



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**



**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA**  
**ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS NAS**  
**CASCAS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi**

**CAMILA CASTELO BRANCO RANGEL DE ALMEIDA**

**RECIFE**  
**2013**

**CAMILA CASTELO BRANCO RANGEL DE ALMEIDA**

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA  
ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS NAS  
CASCAS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Karina Perrelli Randau

**RECIFE  
2013**

Catálogo na Publicação  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- A447e Almeida, Camila Castelo Branco Rangel de.  
Estudo farmacognóstico e validação de metodologia  
espectrofotométrica para quantificação de taninos nas cascas de *schinus  
terebinthifolius raddi* / Camila Castelo Branco Rangel de Almeida. – Recife:  
O autor, 2013.  
93 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.
- Orientador: Luiz Alberto Lira Soares.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.  
Inclui bibliografia.
1. Aroeira. 2. Histoquímica. 3. Espectrofotometria. 4. Polifenóis. I.  
Soares, Luiz Alberto Lira (Orientador). II. Título.
- 615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-113)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 25 de Fevereiro de 2013

Defesa de dissertação de mestrado aprovada em 25 de fevereiro de 2013 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares  
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

EXAMINADOR INTERNO: Profª Drª Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim  
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

EXAMINADOR EXTERNO: Profª Drª Flávia Carolina Lins da Silva  
(Centro de Educação e Saúde - UFCG)

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente aos meus orientadores, Prof. Luiz Alberto Soares e Prof<sup>a</sup> Karina Randau, pela oportunidade que me foi dada e pela dedicação e empenho admiráveis. Em seguida a todos os meus companheiros de laboratório, em especial a Magda, Asaph e Marcos pelas valiosas contribuições, a Larissa pela amizade, companhia e trocas de favores e de angustias e a Vanessa pelo companheirismo e pelas tardes animadas. À minha irmã Cecília e ao meu pai pelo apoio para seguir em frente. Às minhas amigas Grace e Rafaella pelas aflições compartilhadas, o convívio com vocês foi muito importante. A Daniela e Thiago pelo apoio nas horas necessárias. A Rafael companheiro em todos os momentos.

Muito obrigada!

“É um privilégio ter vivido uma vida difícil”

Indira Gandhi

## RESUMO

*Schinus terebinthifolius* Raddi conhecida popularmente por aroeira e amplamente distribuída no Brasil, é utilizada na medicina tradicional por apresentar atividades biológicas comprovadas. Estas são geralmente atribuídas à presença dos polifenóis e taninos existentes em sua composição. O objetivo deste trabalho foi realizar caracterização anatômica e histoquímica dos ramos e da casca do caule e validar metodologia para quantificação de taninos totais presentes na casca empregando o reagente de Folin-Ciocalteu (FC). O material vegetal foi coletado, identificado no herbário do IPA e a exsiccata depositada sob o número 87539. O material foi preparado em lâminas semipermanentes seguindo os procedimentos usuais em anatomia vegetal. A folha é revestida por cutícula estriada, possui tricomas e estômatos anomocíticos apenas na face abaxial. O mesofilo é assimétrico em disposição dorsiventral com feixes vasculares colaterais. O caule apresenta tricomas tectores e glandulares, lenticela e raios unisseriados. O xilema é constituído por elementos de vasos todos com placas de perfuração simples, e pontuações dos tipos alternadas, reticuladas e escalariformes; podem apresentar apêndice nas extremidades ou não. Na casca observa-se bainha esclerenquimática completa, camadas de floema secundário e raios bisseriados heterogêneos. Em todas as partes estudadas foram verificados cristais de oxalato de cálcio e canais secretores, estes são ramificados na casca. Polifenóis e taninos foram identificados em todas as partes analisadas. A metodologia para quantificação de taninos foi validada quanto aos parâmetros exigidos pela RE nº 899/2003. E demonstrou ser adequada para a espécie, apresentando especificidade e linearidade ( $R^2 = 0,9924$ ). A recuperação apresentou valores entre 88,24 e 93,86%. O método também foi preciso através da repetitividade, determinada pelo desvio padrão relativo de seis extratos à concentração teste com  $TT = 3,29 \mu\text{g/mL} \pm 0,132$  (4,00%), e na precisão intermediária os fatores dias e analistas diferentes não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Quanto à robustez a análise demonstrou que durante o experimento as amostras e o reagente FC devem ser protegidos da luz. Dessa forma, os resultados deste trabalho contribuem para a diagnose desta espécie fornecendo assim subsídios para a certificação de autenticidade da droga vegetal. Além de garantir segurança para a quantificação, por espectrofotometria, do teor de taninos totais na casca de *Schinus terebinthifolius*.

**Palavras chave:** Aroeira. Anatomia. Histoquímica. Espectrofotometria. Polifenóis.

## ABSTRACT

*Schinus terebinthifolius* Raddi, popularly known as aroeira and widely distributed in Brazil, is used in traditional medicine due to its proven biological activities. These are generally attributed to the presence of polyphenols and tannins existent in its composition. The aim of this study was to perform the anatomical and histochemistry characterization of the branches and stem bark and to validate a methodology for quantification of tannins present in the stem bark using the Folin-Ciocalteu (FC) reagent. The plant material was collected, identified at the herbarium of IPA and the voucher was deposited under the number 87539. The material was prepared in semipermanent glass slides according to the usual procedures in plant anatomy. The leaf is coated by striated cuticle, trichomes and has anomocytic stomates only on the abaxial surface. The mesophyll is asymmetrical in dorsiventral disposition with collateral vascular bundles. The stem has glandular and no glandular trichomes, lenticels and uniseriate rays. In the xylem were evidenced tracheid and vessel elements all with simple perforation plates and alternate, reticulated and scalariform marks; may present appendix at the ends or not. In the bark is observed sclerenchymatic sheath complete layers of secondary phloem and biseriate heterogeneous rays. In all the parts analyzed were verified calcium oxalate crystals and secretory ducts, these are branched in the shell. Polyphenols and tannins were identified in all parts studied. The methodology for quantification of tannins was validated for the parameters required by RE n° 899/2003. The methodology was adapted and validated for the species, with specificity and linearity ( $R^2 = 0.9924$ ). The recovery presented values between 88.24 and 93.86%. The method is also accurate by repeatability, determined by relative standard deviation of six extracts concentration test with  $TT = 3.29 \mu\text{g} / \text{mL} \pm 0.132$  (4.00%), and in the intermediate precision the factors days and different analysts showed no statistically significant difference. As for robustness, the analysis showed that during the experiment the samples and FC reagent should be protected from light. Therefore, the results of this work contribute to the diagnosis of this species thus providing subsidies for certification of authenticity plant drug. Besides ensuring safety for quantification by spectrophotometry of total tannins in the bark of *Schinus terebinthifolius*.

**Keywords:** Aroeira. Anatomy. Histochemistry. Spectrophotometry. Polyphenols.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                |             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>                                                                                                     | <b>Pág.</b> |
| Figura 1. Estrutura química do ácido gálico e do ácido elágico.....                                                            | 21          |
| Figura 2. Estrutura química dos monômeros catequina e epicatequina.....                                                        | 22          |
| <br><b>CAPÍTULO I</b>                                                                                                          |             |
| Figura 1. Folíolo de <i>Schinus terebinthifolius</i> em secção paradérmica.....                                                | 50          |
| Figura 2. Folíolo de <i>Schinus terebinthifolius</i> em secção transversal.....                                                | 50          |
| Figura 3. Nervura central de <i>Schinus terebinthifolius</i> em secção transversal.....                                        | 51          |
| Figura 4. Pecíolo em secção transversal.....                                                                                   | 51          |
| Figura 5. Caule jovem de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) em secção transversal.....                      | 52          |
| Figura 6. Caule jovem de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) em secção transversal.....                      | 52          |
| Figura 7. Caule jovem de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) em secção longitudinal radial.....              | 53          |
| Figura 8. Caule jovem de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) em secção longitudinal tangencial.....          | 54          |
| Figura 9. Casca de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) em secção transversal.....                            | 55          |
| Figura 10. Casca de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) em secção longitudinal radial.....                   | 56          |
| Figura 11. Casca de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) em secção longitudinal tangencial.....               | 56          |
| Figura 12. Macerado do caule de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae).....                                     | 57          |
| Figura 13. Histoquímica do folíolo de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) em secção transversal.....         | 58          |
| Figura 14. Histoquímica do caule dos ramos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) em secção transversal..... | 59          |
| Figura 15. Histoquímica da casca do caule de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) em secção transversal.....  | 60          |

## CAPÍTULO II

|                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Espectro de varredura para solução amostra correspondente a polifenóis totais a partir da matéria-prima de <i>S. terebinthifolius</i> Raddi .....              | 68 |
| Figura 2. Histoquímica da casca do caule de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) em secção transversal.....                                             | 69 |
| Figura 3. Gráfico de Pareto obtido através de planejamento fatorial $3^2$ .....                                                                                          | 71 |
| Figura 4. Superfície de resposta, para os principais efeitos (tempo de reação e concentração de carbonato de sódio), obtido através de planejamento fatorial $3^2$ ..... | 72 |
| Figura 5. Curva de calibração do padrão ácido gálico.....                                                                                                                | 72 |
| Figura 6. Curva de linearidade representando taninos totais nas cascas de <i>S. terebinthifolius</i> .....                                                               | 73 |
| Figura 7. Espectro de varredura do padrão (ácido gálico).....                                                                                                            | 74 |
| Figura 8. Espectro de varredura para solução amostra correspondente a polifenóis totais nas cascas de <i>S. terebinthifolius</i> .....                                   | 74 |
| Figura 9. Gráfico de comparação entre as retas de linearidade e especificidade demonstrando a especificidade do método.....                                              | 75 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Comparação anatômica do caule e da casca do caule de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....     | 38 |
| Tabela 2. Histoquímica das folhas, do caule e da casca do caule de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi..... | 40 |

### CAPÍTULO II

|                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Matriz de desenho composto central (DCC) aplicado para avaliar a influência da quantidade de reagente de Folin, concentração de carbonato e tempo de reação nas respostas do método (absorbância)..... | 65 |
| Tabela 2. Valores da absorbância da cinética de reação de complexação dos polifenóis com o reagente Folin Ciocalteau.....                                                                                        | 69 |
| Tabela 3. Matriz de planejamento experimental.....                                                                                                                                                               | 70 |
| Tabela 4. Análise da precisão intermediária.....                                                                                                                                                                 | 75 |
| Tabela 5. Teste de recuperação.....                                                                                                                                                                              | 76 |
| Tabela 6. Análise da robustez.....                                                                                                                                                                               | 77 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                             | Pág.      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                   | <b>11</b> |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                    | <b>13</b> |
| <b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>                                                                                                          | <b>14</b> |
| 3.1 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.. .....                                                                                           | 14        |
| 3.1.1 Aspectos botânicos .....                                                                                                              | 15        |
| 3.1.2 Aspectos fitoquímicos .....                                                                                                           | 16        |
| 3.1.3 Propriedades medicinais .....                                                                                                         | 17        |
| 3.1.4 Aspectos toxicológicos .....                                                                                                          | 20        |
| 3.2 Taninos .....                                                                                                                           | 21        |
| 3.3 Métodos de quantificação de taninos .....                                                                                               | 23        |
| 3.4 Validação de métodos analíticos .....                                                                                                   | 25        |
| <b>4 CAPÍTULO I .....</b>                                                                                                                   | <b>26</b> |
| 4.1 Anatomia do caule de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae).....                                                         | 26        |
| <b>5 CAPÍTULO II.....</b>                                                                                                                   | <b>61</b> |
| 5.1 Validação de metodologia analítica para quantificação de taninos na casca de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae)..... | 61        |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                                                                          | <b>82</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                     | <b>84</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas desde a antiguidade pela população para o tratamento de doenças. Com o desenvolvimento da ciência e avanço de pesquisas foi descoberto que as plantas medicinais possuem metabólitos secundários responsáveis por suas atividades biológicas e que contribuem para a cura (CAPASSO, 1986; KOROLKOVAS, 1996; RATES, 2001; GARCIA et al., 2003). Com o passar do tempo o comércio de plantas aumentou e as indústrias de fitoterápicos também surgiram. Ocorrendo a disponibilidade e acesso a produtos muitas vezes sem condições adequadas de uso, sem garantia da qualidade, segurança e eficácia, fundamentais para a recuperação ou preservação da saúde do usuário. Necessitando-se, portanto do desenvolvimento de métodos e especificações para garantir a qualidade desde a exploração racional dos recursos naturais empregados como matéria-prima, durante o processo de produção até a dispensação do produto acabado (MARQUES, 1996; CALIXTO, 2000; ELVIN-LEWIS, 2001; RATES, 2001; CHAN, 2003; BENT; KO, 2004; GIVEON et al., 2004; FISHER, 2005).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 14/2010 trata das exigências para a obtenção do registro de fitoterápicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). E como requisitos mínimos são exigidos métodos de controle de qualidade botânico e químico. Para o controle de qualidade botânico são exigidos testes de autenticidade e identificação microscópicas, que podem ser obtidos através da análise anatômica e histoquímica. Dentro dos métodos de diagnose anatômica há a maceração que promove a dissociação das células possibilitando observá-las isoladamente, sendo indicado para a análise do material quando este se encontra fragmentado. Quanto ao controle químico, as espécies vegetais produzem diferentes substâncias químicas denominadas de metabólitos secundários em diferentes proporções, que variam, por exemplo, de acordo com o habitat, a pluviosidade, o oferecimento de luz, as características dos solos e do seu potencial genético. Algumas substâncias químicas também podem ser características de uma determinada espécie vegetal (MIGLIATO et al., 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Neste contexto os metabólitos secundários podem ser empregados como marcadores para a caracterização e identificação da espécie, assim como sua presença pode ser responsável pela manutenção da eficácia da droga vegetal (DAVID et al., 2004).

*Schinus terebinthifolius* é uma espécie vegetal com reconhecida importância medicinal, sendo utilizada pela população e suas cascas são empregadas na produção de diversos fitoterápicos e cosméticos tais como: Kios<sup>®</sup> (comprimido utilizado no tratamento de gastrite), Kronel<sup>®</sup> gel (utilizado no tratamento de cervicites e vaginites), Sanativo<sup>®</sup> (utilizado como cicatrizante) e Kronel<sup>®</sup> sabonete íntimo ou infantil (ZUANAZZI; MONTANHA 2004; MELLO; SANTOS, 2006). É uma espécie vegetal conhecida por apresentar alto teor de polifenóis, dos quais a maioria são taninos. Os taninos correspondem a um grupo de substâncias amplamente distribuído no reino vegetal, aos quais é atribuído um número significativo de atividades biológicas (HASLAM et al., 1989; SCHOLZ, 1994). Devido às suas atividades esses metabólitos secundários, bem como as espécies que os contém, despertam um grande interesse para produção de fitoterápicos. Diante disto têm sido empregados como substâncias marcadoras para avaliação da qualidade de diversas matérias primas vegetais (SOARES, 2002; MELLO; SANTOS, 2006).

Devido à variedade de métodos e reagentes utilizados para realizar a quantificação de taninos, existe a necessidade da padronização e validação de um método que seja seguro e eficaz. Assim como existe a variedade metodológica, cada espécie vegetal possui suas características particulares, e que não podem ser desconsideradas no momento de ensaios que visam avaliar a qualidade da matéria prima que será utilizada para a produção de fitoterápicos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi a caracterização anatômica e histoquímica dos ramos e da casca do caule de *Schinus terebinthifolius* Raddi, bem como a validação de método de doseamento dos taninos presentes nas cascas, a fim de contribuir para o controle de qualidade desta espécie.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo farmacognóstico e validar metodologia espectrofotométrica para quantificação de taninos das cascas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar caracterização anatômica e histoquímica dos ramos e da casca do caule de *S. terebinthifolius*;
- Otimizar e validar metodologia espectrofotométrica para quantificação de taninos das cascas do caule de *S. terebinthifolius*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *Schinus terebinthifolius* Raddi

*Schinus terebinthifolius* é uma espécie vegetal pertencente à família Anacardiaceae, a qual é composta por 79 gêneros com aproximadamente 600 espécies, predominantemente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, mas poucas podem ocorrer em regiões temperadas (JUDD et al., 1999; JOLY, 2002). Nesta família, as espécies podem apresentar folhas inteiras ou compostas de disposição alterna, flores pequenas, não vistosas de coloração branca ou amarelo-esverdeada com sépalas e pétalas pentâmeras e frutos que podem ser secos, tipo noz, baciforme ou drupáceo, podendo também ocorrer, desenvolvimento de pseudofrutos como no gênero *Anacardium* (JOLY, 2002).

Algumas espécies de Anacardiaceae são conhecidas por possuírem madeira de boa qualidade e importância alimentar, muitas são frutíferas, como *Mangifera indica* L. (manga), *Anacardium occidentale* L. (caju), *Spondias mombin* L. (seriguela) e *Pistacia vera* L. (pistache) (BARROSO, 1991; JUDD et al., 1999; LORENZI; MATOS, 2002). Outras são empregadas na medicina popular, sendo utilizadas como cicatrizante, estomáquico e antidiarréico, principalmente pela presença de taninos (JOLY, 2002) e óleo-resinas (SANGUINETTI, 1989; CRUZ, 1995; ALONSO, 1998; LORENZI; MATOS, 2002). Como exemplo de *Anacardium humile* A. St.-Hil. (caju-do-cerrado), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (arendiúva) e *Schinus molle* L. (pimenteiro) (JOLY, 2002).

Muitas espécies de Anacardiaceae também são conhecidas por causarem dermatites em indivíduos suscetíveis, devido à catecóis presentes na resina secretada (CRONQUIST, 1981; JUDD et al., 1999). Além de taninos e óleo-resinas, são comuns em diferentes membros desta família, metabólitos como terpenos, flavonoides, ácidos orgânicos, e outros complexos químicos (LLOYD et al., 1977; MORTON, 1978; SKOPP; SCHWENKER, 1986).

*Schinus terebinthifolius* é uma das espécies de Anacardiaceae que desperta interesse farmacêutico por se tratar de uma planta com propriedades medicinais, e por apresentar constituintes fitoquímicos importantes, os quais têm auxiliado no tratamento e cura de diversas doenças (GUERRA et al., 2000; AMORIM; SANTOS, 2003). É uma das 71 plantas medicinais listadas pelo Ministério da Saúde como de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), além de fazer parte da primeira edição da Farmacopéia Brasileira (1926).

### 3.1.1 Aspectos botânicos

*Schinus terebinthifolius* Raddi, conhecida popularmente por aroeira, aroeira vermelha, aroeira pimenteira, pimenta brasileira, aroeira da praia, aroeira negra, aroeira mansa e fruto-de-sabiá (LORENZI, 1992; TAKEDA; FARAGO, 2001; DI-STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI; MATOS, 2002). Essa espécie apresenta grande plasticidade ecológica, é nativa da América do Sul (CARMELLO-GUERREIRO; PAOLI, 2002), distribui-se desde o Nordeste do Brasil até o Rio Grande do Sul, sendo encontrada também na Argentina, Paraguai e Uruguai (SANCHONETE, 1989). Está presente em várias formações vegetais e se adapta em variados ambientes (LORENZI, 2002; BACKES; IRGANG, 2002), ocorrendo desde o nível do mar até 2000 metros de altitude, e em locais com precipitação média anual de 950 mm a 2200 mm (CARVALHO, 1997; TAKEDA; FARAGO, 2001; LORENZI; MATOS, 2002). Segundo a Fundação André Tosello (2003), a aroeira é encontrada também na transição do cerrado e mata mesófila.

Sua altura pode variar de 5 a 10 m, podendo apresentar-se como arbustos de caule retorcido até a forma de árvore com copa globosa (LORENZI, 2002; BACKES; IRGANG, 2002). O diâmetro do tronco varia de 20 a 60 cm (REITZ et al., 1983), revestido por casca grossa. As folhas são alternas, compostas, imparipinadas geralmente com nove ou onze folíolos de aproximadamente 3 cm de comprimento e 1 cm de largura. Estes são sésseis, elíptico-lanceolados a obovados, coriáceos, de margem lisa a levemente serrilhada, ápice agudo a obtuso e base aguda (DUARTE et al., 2007). Possui inflorescências paniculadas, com flores pequenas e esbranquiçadas e os frutos são globóides vermelhos do tipo drupa (TAKEDA; FARAGO, 2001; LORENZI; MATOS, 2002). Estes são conhecidos por pimenta-rosa ou pimenta brasileira, e são utilizados na cozinha nacional e internacional como um condimento alimentar que substitui a pimenta do reino (LORENZI, 1998; BACKES; IRGANG, 2002).

Ecologicamente é classificada como planta perenifólia, heliófita e pioneira (SANCHOTENE, 1989; CARVALHO, 1997; LORENZI, 1998; BACKES; IRGANG, 2002). Desenvolve-se facilmente em ambientes úmidos, crescendo também em terrenos secos e pobres (LORENZI, 1992). Devido à facilidade do replantio e propagação, a aroeira é uma espécie potencial para o reflorestamento e recuperação de áreas degradadas e solos pouco férteis (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; CARPANEZZI, et al., 1990; GLUFKE, 1999;

TAKEDA; FARAGO, 2001; LORENZI; MATOS, 2002). Devido sua facilidade de adaptação, tornou-se uma espécie invasora na Flórida, sendo proibido o seu plantio (BACKES; IRGANG, 2002).

### 3.1.2 Aspectos fitoquímicos

*Schinus terebinthifolius* é bastante estudada do ponto de vista químico e diversos estudos descrevem os constituintes presentes nesta espécie. Foram identificados metabólitos secundários como: fenóis (STAHL et al., 1983; CERUKS et al., 2007), flavonoides (KASSEM et al., 2004; DEGÁSPARI et al., 2005; LIMA et al., 2006), óleos essenciais ricos em triterpenos, monoterpenos e sesquiterpenos (LLOYD et al., 1977; LIMA et al., 2006; LIMA et al., 2009), alcalóides, saponinas (KRÖKER, 2003; LIMA et al., 2006), esteroides, antraquinonas (LIMA et al., 2006) e alto teor de taninos (LORENZI, 2002; MATOS, 2002; LIMA et al., 2006; LIMA et al., 2009; CARLINI et al., 2010; KRÖKER, 2012).

Em 1977, Lloyd e colaboradores, descreveram no óleo volátil, a presença de  $\alpha$  e  $\beta$  – pineno, carene, limoneno,  $\alpha$  e  $\beta$  felandreno, p-cimeno e terpinoleno, juntamente com pequenas quantidades de álcoois e cetonas monoterpênicas e triterpênicas, hidrocarbonetos sesquiterpênicos, além de triterpenos (CAMPELO; MARSAIOLI, 1975) e triterpenos ácidos (CAMPELO; MARSAIOLI, 1974) nos extratos das cascas e folhas. Na Flórida e em outros países, *S. terebinthifolius* é classificada como uma categoria de espécies terrestres invasoras, devido a atividade alelopática que possui (BENNETT; HABECK, 1991; MORGAN; OVERHOLT, 2005). Tendo sido identificados 57 óleos essenciais, em várias partes desta espécie, das quais boa parte foram terpenóides que representaram 4,65% (m/m) nos frutos maduros, podendo estes óleos serem potenciais substâncias químicas alelopáticas (ALMEIDA BARBOSA et al., 2007).

Em extrato etanólico das folhas foram evidenciados fenóis, flavonas, flavonoides e esteroides (LIMA et al., 2006). Ceruks e colaboradores (2007) analisaram a fração acetato de etila, de uma partição de extrato etanólico das folhas, e guiados pelo ensaio para detecção do potencial antirradical livre (DPPH) isolaram cinco compostos fenólicos, galato de etila, galato de metila, miricetina, miricetrina (miricetina-3-O- $\alpha$ -ramnosídeo) e quercitrina (quercetina-3- $\alpha$ -ramnosídeo). A composição do extrato das folhas de *S. terebinthifolius* obtidos por

bioprospecção revelou a presença de saponinas, flavonoides, triterpenos, esteróides e taninos (JOHANN et al., 2007).

