



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

FABÍOLA BERNARDO CARNEIRO

**TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
IMPRESSÕES DIGITAIS QUÍMICAS DA DROGA VEGETAL *Schinus terebinthifolius*
RADDI.**

Tese de Doutorado

Recife - PE

2017



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

**TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
IMPRESSÕES DIGITAIS QUÍMICAS DA DROGA VEGETAL *Schinus terebinthifolius*
RADDI.**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Coorientador: Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos

Recife - PE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- C289t Carneiro, Fabíola Bemardo.
Técnicas cromatográficas para caracterização e avaliação de impressões digitais químicas da droga vegetal *Schinus terebinthifolius raddi* / Fabíola Bemardo Carneiro. – 2017.
104 f.: il.; tab.; quad.; gráf.; 30 cm.
- Orientador: Luiz Alberto Lira Soares.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Anacardiaceae. 2. Análise química. 3. Cromatografia. 4. Teste de sensibilidade microbiana. I. Soares, Luiz Alberto Lira (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2017-174)

FABÍOLA BERNARDO CARNEIRO

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
IMPRESSÕES DIGITAIS DO DERIVADO DE DROGA VEGETAL *Schinus terebinthifolius*
RADDI.

Tese de Doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de
Pernambuco, em cumprimento às
exigências para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 27/04/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (Presidente da Banca)

Prof. Dra. Ivone Antônia de Souza (Membro interno)

Prof. Dra. Celidarque da Silva Dias (Membro externo)

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães (Membro externo)

Prof. Dr. Josué do Amaral Ramalho (Membro externo)

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos anos de trabalho que resultaram nesta tese, pessoas e instituições me ajudaram, ensinando e apoiando. Agora com o alcance deste objetivo não poderia deixar de reconhecê-las.

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não me deixar desanimar com as dificuldades.

Ao orientador desta tese Professor Doutor Luís Alberto de Lira Soares, pela oportunidade que me foi concedida, orientação, incentivo e apoio. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

Ao Coorientador Professor Doutor Sócrates Golzio por sua amizade, disponibilidade, apoio e incentivo na elaboração deste trabalho.

Ao professor Marcus Tullius pela orientação e incentivo que tornaram possível a realização deste trabalho.

A todos os professores da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos – NUDATEF da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, pela disponibilidade de sua estrutura física e técnica, contribuindo para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFPB) e Instituto De Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPEFARM - UFPB), pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

As minhas amigas Magda Assunção, Júlia Sousa, Wliana Viturino e Isabelle Ferraz pelo apoio, disponibilidade e logística em Recife. A experiência de uma produção compartilhada na comunhão com amigos foi uma das melhores experiências da minha formação acadêmica.

Aos amigos de turma de faculdade, que torceram por essa conquista e que se fazem presentes até hoje, mesmo com a distância.

Ao meu marido Pablo Queiroz. Agradeço por todo o seu amor, empenho e presença incansável com que tem me apoiado ao longo da nossa história.

Em especial, aos meus filhos Gabriela Carneiro Queiroz e Pablo Queiroz Lopes Filho que são minha maior realização.

Agradeço aos meus pais (Jairo e Janete) que sempre primaram pela educação, por todo esforço de vocês para minha formação pessoal e profissional.

Minha família que sempre foi fonte de apoio, alegria e descanso do trabalho. Agradeço a todos vocês e em especial as minhas irmãs Suênia, Isabelle e Morgana.

E finalmente gostaria de expressar toda minha gratidão e apreço a todos àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

“Nãõ temas; crê somente.”

Marcos 5:36.

RESUMO

No Brasil, o governo federal, através de diversos programas, tem investido na estratégia global para a medicina tradicional e a medicina complementar e alternativa reforçando o compromisso de estimular o desenvolvimento de políticas públicas a fim de inseri-las no sistema oficial de saúde. As iniciativas do Ministério da Saúde, em parceria com órgãos do governo e sociedade civil, visam viabilizar a utilização racional de plantas medicinais e fitoterápicos, tendo como linhas condutoras à preservação da biodiversidade, o desenvolvimento sustentável, a repartição de benefícios, além do benefício à população brasileira. A qualidade da matéria-prima vegetal tem um importante papel na obtenção de produtos fitoterápicos, já que esta apresenta como características a complexidade e a variabilidade da sua composição. A *Schinus terebinthifolius* Raddi é popularmente conhecida por aroeira pertence à família Anacardiaceae e apresenta atividades antiinflamatória, antidiarréica, diurética e antipirética. Neste trabalho a *Schinus terebinthifolius* Raddi, coletada em diferentes estados do nordeste brasileiro, foi caracterizada por métodos cromatográficos aplicados em um estudo de monitorização quantitativa dos extratos vegetais obtidos pelo processo de turbólise. A análise química mostrou que os exemplares estudados apresentaram compostos químicos majoritários distintos, α -pineno, limoneno, felandreno e careno, infere-se que, as variações obtidas possam estar relacionadas às condições ambientais, a diferença de solo, além da idade fisiológica das plantas. Estudo quimiométrico de análise de componentes principais (PCA) foi realizado para confirmar as semelhanças químicas entre as plantas coletadas. Os ensaios realizados por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas e tratados por PCA demonstraram que o grupo A formado pelos estados de RN, PB, SE, PE, AL, grupo B formado pelo estado do CE e o grupo C formado pelos estados de PI, MA, BA apresentaram respectivamente careno, felandreno e limoneno, como marcadores que influenciaram na formação dos grupos por similaridade, podendo-se afirmar que as plantas pertencentes ao mesmo grupo são semelhantes porque apresentam os mesmos metabólitos secundários. A Análise realizada por CCD-AE revelou a presença de ácido gálico e catequina confirmado por CLAE-DAD e foi útil na separação e identificação de taninos e flavonoides em folhas de *S. terebinthifolius*. Em função dos resultados encontrados pode-se concluir que os métodos empregados neste trabalho permitiram alcançar os objetivos propostos de caracterização qualitativa e quantitativa do extrato bruto de folhas de *S. terebinthifolius*. Para avaliar a atividade biológica dos extratos, sobre o crescimento das cepas de bactérias e de fungos, foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM) nas concentrações de 1024 $\mu\text{g/mL}$ a 32 $\mu\text{g/mL}$, os quais não produziram inibição nesta concentração, o que não quer dizer que a amostra vegetal não tenha atividade contra os micro-organismos testados em concentrações superiores a esta.

