JR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.38, p. 369-380, 2007.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B. DE F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. DE S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, São Paulo, v.30, n.5, p. 1323-1338, 2007.

VELASQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; BUSCHIAZZO, P. M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 74, p. 91-7, 2003.

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L. et al. **Controle de doenças de plantas fruteiras**. v.1, Viçosa-MG: UFV, 2002, p. 445-509.

VENZON, M.; PAULA JUNIOR, T.J.; PALLINI, A. (Orgs). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM: UFV, 2006. 360p.

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

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**: a thin layer chromatography atlas. 2. ed. Heidelberg: Springer, 1996. 369p.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Eds). **Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p.47-75.

ZUANAZZI J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2010, p. 578-612.

APÊNDICES

APÊNDICE A

< Uso exclusivo do INPI >

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PROTOCOLO GERAL

025130000172
18/06/2013 14:32 REES



BR 10 2013 015300 1

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR


INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
	Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente	Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES
- 1.2 Qualificação: INSTITUIÇÃO DE ENSINO SUPERIOR - IES
- 1.3 CNPJ/CPF: 32479123/000143
- 1.4 Endereço Completo: AV. FERNANDO FERRARI, 514, VITÓRIA - ES
- 1.5 CEP: 29075910
- 1.6 Telefone: 27 40097885
- 1.7 Fax: 27 40092438
- 1.8 E-mail: init@prppg.ufes.br

 continua em folha anexa

- 2. Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

"BIOBASE AUTOEMULSIONÁVEL FITOSANITIZANTE, PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIOBASE E USOS DA MESMA"

 continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão: do pedido Nº** **Data de Depósito:**

- 5. Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

 continua em folha anexa

APÊNDICE A



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: MARIA DIANA CERQUEIRA SALES

6.2 Qualificação: MESTRE EM BIOTECN.

6.3 CPF: 447.707.746-72

6.4 Endereço Completo: Rua Júlia Lacourt Penna, 190- Jardim Camburi, Vitória-ES

6.5 CEP: 29.090-210

6.6 Telefone: 27 33450795

6.7 FAX:

6.8 E-mail: dsdianasales@gmail.com

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 a 11.12 os documentos anexados, se houver.

APÊNDICE A


INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	3/3
	Título do Documento:	Depósito de Pedido de Patente		Código:	FQ001
				Versão:	2
				Procedimento:	DIRPA-PQ006

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	01
<input type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	21
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	03
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: n ^o , _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	03
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	01
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ n ^o de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) Documentos de Cessão de Direitos do Inventor (02) TERMO DE POSSE DO REITOR (01)	03

12. Total de folhas anexadas: 32 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Vitória/ES, 04 de junho de 2013

Local e Data

Assinatura e Carimbo



Reinaldo Centoducatte
 Reitor
 Universidade Federal do Espírito Santo

APÊNDICE A**Continuação****6. Inventor (72):**

6.1 Nome: José Aires Ventura

6.2 Qualificação: Doutor em Fitopatologia

6.3 CPF: 451.632.947-68

6.4 Endereço Completo: Rua Ludwick Maçal 265- Apt. 202, Jardim da Penha,

Vitória/ ES

6.5 CEP: 29 060-030

6.6 Telefone: 27-30220399

6.7 FAX:

6.8 E-mail: ventura@incaper.es.gov.br ; ventura@pq.cnpq.br**6. Inventor (72):**

6.1 Nome: Patrícia Machado Bueno Fernandes

6.2 Qualificação: Doutora em Química

6.3 CPF: 778.941.547-68

6.4 Endereço Completo: Rua Renato Nascimento Daher Carneiro, 780, apt. 503,

Vitória/ES

6.5 CEP: 29052-730

6.6 Telefone: 27 33357348

6.7 FAX:

6.8 E-mail: pmbfernandes@gmail.com