A análise química da casca de *Schinus terebinthifolius* provou a existência de antraquinonas, xantonas e esteroides livres (LIMA et al., 2006). Foi identificada a presença de alto teor de taninos condensados (catequina), ácido gálico e flavonoides. Saponinas, derivados de ácido cinâmico, triterpenos/esteroides, monoterpenos, sesquiterpenos e açúcares também foram evidenciados (LIMA et al., 2009; SANTOS et al., 2000). Carlini e colaboradores (2010) quantificaram em extrato liofilizado das cascas de *S. terebinthifolius*, 43,5% de fenóis totais, dos quais 0,9% correspondiam a taninos gálico. Lima e colaboradores (2006) verificaram no extrato etanólico da casca do caule de *S. terebinthifolius* a presença de fenóis, triterpenos pentacíclicos e antraquinonas enquanto que no extrato hexano o teste foi positivo para flavonas, flavonoides, xantonas, esteroides, antraquinonas e triterpenos pentacíclicos (LIMA et al., 2006).

### 3.1.3 Propriedades medicinais

Há muitos anos o uso medicinal da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é descrito, tendo sido referido na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (1926). A aroeira é bastante utilizada pela população desde a época dos jesuítas, que preparavam o “Bálsamo das Missões” com sua resina, famosa no Brasil e no exterior, devido suas propriedades terapêuticas, sendo indicada popularmente contra gastrite, azia, febre, uretrite, diarreia, tosse, reumatismo, dor de dente e micoses (KRÖKER, 2003). Esta espécie é muito utilizada na medicina popular, e há diversos estudos que através de diferentes modelos farmacológicos relatam propriedades como anti-inflamatória (GAZZANEO et al., 2005; CAVALHER-MACHADO et al., 2008), antimicrobiana (SCHMOURLO et al., 2005; LIMA et al., 2006; JOHANN et al., 2007; SILVA et al., 2009), cicatrizante (COUTINHO et al., 2006; LUCENA et al., 2006), expectorante, antiséptico, antidiarreico (DI-STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI; MATOS, 2002; MEDEIROS et al., 2004), antioxidante (VELÁZQUEZ et al., 2003; AABY et al., 2004; CERUKS et al., 2007), gastroprotetor (FALCÃO et al., 2008; CARLINI et al., 2010) e antitumoral (QUEIRES et al., 2006).

Em 1977, Lloyd e colaboradores descreveram que o óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* foi usado para tratar problemas respiratórios, micoses e infecções por *Candida*

spp. (uso tópico), e que essas atividades foram atribuídas a altas concentrações de monoterpenos presentes. Enquanto Siddiqui e colaboradores (1995) relataram que os óleos essenciais desta planta possuem atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus subtilis* e cepas de *Staphylococcus* sp. O estudo realizado por Silva e colaboradores (2009), utilizando isolados de bactérias causadoras de otite em cães, mostrou que o óleo essencial de *S. terebinthifolius* foi ativo contra todos os estafilococos coagulase-positiva obtidos a partir de cães doentes, resistente a vários antibióticos indicados para a terapia.

O extrato hidroalcólico de folhas da Aroeira mostrou significativa atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e ação antifúngica contra *Candida albicans*, em concentrações de 12,6 e 6,3 mg/mL (MARTINEZ et al., 1996; MARTINEZ et al., 2000). O extrato etanólico das folhas inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (MARTINEZ et al., 1996; GUERRA et al., 2000). Em estudo de Johann e colaboradores (2007), sobre a atividade antifúngica da aroeira, os extratos das folhas nas frações acetato de etila e diclorometano apresentaram forte atividade contra cepas de *Candida krusei*, *Candida glabrata* e de *Sporothrix schenckii* (Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 30 µg/mL), esta última foi altamente sensível para o extrato etanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* (CMI de 15 µg/mL).

Em contraste, os extratos a partir da casca de *S. terebinthifolius* foram mais ativos contra *Cryptococcus neoformans*, considerando que o extrato bruto (etanólico) e a fração de acetato de etila exibiram uma CMI de 30 µg/mL. O extrato aquoso das folhas não foi eficiente contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e o extrato etanólico foi mais eficiente contra *C. albicans* (SCHOMOURLO et al., 2006). Em estudo de Amorim e Santos (2003), extratos aquosos da folha e do caule não apresentaram atividade em concentrações inferiores a 1000 µg/mL. Porém, em outro trabalho o extrato aquoso de *S. terebinthifolius* inibiu o crescimento de *Candida albicans* (SCHMOURLO et al., 2005).

O extrato etanólico da casca de *Schinus terebinthifolius* numa concentração de 1 mg/mL, bem como as frações em hexano, clorofórmio e em acetato de etila provenientes deste, apresentaram melhor atividade contra cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* (fluorquinolonas resistentes e resistentes a macrolídeos) que contra cepas suscetíveis a tratamento com antimicrobianos tradicionais (LIMA et al., 2006). Também foi descrito o uso

popular de *S. terebinthifolius* para tratar infecções respiratórias (LIMA et al., 2006) e que esta espécie é indicada para o tratamento de vaginite e estomatite bacteriana (AMORIM; SANTOS, 2003).

Estudos também revelam atividade cicatrizante, na qual o extrato hidroalcoólico da casca de *Schinus terebinthifolius* por via intraperitoneal apresentou um efeito positivo no processo de cicatrização de anastomoses do cólon (COUTINHO et al., 2006), na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga (LUCENA et al., 2006) e por via percutânea, apresentou ação cicatrizante nas feridas do dorso de ratos (CASTELO BRANCO NETO et al., 2006). Também foi evidenciado que alguns eventos responsáveis pelo processo de cicatrização foram favorecidos em ratos que receberam extrato de aroeira para tratar feridas cirúrgicas em bexigas, como por exemplo neoformação vascular, colagenização e menor inflamação aguda (LUCENA et al., 2006).

Ceruks e colaboradores (2007) analisaram a fração acetato de etila das folhas de *S. terebinthifolius*, isolaram os seguintes compostos: galato de etila, galato de metila, miricetina, miricetrina (miricetina-3-O- $\alpha$ -ramnosídeo) e quercitrina (quercetina-3- $\alpha$ -ramnosídeo), os quais apresentaram potencial atividade antioxidante do tipo antirradical livre (DPPH). Kikuzaki e colaboradores (2002) compararam as atividades do ácido gálico e de uma série de seus ésteres frente ao DPPH, para analisar suas atividades antioxidantes, e todas as substâncias foram mais ativas que o  $\alpha$ -tocoferol. Visto que ésteres do ácido gálico e flavonóides derivados da miricetina e quercetina apresentam elevado potencial anti-radicalar (KIKUZAKI et al., 2002; AABY et al., 2004) sugere-se que estas substâncias e seus derivados sejam as responsáveis pela atividade antioxidante da aroeira. Em estudo realizado por Velázquez e colaboradores (2003) com o extrato das partes aéreas da aroeira, também revelou atividade antioxidante de *S. terebinthifolius* devido sua capacidade de sequestrar o radical livre DPPH e atividade de superóxido.

O extrato aquoso de folhas de *Schinus terebinthifolius* revelou atividade anti-inflamatória do tipo não-esteroidal, através de tratamento oral com doses de 0,125 a 0,5 g/kg (MOURELLE et al., 1993). Triterpenoides presentes nos frutos mostraram ser inibidores competitivos específico da fosfolipase A2 secretada (JAIN et al., 1995).

O extrato de aroeira foi administrado por gavagem e por via intraperitoneal, onde foi avaliado o índice de ulceração (ou número de úlceras por rato), sendo o extrato (decocto) da aroeira ativo por ambas as vias. O efeito anti-úlceras foi visto em doses de 50 mg/kg à 300

mg/kg, onde os animais tratados com estas doses ou doses superiores não mostraram lesões gástricas. A utilização do extrato de aroeira foi suficiente para produzir efeitos de aumento do volume e do pH do suco gástrico, redução do sangramento além de redução do trânsito intestinal, possuindo assim um efeito marcante de proteção da mucosa gástrica em ratos (CARLINI et al., 2010).

Estudos sobre plantas com ação antiulcerogênia, relacionam essa atividade aos compostos fenólicos (BORRELI; IZZO, 2000; FALCÃO et al., 2008). Devido os efeitos antioxidantes e de proteção da mucosa gástrica, desses metabólitos, especialmente dos taninos. Estando estas substâncias presentes em alta quantidade em *Schinus terebinthifolius* (CARLINI et al., 2010). Em outro estudo pré-clínico, utilizando o decocto, ficou comprovada a sua eficácia como protetor gástrico, elevando o pH do suco gástrico de 5,85 para 6,57 (SANTOS et al., 2006).

### 3.1.4 Aspectos toxicológicos

Estudos demonstraram que a resina, o cardanol e outros componentes do óleo essencial ( $\alpha$ -felandreno,  $\beta$ -felandreno e  $\delta$ -careno) de *Schinus terebinthifolius* podem causar dermatite alérgica (STAHL et al., 1983; MORAES et al., 2004). Porém em ensaio pré clínico realizado com o óleo da aroeira, com doses menores que 225 mg/kg, não observaram-se alterações clínicas nem histológicas significativas que indicassem potencial toxicidade (SILVA et al., 2009).

Quanto ao extrato da casca do caule de *S. terebinthifolius*, administrado por via oral em doses de até 5 g/kg, não houve qualquer sinal de toxicidade aguda em ratos (LIMA et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos com os frutos de aroeira consumidos por via oral (PIRES et al., 2004).

O tratamento subagudo com doses diárias do extrato da casca por 45 dias consecutivos, também não produziu qualquer sinal clínico de toxicidade ou mortes. Não ocorreram alterações no peso, na ingestão de água e de alimento durante o período de tratamento. Não houve alterações significativas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Além disso, não houve qualquer efeito sobre os níveis de alanina, aspartato aminotransferases e gama-glutamil transpeptidase e creatinina, os quais são bons indicadores do funcionamento do fígado e das funções renais, respectivamente. A ausência de toxicidade hepática foi

confirmada pela avaliação histológica deste órgão, e ao fato de os níveis plasmáticos de colesterol permanecerem inalterados (HILALY et al., 2004; LIMA et al., 2009).

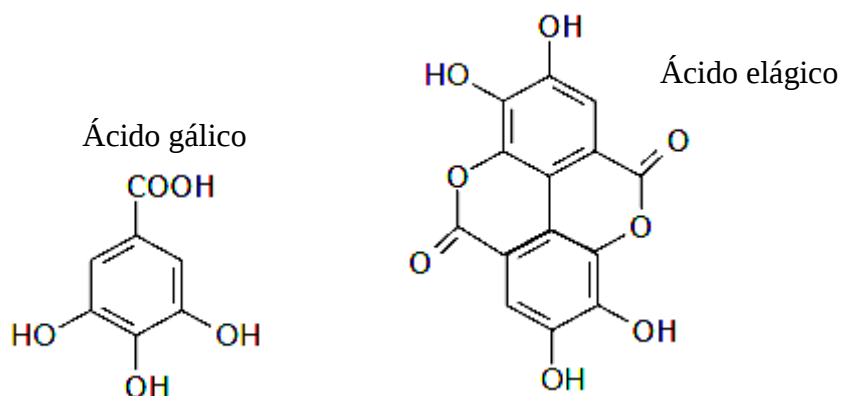
Os dados acima contribuem para a segurança do uso desta espécie na medicina popular e na produção de fitoterápicos.

### 3.2 Taninos

*Schinus terebinthifolius* apresenta alto teor de taninos e estes estão relacionados às principais atividades biológicas desta espécie. Sabe-se que os taninos correspondem a um grupo de metabólitos secundários amplamente distribuído no reino vegetal, ao qual é atribuído um número significativo de atividades (HASLAM et al., 1994). São substâncias complexas de natureza polifenólica, com peso molecular variando de 500 a 3000 Dalton (MELLO; SANTOS, 2006). De acordo com suas estruturas químicas, são divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (BRUNETON, 2001; MELLO; SANTOS, 2006).

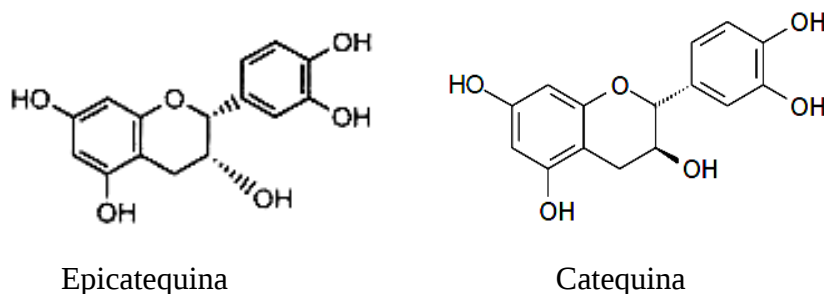
Os taninos hidrolisáveis são ésteres, com um açúcar central e ácidos fenólicos, principalmente ácidos gálico e elágico (Figura 1). Os galotaninos resultam da união entre unidades de ácido gálico e um poliol. Os elagitaninos possuem um ou dois resíduos de hexa-hidroxi-difenila-D-glicose (HHDP) unidos a um açúcar central (Figura 2).

**Figura 1.** Estrutura química do ácido gálico e do ácido elágico.



Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3,4-diol ou de flavan-3-ol, como a catequina ou a epicatequina, respectivamente unidas por pares de ligações C4→C8 ou C4→C6 (Figura 2).

**Figura 2.** Estrutura química dos monômeros catequina e epicatequina.



Esses taninos também são denominados proantocianidinas, devido à propriedade de produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas (MARTINS, 1998; BRUNETON, 2001; MONTEIRO et al., 2005; MELLO; SANTOS, 2006; SHOJI et al., 2006). Taninos hidrolisáveis e condensados se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. Os condensados ocorrem amplamente em gimnospermas e angiospermas, enquanto que os hidrolisáveis estão quase restritos a angiospermas dicotiledôneas (MELLO; SANTOS, 2006). Podem ocorrer na casca, folhas, frutos e galhos (HARVEY, 2001).

Os taninos são metabólitos secundários de interesse econômico, ecológico e medicinal. A sensação adstringente provocada por vinhos, sucos de frutas, chás e outras bebidas está relacionada, em grande parte, aos taninos, devido a precipitação de proteínas ricas em prolina presentes na saliva, levando a perda do poder lubrificante (BRUNETON, 2001; CHARLTON et al., 2002; SIMON et al., 2003; MELLO; SANTOS, 2006). Por precipitarem alcalóides os taninos também podem servir de antídoto em casos de intoxicações (MONTEIRO et al., 2005).

São atribuídas aos taninos atividades biológicas e farmacológicas, como ação cicatrizante de feridas e queimaduras, proteção da mucosa gástrica, em casos de úlcera gástrica, ação bactericida, fungicida, antiviral, moluscicida, antitumoral, no tratamento de arteriosclerose e da artrite reumatoide, antidiarreica, hemostática e inibidores enzimáticos. Essas atividades estão relacionadas com a capacidade que estas substâncias possuem de formar complexos com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos e com íons

metálicos, além de possuírem atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres (MARTINS, 1998; BRUYNE, et al., 1999; BRUNETON, 2001; MELLO; SANTOS, 2006; MONTEIRO et al., 2005). Dessa forma originam radicais estáveis, inibindo a peroxidação de lipídios e outras substâncias (BRUYNE et al., 1999; GAULEJAC et al., 1999; RIGO et al., 2000; BRUNETON, 2001; GUENDEZ et al., 2005; MONTEIRO et al., 2005; MELLO; SANTOS, 2006).

Por suas atividades biológicas, as espécies vegetais como *Schinus terebinthifolius* que apresentam os taninos como metabólitos secundários despertam interesse para a produção de fitoterápicos. Diante do exposto, os taninos têm sido empregados como substâncias marcadoras para a avaliação da qualidade de diversas matérias-primas vegetais utilizadas na produção de medicamentos (SOARES, 2002; MELLO; SANTOS, 2006). Sendo necessários métodos seguros e eficazes para a quantificação dessas substâncias na droga vegetal.

### 3.3 Método de quantificação de taninos

Vários são os métodos empregados para a determinação do teor de taninos, tanto quantitativa quanto qualitativamente. Métodos colorimétricos, gravimétricos (MONTEIRO et al., 2005), nefelométricos (CARVALHO et al., 2004), por cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas ou ressonância magnética nuclear.

Dentre os métodos colorimétricos destaca-se o método de determinação de fenóis totais, que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, presente em diferentes compêndios oficiais (PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1980; DEUTSCHES ARZNEIBUCH, 1992; WHO, 1992; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Este método foi criado por Folin e Macallum (1912), e utilizavam o reagente fosfotúngstico para quantificar o ácido úrico na urina através de reações de oxirredução. Posteriormente o reagente foi modificado e denominado reagente de Folin-Denis (FOLIN; DENIS, 1912). E atualmente se utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, inicialmente denominado de reagente fenol modificado, que difere do reagente de Folin-Denis pela presença de sulfato de lítio, adicionado para evitar a formação de precipitados indesejáveis (FOLIN; CIOCALTEU, 1927; SCALBERT, 1992).

Ao empregar um excesso de reagente pode-se observar uma certa absorvância na região espectral do azul acompanhada de turbidez. Esta é atribuída à formação de precipitados de sais insolúveis de sódio, no caso do reagente de Folin Denis. Por este motivo houve a

inclusão de sais de lítio no reagente de Folin Ciocalteu, com a finalidade de deslocar o sódio, minimizando assim essa turbidez (FOLIN; CIOCALTEU, 1927; SCALBERT, 1992). Outro motivo que leva a substituição do Folin Denis pelo Folin Ciocalteu é pelo o segundo possuir uma maior sensibilidade (SCALBERT, 1992).

O mecanismo de reação que leva ao doseamento de polifenóis totais no método de Folin Ciocalteu é através de reação de oxirredução, gerando um complexo de coloração azul, derivado da redução do reagente pelas hidroxilas fenólicas, o qual é quantificado por espectrofotometria (UV). A reação de formação do complexo ocorre em meio fracamente alcalino, o que explica a presença do carbonato de sódio na metodologia (FOLIN; DENIS, 1912; SCALBERT, 1992).

O método de Folin Ciocalteu é aplicável para a determinação de substâncias polifenólicas em geral, mas também possibilita a quantificação de taninos. O cálculo do teor de taninos é realizado indiretamente, subtraindo do teor de polifenóis totais, o teor da fração não tanante, ou seja, fração de polifenóis que, em tratamento prévio com agente precipitante (proteína), não precipitam (SCALBERT, 1992; COSTA, 1994; BRUNETON, 2001; MELLO; SANTOS, 2006). Uma limitação deste método está relacionada à escolha do agente precipitante ideal, ou seja, o mais específico, sensível, preciso, de baixo custo, que necessite de menor tempo de reação e que seja mais estável.

Dentre os agentes precipitantes empregados para a precipitação dos taninos, está o pó de pele o qual é o mais preconizado por códigos oficiais (PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1980; DEUTSCHES ARZNEIBUCH, 1992; WHO, 1992). Entretanto, este apresenta limitações relacionadas ao custo e a variabilidade de procedência, portanto estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar o fenômeno de complexação e para avaliar a eficácia de outros agentes precipitantes, de natureza protéica ou não (BATE-SMITH, 1973; VERZA, 2006).

A caseína é a primeira escolha para a substituição do pó de pele como agente precipitante. Esta classe de proteínas é composta por moléculas anfipáticas, relativamente pequenas, contendo grande número de resíduos de prolina distribuídos de maneira uniforme nas seqüências de aminoácidos. Essa organização estrutural confere conformações moleculares relativamente abertas. Todas as caseínas possuem uma carga negativa próxima da neutralidade, o que facilita a complexação e a precipitação com taninos (LUCK et al., 1994).

### 3.4 Validação de métodos analíticos

O fundamento do método de Folin-Ciocalteu, preconizado para a determinação do teor de taninos é único. No entanto, a análise comparativa de diversos métodos oficiais (DEUTSCHES ARZNEIBUCH, 1998; BRITISH PHARMACOPeia, 2001; EUR. PH.; 2002; F. BRAS. 2010), realizada por Verza (2006), revela que existem diferenças em termos de técnica, em parâmetros tais como: composição de reagentes, tempo ótimo de leitura e comprimento de onda. Além da suscetibilidade do complexo tanino-proteína a fatores tais como: temperatura, pH, proporção tanino:agente complexante, massa molecular, solubilidade do complexo e a própria variabilidade do teor de taninos entre as diferentes espécies vegetais estão amplamente documentados na literatura. Diante dessas variabilidades entende-se a importância da padronização desses parâmetros, e adequação do método para cada espécie vegetal de interesse, valorizando assim suas diferentes composições. Esta padronização pode ser obtida através da validação do método. Sendo, portanto, importante a validação de metodologia para quantificação de taninos de *S. terebinthifolius*.

Validação de um método analítico é o processo de demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido, é um aspecto essencial à garantia da qualidade analítica (BARROS, 2002; BRASIL, 2003). Também pode ser entendida como um processo de obtenção, documentação e análise de dados, permitindo descrever o método de forma detalhada, permitindo a identificação e o controle dos fatores de variação. A validação é, portanto, um processo sistemático, que permite que execução do processo analítico siga critérios estabelecidos e aceitos, e sejam reprodutíveis em diferentes laboratórios, com precisão e exatidão, através do estabelecimento de limites de confiança (MARTINS, 1998).

Os testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos são considerados validados, desde que sejam avaliados parâmetros como: exatidão, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), especificidade, linearidade e robustez (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

## 4 CAPÍTULO I

### 4.1 ANATOMIA DOS RAMOS E DA CASCA DO CAULE DE *Schinus terebinthifolius* RADDI (ANACARDIACEAE)

(Artigo a ser submetido à *Revista Brasileira de Farmacognosia*)



**Anatomia dos ramos e da casca do caule de**  
***Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)**

**Camila C. B. R. de Almeida,<sup>2</sup>Asaph S. C. O. Santana<sup>1</sup>, Flávia C. L. da Silva<sup>3</sup>, Luiz A. L. Soares<sup>1,2</sup>, Karina P. Randau<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>*Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.*

<sup>2</sup>*Programa de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.*

<sup>3</sup>*Laboratório de Botânica Aplicada, Centro de Educação e Saúde. Universidade Federal de Campina Grande.*

**Resumo:** *Schinus terebinthifolius* Raddi conhecida popularmente por aroeira, desperta interesse farmacêutico por apresentar propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, cicatrizante e antisséptica. O objetivo deste estudo foi realizar caracterização anatômica e histoquímica com a finalidade de aplicar no controle de qualidade da matéria prima vegetal. As amostras foram coletadas e preparadas em lâminas semipermanentes seguindo os procedimentos usuais em anatomia vegetal. A folha é revestida por cutícula estriada, possui tricomas tectores e estômatos anomocíticos apenas na face abaxial. O mesofilo é assimétrico em disposição dorsiventral com feixes vasculares colaterais. O caule apresenta tricomas tectores e glandulares, lenticela e raios unisseriados. O xilema é constituído por elementos de vasos todos com placas de perfuração simples, e pontuações dos tipos alternadas, reticuladas e escalariformes; podem apresentar apêndice nas extremidades ou não. Na casca observa-se

bainha esclerenquimática completa, camadas de floema secundário e raios bisseriados heterogêneos. Em todas as partes estudadas foram verificados cristais de oxalato de cálcio e canais secretores, estes são ramificados na casca. Polifenóis e taninos foram identificados em todas as partes analisadas. Estas estruturas são concordantes com estruturas anatômicas descritas para a família Anacardiaceae e contribuem para a diagnose desta espécie, fornecendo assim subsídios para a certificação de autenticidade da droga vegetal.

**Palavras chave:** Anacardiaceae, aroeira, droga vegetal, microscopia, anatomia.

## Introdução

Anacardiaceae é uma família composta por 79 gêneros com aproximadamente 600 espécies, predominantemente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, com poucas espécies em regiões temperadas. Geralmente, representantes desta família apresentam folhas inteiras ou compostas de disposição alterna; flores pequenas e pentâmeras e frutos que podem ser secos, tipo noz ou baciforme ou drupáceos, podendo ainda ocorrer pseudofrutos (Joly, 2002). Muitas espécies desta família produzem taninos (Joly, 2002) e óleo-resinas (Alonso, 1998; Lorenzi & Matos, 2002), sendo os taninos responsáveis por diferentes atividades terapêuticas (Haslam et al, 1994). Esta família abriga espécies com importância alimentar (Lorenzi & Matos, 2002) e medicinal, sendo amplamente empregadas na medicina popular como, por exemplo, *Schinus terebinthifolius* Raddi (Albuquerque et al, 2007).