Palavras Chave: Anacardiaceae. Análise química. Cromatografia. Teste de sensibilidade microbiana

ABSTRACT

In Brazil, the federal government has invested in the global strategy for traditional medicine, complementary and alternative medicine through number programs, reinforcing the commitment to stimulate the development of public policies in order to introduce them into the official health system. The Ministry of Health initiatives, in partnership with government agencies and civil society, aim to enable the rational use of medicinal plants and phytotherapics, having as a guideline the preservation of biodiversity, sustainable development, health and economic benefits to the population. The quality of the vegetal raw material has an important role in the production of herbal products due to the complexity and variability of its composition. *Schinus terebinthifolius* Raddi is popularly known as aroeira belongs to family Anacardiaceae and has anti-inflammatory, antidiarrheal, diuretic and antipyretic activities. In the present work, *Schinus terebinthifolius* Raddi collected in different states of northeastern Brazil, was characterized by chromatographic methods and used in a quantitative monitoring study of the plant extracts obtained by the turbo extraction process. The chemical analysis showed that the studied specimens presented different chemical compounds, α -pinene, limonene, phellandrene and carene, it is inferred that, the variations obtained could be related to the environmental conditions, the soil differences, in addition to the physiological age of the plants. A major component analysis (PCA) was performed to confirm the chemical similarities between the collected plants. The tests performed by gas chromatography coupled to mass detector and treated by PCA, demonstrated that the group A formed by the strains collected on the states of RN, PB, SE, PE, AL, group B formed by the strains collected on the state of the EC and group C formed by the strains collected on the states of PI, MA, BA, presented carene, phellandrene and limonene as markers that influenced the formation of groups by similarity, and it is correct to say that plants belonging to the same group are similar because they have the same secondary metabolites. Analysis by high-performance thin-layer chromatography revealed the presence of gallic acid and catechin, which was confirmed by high performance liquid chromatography. Such techniques were useful in the separation and identification of tannins and flavonoids presents in the leaves of *S. terebinthifolius*. Based on the results, it can be concluded that the methods performed in this work made it possible for us to characterize the raw extracts of *S. terebinthifolius* leaves. In order to evaluate the biological activity of the extracts on the growth of bacterial and fungal strains, a minimum inhibitory concentration (MIC) test was performed at concentrations from 1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$ to 32 $\mu\text{g} / \text{mL}$. No inhibition was observed at these concentrations. The fact that there was no CIM does not mean that the plant sample has no activity. Concentrations higher than tested may exhibit antibacterial and fungicidal activity.

Keywords:Anacardiaceae. Chemical analysis. Chromatography. Microbial sensitivity tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Folhas e frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	25
Figura 2	Compostos isolados das folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	27
Figura 3	Microplaca para a avaliação da CIM.....	43
Figura 4	Determinação do perfil cromatográfico por CCD-AE de folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	48
Figura 5	Cromatogramas e espectros de varredura correspondentes ao ácido gálico e a catequina.....	50
Figura 6	Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD das amostras dos extratos de folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	51
Figura 7	Cromatogramas obtidos por CCD-AE (a) e CLAE-DAD (b).....	54
Figura 8	Perfis cromatográficos de amostras de <i>S. terebinthifolius</i> referentes a coletas realizadas nos estados.....	55
Figura 9	Gráfico de <i>scores</i> dos dados de GC-MS a partir de amostras de <i>S.terebinthifolius</i>	58
Figura10	Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 versus PC2) das amostras de <i>S terebinthifolius</i>	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Instrumentos normativos: resoluções, portarias e relatórios elaborados para fortalecer a fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS).....	23
Quadro 2	Locais de coleta das amostras de folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Áreas de pico de ácido gálico e catequina obtido por CLAE-DAD em amostras das folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	52
Tabela 2	Principais componentes identificados por GC-MS nas amostras de <i>S. terebinthifolius</i>	56
Tabela 3	Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima de extratos contra cepas de microorganismos.....	60
Tabela 4	Síntese de trabalhos publicados sobre concentração inibitória mínima com a droga vegetal <i>S. terebinthifolius</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIS	Ações integradas de saúde.
AL	Alagoas.
BA	Bahia.
BPF	Boas práticas de fabricação.
CCD-AE	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência.
CE	Ceará.
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
CIS	Comissão interinstitucionais de saúde.
CLAE-DAD	Cromatografia líquida acoplada a detector Fotodiodos.
CONAFIT	Subcomissão nacional de assessoramento em fitoterápicos.
DIC	Detector de ionização em chama.
IPA	Instituto de pesquisa agropecuária.
MA	Maranhão.
OMS	Organização Mundial da Saúde.
ONUDI	Organizações das nações unidas para o desenvolvimento industrial.
PB	Paraíba.
PC	Componentes principais.
PC1	Primeiro componente principal.
PC2	Segundo componente principal.
PCA	Análise de componentes principais.
PE	Pernambuco.
PI	Piauí.
RDC	Resolução da diretoria colegiada.
Rf	Fator de retenção.
RN	Rio Grande do Norte.
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao sistema único de saúde.
SE	Sergipe
SUDS	Sistema unificado e descentralizado de saúde.
SUS	Sistema único de saúde.
SVS	Secretaria de vigilância sanitária.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1 Inserção de Medicamentos Fitoterápicos no Sistema Único de Saúde	22
3.2 <i>Schinus terebinthifolius</i>: Aspectos Gerais, Atividades Biológicas e Composição Química	25
3.2.1 Aspectos Gerais.....	25
3.2.2 Composição Química.....	26
3.2.3 Atividades Biológicas.....	28
3.3 Métodos Cromatográficos	29
3.3.1 Cromatografia Gasosa em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE).....	30
3.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	31
3.3.3 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).....	32
3.4 Quimiometria	33
3.4.1 Análises Exploratórias.....	34
3.5 Investigação da Atividade Antimicrobiana de Droga Vegetal	35
4 MATERIAL E MÉTODO	38
4.1 Material Vegetal	38
4.2 Método de Preparo dos Extratos Brutos	38
4.2.1 Extração por Turbólise.....	38
4.2.2 Processamento dos Extratos.....	39
4.3 Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência	39
4.3.1 Preparação da Amostra.....	39
4.3.2 Condições Cromatográficas.....	39
4.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	40
4.4.1 Preparação de Amostra.....	40
4.4.2 Condições Cromatográficas.....	40
4.5 Análise por Cromatografia Gasosa	41
4.5.1 Preparação da amostra.....	41
4.5.2 Condições Cromatográficas.....	41
4.6 Análise Quimiométrica	41
4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana	42
4.7.1 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana dos extratos de folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	42
4.7.2 Microorganismos.....	42
4.7.3 Determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM).....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Coleta, tratamento e caracterização de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	46
5.2 Perfil químico obtido por cromatografia em camada delgada de classes metabólicas presentes nos extratos brutos de <i>S. terebinthifolius</i>	47
5.3 Perfil químico obtido por CLAE-DAD nos extratos brutos de <i>S. terebinthifolius</i>	50
5.4 Relação entre cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjo fotodiodo (CLAE-DAD)	53
5.5 Caracterização dos extratos das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas e análise quimiométrica	55
5.6 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em placas da atividade antimicrobiana dos extratos de folhas <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	60