*Schinus terebinthifolius* apresenta diâmetro do tronco variando de 20 a 60 cm (Reitz et al, 1983), revestido por casca grossa. Possui inflorescências paniculadas, com flores pequenas e esbranquiçadas e frutos globóides vermelhos do tipo drupa (Takeda & Farago, 2001; Lorenzi & Matos, 2002). Também é denominada *S. terebinthifolia* Raddi, e pode ser conhecida popularmente por aroeira, aroeira-da-praia, aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira, pimenta-brasileira, aroeira-negra, aroeira-mansa e fruto-de-sabiá (Silva-Luz & Pirani, 2012). Essa espécie apresenta grande plasticidade ecológica, é nativa da América do Sul (Carmello-Guerreiro & Paoli, 2002), distribui-se desde o Nordeste do Brasil até o Rio Grande do Sul (Silva-Luz & Pirani, 2012), sendo encontrada também na Argentina, Paraguai e Uruguai (Sanchoetene, 1989).

Diversos estudos relatam os constituintes químicos presentes nesta espécie, sendo identificados os seguintes metabólitos secundários: óleos essenciais (Lima et al, 2009),

alcaloides, saponinas, triterpenos, flavonoides (Kröker, 2012; Lima et al, 2006), esteroides, antraquinonas (Lima et al, 2006) e taninos (Carlini et al, 2008; Lima et al, 2009).

É uma espécie de interesse por se tratar de uma planta com propriedades medicinais e alimentícias. Como alimento, o consumo de seus frutos é utilizado na culinária nacional e internacional (Backes & Irgang, 2002), e como medicinal, é popularmente indicada para o tratamento de diversas doenças (Amorim & Santos, 2003; Albuquerque et al, 2007). Estudos comprovam propriedades anti-inflamatória (Cavalher-Machado et al, 2008), antimicrobiana (Schomourolo et al, 2005; Johann et al, 2007; Silva et al, 2009), ser eficaz para o tratamento de vaginites (Amorim & Santos, 2003; Lima et al, 2006), cicatrizante (Coutinho et al, 2006; Lucena et al, 2006), expectorante, antisséptico, antidiarreico (Lorenzi & Matos, 2002; Medeiros et al, 2004), antioxidante (Aaby et al, 2004; Ceruks et al, 2007), gastroprotetor (Falcão et al, 2008; Carlini et al, 2010) e antitumoral (Queires et al, 2006).

Diante da importância medicinal de *Schinus terebinthifolius*, existe a necessidade da correta caracterização anatômica para o controle de qualidade da matéria prima vegetal. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo verificar a histolocalização de metabólitos e caracterizar anatomicamente os ramos e as cascas do caule de *S. terebinthifolius*, a fim de fornecer subsídios para a identificação e certificação de autenticidade da espécie. Além disso, propõe-se utilizar a técnica de maceração para a dissociação das células do xilema, visando contribuir para um melhor conhecimento das suas estruturas, tendo em vista que não há descrições detalhadas sobre estas estruturas de *S. terebinthifolius*.

## **Materiais e Métodos**

### **Material vegetal**

Os ramos e cascas do caule de *Schinus terebinthifolius* Raddi, foram coletados em Recife – PE, nos meses de novembro/2011 e março/2013. A identificação e depósito da exsicata foram realizados no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco sob o número 87539.

### **Metodologia**

As amostras coletadas foram fixadas em FAA 50 e seccionadas à mão livre. Para o caule dos ramos e para a casca foram obtidas secções transversais e longitudinais (radiais e tangenciais). Para as folhas foram obtidas secções transversais e paradérmicas. As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 30%, lavadas com água destilada e coradas com azul de astra e safranina. Por fim, lâminas semipermanentes foram preparadas (Sass, 1951; Johansen, 1940).

Para dissociação do material foi utilizado o método de maceração. Para este método, os fragmentos da casca e fragmentos longitudinais do caule, permaneceram por cinco dias em mistura de ácido crômico 10% e ácido nítrico 10% (1:1), sendo o material filtrado e a mistura de ácidos renovada a cada 24 horas. Por fim o material foi lavado com água destilada e solução hidroalcoólica 50% e corado com safranina 1% em solução hidroalcoólica 50% (v/v) por 24 horas (Johansen, 1940).

Para a análise histoquímica utilizaram-se cortes transversais do caule e da folha dos ramos e da casca, recém-coletados e ainda frescos. Na histolocalização dos metabólitos foram utilizados como reagentes: Sudam III para as substâncias lipofílicas (Sass, 1951), cloreto férrico para compostos fenólicos, lugol para amido, floroglucinol para ligninas, nadi para terpenóides (David & Carde, 1964) e vanilina clorídrica para taninos (Ricco, 2002). As análises foram realizadas em fotografias digitais capturadas por câmera digital (Sony) acoplada ao microscópio óptico (Olympus).

## **Resultados**

### **Anatomia das folhas**

Na face adaxial observa-se a epiderme constituída por células com formato poligonal, que apresentam pontuações na parede celular (Figura 1A) e é revestida por cutícula estriada (Figura 1B). Também na face superior observam-se drusas (Figura 1B). Os estômatos estão inseridos no mesmo nível das células vizinhas, são do tipo anomocíticos e encontram-se dispersos de forma aleatória apenas na face abaxial da folha, classificando-a como folha hipoestomática (Figura 1C). Tricomas tectores e drusas também são observados na face abaxial (Figura 1D).

#### **Figura 1**

A epiderme é uniestratificada em ambas as faces, apresentando células da epiderme adaxial maiores que da epiderme abaxial, e na face superior observa-se a hipoderme. O mesofilo é assimétrico, apresenta parênquima paliçádico e lacunoso em disposição dorsiventral. O primeiro é constituído de duas camadas de células alongadas dispostas lado a

lado perpendiculares à epiderme e o segundo é constituído por cerca de seis camadas de células de formatos variados (Figura 2A). Também no mesofilo são observados canais secretores (Figura 2A) e drusas de oxalato de cálcio (Figura 2B). Os feixes vasculares são colaterais, circundados por bainha parenquimática e alguns estão associados aos canais secretores (Figura 2C).

#### Figura 2

A nervura central em secção transversal é biconvexa e logo após à epiderme das faces superior e inferior observa-se colênquima anelar. Apresenta três feixes vasculares colaterais localizados no centro da nervura. Observam-se cinco canais secretores associados ao floema e dois apresentam lúmen grande. Também é possível observar células esclerenquimáticas isoladas (Figura 3A) e drusas e cristais prismáticos no floema e no colênquima (Figura 3B).

#### Figura 3

Em secção transversal o pecíolo é biconvexo, coberto por uma delgada camada de cutícula, apresenta epiderme uniestratificada, seguida por quatro a cinco camadas de colênquima. O parênquima cortical é constituído por cinco a nove camadas de células parenquimáticas de diferentes dimensões. Observa-se bainha esclerenquimática descontínua em torno dos canais secretores, os quais apresentam o lúmen relativamente grande. O sistema vascular apresenta-se de forma contínua, constituído por floema e xilema, o qual apresenta poros dispostos radialmente. Em seguida observa-se a medula parenquimática com calotas de floema primário (Figura 4A). Cristais prismáticos e drusas são observados no colênquima, no parênquima cortical e no floema (Figura 4B e C). Tricomas tectores também estão presentes (Figura 4D).

#### Figura 4

## **Anatomia do caule**

### **Secção transversal**

Ao seccionar transversalmente o caule pode-se observar o caule em crescimento primário e desenvolvendo o crescimento secundário. Em estágio primário o caule apresenta cutícula espessa, epiderme unisseriada, parênquima cortical com cerca de 10 camadas de células parenquimáticas e canais secretores associados ao floema. O sistema vascular possui floema e xilema primários, em feixes vasculares colaterais com disposição eustélica, sendo possível observar câmbio fascicular e interfascicular. O xilema primário está diferenciado em metaxilema e protoxilema. A medula é constituída de células parenquimáticas de paredes espessadas e apresenta também canais secretores (Figura 5A).

Com o desenvolvimento o crescimento secundário pode-se observar que este apresenta forma circular, com três a quatro camadas de periderme substituindo a epiderme, sendo possível observar as células do súber e do felogênio. Em torno dos canais secretores são verificadas fibras esclerenquimáticas. O sistema vascular apresenta câmbio vascular se diferenciando em floema e xilema. O xilema com fibras abundantes, vasos dispostos em fileiras radiais e raios que se prolongam até o floema. E na medula são visualizadas calotas de floema primário. Observa-se também na superfície, a presença de lenticela (Figura 5B).

#### **Figura 5**

Cutícula espessa e periderme com oito camadas pode ser observada na figura 6A. O súber é constituído de células ligeiramente quadrangulares de diferentes dimensões e com parede espessada nos sentidos anticlinal e periclinal, e o felogênio apresenta células retangulares achatadas radialmente (Figura 6A). No caule jovem também se evidencia a

presença de tricomas tectores unicelulares de ponta aguda e paredes espessadas e tricomas glandulares do tipo claviforme de cabeça multicelular e pedúnculo curto (Figura 6B). Bem como drusas e cristais prismáticos nas células parenquimáticas em ambas as situações (Figuras 6C e 6D).

### **Secção Longitudinal**

Na secção longitudinal radial não se observa epiderme, e sim periderme com células do súber e do felogênio alongadas longitudinalmente, podendo-se observar as células da feloderme semelhante às células do parênquima cortical, porém menores. No córtex algumas células se apresentam alongadas longitudinalmente e outras circulares com diferentes dimensões (Figura 7A). No xilema é possível observar elementos de vasos dispostos entre fibras e raios unisseriados homocelulares compostos por células quadradas (Figuras 7B) e elementos de vasos com pontuações variando dos tipos alternas a escalariformes (Figura 7C e 7D).

#### **Figura 7**

Em secção longitudinal tangencial pode-se observar os elementos de vasos, as fibras, que são as estruturas alongadas, estreitas e com extremidades afinadas e os raios unisseriados. Assim como também, canal secretor (Figura 8A). Na figura 8B observa-se a ligação entre dois elementos de vasos. Cristais prismáticos estão presentes nas células parenquimáticas do floema (Figura 8C) e verifica-se a presença de placa crivada de elemento tubo crivado (Figura 8D).

#### **Figura 8**

## **Anatomia da casca do caule**

### **Secção transversal**

A periderme possui súber composto por aproximadamente 15 camadas de células achatadas radialmente, e a feloderme apresenta várias calotas de fibras esclerenquimáticas (Figura 9A) e canais secretores. Logo após a periderme verifica-se uma bainha esclerenquimática contínua (Figura 9B). Observam-se faixas tangenciais constituídas por cerca de sete a dez camadas de células parenquimáticas, com canais secretores inseridos, intercalando-se com regiões floemáticas contendo calotas de fibras esclerenquimáticas também dispostas tangencialmente. Também é possível observar os raios atravessando toda espessura da casca (Figura 9C). Quanto ao tipo dos canais secretores, a origem é equizógena, e ao redor observam-se vários grãos de amido (Figura 9D).

### **Secção longitudinal radial e tangencial**

Em secção radial observar-se o súber com células achatadas radialmente (Figura 10A) e as células da feloderme com formatos irregulares e fibras esclerenquimáticas presentes nesta. Faixas de células parenquimáticas intercalam-se com faixas floemáticas, estas com fibras abundantes, que dificultam a visualização das células do floema (Figura 10B). Os raios são heterocelulares constituídos por células parenquimáticas procumbentes, que são alongadas no sentido radial, e eretas, estas localizadas nas margens superior e inferior do raio. As células das faixas parenquimáticas apresentam-se em sua maioria alongadas longitudinalmente e algumas são arredondadas (Figura 10C). No floema é possível observar células

parenquimáticas contendo cristais prismáticos (Figura 10D). Em secção tangencial os raios são bisseriados (Figura 11A) e os canais secretores são ramificados (Figura 11B).

Figura 10

Figura 11

### **Células dissociadas do caule**

No xilema, através da dissociação das células, constatou-se a presença de elementos de vasos todos com placa de perfuração simples. Foram observados vasos com pontoações do tipo reticulada, sem apêndice em ambas as extremidades e de lúmen estreito (Figura 12A), pontoações reticuladas a escalariforme, com apêndice em ambas as extremidades e lúmen estreito e fibras libriformes abundantes (Figura 12B), pontoações escalariforme com apêndice em uma das extremidades e de lúmen estreito ou largo, assim como também fibras libriformes (Figuras 12C), vasos com pontoações reticulada a escalariforme, de lúmen estreito, apêndice em apenas uma das extremidades e fibras libriformes (Figura 12D). Também se confirma a presença de células pétreas (Figuras 12E) e de traqueídeo (Figura 12F). A tabela 1 apresenta uma comparação entre as estruturas anatômicas do caule dos ramos e da casca.

Figura 12

**Tabela 1.** Comparação anatômica do caule e da casca do caule de *Schinus terebinthifolius*.

| <b>CAULE DOS RAMOS<br/>(Crescimento primário)</b>                   | <b>CAULE DOS RAMOS (Início de<br/>desenvolvimento secundário)</b> | <b>CASCA</b>                                      |
|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Cutícula e Epiderme                                                 | Desenvolvimento de periderme                                      | Periderme e súber evidente                        |
| Fibras escassas                                                     | Fibras em torno dos canais                                        | Fibras abundantes, no floema, parênquima e bainha |
| Floema e xilema (eustélica) interligados por câmbio interfascicular | Floema e xilema dispostos continuamente                           | Faixas de floema e parênquima                     |
| Raio unisseriado homocelular                                        | Raio unisseriado homocelular                                      | Raio bisseriado heterocelular                     |
| Ausente                                                             | Lenticelas                                                        | Ausente                                           |
| Tricomas tectores e glandulares                                     | Tricomas tectores e glandulares                                   | Ausente                                           |
| Cristais de oxalato de cálcio                                       | Cristais de oxalato de cálcio                                     | Cristais de oxalato de cálcio                     |
| Canais secretores                                                   | Canais secretores                                                 | Canais secretores ramificados                     |

## Histoquímica

### Folíolo

Foi evidenciada a presença de substâncias lipofílicas apenas na cutícula (Figura 13A). O floroglucinol revelou lignina nas fibras do xilema da nervura central e em fibras presentes no mesófilo (Figura 13B). O cloreto férrico e a vanilina clorídrica evidenciam, respectivamente, polifenóis (Figura 13C e D) e taninos (Figura 13E e F) por toda extensão da folha. Terpenóides foram observados na cutícula, nas células da epiderme e da hipoderme, em células em torno do canal secretor (Figura 13G) e nas células parênquima paliçádico (Figura 13H). Não foi identificada a presença de amido.

Figura 13

## **Caule dos ramos**

Os testes histoquímicos indicaram a presença de substâncias lipofílicas na cutícula, na periderme, nas fibras do xilema, nas fibras esclerênquimas localizadas em torno dos canais secretores (Figura 14A) e nos tricomas tectores (Figura 14B). O cloreto férrico reagiu com as células do súber e com as células da medula, mas compostos fenólicos em abundância foram evidenciados no felogênio, no parênquima cortical, nas células esclerenquimáticas em torno dos canais secretores e no floema. Observa-se também polifenóis no interior das fibras do xilema (Figura 14C). Reservas de amido foram verificadas no floema (Figura 14D), no interior das fibras do xilema e nas células parenquimáticas da medula, principalmente nas proximidades do xilema (Figura 14E). As fibras esclerenquimáticas presentes no parênquima cortical e as fibras do xilema apresentam-se lignificadas (Figura 14F). Os taninos estão presentes em abundância no felogênio, no parênquima cortical, nas fibras em torno dos canais secretores, no floema, no interior das fibras do xilema e em menor intensidade na medula (Figura 14G).

Figura 14

## **Casca do caule**

Foi evidenciada a presença de substâncias lipofílicas no interior dos canais secretores, discreta presença nas células parenquimáticas das faixas tangenciais e nos raios (Figura 15A). Reservas de amido estão presentes principalmente nas células parenquimáticas das faixas tangenciais, mas também ocorrem no floema (Figura 15B). O floroglucinol revelou lignina nas fibras esclerenquimáticas inseridas no floema (Figura 15C). O cloreto férrico e a

vanilina clorídrica evidenciam alta concentração de polifenóis (Figura 15D) e taninos (Figura 15E), respectivamente, presentes por toda extensão da casca. A tabela 2 apresenta uma síntese dos resultados dos testes histoquímicos realizados.

Figura 15

**Tabela 2.** Histoquímica das folhas, do caule e da casca do caule de *Schinus terebinthifolius*.

| PARTE           | LIPÍDIO                                                                    | AMIDO                                                    | LIGNINA                      | POLIFENOIS    | TANINOS       |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------|---------------|---------------|
| FOLHAS          | Cutícula e parênquima paliçádico                                           | Ausente                                                  | Fibras do xilema do mesofilo | Toda extensão | Toda extensão |
| CAULE DOS RAMOS | Fibras, periderme e tricomas                                               | Floema e na medula próxima às calotas de floema primário | Fibras                       | Toda extensão | Toda extensão |
| CASCA           | Interior dos canais, raios e das faixas de parênquima associadas ao floema | Faixas de parênquima e no floema                         | Fibras                       | Toda extensão | Toda extensão |

## Discussão

Características da folha como células da epiderme adaxial maiores que da epiderme abaxial, presença de hipoderme, mesofilo com organização dorsiventral apresentando canais secretores, nervura central biconvexa com cerca de cinco canais secretores, estômatos anomocíticos, hipoestomática, presença de drusas e cristais prismáticos corroboram com características descritas em outras diagnoses (Oliveira, 2004; Duarte et al, 2007; 2009; Júnior, 2009; Grisi, 2010). O pecíolo segue o perfil de organização semelhante ao do caule. As estruturas do caule dos ramos de *Schinus terebinthifolius*, como a disposição da região

cortical, do sistema vascular e da região medular, confirmam características estruturais das dicotiledôneas, classe a qual a aroeira pertence.

Em diagnose realizada por Duarte e colaboradores (2007), foi relatada a presença de epiderme e felogênio no sistema de revestimento caulinar. No entanto Oliveira (2004) observou periderme revestindo o caule de *Schinus terebinthifolius*. Neste estudo pôde-se caracterizar e diferenciar a anatomia do caule em crescimento primário, em estágio de transição para o crescimento secundário e da casca, na qual as estruturas secundárias são definidas. Este resultado demonstra a importância em primeiramente identificar a parte da planta a ser analisada e em seguida qual o estágio de crescimento que esta parte se encontra. Visto que há diferenças estruturais, podendo ser essa a justificativa pelos resultados diferentes descritos nos trabalhos de Duarte e colaboradores (2007) e de Oliveira (2004). Além de a literatura relatar que os farmacógenos geralmente estão presentes em estruturas com crescimento secundário.

Ao observar o caule dos ramos transitando do estágio de crescimento primário para o secundário observa-se o um avanço no desenvolvimento do sistema vascular, o que vai garantir aumento do diâmetro do caule. Na casca observam-se várias camadas de floema intercalando-se com faixas de parênquima cortical. Verifica-se também, que no caule transitando para o crescimento secundário e na casca há um aumento no número de canais secretores associados ao floema, os quais na casca apresentam um formato ramificado e não mais circular.

As mesmas características do xilema como a presença de raios (Gonçalves et al, 2005) e a disposição dos elementos de vasos em fileiras radiais observadas nesta análise, foram verificadas por Duarte e colaboradores (2007) e Oliveira (2004), sendo também um arranjo característico da família Anacardiaceae (Metcalf & Chalk, 1950). Neste estudo foram

verificados raios bisseriados heterocelulares com células procumbentes e eretas conforme relatado por Cury (2001), e em alguns cortes foi possível observar o parênquima axial paratraqueal. Porém, diferentemente do observado neste estudo, Cury (2001) observou vasos na maioria múltiplos e dispostos de forma difusa, parênquima axial difuso e tilos não abundantes. O que pode ser justificado pelo fato da amostra utilizada no estudo de Cury (2001) ter sido retirada diretamente do tronco, o qual é mais desenvolvido. Enquanto, as amostras analisadas, neste estudo, foram retiradas das extremidades dos ramos.

Gonçalves e colaboradores (2005), em análise de amostras carbonizadas de várias espécies de Anacardiaceae, dentre elas *Schinus terebinthifolius*, também verificou poros difusos como Cury (2001), mas, com parênquima axial paratraqueal escasso. Gonçalves et al (2005) e Cury (2001) relataram a presença de cristais nas células parenquimáticas dos raios de *S. terebinthifolius*, conforme visto no floema nesta análise em ambos estádios.

Os tricomas auxiliam na caracterização de grupos taxonômicos, por assumirem morfologia variada e característica de determinadas espécies sendo assim importantes na identificação de drogas vegetais (Metcalf & Chalk, 1988). Neste trabalho o corte transversal do caule dos ramos de *S. terebinthifolius* revelou a presença de tricomas tectores e glandulares, sendo os mesmos tipos também relatados no caule por Duarte et al (2007). Nas folhas de *S. terebinthifolius* foram observados vários tricomas tectores, porém um tricoma glandular do tipo claviforme foi observado no corte realizado para o estudo histoquímico, corroborando com o descrito por Duarte et al (2007) e Grisi (2010).

Cristais de oxalato de cálcio, bem como a forma que assumem nos vegetais podem auxiliar na caracterização de grupos taxonômicos, sendo também relevantes na identificação de drogas vegetais (Metcalf & Chalk, 1988). Cristais característicos de oxalato de cálcio foram visualizados nas folhas e no caule de *S. terebinthifolius*, corroborando com o descrito

por Duarte e colaboradores (2007; 2009), além de também ocorrerem na casca. A deposição destes cristais é comum em espécies de Anacardiaceae (Metcalf & Chalk, 1988; Álvarez et al, 2008) e pode estar relacionada a vários fatores, dentre eles proteção contra herbivoria (Fernandes, 1994), regulação de cálcio, suporte tecidual e detoxificação (Nakata, 2003).

Estruturas secretoras são valorosas para o diagnóstico taxonômico. É característica marcante de Anacardiaceae a ocorrência de canais secretores ou resiníferos em órgãos vegetativos e reprodutivos. Estes canais estão comumente associados ao floema, circundados por fibras, (Metcalf & Chalk, 1950; Cronquist, 1981), podendo ser encontrados também na medula (Metcalf & Chalk, 1950, Oliveira, 2004), como pode ser observado neste estudo na secção transversal do caule e da casca de *S. terebinthifolius*. Esses canais produzem substâncias de uso medicinal, industrial ou com efeitos alergênicos (Judd et al, 1999).

A dissociação das células, através do lenho macerado, permite observar células do xilema em grupos ou individualizadas, visto que estas resistem ao processo o qual é muito agressivo (Esaú, 1997). A presença de apêndices nos elementos de vasos pode ser uma característica diferenciada desta espécie. Nos elementos de vasos da aroeira, Cury (2001) observou, através de cortes longitudinais, pontoações arredondas alternas, sendo estas também observadas nesta análise, além de vasos com pontoações do tipo escalariforme e reticulada. Células pétreas visualizadas nas lâminas do macerado, não estão associadas ao xilema, mas sim às fibras esclerenquimáticas. E por serem células resistentes suportaram o processo de maceração, podendo ser observadas.

Os compostos identificados na análise histoquímica confirmam análises fitoquímicas realizadas anteriormente quanto à presença de polifenóis e taninos, os quais estão presentes em abundância tanto nos ramos (folhas e caule) quanto na casca. Estas são as principais substâncias responsáveis pelas atividades de interesse farmacêutico desta espécie. Este

resultado levanta a hipótese de que tanto o caule e folhas dos ramos, quanto a casca do caule adulto, o qual é comumente utilizado, podem ser empregados como drogas vegetais desta espécie. Porém as folhas e os caules dos ramos apresentam uma vantagem, pois a sua retirada não compromete a sobrevivência do vegetal. Enquanto que a retirada da casca, é mais limitada, visto que dependendo da extensão da área retirada o vegetal não sobrevive porque impede a condução da seiva elaborada que é feita através do floema e a cicatrização desse corte é longa. Mas a análise histoquímica é qualitativa, portanto através dela não podemos afirmar com segurança que os caules jovens apresentam exatamente as mesmas substâncias químicas que a casca do caule adulto, as quais garantem as atividades biológicas relatadas em diversos estudos. Sendo necessários estudos analíticos quantitativos para verificar se ambas as composições e as concentrações desses polifenóis presentes nas folhas, no caule e na casca do caule são responsáveis pelas atividades biológicas atribuídas a esta espécie vegetal.