6 CONCLUSÃO.....	64
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
APÊNDICES.....	83
APÊNDICE A. Cromatogramas obtidos por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CLAE) dos extratos de <i>S. terebinthifolius</i>	83
APÊNDICE B. Cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos de <i>S. terebinthifolius</i>	92
ANEXOS.....	102
ANEXO A. Artigo.....	102
ANEXO B. Ficha de identificação botânica dos materiais vegetais coletados na BA - Bahia (1), AL Alagoas (2), PI - Piauí (3), PB - Paraíba (4), MA - Maranhão (5), PE - Pernambuco (6), CE - Ceará(7), RN - Rio Grande do Norte (8) e SE - Sergipe (9).....	103

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as drogas vegetais são utilizadas no tratamento de diversas doenças. As plantas medicinais desempenham um papel fundamental na saúde mundial. Nas últimas décadas, apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, as plantas ainda tem importante contribuição nos cuidados de saúde. Este aumento do uso de medicamentos à base de plantas está relacionado a diversas razões, tais como, a ineficiência de medicamentos convencionais, o uso abusivo de drogas sintéticas resultando em efeitos secundários, o grande percentual da população mundial que não tem acesso a medicamentos convencionais, dentre outros (NIKAM *et al*, 2012). De acordo com uma estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial ainda usa ervas e outros medicamentos tradicionais para os cuidados primários de saúde. (WHO, 2011)

A garantia de segurança, qualidade e eficácia de plantas medicinais e produtos à base de plantas tornou-se uma questão importante na comercialização de plantas medicinais. As matérias-primas à base de plantas são propensas a uma grande variação devido fatores, como a variação sazonal, as variações genotípicas e quimiotípicas (KULKARNI *et al*, 2014).

Nos últimos anos a pesquisa de novas substâncias ativas de origem vegetal tem crescido expressivamente, o que é demonstrado pelo aumento do número de projetos de pesquisa em empresas privadas e organizações governamentais, como também pela crescente quantidade de publicações nas principais revistas científicas das áreas de farmacologia e química (CABRAL, 2010).

A matéria-prima vegetal é o recurso primário para a obtenção do produto final e sua qualidade é essencial no desenvolvimento e produção de fitoterápicos. A padronização de matéria-prima e dos processos tecnológicos envolvidos são ferramentas indispensáveis na busca pela preservação da integridade química e farmacológica da planta, avaliando a presença de sua ação biológica e a segurança de sua utilização, assim valorizando seu potencial terapêutico. (LIMA, 2015).

O controle de qualidade da matéria-prima vegetal verifica a presença de marcadores químicos, mas não garante a identificação do material vegetal que pode ter sido enriquecido com marcadores e, dependendo da técnica, não é possível identificar a presença de outros vegetais contaminantes presentes. Desta forma a maneira mais segura de analisar materiais vegetais é através do perfil cromatográfico (LEÃO, 2010).

De acordo com Sales (2013), a parte da planta utilizada e a presença de determinados metabólitos secundários são as principais características morfo-histológicas e químicas da espécie

Schinus terebinthifolius, relacionadas ao seu reconhecimento laboratorial como droga. Conforme Farmacopeia Brasileira a casca é a parte do material vegetal a ser utilizado, porém estudos realizados por Salvi Júnior (2013) demonstraram que além das cascas, as folhas também podem ser utilizadas como fonte de constituintes farmacologicamente ativos.

A *S. terebinthifolius* apresenta composição química predominante de monoterpenos (85,1%), sendo os mais abundantes δ -3-careno (30,37%), limoneno (17,44%), α -felandreno (12,60%), α -pineno (12,59%), mirceno (5,82%) e *o*-cimeno (3,46%), seguido pelos sesquiterpenos (5,34%) trans-cariofileno, *Y*-muruleno, δ -cadineno e epi- α -cadinol (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Na folha foram identificadas substâncias responsáveis pela atividade antioxidante, e a presença de derivados fenólicos, tais como os galatos de metila e etila, além de flavonoides miricetina, miricetrina e quercitrina (SANTANA *et al.*, 2012).

As propriedades da espécie *S. terebinthifolius* despertaram o interesse terapêutico em virtude de sua amplitude de atividades farmacológicas assim sendo incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), cuja lista apresenta plantas medicinais com potencial para gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), e tem por objetivo orientar estudos que possam subsidiar a elaboração de produtos para uso da população, com eficácia e segurança (BOCHNER, 2012).

Como ferramenta indispensável na análise de matérias-primas vegetais, a cromatografia é uma técnica muito utilizada na separação de componentes presentes em matrizes complexas, como nos produtos vegetais. Através desta técnica é possível realizar análises de quantificação e identificação de constituintes químicos obtendo-se resultados eficazes, seguros e rápidos (RABELO *et al.*, 2013).

O cromatograma apresenta um perfil químico detalhado das matérias-primas vegetais e produtos derivados. Ainda que a concentração dos compostos não seja exatamente a mesma em diferentes amostras de uma mesma droga vegetal, a identificação de produtos multicompostos de uso na medicina tradicional pode ser feita com precisão. Deste modo, o perfil obtido pode ser fundamental para confirmar a integridade de tais produtos (BEZERRA *et al.*, 2012).

Neste contexto, a cromatografia é uma técnica muito utilizada na separação de componentes presentes em matrizes complexas, como nos produtos vegetais. Através desta técnica, que pode ser hifenada, é possível realizar análises de quantificação e identificação de constituintes químicos obtendo-se resultados altamente eficazes, seguros e rápidos (SOUZA *et al.*, 2011).