Verifica-se que há variação na localização de substâncias lipofílicas nas diferentes estruturas analisadas. Nas folhas estas substâncias estão presentes na cutícula e no parênquima paliçádico, no caule dos ramos estão nas fibras, na periderme e nos tricomas, enquanto que na casca ocorrem no interior dos canais secretores e nas células parenquimáticas dos raios e das faixas que intercalam com o floema. A reação positiva com reagente de Nadi nas folhas sugere que as substâncias lipofílicas identificadas pelo Sudan III, na cutícula e no parênquima paliçádico, podem também ser óleos essenciais ou oeloresinas. Em análise histoquímica das folhas realizada por Júnior (2009), a reação com o reagente de Nadi foi negativa, porém foram identificados terpenoides com grupamentos carbonílicos através do teste com 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Reserva de amido é ausente nas folhas, mas no caule dos ramos está presente no floema e na casca está presente nas faixas de células parenquimáticas e em menor quantidade

no floema. Não foram identificados metabólitos secundários nos interiores dos canais secretores, o que pode ser justificado pelo fato da secreção de substâncias ocorrer de forma cíclica, em que após a liberação do secretado acumulado nas células, se dá início uma nova síntese e armazenamento (Sant'anna-Santos, 2006). O resultado mostra perfil químico semelhante entre as folhas e o caule, com a diferença de que nas folhas não há reserva de amido. Oliveira (2004) realizou testes no caule apenas com cloreto férrico e lugol, e identificou a presença de polifenóis nas células parenquimáticas do córtex e da medula e amido em pequena quantidade na medula.

Estruturas observadas neste estudo como células esclerificadas no parênquima cortical, calotas de fibras inseridas no floema, cilindro xilemático com raios estreitos, cristais de oxalato de cálcio, elementos de vasos com placas de perfuração simples, parênquima axial escasso, raios estreitos ou unisseriados geralmente heterogêneos e células do floema contendo cristais são atributos de Anacardiaceae (Metcalf & Chalk, 1950). Os resultados obtidos corroboram com características descritas em estudos anteriores (Oliveira, 2004; Gonçalves et al, 2005; Duarte et al, 2007; Grisi, 2010) e com a anatomia de espécies vegetais pertencentes à família (Metcalf & Chalk, 1950).

A descrição apresentada auxilia a diagnose anatômica da droga vegetal de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Além de incrementar as descrições realizadas anteriormente com detalhes anatômicos dos cortes longitudinais do caule, da casca e das células dissociadas do xilema do caule. Desta forma, o presente estudo contribuiu para a certificação de autenticidade da droga vegetal de *Schinus terebinthifolius*, bem como para a diferenciação de outras espécies vegetais podendo-se evitar falsificações.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPQ pelo apoio financeiro (133408/2011-6, 312537/2009-3, 483870/2011-0), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (03/2010, ANVISA) e ao IPA – Instituto de Pesquisa Agronômico por concessão do local para coleta do material vegetal.

## Referências

- Aaby K, Hvattum E, Skrede G 2004. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: Relationship to antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 52: 4595-4603.
- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins-Neto EMF, Melo JG, Santos, JP 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114: 325-354.
- Alonso JR 1998. *Tratado de Fitomedicina - bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: ISIS Ediciones S. R. L.
- Álvarez R, Encina A, Pérez-Hidalgo, N 2008. *Pistacia terebinthus* L. leaflets: an anatomical study. *Plant Syst Evol* 272: 107–118.
- Amorim MMR, Santos LC 2003. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. *Rev Brasil Ginecol e Obstet* 25 (2): 95-102.
- Backes P, Irgang B 2002. *Árvores do Sul: Guia de identificação e interesse ecológico. As principais espécies nativas Sul-Brasileiras*. Santa Cruz do Sul: Instituto Souza Cruz.
- Carlini EA, Duarte-Almeida JM, Rodrigues E, Tabach R 2010. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). *Braz J Pharmacog* 20(2): 140-146.
- Carmello-Guerreiro SM, Paoli AAS 2002. Ontogeny and structure of the pericarp of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Braz Arch Biol Technol* 45 (1): 73-79.
- Cavalher-Machado SC, Rosas EC, Brito FA, Heringe AP, Oliveira RR, Kaplan, MAC, Figueiredo MR, Henriques MGMO 2008. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *Int Immunopharmacol* 8: 1552–1560.
- Ceruks M, Romoff P, Fávero OA, Lago JHG 2007. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quim Nova* 30: 597–599.

Coutinho IHILS, Torres OJM, Matias JEF, Coelho JCU, Stahlke-Júnior HJ, Agulham MA, Bachle E, Camargo PAM, Pimentel SK, Freitas ACT 2006. Efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirurg Bras* 21: 49–54.

Croquist A 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University.

Cury G 2001. *Descrição da estrutura anatômica do lenho e sua aplicação na identificação de espécies arbóreas do cerrado e da mata atlântica do estado de São Paulo*. Piracicaba. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Recursos Florestais, Universidade de São Paulo.

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

Duarte MR, Schroder LM, Toledo MG, Yano M, Machado AA, Modolo AK 2009. Anatomia foliar comparada de espécies de aroeira: *Myracrodruon urundeuva* Allemão e *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Rev Visão Acad* 10(1): 18-28.

Duarte MR, Toledo MG, Oliveira RLB 2007. Diagnose morfoanatômica de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). *Rev Visão Acad* 7(2): 05-13.

Esau K 1976. *Anatomia das Plantas com Sementes*. São Paulo: Edgard Blucher.

Falcão HS, Mariath IR, Diniz MFFM, Batista LM, Barbosa-Filho JM 2008. Plants of the American continent with antiulcer activity. *Phytomedicine* 15: 132-146.

Fernandes GW 1994. Plant mechanical defenses against insect herbivory. *Rev Bras Entomol* 38(2): 421-433.

Gonçalves TAP, Zborowski MB, Scheel-Ybert R 2005. Coleção de referência antracológica: Anatomia da madeira de espécies de Anacardiaceae, Annonaceae, Aquifoliaceae, Apocynaceae, Araliaceae e Compositae de vários biomas brasileiros. *X Congresso Brasileiro da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário*. Guarapari, Brasil.

Grisi FA 2010. *Aspectos fisiológicos de aroeira (Schinus) sob níveis distintos de saturação hídrica em ambiente protegido, e área ciliar em processo de recuperação*. Curitiba. Tese de doutorado, Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná.

Haslam E, Lilley TH, Cai Y, Martin R, Mignolato D 1989. Traditional herbal medicines the role of polyphenols. *Planta Med*. 55: 1-8. 2.

Johann S, Pizzolatti MG, Donni CL, Resende MA 2007. Antifungal properties of plants used Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Braz J Microbiol* 38(4): 632-637.

Johansen DA 1940. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill.

Joly AB 2002. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Companhia editora nacional. 13ª Edição.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF. 1999. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. Sunderland: Sinauer Associates.

Júnior-Salvi A 2009. *Schinus terebinthifolius Raddi: estudo anatômico e histoquímico das folhas e investigação do potencial farmacêutico do extrato etanólico e suas frações*. Araraquara. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo.

Kröker EAP 2003. *Plantas medicinais, aromáticas e condimentares*. <http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/>. Acesso em dezembro de 2012.

Lima LB, Vasconcelos CFB, Maranhão HML, Leite VR, Ferreira PA, Andrade BA, Araújo EL, Xavier HS, Lafayette SSL, Wanderley AG 2009. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. *J Ethnopharmacol* 126 (3): 468-473.

Lima MRF, Luna JS, Santos AF, Andrade MCC, Sant'ana AEG, Genet JP, Marques B, Neuville L, Moreau N 2006. Anti-bacterial activity of some brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 105: 137-147.

Lorenzi H, Matos FJA 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Plantarum.

Lucena PLH, Ribas-Filho JM, Mazza M, Czezczko NG, Dietz UA, Correa-Neto MA, Henriques GS, Santos OJ, Ceschin AP, Thiele ES 2006. Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. *Acta CirurgBras* 21: 44-49.

Medeiros MFT, Fonseca VSD, Andreato RHP 2004. Plantas medicinais e seus usos pelos sítiantes da Reserva Rio das Pedras. *Acta Bot Bras* 18 (2): 391-399.

Metcalf CR, Chalk L 1950. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy, with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon.

Metcalf CR, Chalk L 1988. *Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem*. Oxford: Clarendon.

Nakata PA 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *PlantSci* 164: 901-909.

Oliveira LS 2004. *Influência do solo contaminado com petróleo na morfologia e fisiologia de Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae)*. Curitiba. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná.

Queires LC, Fauvel-Lafetve F, Terry S, Taille A, Kouyoumdjian JC, Chopin DK, Vacherot F, Rodrigues LE, Crepin M 2006. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius* Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. *Anticancer Res* 26(1A): 379-387.

Reitz R, Klein RM, Reis A 1983. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Itajaí: SUDESUL.

Ricco RA, Sena GA, Vai VM, Wagner ML, Gurni AA 2002. Taninos Condensados de *Ephedra Chilensis* K. Presl (= *E. Andina* Poepp. Ex May.) – Ephedraceae. *Dominguezia* 18(1): 17-25.

Sanchotene MCC 1989. *Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana*. Porto Alegre: SAGRA.

Sant'Anna-Santos BF, Thadeo M, Meira RMSA, Ascensão L 2006. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *Rev Árvore* 30(3): 481-489.

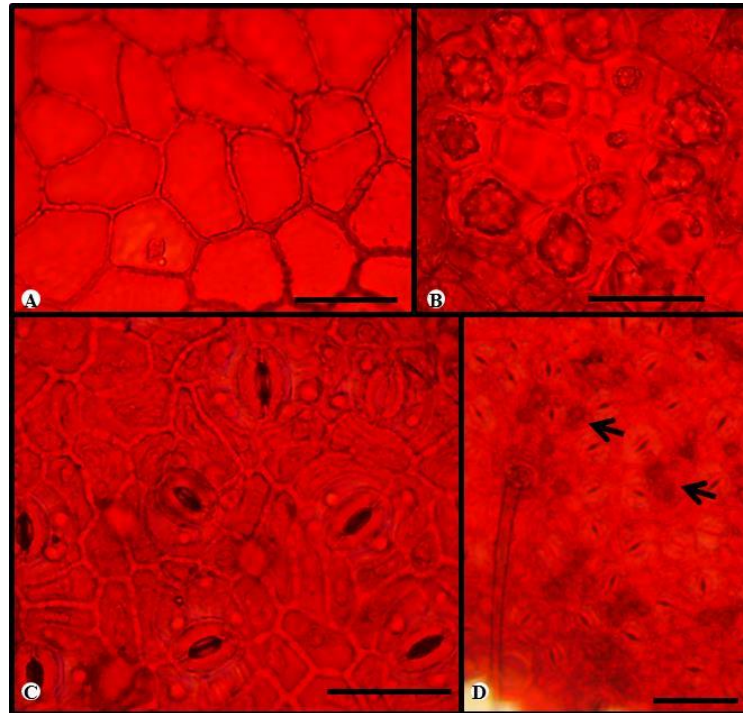
Sass JE 1951. *Botanical microtechnique*. 2<sup>nd</sup> Ed. Iowa: State College Press.

Silva AB, Silva T, Franco ES, Rabelo AS, Lima ER, Mota RA, Câmara CAG, Pontes-Filho NT, Lima-Filho JV 2009. Antibacterial activity, chemical composition and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Braz J Microbiol* 41: 158-163.

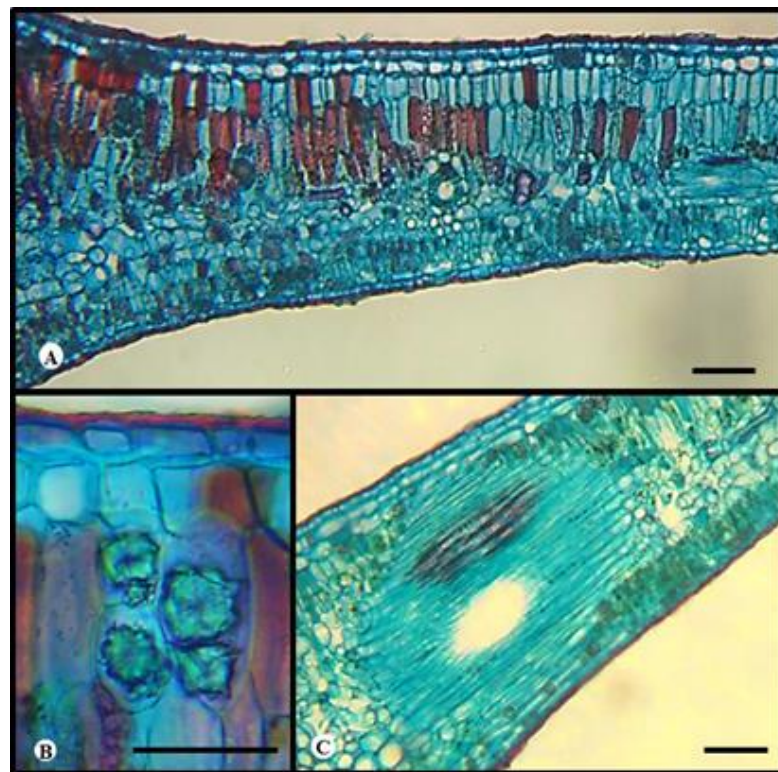
Silva-Luz CL, Pirani JR 2012. Anacardiaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB004401>. Acesso em Novembro de 2012.

Schmourlo G, Mendonça-Filho RR, Alviano CS, Costa SS 2005. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *J Ethnopharmacol* 96: 563-568.

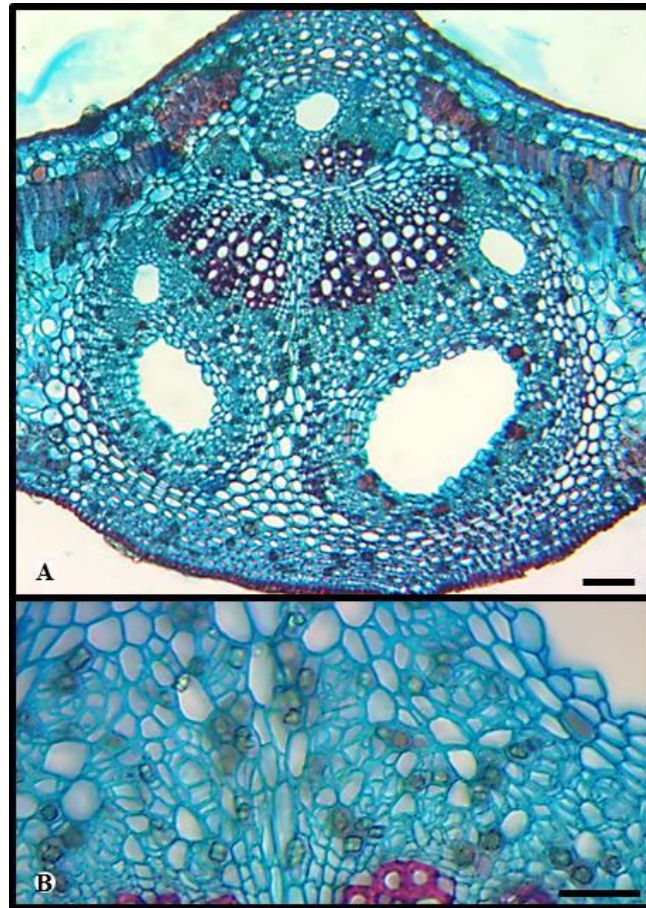
Takeda IJM, Farago PV 2001. *Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha*. Curitiba: Serzegráf.



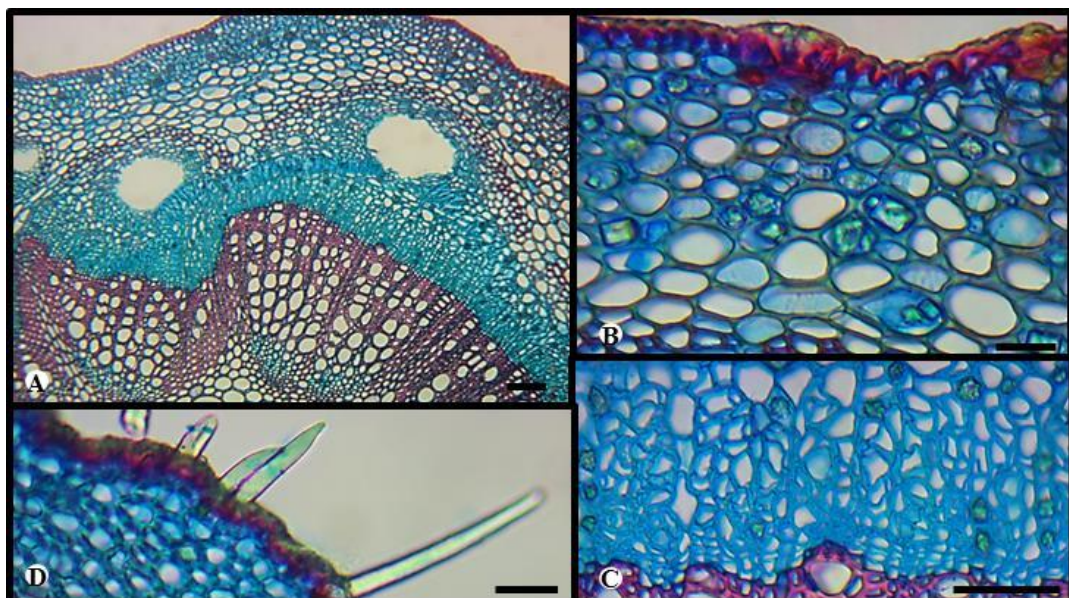
**Figura 1.** Folíolo de *Schinus terebinthifolius* em secção paradérmica. A. Superfície adaxial células poligonais com pontoações nas paredes celulares. B. Drusas na superfície adaxial. C. Superfície abaxial demonstrando a disposição dos estômatos. D. Superfície abaxial com tricoma tector e drusas (setas). A, B e C = 50  $\mu\text{m}$ ; D = 100  $\mu\text{m}$ .



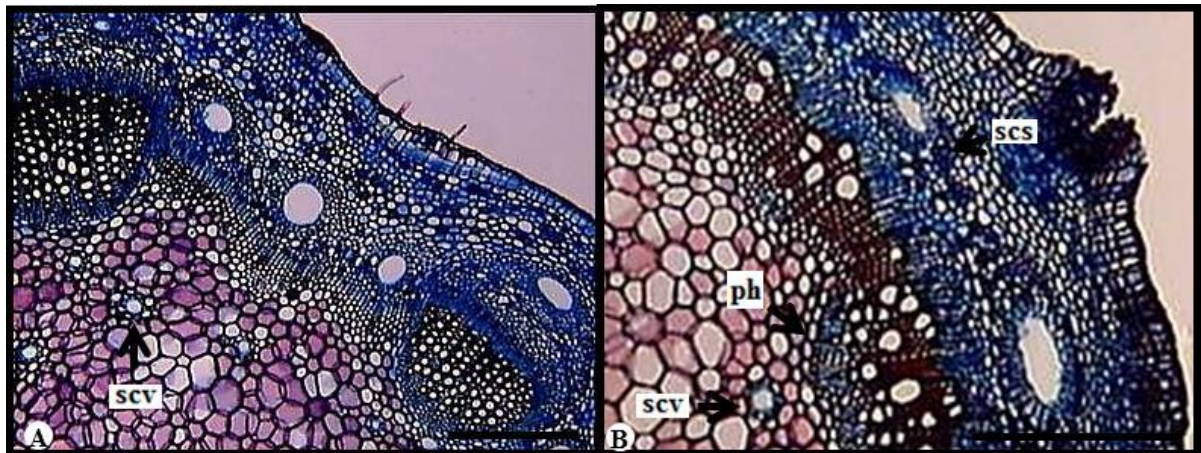
**Figura 2.** Folíolo de *Schinus terebinthifolius* em secção transversal. A. Mesófilo. B. Drusas. C. Feixe vascular colateral associado ao canal secretor. A e C = 100  $\mu\text{m}$ ; B = 50  $\mu\text{m}$ .



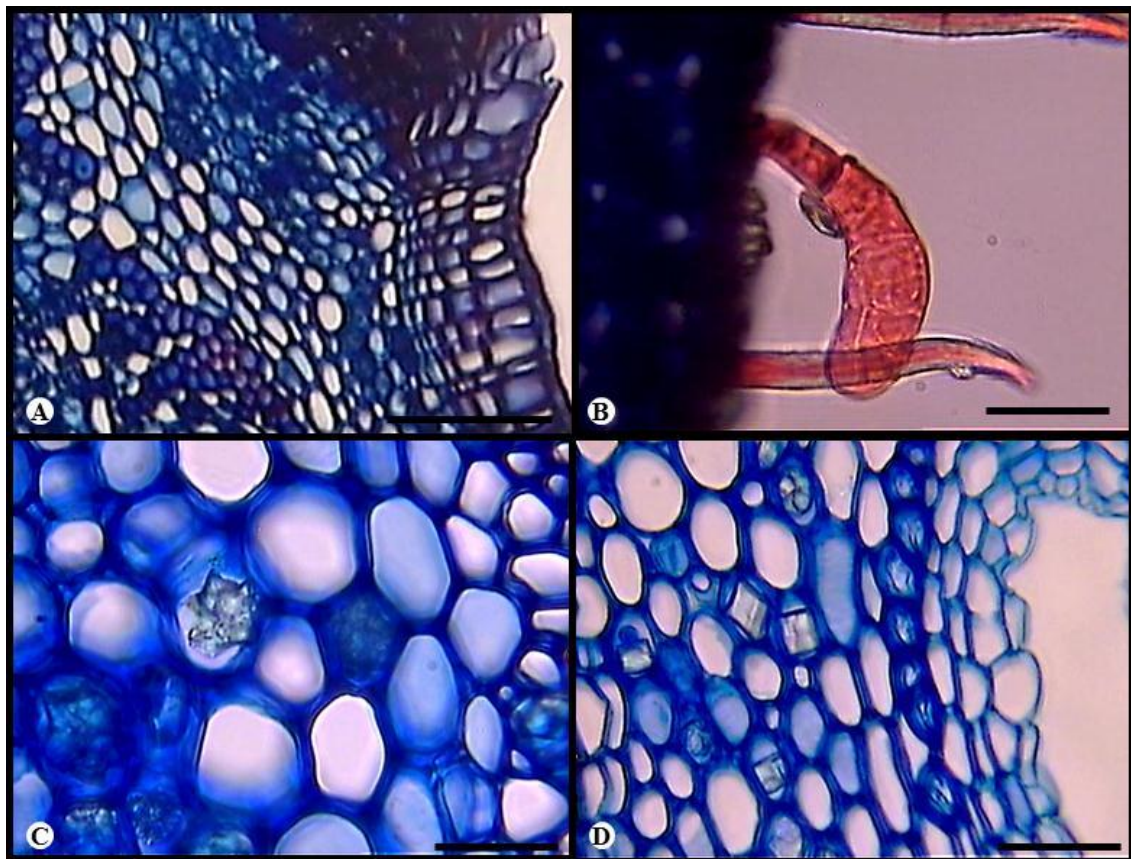
**Figura 3.** Nervura central de *Schinus terebinthifolius* em secção transversal. A. Visão geral da nervura central. B. Drusas. A = 100  $\mu\text{m}$ ; B = 50  $\mu\text{m}$ .