Deste modo, a utilização de técnicas analíticas cromatográficas para avaliar a constância e a uniformidade na composição de metabólitos secundários garante a padronização do material vegetal no preparo de fitoterápicos em escala industrial, podendo auxiliar no reconhecimento e na

compreensão dessas variações, ampliando os conhecimentos sobre interações ecológicas do vegetal com seu ambiente (CARVALHO, 2011).

Neste contexto, as técnicas de análises estatísticas quimiométricas, através de métodos matemáticos de reconhecimento de padrões como Análise de Componentes Principais (PCA) e outros métodos de análise multivariada favorecem a visualização de toda a informação contida nas impressões digitais químicas. O PCA é utilizado para analisar qualitativamente as amostras, reduzindo o número de variáveis e a dimensionalidade dos dados. O gráfico de *scores* de PCA é um mapa das observações que mostra a possível presença de quaisquer valores extremos nos dados (ALAERTSA *et al.*, 2014, POMERANTSEV E RODIONOVA, 2014).

Neste trabalho a investigação do grau de similaridade de plantas coletadas em diferentes estados do nordeste do Brasil através da análise dos extratos de droga vegetal obtidos de folhas de *S. terebinthifolius*, foi caracterizada por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE), cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). Por fim, foram avaliadas as atividades antimicrobianas dos extratos da referida espécie vegetal.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter impressões digitais cromatográficas do extrato de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi coletadas nos estados da região nordeste utilizando técnicas cromatográficas em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE), cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo fotodiodos (CLAE-DAD) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM/FID).

2.2 Objetivos Específicos

- Coletar, processar e caracterizar as folhas de *S. terebinthifolius*;
- Estabelecer perfis cromatográficos para folhas de *S. terebinthifolius* obtidos por CCD-AE, CLAE-DAD e CG-EM/FID;
- Empregar ferramenta quimiométrica de análise de componentes principais (PCA), nos dados cromatográficos obtidos por CG-EM dos extratos de *S. terebinthifolius*, para investigar correlação entre os dados;
- Avaliar atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de folhas de *S. terebinthifolius* utilizando a técnica de microdiluição em placas.

REFERENCIAL TEÓRICO

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Inserção de Medicamentos Fitoterápicos no Sistema Único de Saúde

Até a primeira metade do século XX, o Brasil era essencialmente rural e usava amplamente a flora medicinal, tanto nativa quanto introduzida. Hoje, a medicina popular do país é reflexo das uniões étnicas entre os diferentes imigrantes e os inúmeros povos nativos que difundiram o conhecimento das ervas locais e de seus usos, transmitidos e aprimorados de geração em geração (ANTÔNIO *et al.*, 2013).

Em 1978 a organização mundial de saúde (OMS) passa a reconhecer o uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico e recomenda a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso. Reconhecendo que as plantas medicinais como importantes instrumentos da Assistência Farmacêutica, vários comunicados e resoluções da OMS expressam a posição do organismo a respeito da necessidade de valorizar o uso desses medicamentos, no âmbito sanitário (TSCHUMI, 2015).

A OMS reforçou o compromisso de estimular o desenvolvimento de políticas públicas a fim de inserir a medicina tradicional e a medicina complementar e alternativa no sistema oficial de saúde. Em 2005, a OMS publicou a Política Nacional de Medicina Tradicional e Regulamentação de Medicamentos Fitoterápicos, em que discute a situação mundial a respeito das políticas de medicina tradicional e fitoterápicos, inclusive o Brasil. A inserção do Brasil procede por ser um país com a maior diversidade genética vegetal do mundo e, também, por possuir grande tradição do uso das plantas medicinais, vinculada ao conhecimento popular, transmitido oralmente por gerações (FERREIRA *et al.*, 2013).

A validação do trabalho e das propriedades medicinais, baseado na análise das formas de conhecimento empírico e científico, possibilitando o uso adequado das plantas medicinais quer diretamente pelo usuário ou pela aplicação da tecnologia adequada a sua transformação em produtos fitoterápicos, objetivando atender às recomendações da OMS. (DOS SANTOS, 2016)

Atinente aos interesses popular e institucional, o aumento da capacitação, nas universidades e nos centros de pesquisa crescem para fortalecer a fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), uma vez que, após a década de 1980, diversos instrumentos normativos como resoluções, portarias e relatórios foram elaborados, conforme citados no quadro 1.

Quadro 1 - Instrumentos normativos: resoluções, portarias e relatórios elaborados para fortalecer a fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS).

Portaria n. ° 212, de 11 de setembro de 1981, do Ministério da Saúde.	Em seu item 2.4.3, define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica.
Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos do Ministério da Saúde (1982).	Objetivou o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico no valor farmacológico de preparações de uso popular, à base de plantas medicinais.
Relatório Final da 8ª Conferência Nacional de Saúde, realizada em 1986.	Item 2.3a, refere: “introdução de práticas alternativas de assistência à saúde no âmbito dos serviços de saúde, possibilitando ao usuário o acesso democrático de escolher a terapêutica preferida” (CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 1986).
Resolução 40.33/1987 da 40ª Assembléia Mundial de Saúde.	Recomendou aos Estados-membros: 1) Iniciar programas amplos, relativos à identificação, avaliação, preparo, cultivo e conservação de plantas usadas em medicina tradicional; 2) Assegurar a qualidade das drogas derivadas de medicamentos tradicionais extraídas de plantas, pelo uso de técnicas modernas e aplicações de padrões apropriados e de boas práticas de fabricação (BPF).
A Organização das Nações Unidas para o Desenvolvimento Industrial (ONUDI), em Madri-Espanha, 1987.	Entre as recomendações, propõe: “incluir a utilização de medicamentos fitoterápicos no Sistema Nacional de Assistência à Saúde, assim como educação e capacitação em saúde, em nível nacional”.
Resolução CIPLAN Nº 08, de 08 de março de 1988.	Resolve: 1. Implantar a prática de Fitoterapia nos serviços de saúde, assim como orientar, através das Comissões Interinstitucionais de saúde (CIS), buscarem a inclusão da Fitoterapia nas Ações Integradas de Saúde (AIS), e/ou programação do Sistema Unificado e Descentralizado de saúde (SUDS) nas Unidades Federadas, visando colaborar com a prática oficial da medicina moderna, em caráter complementar. 2. Criar procedimentos e rotinas relativas à prática da Fitoterapia nas Unidades Assistenciais Médicas (BRASIL, 1988b).