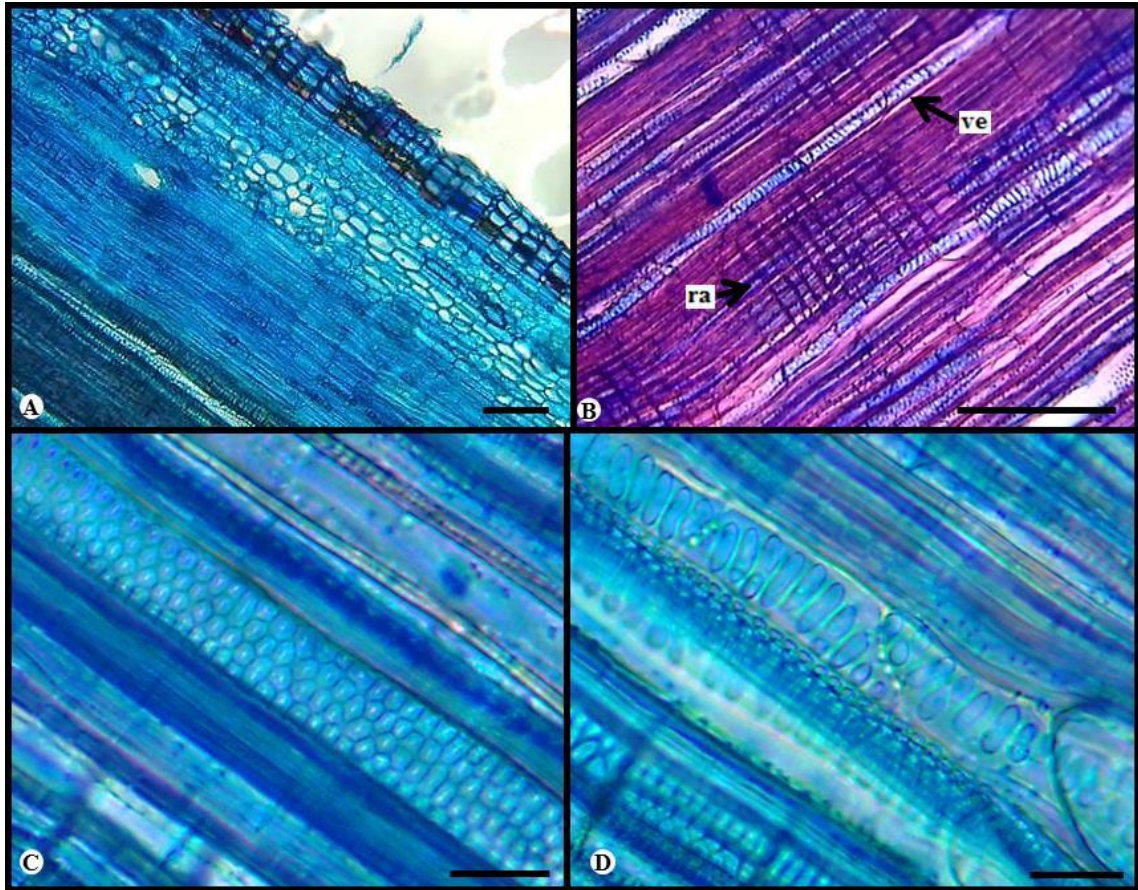
**Figura 4.** Pecíolo em secção transversal. A. Visão geral do pecíolo. B. Drusas e cristais prismáticos. C. Drusas. D. Tricomas tectores. A = 100  $\mu\text{m}$ ; B, C e D = 50  $\mu\text{m}$ .



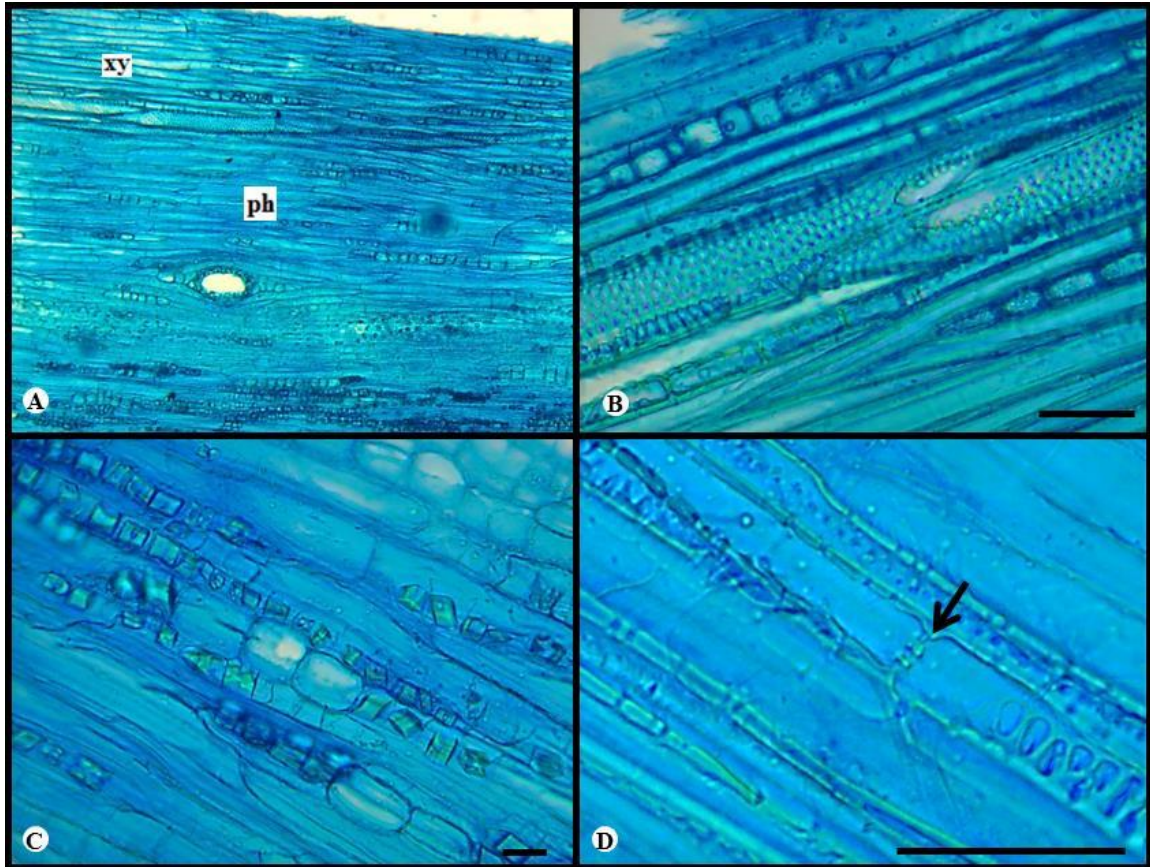
**Figura 5.** Caule jovem de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae) em secção transversal. A. Organização caular, canal secretor na medula (seta). B. Caule com crescimento secundário em desenvolvimento, fibras esclerenquimáticas, calota de floema primário e canal secretor na medula (setas). Barras: A e B = 200 µm. (scs = bainha esclerenquimática; scv = canal secretor; ph = floema primário).



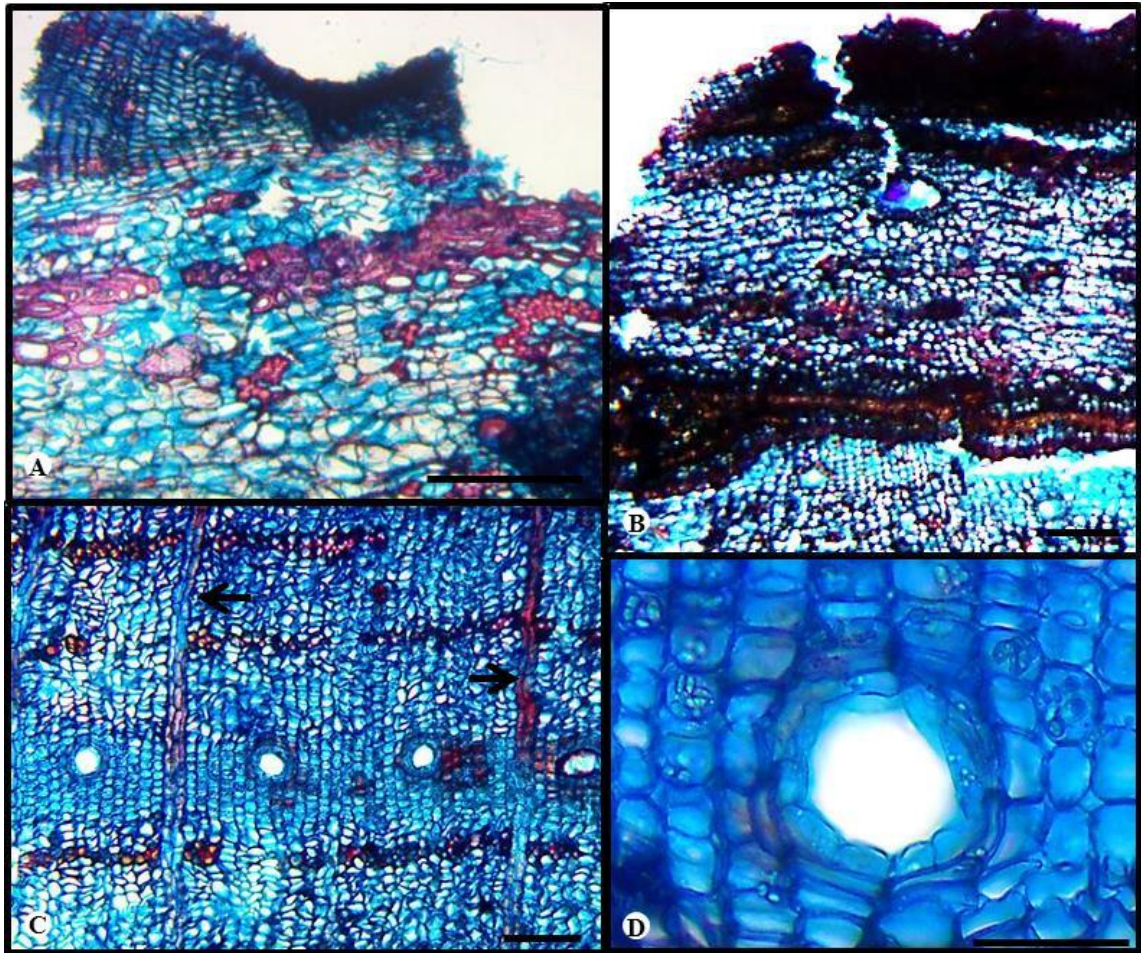
**Figura 6.** Caule jovem de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae) em secção transversal. A. Sistema de revestimento e córtex. B. Tricoma tector unicelular e tricoma glandular. C. Drusas. D. Cristais prismáticos. Barras: A, C e D = 20 µm; B = 200 µm.



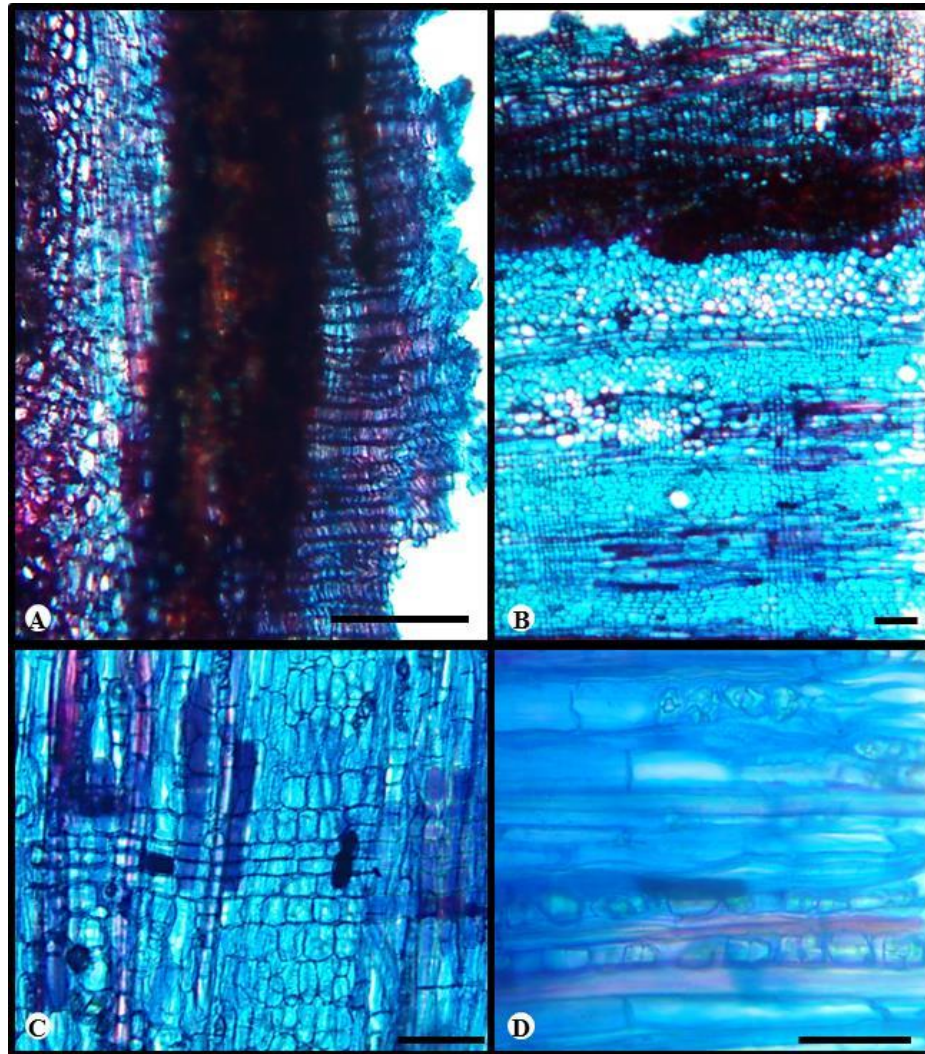
**Figura 7.** Caule jovem de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae) em secção longitudinal radial. A. Células da periderme e do córtex. B. Xilema com raios unisseriados homocelulares. C. Elemento de vaso com pontuações do tipo areoladas alternadas. D. Elemento de vaso com pontuações do tipo escalariforme. Barras: A= 200  $\mu\text{m}$ ; B = 100  $\mu\text{m}$ ; C e D = 30  $\mu\text{m}$ . (ve = elementos de vasos; ra = raio).



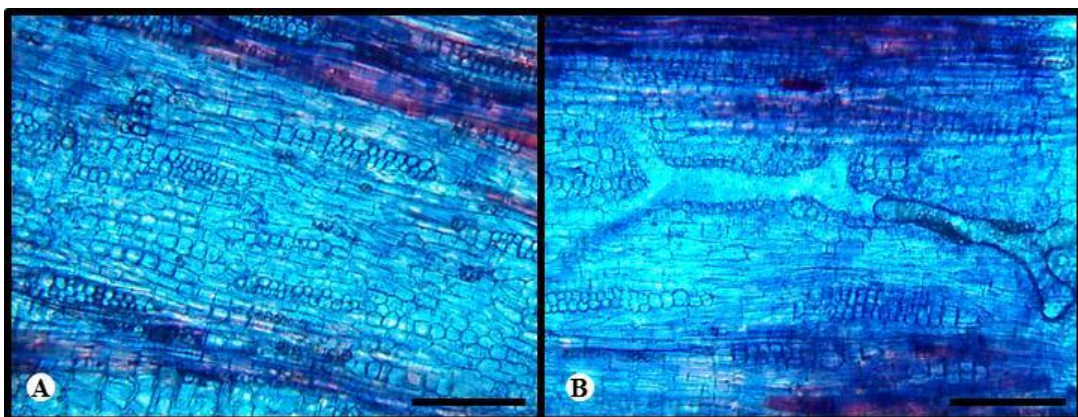
**Figura 8.** Caule jovem de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae) em secção longitudinal tangencial. A. Visão geral do corte. B. Ligação entre dois elementos de vasos. C. Células parenquimáticas do floema contendo cristais prismáticos. D. Placa crivada (seta). Barras: A = 200  $\mu\text{m}$ ; B, C e D = 50  $\mu\text{m}$ . (xy = xilema; ph = floema).



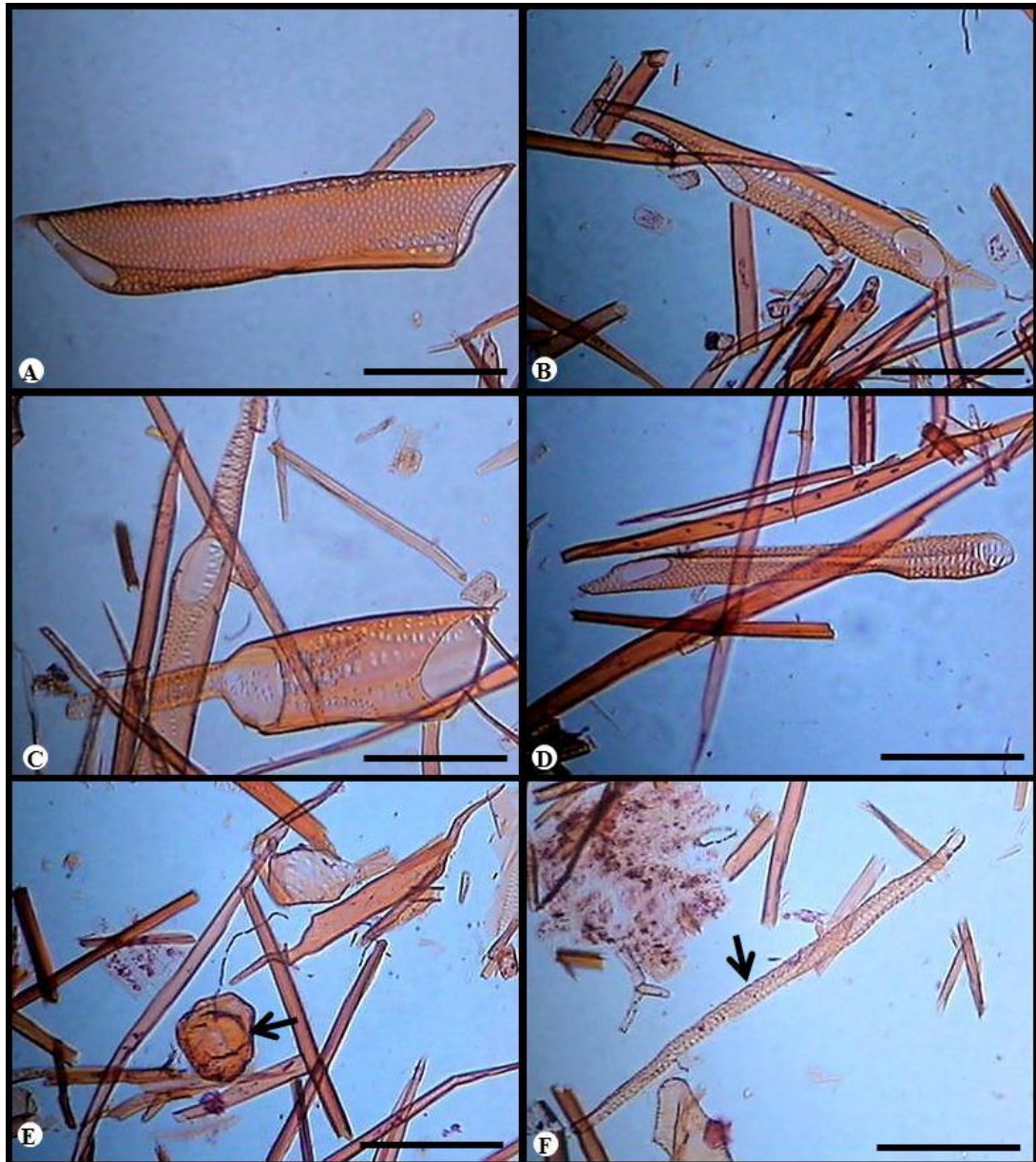
**Figura 9.** Casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae) em secção transversal. A. Periderme, detalhe das células do súber e da feloderme. B. Bainha esclerenquimática completa. C. Floema, faixa de parênquima cortical e raios (setas). D. Canal secretor. Barras: A, B e C = 2 00 µm; D = 50 µm.



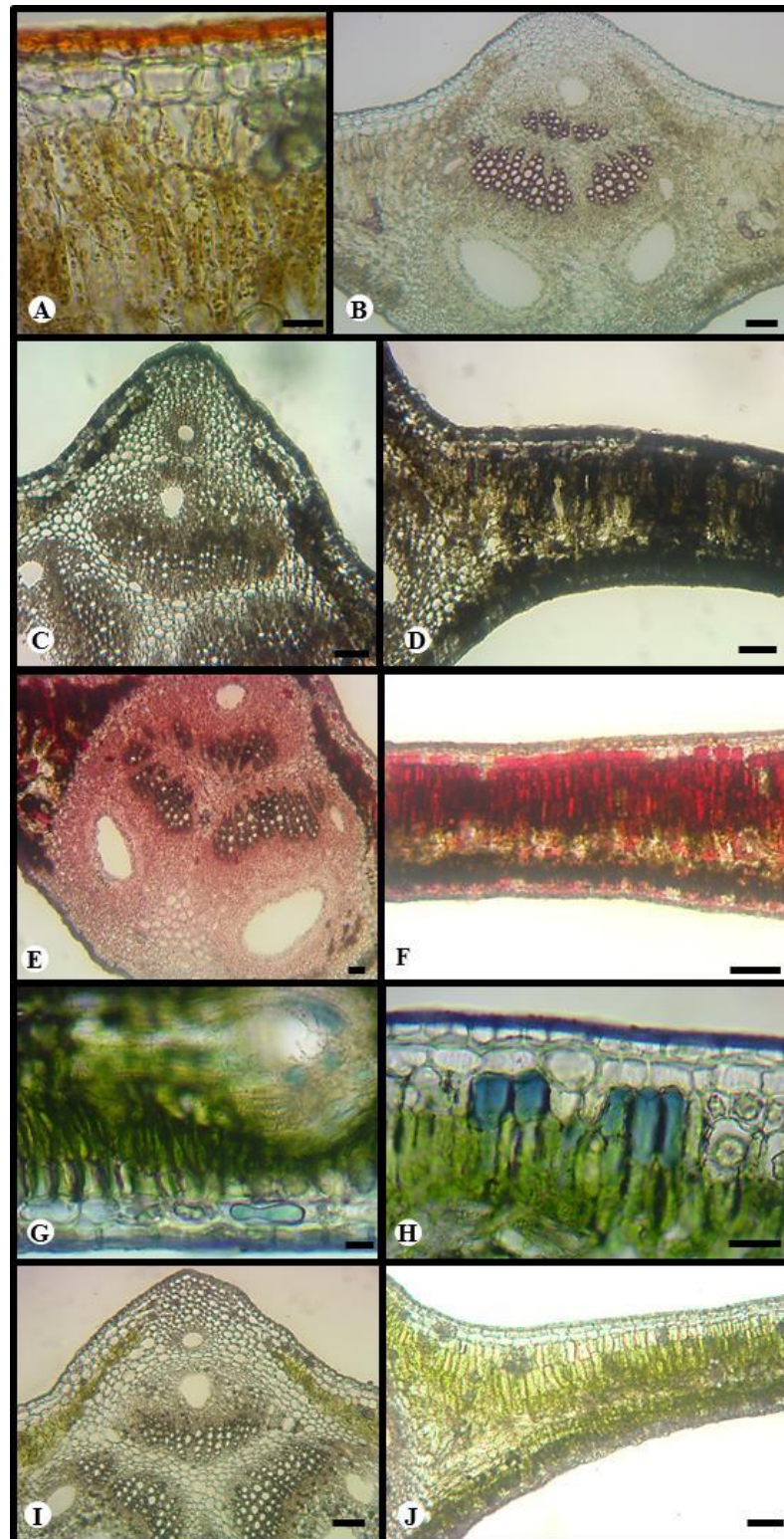
**Figura 10.** Casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae) em secção longitudinal radial. A. Súber e região cortical. B. Visão geral da casca. Faixas de parênquima cortical e de floema com fibras abundantes. C. Células parenquimáticas dos raios (seta). D. Cristais prismáticos em células do floema.