Parecer n.º 04/92 do Conselho Federal de Medicina, aprovado em 17 de janeiro de 1992.	Reconhece a fitoterapia como método terapêutico.
Portaria n.º 31/SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária, de 06 de abril de 1994.	Cria o grupo de estudos de produtos fitoterápicos.
Portaria n.º 06/SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária, de 31 de janeiro de 1995.	Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária.
Relatório final da 10ª Conferência Nacional de Saúde (CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 1996).	Item 80.2: “os gestores do SUS devem estimular e ampliar pesquisas realizadas em parceria com Universidades Públicas”; Item 286.12: “incorporar ao SUS, em todo o país, as práticas de saúde como a fitoterapia, acupuntura e homeopatia, contemplando as terapias alternativas e práticas populares”; Item 351.10: o ministério da saúde deve incentivar a fitoterapia na assistência farmacêutica pública e elaborar normas para sua utilização.
Portaria n.º 665 de 1998, do Ministério da Saúde.	Cria a Subcomissão Nacional de Assessoramento em Fitoterápicos (CONAFIT) que teve como atribuição: (1) Assessorar a Secretaria de Vigilância Sanitária – SVS, nos assuntos científicos, técnicos e normativos envolvidos na apreciação da eficácia e segurança do uso de produtos fitoterápicos; (2) Manifestar-se sobre questões relacionadas à farmacovigilância e ao desenvolvimento de pesquisas clínicas na área de fitoterápicos; (3) Subsidiar a SVS na realização de eventos técnico-científicos, de interesse dos trabalhos da Comissão e que concorram para a ampla divulgação de conhecimentos e informações pertinentes ao controle sanitário desses agentes (BRASIL, 1998d).
Resolução da Diretoria Colegiada, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC/ANVISA) nº 17 de 2000.	Atualiza a regulamentação de registro de medicamentos fitoterápicos e define o medicamento fitoterápico tradicional.
Portaria n.º 254 de 2002, do Ministério da Saúde.	Aprova a Política Nacional de Atenção à Saúde dos Povos Indígenas. Item 4.5: “...a assistência farmacêutica devem também compor as práticas de saúde tradicionais dos povos indígenas”. (BRASIL, 2002a, item 4.5).
Resolução da ANVISA (RE/ANVISA) nº 90 de 2004.	Dispõe sobre o guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos.
Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA (RDC/ANVISA) nº 26 de 2014.	Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.

Fonte: A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos.

Entre as ações do Ministério da Saúde, em parceria com órgãos governamentais e não governamentais, têm-se a Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos (2006) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (2006) que objetiva ampliar as opções terapêuticas aos usuários do SUS, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde. (BRASIL, 2006)

Do acima exposto, pode-se ter a dimensão das iniciativas do Ministério da Saúde, em parceria com órgãos do governo e sociedade civil, para viabilizar a utilização racional de plantas medicinais e fitoterápicos, tendo como linhas condutoras à preservação da biodiversidade, o desenvolvimento sustentável, a repartição de benefícios, além do benefício à população brasileira.

3.2 *Schinus terebinthifolius*: Aspectos Gerais, Atividades Biológicas e Composição Química

3.2.1 Aspectos Gerais

Schinus terebinthifolius Raddi (Figura 1), pertencente à família Anacardiaceae, é popularmente chamada de aroeira, aroeira-da-praia, aroeira-vermelha, aroeira-mansa, aroeira-precoce, aroeira-pimenteira, aroeira-do-brejo, aroeira-negra, aroeira-branca, aroeira-do-campo, aroeira-do-sertão, aroeira-do-paraná, entre outros (LORENZI, 2002).

Figura 1 - Folhas e frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.



Fonte: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1298
Acesso em: 27 de março de 2016.

É originária da América do Sul, nativa do Brasil, Paraguai, Uruguai e leste da Argentina (LORENZI, 2002). É largamente distribuída por todo território brasileiro, estendendo-se desde Pernambuco até Rio Grande do Sul e pode ser encontrada na Europa, onde a cultivam como espécie ornamental, América Central e Sul dos Estados Unidos, principalmente na Flórida (CORRÊIA, 1984; FLEIG, 1989).

A *S. terebinthifolius* é uma árvore de crescimento rápido com porte pequeno, podendo atingir de 5 a 10 metros na idade adulta e, apresentar de 30 a 60cm de espessura de diâmetro do caule. A sua propagação pode ser através de sementes ou por estaquia a partir da raiz e do caule (LORENZI, 2002).

Essa árvore apresenta folhas perenes, verde-escuras, compostas, oblongas a elípticas, na parte superior do limbo contendo nervuras pronunciadas do tipo imparipenada de aroma forte. As suas flores melíferas apresentam cor amarelo-pálido a branco, são pequenas e agrupadas em panículas. O período de florescimento ocorre nos meses de setembro a janeiro (ALMEIDA, 2005).

Sua raiz é pivotante, bastante desenvolvida, favorecendo sua sobrevivência a ambientes adversos (BAGGIO, 1988). Os frutos são numerosos, pequenos, em forma de drupa, constituídos por uma casca esverdeada no início passando a vermelho-brilhante quando maduros (MACHADO e GUERREIRO, 2001; ALMEIDA, 2005). O fruto apresenta uma única semente de cor marrom-escuro envolvida por uma secreção pegajosa, medindo aproximadamente 0,3mm de diâmetro. A frutificação predomina durante os meses de janeiro a julho (LORENZI, 2002).

3.2.2 Composição Química

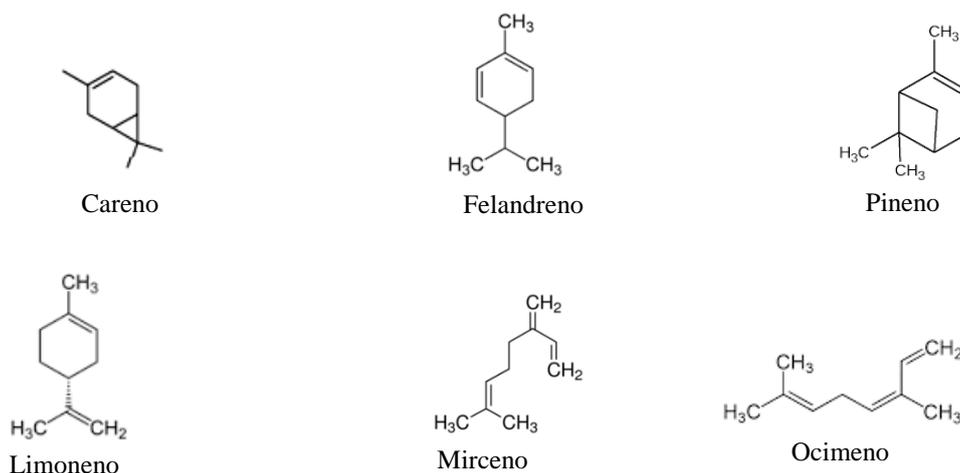
A *S. terebinthifolius* apresenta uma gama de substâncias em sua composição, como os compostos: terebinthona, o ácido hidroximasticadienóico, o ácido terebinthifólico e o ácido ursólico (LIPINSKI *et al.*, 2012).

Além destas substâncias, a espécie evidencia, entre outros constituintes, taninos, flavonóides e óleos essenciais. De todos os resultados da metabolização de compostos sintetizados pela planta, fazem parte do grupo de substâncias com maior número de compostos biologicamente ativos, os alcalóides e os óleos essenciais. Estes últimos atuam como inibidores da germinação, na proteção contra perda de água e aumento da temperatura, na proteção contra predadores e na atração de polinizadores (SANTOS *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais da *S. terebinthifolius* apresentaram destaque na presença de monoterpenos (85,81%), apresentando como constituição principal: careno (30,37%), limoneno (17,44%), felandreno (12,60%), pineno (12,59%), mirceno (5,82%) eocimeno (3,46%);

sesquiterpenos se mostraram em menor proporção (5,34%). Ainda quanto ao extrato, este contém em sua resina resquícios de óleos voláteis, os quais ainda têm em sua composição o carvacrol (COLE *et al*, 2014). Alguns compostos isolados das folhas de *S. terebinthifolius* estão citados na Figura 2.

Figura 2 - Compostos isolados das folhas de *S. terebinthifolius*



Estudos fitoquímicos e biológicos realizados em *S. terebinthifolius* descreveram a ocorrência de terpenóides e ácidos graxos também em sua constituição. Entre os terpenóides, dois triterpenos separados da Aroeira foram caracterizados como inibidores específicos da fosfolipase A2. Estudos citam ainda que o extrato etanólico possui acetato de galato, quercitrina, gaiato de metilo e miricetina responsáveis, possivelmente, pela ação contra radicais livres. Na medicina popular, tem sido utilizada como um tratamento para as infecções respiratórias e desordens digestivas, tais como gastrite, atonia gástrica e diarreia (ESTEVÃO *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2013).

Cerusk e colaboradores (2007) identificaram nas folhas quercitrina e miricetina, miricetrina, galato de etila e galato de metila. Também foram identificadas por Carvalher-Machado e colaboradores (2008), galato de metila e ácido gálico. As folhas são ricas em taninos e óleos essenciais (JORGE & MARKMANN, 1996). Santana e colaboradores (2012) isolaram cinco compostos das folhas dessa espécie: ácido gálico, galato de etila, galato de metila, trans catequina e quercitrina.

3.2.3 Atividades Biológicas

A literatura etnobotânica relata o uso das cascas, com base na tradição popular, na forma de cozimento (decocto), especialmente pelas mulheres, durante vários dias, em banhos de assento após o parto como anti-inflamatório e cicatrizante, ou como medicação caseira para o tratamento de doenças do sistema urinário e do aparelho respiratório, bem como nos casos de hemoptise e hemorragia uterina. As folhas e os frutos são adicionados à água de lavagem de feridas e úlceras (LORENZI E MATOS, 2008).

Santos e colaboradores (2009) realizaram um estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas para problemas bucais na cidade de João Pessoa-PB, e relataram indicação popular da ingestão do infuso de *S. terebinthifolius* para casos de inflamação bucal. Também foi relatado seu uso como cicatrizes de feridas e em inflamações (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). Em um estudo realizado por Albertasse e colaboradores (2010), o xarope e o banho de assento das folhas e cascas da espécie foram descritos para uso em úlcera e tosse, e como cicatrizante, respectivamente. O chá das cascas e as folhas da espécie são usados para lavar feridas e, também, para gripes, dor de dente, ferida na boca, dor de garganta, asma, febre e doenças femininas (BOSCOLO, 2007; MOURA-COSTA, 2012).

As partes utilizadas de *S. terebinthifolius* que apresentam propriedades medicinais são: casca, folhas e frutos. As folhas secas esmagadas são aplicadas como antisséptico sobre úlceras cutâneas. Utilizam-se infusões de folhas para doenças respiratórias e a resina das raízes é popularmente considerada eficaz no tratamento de tumores ganglionares (BARBOSA *et al.*, 2007).

Além disso, a *S. terebinthifolius* possui propriedades medicinais, onde são utilizadas folhas, cascas e frutos para atividades antiinflamatórias, antidiarreica, diuréticos e antipiréticos. Por essa razão, os seus diferentes órgãos são utilizados com fins terapêuticos, nos tratamentos contra febre, lesões e úlceras de pele e mucosas e inflamação do útero, sistema digestivo (gastrite, atonia gástrica, diarreia) e sistema urinário. Da sua casca é extraído o óleo, o qual é empregado contra tumores e doenças da córnea (MARTÍNEZ, *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 2004; DEGÁSPARI, *et al.*, 2005); além do mais, pode combater até inflamações de artrite reumatoide, asma (SCALON *et al.*, 2006) e também doenças venéreas (MARTÍNEZ, *et al.*, 1996). Para obter atividade antisséptica, dissolve-se em álcool a resina retirada do cerne da madeira. As folhas da aroeira quando mascadas, têm a função de clareamento dos dentes. As cascas dos ramos da árvore quando postas em infusão são utilizadas para curtir o couro e, quando passado em redes de pesca e velas, promove o fortalecimento das mesmas, devido à presença de taninos para conter os excessivos ataques dos peixes à rede (LORENZI E MATOS, 2002; RIZZINI, 1995; DEGÁSPARI, 2004; KRUEL e PEIXOTO, 2004).