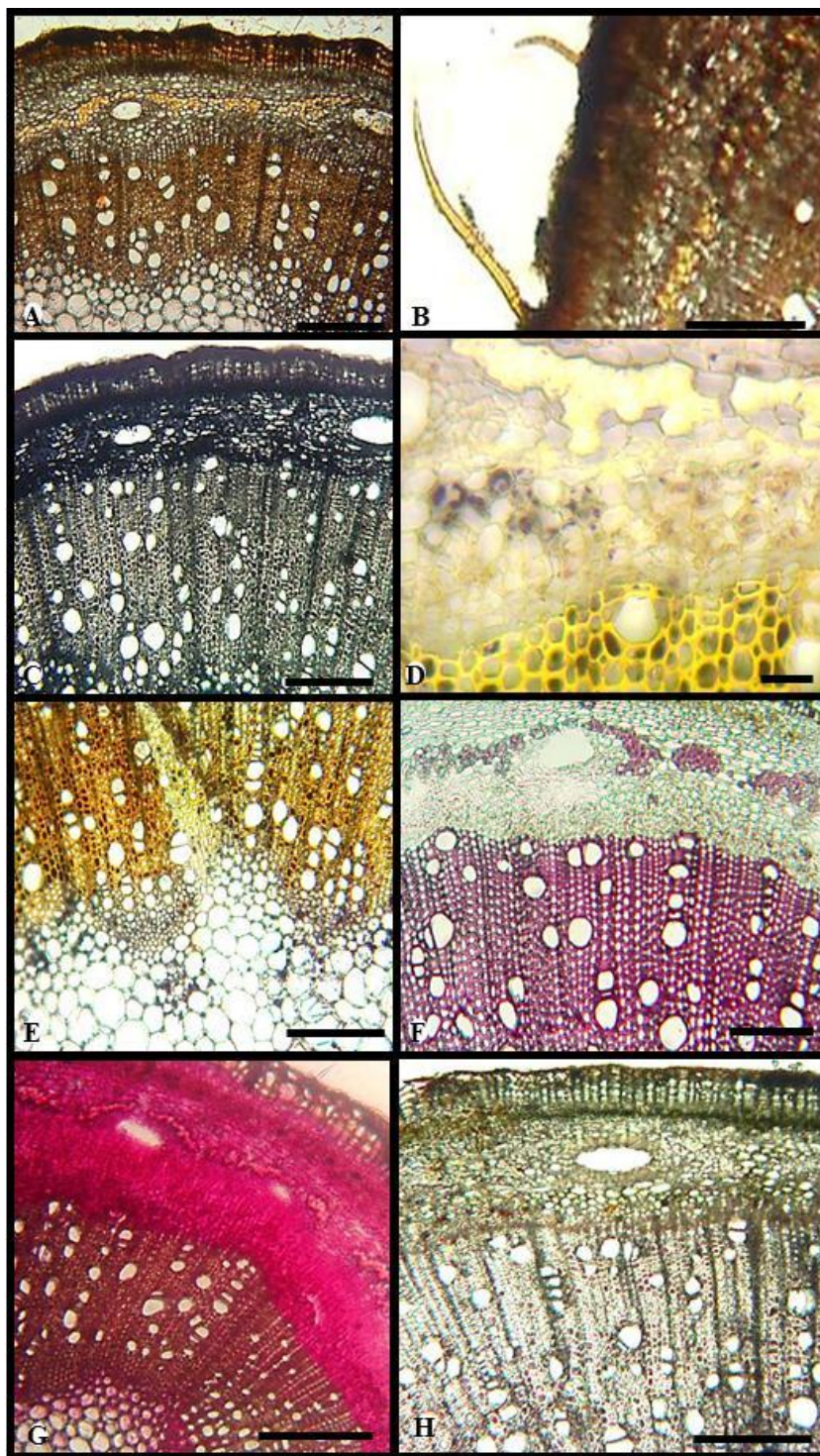
**Figura 11.** Casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae) em secção longitudinal tangencial. A. Visão geral, raios bisseriados. B. Canal secretor ramificado. Barras: A e B = 200  $\mu\text{m}$ .



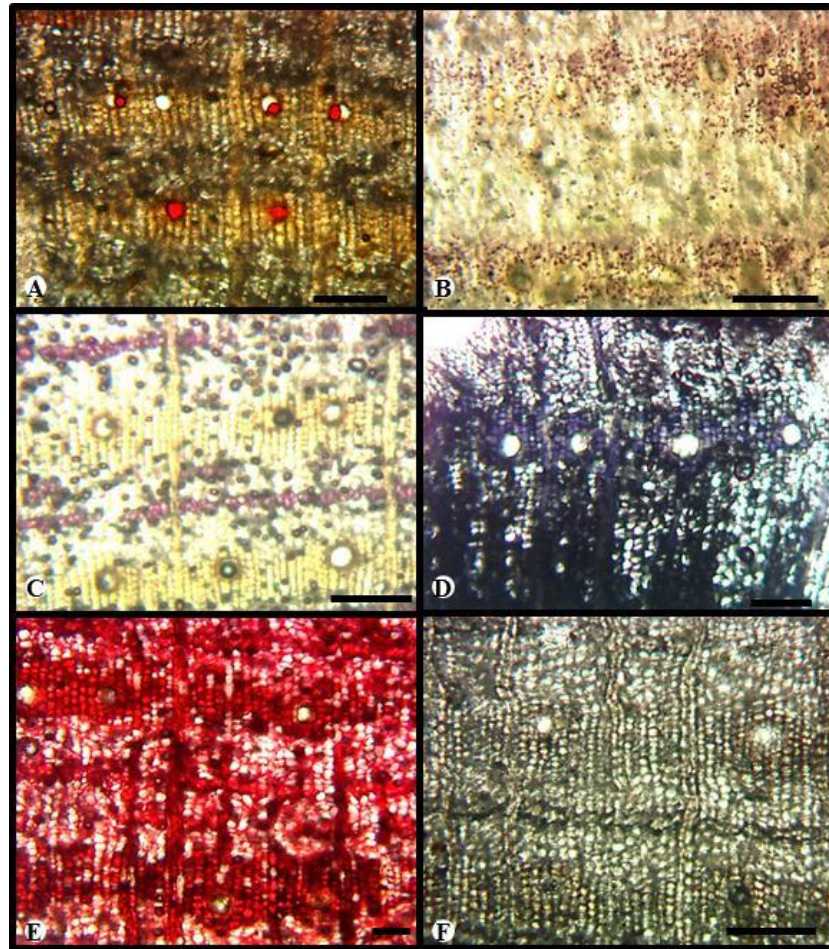
**Figura 12.** Macerado do caule de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae). A. Vaso com pontuações do tipo reticulada, sem apêndice. B. Vaso com pontuações reticuladas a escalariforme, com apêndice em ambas as extremidades, lúmen estreito e fibras libriformes. C. Vasos com pontuações escalariforme com apêndice em uma das extremidades, um de lúmen estreito outro de lúmen largo e fibras libriformes. D. Vaso com pontuações reticulada a escalariforme, de lúmen estreito, apêndice em uma das extremidades e fibras libriformes. E. Célula pétreia (seta). F. Traqueídeos (seta). Barras: A, B, C, D e E = 100  $\mu$ m.



**Figura 13.** Histoquímica do folíolo de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae) em secção transversal. A. Sudan III revelando lipídios na cutícula. B. Floroglucinol revelando ligninas nas fibras. C e D. Cloreto férrico evidenciando polifenóis por toda extensão da folha. E e F. Vanilina clorídrica evidenciando os taninos. G e H. Nadi evidenciando óleos essenciais. I e J. Controle. Barras: A, G e H = 50  $\mu\text{m}$ ; B, C, D, E, F, I e J = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 14.** Histoquímica do caule dos ramos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae) em secção transversal. A. Sudan III revelando lipídios na periderme, nas fibras esclerenquimáticas e nas fibras do xilema. B. Sudan III no tricmatector. C. Cloreto férrico evidenciando polifenóis por toda extensão do caule. D. Reserva de amido no floema e no interior das fibras do xilema (lugol). E. Amido no interior das fibras do xilema. F. Floroglucionol revelando ligninas nas fibras. G. Vanilina clorídrica evidenciando os taninos. H. Controle. Barras: A, B, C, E, F, G e H = 200 µm, D = 50 µm.



**Figura 15.** Histoquímica da casca do caule de *Schinusterebinthifolius*Raddi. (Anacardiaceae) em secção transversal. A. Sudan III revelando lipídios nas células parenquimáticas e no interior dos canais secretores. B. Amido reveladas por lugol no parênquima e no floema. C. Floroglucionol revelando ligninas nas fibras. D. Cloreto férrico revelando polifenóis. E. Vanilina clorídrica evidenciando os taninos. F. Controle. Barras: A, B, C, D, E, F, G e H = 200  $\mu$ m.

## 5 CAPÍTULO II

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
TANINOS NAS CASCAS DE *Schinus terebinthifolius* RADDI (ANACARDIACEAE)**

## Introdução

*Schinus terebinthifolius* Raddi pertencente à família Anacardiaceae, é uma árvore com ampla distribuição geográfica (LORENZI, 1992), ocorrendo no Brasil, nos estados do Nordeste, Sudeste e Sul do país (SILVA-LUZ, 2012). É conhecida popularmente por aroeira, aroeira da praia, aroeira de remédio, aroeira vermelha, aroeira pimenteira ou aroeira mansa (LORENZI, 1992; TAKEDA; FARAGO, 2001; LORENZI; MATOS, 2002). Os frutos são utilizados na culinária em substituição à pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), sendo muito famosa na cozinha européia, principalmente na França (LORENZI, 1992).

Seu uso pela população ocorre desde a época dos jesuítas (KRÖKER, 2003), foi incluída na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (1926) e atualmente é uma das 71 plantas medicinais listadas pelo Ministério da Saúde como de interesse do SUS (BVS, 2012). Diversos estudos comprovam atividade antiinflamatória (CAVALHER-MACHADO et al., 2008), antimicrobiana (AMORIM; SANTOS, 2003; LIMA et al., 2006; SCHOMOUROLO et al., 2006; JOHANN et al, 2007; SILVA et al, 2009), cicatrizante (COUTINHO et al., 2006; LUCENA et al., 2006), expectorante, antidiarreico (DI-STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI; MATOS, 2002; MEDEIROS et al., 2004), antioxidante (AABY et al., 2004; CERUKS et al., 2007), gastroprotetor (FALCÃO et al., 2008; CARLINI et al., 2010) e antitumoral (QUEIRES et al., 2006).

Apresenta grande diversidade de constituintes químicos como óleos essenciais (LIMA et al., 2009), alcaloides, saponinas, triterpenos, flavonoides (KRÖKER, 2003; LIMA et al., 2006), esteroides e antraquinonas (LIMA et al., 2006), e é conhecida principalmente por apresentar alto teor de taninos (LORENZI, 2002; MATOS, 2002; KRÖKER, 2003; LIMA et al., 2006; CARLINI et al., 2008; LIMA et al., 2009), os quais estão bastante relacionados com as atividades citadas (JOLY, 2002).

Os taninos são substâncias polifenólicas complexas, amplamente distribuídas no reino vegetal (HASLAM et al., 1994) e de acordo com suas estruturas químicas, são divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (BRUNETON, 2001; MELLO; SANTOS, 2006). São atribuídas a estes metabólitos secundários um número significativo de atividades biológicas as quais se devem a capacidade de formarem complexos com macromoléculas como proteínas, polissacarídeos e com íons metálicos. Fazendo com que plantas que possuam estes metabólitos despertem interesse econômico, ecológico e medicinal (MARTINS, 1998; BRUYNE, et al., 1999; BRUNETON, 2001; MELLO; SANTOS, 2006;

MONTEIRO et al., 2005). *Schinus terebinthifolius* é uma espécie de interesse farmacêutico, utilizada na produção de cosméticos e de fitoterápicos. Sendo importante o estabelecimento de especificação para este metabólito, que garanta a efetividade da atividade para a qual se destina a espécie, bem como o produto final. Desta forma, os taninos têm sido empregados como marcadores para a avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais (SOARES, 2002; MELLO; SANTOS, 2006).

Portanto se faz necessária a quantificação dessas substâncias, e vários são os métodos de determinação do teor de taninos que têm sido empregados (CARVALHO et al, 2004; MONTEIRO et al., 2005). Dentre os métodos mais utilizados destaca-se o espectrofotométrico para determinação de fenóis totais, que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, presente em diferentes compêndios oficiais (PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1980; DEUTSCHES ARZNEIBUCH, 1992; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O método de Folin-Ciocalteu possui fundamento único para a determinação do teor de polifenóis totais. No entanto, a análise comparativa do método apresentado em diversos compêndios oficiais (DEUTSCHES ARZNEIBUCH, 1992; BRITISH PHARMACOPEIA, 2001; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2002; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), realizada por Verza (2006), revelou que existem diferenças nas técnicas e parâmetros utilizados. Tais como, composição de reagentes, tempo ótimo de leitura e comprimento de onda, os quais são influenciados pela suscetibilidade do complexo tanino-proteína a diversos fatores como temperatura, pH e proporção de tanino e agente complexante. Além da própria variabilidade do teor de taninos entre diferentes espécies vegetais, que estão amplamente documentados na literatura, e que também contribuem para a variabilidade do método (VERZA, 2006). Diante do exposto se faz necessária a padronização desses parâmetros e adequação do método para a espécie *S. terebinthifolius*, através da validação da metodologia para quantificação de taninos, valorizando assim suas diferentes composições.

## **Metodologia**

### **Obtenção e preparação do material vegetal**

Foram coletadas as cascas do caule de *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, em Recife – PE, no mês de novembro, cuja identificação e depósito da exsicata foram

realizados no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agronômico de Pernambuco sob o número 87539. As cascas foram trituradas em moinho de facas (Adamo, modelo 340).

### **Preparo da solução extrativa**

Para obtenção da solução extrativa, 0,5 g de matéria-prima triturada foram submetidas à decocção sob refluxo por 30 min, a temperatura de 80-90°C, utilizando 150,0 mL de água. Após resfriamento à temperatura ambiente, a solução extrativa foi transferida para balão de 250,0 mL e o volume completado com água. Após decantação, a solução foi filtrada, sendo desprezados os primeiros 50,0 mL, obtendo-se assim a solução extrativa (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2002; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

### **Otimização dos parâmetros experimentais**

#### **Determinação da concentração da amostra e do comprimento de onda para leitura**

Para escolha da alíquota da solução extrativa a fim obter um valor de absorbância adequado ao método (entre 0,2 e 0,8 UA) e para estabelecimento do comprimento de onda de leitura ótimo, uma série de amostras, diluídas a partir da solução extrativa, foram submetidas à varredura em espectrofotômetro na faixa de 500 a 900 nm. Foi escolhido o comprimento de onda no qual se obteve a absorbância máxima.

### **Cinética de Reação**

Foi realizada a leitura da amostra no espectrofotômetro após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min da adição do carbonato de sódio. A análise foi realizada em triplicata e a média dos valores foi representada através de gráfico de dispersão.

### **Planejamento fatorial**

As amostras foram preparadas utilizando balão volumétrico com capacidade para 25 mL. Foram adicionados 10 mL de água, diferentes alíquotas do reagente Folin Ciocalteau,

alíquota da solução extrativa completando o volume com soluções de carbonato de sódio em diferentes concentrações. Após 15 minutos da adição do último reagente efetuou-se leitura da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis (modelo Evolution 60S), utilizando água como solução de compensação (branco).

As condições foram avaliadas através de planejamento fatorial do tipo  $3^2$  (3 variáveis em 2 níveis de variação) adicionado de 3 pontos centrais. Os fatores analisados foram o volume de reagente Folin Ciocalteu (onde foram testadas alíquotas de 1, 2 e 3 mL), concentração de carbonato de sódio (10,75%, 15% e 20%, (p/v)) e tempo de reação (5, 15 e 25 min) (Tabela 1). As leituras foram realizadas em 780 nm em triplicata. A análise estatística foi realizada através do gráfico de Paretos, regressão pelo método dos mínimos quadrados e ANOVA, utilizando o software STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA).

**Tabela 1.** Matriz de desenho composto central (DCC) aplicado para avaliar a influência da quantidade de reagente de Folin, concentração de carbonato e tempo de reação nas respostas do método (absorbância).

| Variáveis Naturais   |               |             | Variáveis Codificadas |               |             |
|----------------------|---------------|-------------|-----------------------|---------------|-------------|
| Folin Ciocalteu (mL) | Carbonato (%) | Tempo (min) | Folin Ciocalteu (mL)  | Carbonato (%) | Tempo (min) |
| 1                    | 10,75         | 5           | -1                    | -1            | -1          |
| 1                    | 10,75         | 25          | -1                    | -1            | +1          |
| 1                    | 20            | 5           | -1                    | +1            | -1          |
| 1                    | 20            | 25          | -1                    | +1            | +1          |
| 3                    | 10,75         | 5           | +1                    | -1            | -1          |
| 3                    | 10,75         | 25          | +1                    | -1            | +1          |
| 3                    | 20            | 5           | +1                    | +1            | -1          |
| 3                    | 20            | 25          | +1                    | +1            | +1          |
| 2                    | 15            | 15          | 0                     | 0             | 0           |
| 2                    | 15            | 15          | 0                     | 0             | 0           |
| 2                    | 15            | 15          | 0                     | 0             | 0           |

### Determinação da quantidade ideal de caseína

Para escolha da quantidade de caseína adequada para a precipitação dos taninos, foi utilizado como referência o trabalho realizado por Solon e colaboradores (2007).

### Cálculo para determinação do teor de taninos totais

O teor de taninos totais foi calculado através da fórmula:  $TT = PFT - FNT$

Onde: PFT = teor de polifenóis totais (g%); FNT = teor de polifenóis da fração não tanante (g%); TT = teor de taninos totais (g%). Os teores foram expressos em concentração de ácido gálico.

### **Curva de calibração para o padrão de ácido gálico**

A curva de calibração do padrão foi determinada a partir da média de três curvas autênticas, construídas com amostras da solução do padrão, ácido gálico, em sete concentrações (2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 µg/mL). A linearidade foi avaliada através do cálculo de regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados.

### **Validação da metodologia analítica**

A metodologia descrita foi avaliada de acordo com as normas estabelecidas pela RE nº 899 (BRASIL, 2003) e pelas diretrizes do ICH (ICH, 2005). Determinando-se, portanto a especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão e robustez do método. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a confiabilidade dos parâmetros foi verificada pelo coeficiente de variação percentual (CV%), admitindo-se apenas valores inferiores a 5%. Os resultados foram tratados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) *One-Way*, quando aplicável.

### **Linearidade e Limites de detecção e quantificação**

A linearidade do método foi verificada a partir da média de três curvas, construídas com amostras da solução extrativa, em 5 concentrações, 16,0, 32,0, 48,0, 64,0 e 80,0 µg/mL. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), sendo  $R^2 > 0.99$ , o mínimo aceitável.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados (em µg/mL) de acordo com as equações  $LD = DP_a \times 3/IC$  e  $LQ = DP_a \times 10/IC$ , onde  $DP_a$  é o desvio padrão

do intercepto com o eixo do Y obtido das três curvas de calibração do padrão ácido gálico e IC é a média dos coeficientes angulares (inclinação da reta) das respectivas curvas.

### **Especificidade**

A especificidade do método espectrofotométrico foi determinada através da sobreposição dos espectros do padrão e da amostra do extrato. E através do método de adição do padrão. Neste segundo adicionou-se uma concentração fixa do padrão às concentrações da curva de linearidade, e por fim foi feita a comparação das retas obtidas, observando o paralelismo entre elas.

### **Precisão**

A precisão foi avaliada pela repetitividade (precisão intracorrida), na qual foram examinadas, em um único dia, por um operador, seis determinações para amostras a 100% da concentração teste, obtidas a partir de seis soluções extrativas diferentes.

E pela precisão intermediária (precisão intercorrida), a qual foi determinada por dois analistas, cada um fez três determinações para amostras a 100% da concentração teste, obtidas a partir de três soluções extrativas diferentes.

### **Exatidão**

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas do padrão a 80, 100 e 120% (1,0, 2,0 e 3,0  $\mu\text{g/mL}$ ) à amostras da solução extrativa diluída a 100% da concentração teste, com três réplicas cada. Os valores de recuperação, expressos em porcentagem, foram determinados através da razão entre as concentrações médias determinadas experimentalmente com as concentrações teóricas correspondentes.

### **Robustez**

O ensaio para determinação da robustez do método espectrofotométrico foi realizado a partir da variação dos seguintes parâmetros: influência da luminosidade (presença e ausência de luz) e concentração de carbonato de sódio (10,75% para 15%).

## Resultados e discussão

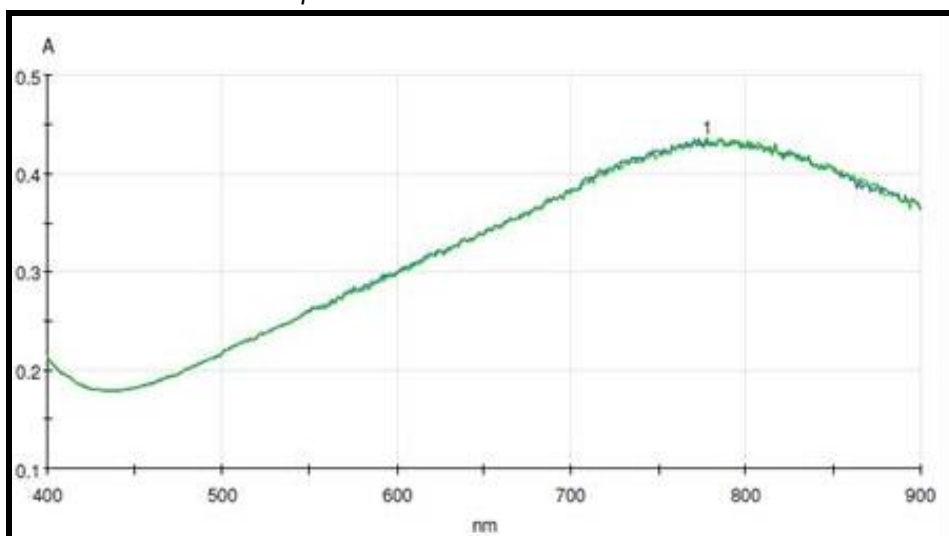
Os ensaios de determinação da alíquota, planejamento fatorial, especificidade e exatidão foram empregados apenas para a etapa de polifenóis totais, visto que o método se baseia primariamente na determinação deste grupo, para posteriormente realizar a determinação de taninos totais.

### Otimização da metodologia

#### Determinação da concentração da amostra e comprimento de onda

O máximo de absorbância após reação do extrato de *S. terebinthifolius* com o reagente Folin Ciocalteu, na presença de carbonato de sódio, foi observado no comprimento de onda de 780 nm. Dentre as concentrações de amostras testadas, a amostra na concentração de 48 µg/mL foi a que apresentou valor de absorbância mais adequado para o método, ou seja entre 0,2 e 0,8 U.A. de acordo com a Lei de Lambert-Beer (Figura 1).

**Figura 1.** Espectro de varredura para solução amostra correspondente a polifenóis totais a partir da matéria-prima de *Schinus terebinthifolius*.



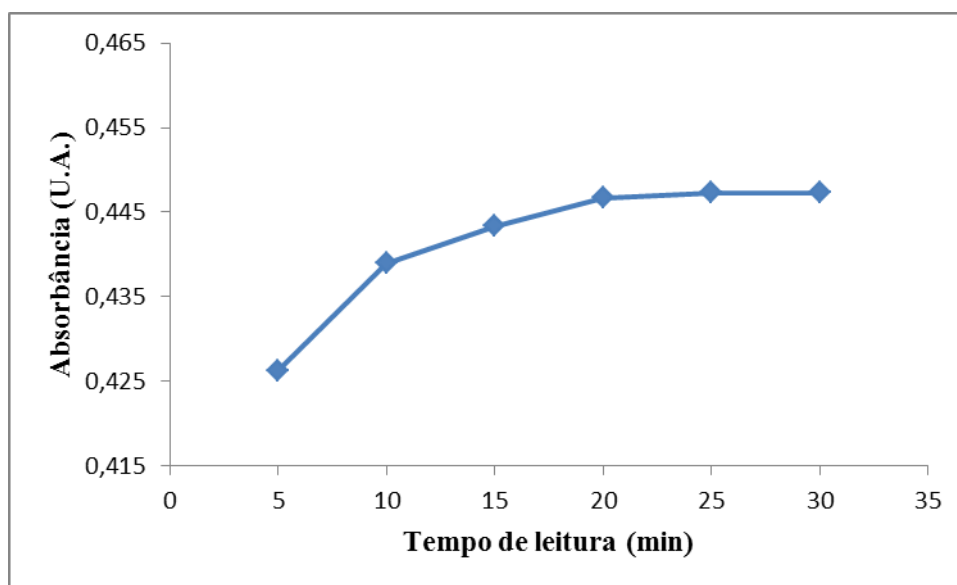
## Cinética de reação

Observa-se na tabela 2 que de 15 para 20 minutos de reação não ocorre incremento significativo da absorbância e após este período a absorbância permanece constante podendo-se também visualizar figura 2.