Os extratos de *S. terebinthifolius* apresentaram atividade antiinflamatória (HERINGER, 2009; BERNARDES, 2010), cicatrizante (LORENZI E MATOS, 2008), antioxidante (BENDAOU *et al.*, 2010; BOSCOLO *et al.*, 2007; EL-MASSRRY *et al.*, 2009) e antimicrobiana (TONIAL, 2010; EL-MASSRRY *et al.*, 2009; JOHANN *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 1996; MONTANARI *et al.*, 2011). Em relação à toxicidade, os extratos não foram tóxicos em estudos agudos (JORGE *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2010; SHARABY *et al.*, 2009; SANTOS, 2010; MAHMOUD *et al.*, 2011; GARREC *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2011; MESQUITA, 2009) e subcrônicos (AFFONSO, 2009; SILVA *et al.*, 2010; PIRES *et al.*, 2004; MATSUO *et al.*, 2001). Também não apresentaram efeito genotóxico (JORGE *et al.*, 2012; RUIZ *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 2003; VARELA-BARCA *et al.*, 2007).

Os estudos clínicos demonstraram tolerabilidade ao extrato, de *S. terebinthifolius*, em contato com a pele (SOARES *et al.*, 2010), efeito no tratamento de vaginose bacteriana (AMORIM E SANTOS, 2003), lesões benignas no útero (SILVA *et al.*, 2004), gastrite (SANTOS *et al.*, 2010) e úlceras pépticas tipo II no palato (CARLINI *et al.*, 2010).

3.3 Métodos Cromatográficos

Para autenticar uma amostra e diferenciá-la das suas espécies estreitamente relacionadas, é recomendado, por farmacopeias e monografias, comparar as suas características macroscópicas, microscópicas e químicas com uma amostra de referência autenticada. Os estudos macroscópicos e microscópicos requerem uma preparação tediosa da amostra e são relativamente não específicos. Consequentemente, esta abordagem fornece informações muito limitadas sobre os aspectos qualitativos e quantitativos das ervas (GAD *et al.*, 2013).

A impressão digital química reflete a presença de múltiplos constituintes químicos. Isto é importante, uma vez que todos os produtos químicos podem contribuir para a qualidade, segurança e eficácia de uma planta medicinal, uma vez que os efeitos terapêuticos se baseiam nas interações aditivas e/ou sinérgicas de numerosos componentes (TISTAERT *et al.*, 2011).

O avanço tecnológico de técnicas analíticas tem apresentado um papel importante na elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com altos níveis de sensibilidade e seletividade, possibilitando o estudo do extrato vegetal bruto, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento. Assim, estratégias de triagem química têm sido desenvolvidas através do uso de técnicas cromatográficas (RODRIGUES *et al.*, 2006).

O emprego de técnicas cromatográficas e analíticas que permitam a separação e o isolamento de substâncias de um extrativo vegetal mostra-se necessário tanto para o conhecimento

da composição química, do princípio ativo e/ou do composto tóxico de uma planta, como também para a determinação de uma substância, ou grupo de substâncias, que sirva como marcadora daquela espécie, para controle qualitativo e quantitativo da droga, propiciando a padronização do material vegetal e produtos relacionados (DRASARA & MORAVCOVA, 2004; FAMEI *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007).

A cromatografia consiste em um método físico-químico de separação dos componentes de uma amostra, que são distribuídos em duas fases em contato íntimo uma estacionária e outra móvel. A fase móvel carrega o analito pela fase estacionária, e durante essa passagem os componentes da mistura são distribuídos de forma que cada composto é seletivamente retido pela fase estacionária. As diferentes modalidades de técnicas cromatográficas podem ser classificadas segundo critérios relacionados ao mecanismo de separação envolvido, aos diferentes tipos de fases utilizadas e a técnica empregada (COLLINS, 2006).

As impressões digitais químicas obtidas por técnicas cromatográficas são fortemente recomendadas para o controle de qualidade de medicamentos à base de plantas, uma vez que podem representar adequadamente as integridades químicas dos medicamentos à base de plantas e dos seus produtos (LIANG *et al.*, 2004).

3.3.1 Cromatografia Gasosa em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE)

A cromatografia planar iniciou-se com os “desenhos” que F.F. Runge desenvolveu em papel, na metade do século dezenove. A cromatografia em papel foi redescoberta por A. J. P. Martin e colaboradores na metade do século vinte (COLLINS, 2009). Mas, as restrições da cromatografia em papel, relacionadas às limitações nos tipos de fase estacionária e às dificuldades em se ter repetibilidade entre as corridas, impulsionaram o desenvolvimento de outra técnica planar, a da cromatografia em camada delgada (CCD) (COLLINS, 2010).

A cromatografia em camada delgada baseia-se principalmente em passos críticos manuais: é um sistema aberto, dependente de fatores ambientais (temperatura, luz, umidade), que podem influenciar nos dados resultantes; além disso, os resultados não podem ser totalmente controlados e as análises não são totalmente reproduzíveis. Em outras palavras, os dados podem não ser cientificamente confiáveis (NICOLLETI, 2011)

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE) - a CCD do século 21 - é a última evolução da cromatografia planar. Na moderna CCD-AE, a placa é a ferramenta central de um complexo sistema de instrumentação automática desenvolvido para controlar condições de análise, para otimizar resultados reproduzíveis. Sendo um processo de vários passos, o

desempenharequer dispositivos separados para cada etapa da sequência: aplicação de amostra, desenvolvimento de cromatograma, derivatização, visualização e documentação. O pleno poder da CCD-AE vem do uso adequado, compatível e complementar, de cada dispositivo em um sistema integrado (REICH & SCHIBLI, 2007).

Para esse fim, foram desenvolvidos sistemas que permitiram a aplicação mecânica das amostras em volumes controlados, e a secagem das manchas por um fluxo de gás, às vezes acompanhada por um leve aquecimento do fundo da placa horizontal (BRANDT, 1972).

Assim a análise de impressão digital por CCD-AE tornou-se uma ferramenta eficaz e importante para conectar o perfil dos constituintes químicos das plantas com a identidade botânica desta, e para a estimativa de marcadores químicos e bioquímicos (MANIKANDAN & AROKIA, 2010; RAMYA *et al.*, 2010).