**Tabela 2.** Valores da absorbância da cinética de reação de complexação dos polifenóis com o reagente Folin Ciocalteu.

| Tempo (min) | Média (U.A.) | DP    | CV%   |
|-------------|--------------|-------|-------|
| 5           | 0,426        | 0,005 | 1,083 |
| 10          | 0,439        | 0,005 | 1,139 |
| 15          | 0,443        | 0,004 | 0,912 |
| 20          | 0,447        | 0,005 | 1,034 |
| 25          | 0,447        | 0,003 | 0,563 |
| 30          | 0,447        | 0,002 | 0,341 |

**Figura 2.** Cinética da reação de complexação dos polifenóis com o reagente Folin Ciocalteu.



### Avaliação das variáveis analíticas – Planejamento fatorial

Em revisão sobre os métodos de determinação do teor de taninos realizada por Verza (2006), observou-se grande variação das especificações analíticas entre diversos compêndios e códigos oficiais. Diferentes comprimentos de onda (730 a 760 nm), tempos de reação (25 a 30 min), volumes de reagente (1 a 3 mL), concentrações de carbonato de sódio e quantidade de caseína foram empregados para diferentes espécies vegetais. Sendo, portanto necessária a padronização destes parâmetros para *Schinus terebinthifolius*. O planejamento fatorial foi o método de escolha para a investigação e determinação das condições adequadas para o método, pois permite a análise da influência das variáveis em conjunto.

A matriz de planejamento experimental, contendo os valores médios da absorbância com seus respectivos desvios-padrão e coeficientes de variação estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Matriz de planejamento experimental.

| Ensaio | Variáveis             |             |             | Resultados |       |       |
|--------|-----------------------|-------------|-------------|------------|-------|-------|
|        | Folin ciocalteau (mL) | Carbonato % | Tempo (min) | Média (UA) | DP    | CV%   |
| 1      | 1                     | 10,75       | 5           | 0,426      | 0,009 | 2,302 |
| 2      | 1                     | 10,75       | 25          | 0,430      | 0,009 | 2,292 |
| 3      | 1                     | 20,00       | 5           | 0,379      | 0,011 | 2,908 |
| 4      | 1                     | 20,00       | 25          | 0,360      | 0,010 | 2,893 |
| 5      | 3                     | 10,75       | 5           | 0,508      | 0,009 | 1,827 |
| 6      | 3                     | 10,75       | 25          | 0,507      | 0,010 | 2,110 |
| 7      | 3                     | 20,00       | 5           | 0,480      | 0,005 | 1,148 |
| 8      | 3                     | 20,00       | 25          | 0,468      | 0,005 | 1,177 |
| 9      | 2                     | 15,00       | 15          | 0,415      | 0,008 | 1,927 |
| 10     | 2                     | 15,00       | 15          | 0,413      | 0,003 | 0,739 |
| 11     | 2                     | 15,00       | 15          | 0,415      | 0,007 | 1,691 |

UA = Unidade de absorbância, DP = Desvio padrão, CV% = Coeficiente de variação.

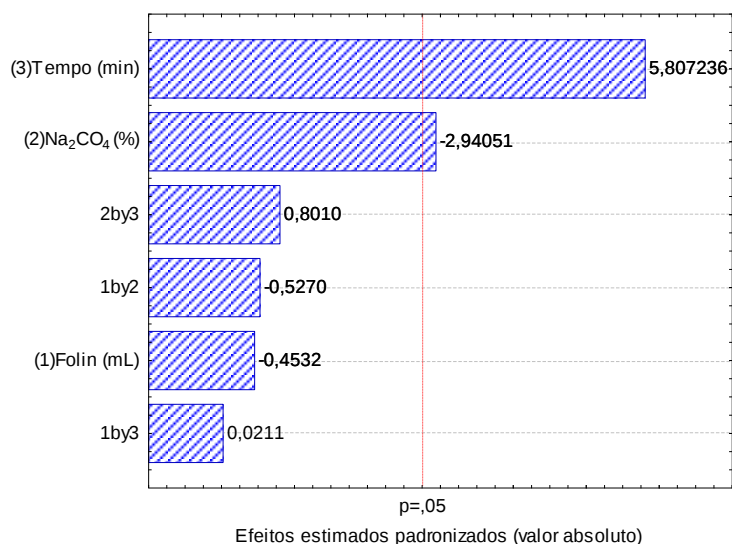
Para verificação da significância dos resultados obtidos para os efeitos estimados foi realizada análise estatística, com intervalo de confiança de 95%, empregando o gráfico de Pareto e ANOVA (Figura 3), além da utilização do gráfico de Superfície de Resposta que permite visualizar a influência das variáveis sobre a absorbância (Figura 4). Ao analisar estes

gráficos e o cálculo dos efeitos estimados para os fatores, observa-se que o fator tempo de reação merece destaque. O aumento do tempo de reação teve influência positiva, a mudança de nível favoreceu a resposta, incrementando a absorbância. Logo, o tempo de reação de 15 minutos foi escolhido como o mais apropriado para execução do experimento, acordo com o resultado da cinética de reação de complexação.

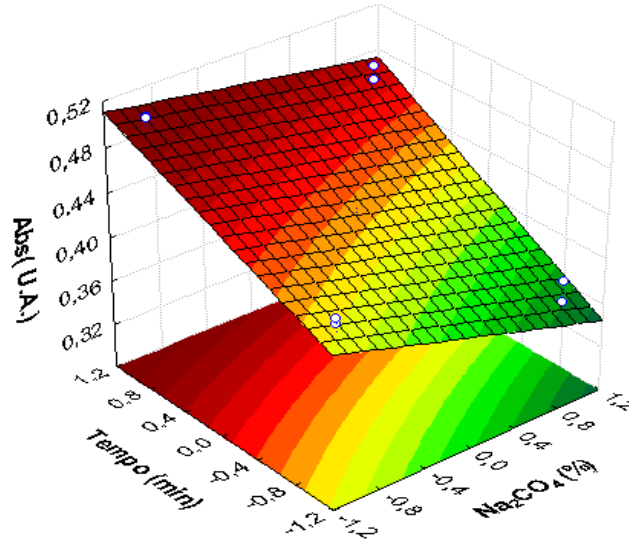
Embora em menor intensidade, o fator carbonato de sódio também exerceu influência relevante. Porém, o aumento na concentração de carbonato de sódio reduz a resposta. Devido ao fato da reação de complexação, ou seja, redução do reagente pelas hidroxilas fenólicas, que gera a coloração azul, ocorrer em meio alcalino. Porém a reação é pouco estável em excesso de base fraca, e principalmente na presença de base forte, observando-se uma perda rápida da coloração (FOLIN;DENIS, 1912; SCALBERT, 1992). Diante disto, a concentração de 10,75% de carbonato de sódio foi escolhida, além de ser uma concentração bastante citada na literatura.

O fator volume de Folin Ciocalteau, não apresentou importância. Porém, estudos relataram que o emprego de 1 mL do reagente sofre o risco de perda da linearidade por insuficiência de reagente nas concentrações mais altas, comprometendo estudos de linearidade. Por outro lado, os dados indicam que o uso de 2 ou 3 mL do reagente é suficiente para o ambiente reacional (MARTINS, 1998; VERZA, 2006). Neste estudo, observou-se que o uso de alíquotas de 1 mL de reagente conduzem a um maior coeficiente de variação das respostas (ver Tabela 2). Portanto, a alíquota de 2 mL de reagente foi adotada para a metodologia.

**Figura 3.** Gráfico de Paretos obtido através de planejamento fatorial  $3^2$ .



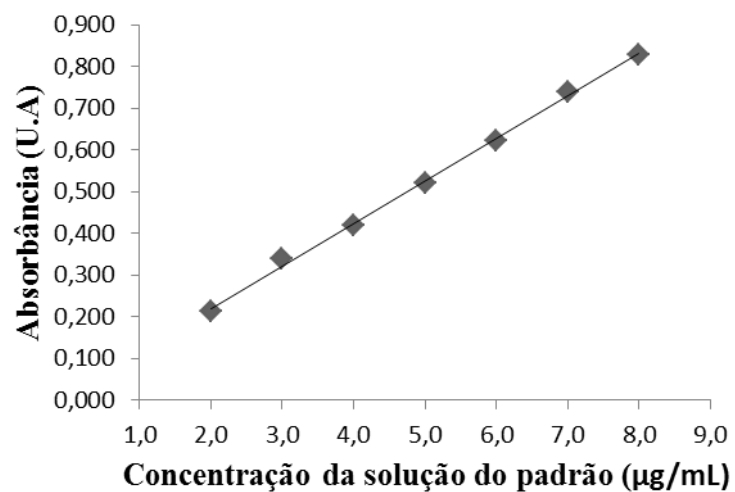
**Figura 4.** Superfície de resposta, para os principais efeitos (tempo de reação e concentração de carbonato de sódio), obtido pelo planejamento fatorial  $3^2$ .



#### Curva de calibração do padrão (ácido gálico)

A média de três curvas de calibração do padrão gerou o gráfico apresentado na Figura 5 com equação da reta sendo  $y = 0,1019x + 0,0158$ , com  $R^2 = 0,9982$ .

**Figura 5.** Curva de calibração do padrão ácido gálico.

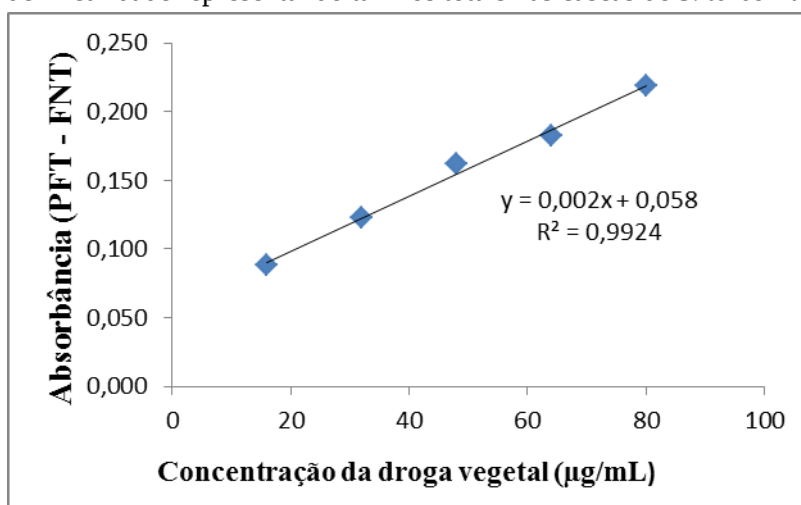


## Validação da metodologia analítica

### Linearidade, limites de detecção e quantificação

A linearidade de um método demonstra que o valor de absorbância obtido, correlaciona a dependência da resposta espectrofotométrica com a variação da concentração da amostra. O resultado foi obtido através da média de três curvas de polifenóis totais (PFT) (solução extrativa) e de três curvas para a fração não tanante (FNT). Sendo posteriormente calculadas as diferenças entre as absorbâncias de polifenóis totais e da fração não tanante para obtenção da curva para taninos totais. Através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi gerada uma reta com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9924, apresentada na figura 6. Este valor significa que 99,24% da variação experimental é explicada pela equação da reta ( $y = 0,002x + 0,058$ ), comprovando a correlação linear entre a resposta espectrofotométrica e a concentração da amostra.

**Figura 6.** Curva de linearidade representando taninos totais nas cascas de *S. terebinthifolius*.



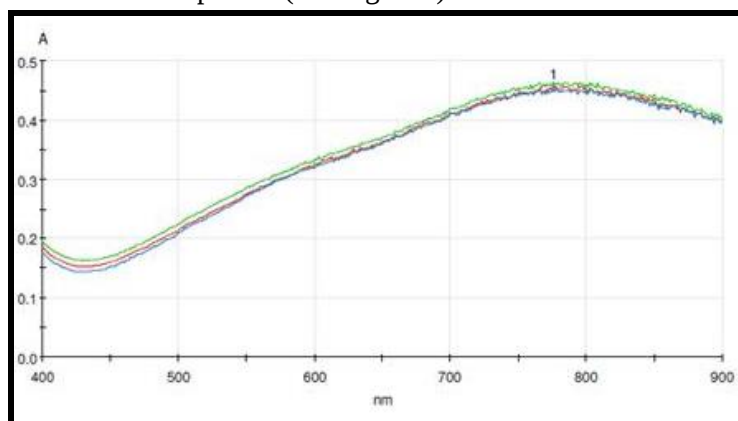
Os valores dos limites de detecção e de quantificação foram 0,2208 e 0,7360 µg/mL, respectivamente. Esses resultados apontam a sensibilidade que o método tem para detectar e quantificar, sem interferências do equipamento, o padrão ácido gálico no extrato das cascas de *S. terebinthifolius*.

## Especificidade

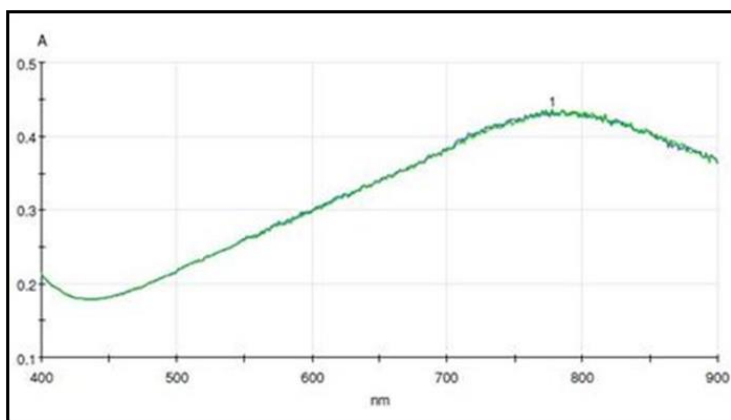
Considerar um método específico significa que ele possui a capacidade de medir exatamente um composto específico, independente da matriz da amostra e de suas impurezas. Através dos espectros obtidos para o ácido gálico (Figura 7), e para solução extrativa de *S. terebinthifolius* (Figura 8), observa-se similaridade de espectro, principalmente do máximo de absorbância, demonstrando a especificidade do método, sendo este, capaz de identificar os polifenóis mesmo na presença de outros constituintes do extrato.

Através do método de adição do padrão, pode-se comparar a reta obtida na determinação da linearidade (polifenóis totais) com equação  $y = 0,008x + 0,087$  e  $R^2 = 0,9993$  e a reta obtida pela adição do padrão com equação  $y = 0,0072x + 0,194$  e  $R^2 = 0,9963$  (Figura 9) e verificar que os coeficientes angulares são bastante aproximados, demonstrando que o método capta a presença dos polifenóis, sendo, portanto específico para quantificação destes.

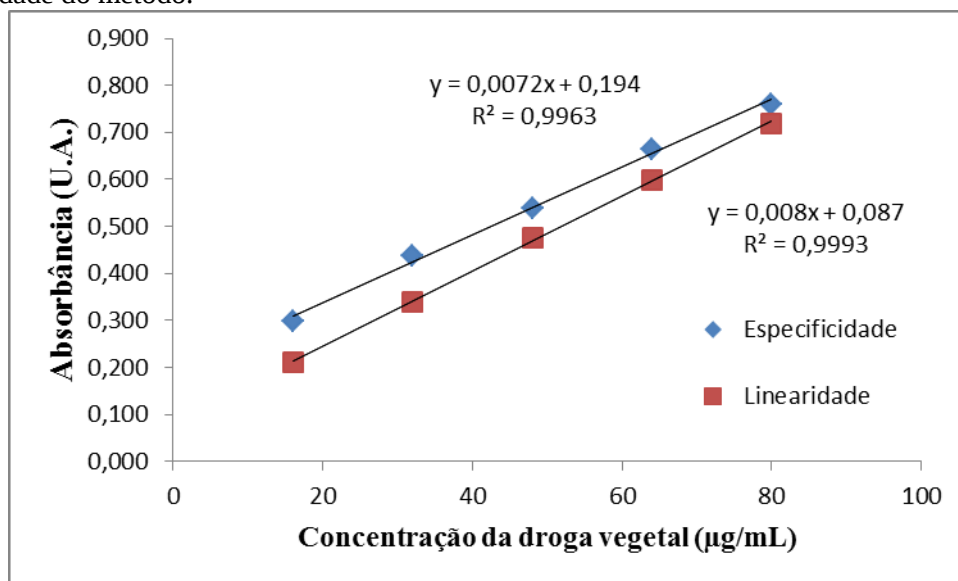
**Figura 7.** Espectro de varredura do padrão (ácido gálico).



**Figura 8.** Espectro de varredura para solução amostra correspondente a polifenóis totais nas cascas de *S. terebinthifolius*.



**Figura 9.** Gráfico de comparação entre as retas de linearidade e especificidade demonstrando a especificidade do método.



### Precisão

Um método é preciso quando demonstra proximidade entre os resultados obtidos em diferentes circunstâncias, mas em condições experimentais iguais. A precisão do método foi avaliada através da repetitividade e da precisão intermediária. No ensaio de repetitividade a solução extrativa apresentou um teor médio de taninos totais de  $3,29\% \pm 0,132$  (4,01%). Para o ensaio de precisão intermediária, os dados foram avaliados estatisticamente através de ANOVA *One-Way*, e os resultados demonstraram que o método é preciso quando as análises são realizadas por um único analista em dias diferentes e por analistas diferentes em um mesmo dia (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise da precisão intermediária.

| Parâmetros      | TT % $\pm$ DP (1) | TT % $\pm$ DP (2) | F tabelado | F calculado |
|-----------------|-------------------|-------------------|------------|-------------|
| Dias 1 e 2      | $3,39 \pm 0,024$  | $3,46 \pm 0,186$  | 6,314      | 0,476       |
| Analistas 1 e 2 | $3,46 \pm 0,186$  | $3,39 \pm 0,133$  | 6,314      | 4,228       |

TT = Taninos totais; DP = Desvio padrão.

## Exatidão

A exatidão representa a capacidade do método de ser coerente entre o resultado obtido e o valor esperado. A amostra de 48 µg/mL da solução extrativa foram adicionados 1, 2 e 3 µg/mL de solução do padrão ácido gálico e as taxas de recuperação de polifenóis totais verificada para as concentrações de padrão adicionadas, obteve-se um percentual de recuperação entre 88,24-93,86% respectivamente, com confiança de 95% (Tabela 5). Estes dados confirmam que a taxa de recuperação do método está dentro das exigências sanitárias (de 80 a 120%), permitindo afirmar que se trata de um procedimento exato (ICH, 2005).

**Tabela 5.** Teste de recuperação.

| Solução extrativa +<br>ácido gálico (µg/mL) | Valor teórico<br>(Polifenóis µg/ml) | Valor Real ± DP<br>(Polifenóis µg/ml) | Recuperação<br>(%) |
|---------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| 48+ 1                                       | 5,9359                              | 5,54 ± 0,076                          | 93,33              |
| 48 + 2                                      | 6,9271                              | 6,50 ± 0,048                          | 93,86              |
| 48 + 3                                      | 8,6935                              | 7,67 ± 0,075                          | 88,22              |

DP = Desvio padrão

## Robustez

Ao analisar a robustez do método, verifica-se a sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, indicando assim, sua confiança durante o processo. Esta verificação é importante para identificar quais condições ou etapas analíticas devem ser melhor controladas. Diante dos resultados apresentados na tabela 6, observa-se que o método foi robusto quanto à pequena variação na concentração do carbonato de sódio de 10,75% para 15%, pois o *F* calculado foi inferior ao *F* tabelado através de ANOVA *One-Way*. Porém quanto ao parâmetro luminosidade verifica-se a necessidade de proteger as amostras e o reagente Folin Ciocalteau da luminosidade durante o experimento visto que houve nítida queda do teor de taninos na presença de luz com *F* calculado superior ao *F* tabelado, sendo este resultado significativo com valor de  $p = 0,0043$ .

**Tabela 6.** Análise da robustez.

| <b>Parâmetros</b>                  | <b>Teor TT (%) <math>\pm</math> DP</b> | <b>F calculado</b> | <b>F tabelado</b> |
|------------------------------------|----------------------------------------|--------------------|-------------------|
| <b>Ausência de luz</b>             | 3,13 $\pm$ 0,155                       | 41,204             | 6,314             |
| <b>Presença de luz</b>             | 2,47 $\pm$ 0,092                       |                    |                   |
| <b>Carbonato de sódio a 10,75%</b> | 3,30 $\pm$ 0,144                       | 1,187              | 6,314             |
| <b>Carbonato de sódio a 15%</b>    | 3,17 $\pm$ 0,147                       |                    |                   |

TT = Taninos totais; DP = Desvio padrão

### Conclusão

A otimização do método bem como o emprego do planejamento fatorial permitiu eleger as condições apropriadas para a metodologia espectrofotométrica, a qual foi adequada de acordo com os parâmetros de validação estabelecidos pela RE nº 899/03 da ANVISA (BRASIL, 2003) e pelo ICH (2005). Apresentando-se como técnica específica, sensível, precisa, exata e robusta, sendo necessário proteger da luminosidade as amostras e o reagente Folin Ciocalteau durante o experimento, para análise quantitativa de taninos totais das cascas de *S. terebinthifolius*.

Além disso, o uso de técnicas espectrofotométricas para a quantificação de metabólitos secundários é fundamental para o controle de qualidade de drogas vegetais. Visto que este tipo de equipamento além de ser de fácil operacionalidade possui custo acessível para pequenas indústrias e laboratórios.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPQ pelo apoio financeiro (133408/2011-6, 312537/2009-3, 483870/2011-0), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (03/2010, ANVISA) e ao IPA – Instituto de Pesquisa Agrônomo por concessão do local para coleta do material vegetal.

## Referências

- AABY, K.; HVATTUM, E.; SKREDE, G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: Relationship to antioxidant activity. *Journal Agricultural Food Chemistry*, Washington, v.52, p.4595-4603. 2004.
- AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro, v.25, n.2, p.95-102. 2003.
- BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE (BVS)  
[http://bvmsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms\\_relacao\\_plantas\\_medicinais\\_sus\\_0603.pdf](http://bvmsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf).  
 Acessado em Dezembro de 2012.
- BRASIL; Resolução RE nº 899 de 29/05/2003; *Diário Oficial da união*, Brasília, DF, 02/06/2003, seção 1 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos.
- BRITISH Pharmacopeia. London: The Stationary Office, 1999, v. I.
- BRUNETON, J. *Farmacognosia – Fitoquímica Plantas Medicinales*. 2 ed. España: Editorial Acríbia S. A. 2001.
- CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v.20, n.2, p.140-146. 2010.
- CARVALHO, E.; MATEUS, N.; FREITAS, V. Flow nephelometric analysis of proteintannin interactions. *Analytica Chimica Acta*, Louisville, v.513, p.97-101, 2004.
- CAVALHER-MACHADO, S.C.; ROSAS, E. C.; BRITO, F. A.; HERINGE, A. P.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; HENRIQUES, M. G. M. O. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology*, Nebraska, v.8, p.1552-1560. 2008.
- CERUKS, M., ROMOFF, P., FÁVERO, O. A., LAGO, J. H. G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova*, São Paulo, v.30, p.597-599, 2007.
- COUTINHO, I. H. I. L. S.; TORRES, O. J. M.; MATIAS, J. E. F.; COELHO, J. C. U.; STAHLKE-JUNIOR, H. J.; AGULHAM, M. A.; BACHLE, E.; CAMARGO, P. A. M.; PIMENTEL, S. K.; FREITAS, A. C. T. Efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v.21, p.49-54, 2006.

DEUTSCHES ARZNEIBUCH 10. Frankfurt: Govi-Deutscher Apotheker, 1992.

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

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 4. ed. France: EDQM, 2002.

FALCÃO, H. S.; MARIATH, I. R.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants of the American continent with antiulcer activity. *Phytomedicine*, Munique, v.15, p.132-146, 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Atheneu, 1 ed. 1926.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 5 ed. 2010.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, Boston, v.73, p.627-650, 1927.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *The Journal of Biological Chemistry*, v.12, p.239-243, 1912

HASLAM, E.; LILLEY, T. H.; CAL, Y.; MARTIN, R.; MAGNOLATO, P. Traditional Herbal Medicines-The Role of Polyphenols. *Planta Medica*, Bélgica, v.55, p.1-8, 1989.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNI, C. L.; RESENDE M. A. Antifungal properties of plants used Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.38, n.4, p.632-637, 2007.

JOLY, A. B. 2002. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Companhia editora nacional. 13ª Edição. 2002.

KRÖKER, E. A. P. *Plantas medicinais, aromáticas e condimentares*. <http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/>. 2003. Acesso em dezembro de 2012.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. EE. G.; GENET, J. P.; MARQUES, B.; NEUVILLE L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v.105, p.137-147, 2006.

LIMA, L. B.; VASCONCELOS, C. F. B.; MARANHÃO, H. M. L.; LEITE, V. R; FERREIRA, P. A.; ANDRADE, B. A.; ARAÚJO, E. L.; XAVIER, H. S.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v.126, n.3, p.468-473, 2009.

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

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil*. 2ª Ed. São Paulo: Editora Plantarum, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Editora Plantarum, 2002.

LUCENA, P. L. H.; RIBAS-FILHO, J. M.; MAZZA, M.; CZECZKO, N. G.; DIETZ, U. A.; CORREA-NETO, M. A.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J.; CESCHIN, A. P.; THIELE, E. Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. *Acta Cirurgica Brasileira*, São Paulo, v.21, p.44–49, 2006.

MATOS, F. J. A. *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. 2.ed. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2002.

MARTINS, A. G. *Influência de fatores tecnológicos na avaliação analítica e farmacológica de extratos secos nebulizados de Maytenus ilicifolia Martius ex Reiss - Celastraceae (espinheira-santa)*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

MEDEIROS, M. F. T.; FONSECA, V. S. D.; ANDREATA, R. H. P. Plantas medicinais e seus usos pelos sítiantes da Reserva Rio das Pedras. *Acta Botânica Brasilica*, Feira de Santana, v.18, n.2, p.391-399, 2004.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 6. ed. rev. ampl., Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis, UFSC, 2006.

MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; AMORIM, E. L. C.; ARAUJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. *Revista Árvore*, Viçosa, v.29, n.6, p 999-1005, 2005.

PHARMACOPÉE FRANÇAISE 10.ed. Paris: Adrapharm, 1980.

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 Research*, v.26, n.1A, p.379-387, 2006.

SCALBERT, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. *Plant Polyphenols*. New York: Plenum Press, 1992.

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

SILVA, A. B.; SILVA, T.; FRANCO, E. S.; RABELO, A. S.; LIMA, E. R.; MOTA, R. A.; CÂMARA, C. A. G.; PONTES-FILHO, N. T.; LIMA-FILHO, J. V. Antibacterial activity, chemical composition and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.41, p.158-163, 2009.

SILVA-LUZ, C. L.; PIRANI, J. R. Anacardiaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB004401>. Acesso em Novembro de 2012, 2012.

SOARES, L. A. L. Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reissek. – Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

SOLON, L. G. S.; COSTA, L. J. L.; WANDERLEY, A.; SOARES, L. A. L.; SOUZA, T. P. Avaliação do agente complexante na quantificação de taninos totais em soluções extrativas de *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Psidium guajava* L. *Biofarma – Ver. Téc. Cient. Farm. Bioquim. Anál. Clín. Toxocol*, v. 2, Nº 4, p. 275-281, 2007.

TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V. *Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha*. Curitiba: Serzegrat, 2001.

VERZA S. G. Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona. Mestrado (Dissertação em Ciências Farmacêuticas). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na folha foram observadas características como: células da epiderme adaxial maiores que da epiderme abaxial, presença de hipoderme, mesofilo com organização dorsiventral apresentando canais secretores, nervura central biconvexa com cerca de cinco canais secretores, estômatos anomocíticos, folha hipostomática, presença de drusas e cristais prismáticos, que confirmam caracteres de folhas de *Schinus terebinthifolius*. O pecíolo segue o perfil de organização semelhante ao do caule.

As estruturas do caule dos ramos de *Schinus terebinthifolius*, como a disposição da região cortical, do sistema vascular e da região medular, confirmam características estruturais das dicotiledôneas, classe a qual a aroeira pertence. Estruturas observadas neste estudo como células esclerificadas no parênquima cortical, calotas de fibras inseridas no floema, cilindro xilemático com raios estreitos, cristais de oxalato de cálcio, elementos de vasos com placas de perfuração simples, parênquima axial escasso, raios estreitos ou unisseriados geralmente heterogêneos e células do floema contendo cristais são atributos de Anacardiaceae, família a qual *Schinus terebinthifolius* pertence. A presença de apêndices nas extremidades dos elementos de vasos pode ser uma particularidade que contribua para a diferenciação da espécie.

Os compostos identificados na análise histoquímica confirmam análises fitoquímicas realizadas anteriormente quanto à presença de polifenóis e taninos, os quais estão presentes em abundância tanto nos ramos (folhas e caule) quanto na casca. Estas são as principais substâncias responsáveis pelas atividades de interesse farmacêutico desta espécie. Podendo-se desta forma, levantar a hipótese de que tanto o caule e folhas dos ramos, quanto a casca do caule adulto, o qual é comumente utilizado, podem ser empregados como drogas vegetais desta espécie. Sendo necessários estudos analíticos quantitativos para verificar se ambas as composições e as concentrações desses polifenóis presentes nas folhas, no caule e na casca do caule são responsáveis pelas atividades biológicas atribuídas a esta espécie vegetal.

A descrição apresentada auxilia a diagnose anatômica da droga vegetal de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Além de incrementar as descrições realizadas anteriormente com detalhes anatômicos dos cortes longitudinais do caule, da casca e das células dissociadas do xilema do caule. Desta forma, o presente estudo contribui para a certificação de autenticidade da droga vegetal de *Schinus terebinthifolius*.

Quanto a metodologia para quantificação de taninos nas cascas de *Schinus terebinthifolius*, a otimização do método bem como o emprego do planejamento fatorial permitiu eleger as condições apropriadas para a metodologia espectrofotométrica, a qual foi adequada de acordo com as legislações vigentes. Apresentando-se como técnica específica, sensível, precisa, exata e robusta, sendo necessário proteger da luminosidade as amostras e o reagente Folin Ciocalteau durante o experimento, para análise quantitativa de taninos totais das cascas de *S. terebinthifolius*.

Além disso, o uso de técnicas espectrofotométricas para a quantificação de metabólitos secundários é fundamental para o controle de qualidade de drogas vegetais. Visto que este tipo de equipamento além de ser de fácil operacionalidade possui custo acessível para pequenas indústrias e laboratórios.

## REFERÊNCIAS

- AABY, K.; HVATTUM, E.; SKREDE, G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: Relationship to antioxidant activity. *Journal Agricultural Food Chemistry*, Washington, v.52, p.4595-4603. 2004.
- ALMEIDA-BARBOSA, L. C.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTS, A. D.; FONSECA DE PAULA, V.; ISMAIL, F. M. D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Química Nova*, São Paulo, v.30, p.1959-1965. 2007.
- ALONSO, J. R. *Tratado de Fitomedicina - bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: ISIS Ediciones S. R. L. 1998.
- AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro, v.25, n.2, p.95-102. 2003.
- BACKES, P.; IRGANG, B. *Árvores do Sul: Guia de identificação e interesse ecológico. As principais espécies nativas Sul-Brasileiras*. Santa Cruz do Sul: Instituto Souza Cruz. 2002.
- BAGGIO, A. J. Aroeira como potencial para usos múltiplos na propriedade rural. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, v.17, p.25-32, 1988.
- BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. *Biológico*, São Paulo, v.64, p.175-177. 2002.
- BARROSO, G. M. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. Viçosa: UFV. 1991.
- BATE-SMITH, E.C. *Phytochemistry*, v. 12, p. 907-12, 1973.
- BENNETT, F. D.; HABECK, D. H. Brazilian peppertree – prospects for biological control in Florida. In: CENTER, T. D.; DOREN, R. F.; HOFSTETTER, R. L.; MYERS, R. L.; WHITEAKER, L. D. (Eds.). *Proceedings of the Symposium on Exotic Pest Plants*. Florida: University of Miami. 1991. pp.23-33.
- BENT, S.; KO, R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. *American Journal of Medical Science*, New York, v.116, p.478-485, 2004.
- BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE (BVS)  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms\\_relacao\\_plantas\\_medicinais\\_sus\\_0603.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf).  
 Acessado em Dezembro de 2012.
- BORELLE F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research*, Reino Unido, v.14, n.8, p.581-591. 2000.

BRASIL; Resolução RE nº 899 de 29/05/2003; *Diário Oficial da união*, Brasília, DF, 02/06/2003, seção 1 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationary Office, 1999, v. I.

BRUNETON, J. *Farmacognosia – Fitoquímica Plantas Medicinales*. 2 ed. España: Editorial Acríbia S. A. 2001.

BRUYNE, T. de.; PIETERS, L.; WIEVROUW, M.; CLERO, E. de.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. J. Biological evaluation of proanthocyanidin dimmers and related polyphenols. *Journal of Natural Products*, Washington, v.62, p.954-958, 1999.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v.33, p.179-189, 2000.

CAMPELO, J.; MARSAIOLI, A. J. Triterpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, Reino Unido, v.13, p.659-660. 1974.

CAMPELO, J.; MARSAIOLI, A. J. 1975. Terebinthifolic acid and bauerenone: new triterpenoid ketones from *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, Reino Unido, v.14, p.2300-2302. 1975.

CAPASSO, F. The medicinal plants in our time. *Bolletino Chimico Farmaceutico*, Milano, v.125, n.9, p.322-327, 1986.

CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v.20, n.2, p.140-146. 2010.

CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; PAOLI, A. A. S. Ontogeny and structure of the pericarp of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v.45, n.1, p.73-79. 2002.

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

CARPANEZZI, A. A.; COSTA, L.G.S.; KAGEYAMA, P.Y.; CASTRO, C.F.A. Espécies pioneiras para recuperação de áreas degradadas: a observação de laboratórios naturais. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6, 1990, Campos do Jordão. *Anais...* São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990.

CARVALHO, P. E. R. *Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. Colombo: Embrapa. 1994.

CARVALHO, E.; MATEUS, N.; FREITAS, V. Flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions. *Analytica Chimica Acta*, Louisville, v.513, p.97-101, 2004.

CARVALHO, E. L. S. *Desenvolvimento de produto seco nebulizado de Maytenus ilicifolia Martius ex Reiss - Celastraceae (espinheirasanta)*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

CASTELO BRANCO-NETO, M. L.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA-FILHO, M. A.; CZECHKO, N. G.; AOKI, S.; CUNHA, S.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; FARION, L. R. A. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v.21, sup.2, p.1-22, 2006.

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

CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*, Oxford, v.52, p.1361-1371, 2003.

CHARLTON, A. J.; BAXTER, N. J.; KHAN, M.L.; MOIR, A. J. G. HASLAM, E.; DAVIES, A.P.; WILLIAMSON, M. P. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.50, p.1593-1601, 2002.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 4 ed., Lisboa: Calouste Gulbenkian, v.2, 1994.

COUTINHO, I. H. I. L. S.; TORRES, O. J. M.; MATIAS, J. E. F.; COELHO, J. C. U.; STAHLKE-JUNIOR, H. J.; AGULHAM, M. A.; BACHLE, E.; CAMARGO, P. A. M.; PIMENTEL, S. K.; FREITAS, A. C. T. Efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v.21, p.49-54, 2006.

CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University, 1981.

CRUZ, G. L. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. 5.ed. Rio de Janeiro: Bertrand Russel, 1995.

DAVID, J. P. L.; NASCIMNETO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. *Infarma*, Brasília, v.16, n.9-10, p.71-76, 2004.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.29, p.617-622, 2005.

DEUTSCHES ARTZNEIBUCH 10. Govi-Deutscher Apotheker, Frankfurt. 1992.

DE SMET, P. A. G. M. Health risks of herbal remedies: na update. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, St. Louis, v.76, p.1-17, 2004.

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

DUARTE, M. R.; TOLEDOM M. G.; OLIVEIRA, R. L. B. Diagnose morfoanatômica de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). *Revista Visão Acadêmica*, Curitiba, v.7, n.2, p.05-13, 2007.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies? *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v.75, p.141-164, 2001.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 4. ed. France: EDQM, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Atheneu, 1 ed. 1926.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 5 ed. 2010

FALCÃO, H. S.; MARIATH, I. R.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants of the American continent with antiulcer activity. *Phytomedicine*, Munique, v.15, p.132-146, 2008.

FISCHER, D. C. H. Controle de qualidade de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos. In: GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. P. *Controle físico-químico de qualidade de medicamentos*. Campo Grande: Editora Uniderp, 2005.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, Boston, v.73, p.627-650, 1927.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *The Journal of Biological Chemistry*, v.12, p.239-243, 1912

FOLIN, O.; MACALLUM, A. B. On the blue color reaction of phosphotungstic acid with uric acid and other substances. *The Journal of Biological Chemistry*, Boston, v.12, p.265- 266, 1912.

FUNDAÇÃO ANDRÉ TOSELLO PESQUISA E TECNOLOGIA. Base de dados tropical-BDT. Disponível em :< <http://www.bdt.fdt.fat.org.br/iRead?23=flora.cerrado=410>>. Acesso em: 11 out. 2003.

GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORREA, C. B. V.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R. E TOMASSINI, T. *Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas*. Fitoterápicos. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br/publicações/padct/bio/cap10/Eloi.html>>. Acesso em: 12 fev. 2003.

GAULEJAC, S.-C.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.47, p.425-431, 1999.

GAZZANEO, L. R. S.; LUCENA, R. F. P.; ALBUQUERQUE, U. P. Knowledge and use Of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, Londres, v.1, p.1-11, 2005.

GIVEON, S. M.; LIBERMAN, N.; KLANG, S.; KAHAN, E. Are people who use “natural drugs” aware of their potentially harmful side effects and reporting to family physician? *Patient Education and Counseling*, Princeton, v.53, p.5- 11, 2004.

GLUFKE, C. *Espécies recomendadas para recuperação de áreas degradadas*. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 1999.

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

GUENDEZ, R.; KALLITHRAKA, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: correlation with antiradical activity. *Food Chemistry*, Reino Unido, v.89, p.1-9, 2005.

GUERRA, M. J. M.; BARREIRO, M. L.; RODRIGUES, Z. M.; RUBLACABA, Y. Actividad antimicrobiana de um extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Roddi (Copal). *Revista Cubana de Plantas Medicinas*, Havana, v.5, p.23-25, 2000.

HARVEY, I. M. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, Davis, v.91, p.3-20, 2001.

HASLAM, E.; LILLEY, T. H.; CAL, Y.; MARTIN, R.; MAGNOLATO, P. Traditional Herbal Medicines-The Role of Polyphenols. *Planta Medica*, Bélgica, v.55, p.1-8, 1989.

HILALY, J. E.; ISRAILI, Z.H.; LYOUSSE, B. 2004. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v.91, p.43-50, 2004.

International Conference on Harmonisation (ICH); *Validation of Analytical Procedures: text and Mehtodology*, Q2(R1), 2005.

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

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNI, C. L.; RESENDE M. A. Antifungal properties of plants used Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.38, n.4, p.632-637, 2007.

JOLY, A. B. 2002. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Companhia editora nacional. 13ª Edição. 2002.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. Sunderland: Sinauer Associates. 1999.

KASSEM, M. E. S.; EL-DESOKY, S. K.; SHARAF, M. Biphenyl esters and bioflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. *Chemistry of Natural Compounds*, New York, v.40, p.447–450, 2004.

KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds *Journal Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.50, p.2161-2168, 2002.

KOROLKOVAS, A. A riqueza potencial de nossa flora. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v.1, p.1-7, 1996.

KRÖKER, E. A. P. *Plantas medicinais, aromáticas e condimentares*. <http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/>. 2003. Acesso em dezembro de 2012.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. EE. G.; GENET, J. P.; MARQUES, B.; NEUVILLE L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v.105, p.137-147, 2006.

LIMA, L. B.; VASCONCELOS, C. F. B.; MARANHÃO, H. M. L.; LEITE, V. R.; FERREIRA, P. A.; ANDRADE, B. A.; ARAÚJO, E. L.; XAVIER, H. S.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v.126, n.3, p.468-473, 2009.

LLOYD, H. A.; JAOUNI, T. M.; EVANS, S. L.; MORTON, J. F. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, Reino Unido, v.16, p.1301–1302, 1977.

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

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2. ed. São Paulo: Editora Plantarum, v.1, 1998.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil*. 2ª Ed. São Paulo: Editora Plantarum, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Editora Plantarum, 2002.

LUCENA, P. L. H.; RIBAS-FILHO, J. M.; MAZZA, M.; CZECKO, N. G.; DIETZ, U. A.; CORREA-NETO, M. A.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J.; CESCHIN, A. P.; THIELE, E. Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. *Acta Cirurgica Brasileira*, São Paulo, v.21, p.44–49, 2006.

LUCK, G. H.; LIAO, N. J.; MURRAY, H. R.; GRIMMER, E. E.; WARMINSKI, M. P.; WILLIAMSON, T. H.; LILLEY, HASLAM E. *Phytochemistry*, v. 37, p. 327-71, 1994.

MARQUES, L. C. Vigilância de fitoterápicos - I: o caso da arnica. *Revista Brasileira Farmacognosia*, São Paulo, v.1, p.8-19, 1996.

MARTINEZ, M. J.; BARREIRO, M. L.; RODRIGUEZ, Z. M.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de um extrato fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Cuba, v.5, p.23–25, 2000.

MARTINEZ, M. J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, N.; JAUREGUI, A. Screening of Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v.52, p.171–174, 1996.

MARTINS, A. G. *Influência de fatores tecnológicos na avaliação analítica e farmacológica de extratos secos nebulizados de Maytenus ilicifolia Martius ex Reiss - Celastraceae (espinheira-santa)*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

MATOS, F. J. A. *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. 2.ed. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2002.

MEDEIROS, M. F. T.; FONSECA, V. S. D.; ANDREATA, R. H. P. Plantas medicinais e seus usos pelos sitiantes da Reserva Rio das Pedras. *Acta Botânica Brasilica*, Feira de Santana, v.18, n.2, p.391-399, 2004.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 6. ed. rev. ampl., Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis, UFSC, 2006.

MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORREA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 17, N° 1, p. 94-101, 2007.

MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P., ARAÚJO, E. de L., AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, São Paulo, v.28, p.892-896, 2005.

MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; AMORIM, E. L. C.; ARAUJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. *Revista Árvore*, Viçosa, v.29, n.6, p 999-1005, 2005.

MORAES, M. O.; BEZERRA, F. A. F.; LOTUFO, L. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A. Avaliação clínica da eficácia e segurança de fitoterápicos no Brasil. *Arq Bras Fitomed Cient*, v.1, p.30-39, 2004.

MORGAN, E.C.; OVERHOLT W. A. Potential allelopathic effects of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae) aqueous extract on germination and growth of selected Florida native plants. *Journal of the Torrey Botanical Society*, Florida v.132, n.1, p.11-15, 2005.

MORTON, J. Brazilian pepper – its impact on people, animals, and the environment. *Economic Botany*, v.32, p.353–359, 1978

MOURELLE, J. A. F.; CAO, M. C. F. L.; RODRÍGUEZ, F. M.; GUTIÉRREZ, Z. P. Actividad antiinflamatoria del *Schinus terebinthifolius* en ratas. *Revista Cubana de Farmacia*, Havana, v.27, p.139–144, 1993.

PHARMACOPÉE FRANÇAISE 10.ed. Paris: Adrapharm, 1980.

PIRES, O. C.; TAQUEMASA, A. V. C.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; ARAÚJO, C. E. P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL50) comparativa entre os frutos de pimenta-do-reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e pimenta do reino (*Piper nigrum* L.). *Latin American Journal of Pharmacy*, v.23, p.176–182, 2004.

QUEIRES, L. C.; FAUVEL-LAFETVE, F.; TERRY, S.; TAILLE, A.; KOUYOUMDJIAN, J. C.; CHOPIN, D. K.; VACHEROT, F.; RODRIGUES, L. E.; CREPIN, M. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius* Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. *Anticancer Res*, v. 26, N° 1A, p. 379-387, 2006.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v.39, p.603-613, 2001.

REITZ, R., KLEIN, R.M., REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Itajaí: SUDESUL. 1983.

RIGO, A., VIANELLO, F., CLEMENTI, G. Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.1996-2002, 2000.

SANCHOTENE, M. C. C. *Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana*. Porto Alegre: SAGRA, 1989.

SANGUINETTI, E. E. *Plantas que curam*. Porto Alegre: Rígel, 1989.

SANTOS, W. O.; ALVES, P. B.; SOUZA, K. R. Estudo comparativo dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas e frutos da aroeira-da-praia. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. 2000, Recife. *Anais...* Recife, Editora Universitária.

SANTOS, O. J.; RIBAS FILHO, J. M.; CZECHKO, N. G.; CASTELO BRANCO NETO, M. L.; NAUFEL JÚNIOR, C.; FERREIRA, L. M.; CAMPOS, R. P.; MOREIRA, H.; PORCIDES, R. D.; DOBROWOLSKI, S. Evaluation of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) extract on the healing process of gastroraphy in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.21, suppl.2, p 39-45, 2006.

SCALBERT, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. *Plant Polyphenols*. New York: Plenum Press, 1992.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C. S.; COSTA, S. S. Rastreio de agentes antifúngicos, utilizando precipitação com etanol e bioautografia de plantas medicinais e alimentares. *Journal of Ethnopharmacol*, Limerick, v.96, p. 563-568, 2005.

SCHOLZ, E. Pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxikologie. *Deutsche Apotheker Zeitung*. v. 134, p. 3167-70, 1994.

SHOJI, T.; MASUMOTO, S.; MORIICHI, N.; KANDA, T.; OHTAKE, Y. Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDITOF/MS. *Journal of Chromatography*, v.1102, p.206-213, 2006.

SIDDIQUI, R. R.; ZAFAR, U.; CHAUDHRY, S. S.; AHMAD, H. Antimicrobial activity of essential oils from *Schinus terebinthifolius*, *Cypress sempervirens*, *Citrus limon*, *Ferula assafoetida*. Part I. Pakistan Journal of Science and Industrial Research, v.38, p.358-361, 1995.

SILVA, M. C. C.; NAKAGAWA, J.; FIGLIOLIA, M. B. Influência da temperatura, da luz e do teor de água na germinação de sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi - Anacardiaceae (aroeira-vermelha). *Revista do Instituto Florestal*, São Paulo, v.13, p.135-146, 2001.

SILVA, A. B; SILVA, T.; FRANCO, E. S.; RABELO, A. S.; LIMA, E. R.; MOTA, R. A.; CÂMARA, C. A. G.; PONTES-FILHO, N. T.; LIMA-FILHO, J. V. Antibacterial activity, chemical composition and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.41, p.158-163, 2009.

SIMON, C.; BARATHIEU, K.; LAGUERRE, M.; SCHMITTER, J-M.; FOUQUET, E.; PIANET, I.; DUFOURC, E. J. Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach. *Biochemistry*, v.42, p.10385-10395, 2003.

SKOPP, G.; SCHWENKER, G. Bioflavonoid from *Schinus terebinthifolius*. *Zeitschrift fuer Naturforschung*, v. B41, p. 1479-1482, 1986.

SOARES, L. A. L. *Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de Maytenus ilicifolia Mart. Ex. Reissek. – Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final*. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

STAHL, E.; KELLER, K.; BLINN, C. Cardanol, a skin irritant in Pink Pepper. *Planta Medica*, v.48, p.5–9, 1983.

TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P.V. *Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha*. Curitiba: Serzegrat, 2001.

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

VERZA S. G. Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona. Mestrado (Dissertação em Ciências Farmacêuticas). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *Quality Control Methods for Medicinal Plants Materials*. WHO, Genebra, 1992.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A., 2004. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P., G. GOSMANN, J. C. P., MELLO, L. A., MENTZ, P. R., PETROVICK, E. D. S. (Orgs). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 5. ed, Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis, UFSC, 2004.