3.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido reconhecida desde o início da década de 1980 como a técnica mais versátil para análise de extratos brutos sem necessidade de preparação complexa de amostras. Ao longo dos anos, a técnica tem se aperfeiçoado em termos de velocidade de análise, tipos de fases estacionárias empregadas, detectabilidade, aplicabilidade a uma variedade de amostras, além da capacidade de hifenação com detectores espectrométricos. Colunas com diferentes fases vêm permitindo uma melhor separação de compostos e o desenvolvimento mais recente inclui o emprego de colunas estáveis em uma maior faixa de pH, contendo partículas com tamanho menores que 5 μm (WU *et al.*, 2013; WOLFENDER, 2009).

As propriedades químicas do material de enchimento e as propriedades da coluna necessitam ser levadas em consideração. Muitas vezes, o uso de pH elevado é necessário a fim de se evitar, por exemplo, a co eluição de picos ou o aparecimento de picos assimétricos (WU *et al.*, 2013).

A detecção de matriz de fotodiodos (DAD) fornece espectros UV e é útil para a detecção de produtos naturais com cromóforos característicos. Por exemplo, os polifenóis podem ser eficientemente localizados por este método porque possuem cromóforos característicos. A técnica também tem sido aplicada com sucesso para a caracterização de compostos fenólicos (ROBBINS, 2003), policetídeos, alcaloides, terpenoides (LARSEN TO & HANSEN MAE, 2008) e flavonóides WOLFENDER *et al.*, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector fotodiodo (CLAE-DAD) é uma boa solução para a determinação química, qualitativa e quantitativa, de compostos de elevado peso

molecular e instáveis termicamente. Por CLAE-DAD podem ser analisados inúmeros compostos, entre os quais, amostras ambientais (pesticidas, etc), amostras alimentares (vitaminas, compostos fenólicos, etc), compostos farmacêuticos (drogas de abuso, antibióticos e etc.)(JOHNSON & ARTHANARISWARANC, 2013).

3.3.3 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

O espectrômetro de massas (EM) é um instrumento que mede a relação massa/carga (m/z) de íons na fase gasosa e a abundância de cada espécie iônica. O espectrômetro de massas se constitui em uma técnica importante em virtude de sua sensibilidade extremamente elevada onde um espectro de massas completo pode ser obtido com alguns poucos nanogramas de material e íons selecionados podem ser obtidos com poucos picogramas (VESSECCHI *et al.*, 2011).

Desde 1952, quando foi introduzida por James e Martin, a cromatografia com fase gasosa foi o método de separação destinado quase que exclusivamente, a substâncias voláteis, termo resistentes e de peso molecular baixo. Com o tempo, algumas classes de substâncias sem estas características também puderam vir a ser analisadas pela cromatografia gasosa, bastando analisá-las em suas formas derivadas, por serem mais estáveis e voláteis que em seu estado original (DE ALSINA *et al.*, 2007).

A cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM) é, entre os métodos espectrométricos, uma excelente técnica, permitindo não só a identificação como a caracterização das substâncias.

Os espectrômetros de massas de baixa e alta resolução são os dispositivos de detecção universal para a cromatografia gasosa. Eles podem operar com ionização por impacto de elétrons ou com ionização química e nos modos varredura –“*full scan*”- para a identificação de substâncias desconhecidas e monitoração de íons para quantificação de uma determinada substância. A maioria dos aparelhos CG/EM já conta com estas duas técnicas de ionização. Estes equipamentos podem ser encontrados com analisadores do tipo “*ion trap*” setor magnético ou quadrupolo. Os limites de detecção variam de 1 ng a 100 pg para EM com quadrupolo e na faixa de 10-100 pg para os EM com “*ion trap*” no modo varredura até a níveis bastante pequenos em pg no modo monitoração de íon (PANCHÚ, 2007).

A cromatografia gasosa é uma técnica que possui alto poder de separação e resolução, o que torna possível a análise de dezenas de compostos de uma mesma amostra. Estas vantagens são extremamente úteis quando combinadas com a espectrometria de massas para a identificação dos analitos em estudo. Os detectores de ionização em chama (DIC) e a espectrometria de massas são

as técnicas mais comuns empregadas em paralelo para quantificação e identificação, respectivamente (DEMEESTERE *et al.*, 2008).

O método de cromatografia gasosa torna mais precisa a identificação de compostos voláteis, permite a quantificação e a verificação de mudanças na composição do óleo essencial, que podem ser causadas por oxidação, ação de enzimas ou fermentação microbiana, levando a compostos sem atividades ou tóxicos (LIANG *et al.*, 2004).

3.4 Quimiometria

A análise de dados multivariados tem se tornado, de modo crescente, uma importante área da química e de outras ciências. Isto sugere que a tendência atual do pensamento científico envolve um raciocínio multivariado, principalmente devido ao desenvolvimento tecnológico atingido neste último século (SABIN *et al.*, 2004).

A definição de quimiometria, mais comumente conhecida, diz que é uma disciplina química que utiliza método matemático estatístico para planejar e selecionar condições ótimas de medidas e experimentos, e extrair o máximo de informações de dados químicos. A disciplina surgiu devido à automação dos laboratórios com o aumento significativo no número de instrumentos analíticos que fornecem dados multivariados (SOUZA *et al.*, 2013).

A quimiometria envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse químico, sendo atualmente considerada como uma disciplina da química e inserida na grade curricular de diversos cursos de graduação e de pós-graduação em universidades brasileiras (BRERETON, 2007).

A aplicação de métodos matemáticos a um conjunto de dados de natureza multivariado, permite uma simplificação do mesmo no sentido de comprimir o espaço dimensional a que este está confinado, possibilitando dessa forma uma melhor interpretação e visualização. Os métodos quimiométricos podem ser aplicados em dados multivariados com os propósitos qualitativos (análise exploratória e reconhecimento de padrões) e quantitativos (calibração) (PARREIRA, 2003).

Os métodos de análise multivariada normalmente utilizados na quimiometria incluem a análise dos componentes principais (PCA), dentre outros, que permitem a extração de conhecimento útil a partir dos dados brutos, incluindo a identificação dos metabólitos nas amostras, os metabólitos cuja concentração variam mais significativamente entre grupos de amostras, o agrupamento de amostras e/ou metabólitos por similaridade (NASCIMENTO, 2016).

3.4.1 Análises Exploratórias

A Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis, PCA) é provavelmente o método quimiométrico mais amplamente difundido, e devido à importância das medidas multivariadas em química, ela é considerada por muitos como o método que mais significativamente muda o ponto de vista dos químicos para a análise multivariada dos dados (BRERETON, 2007).

É um dos métodos mais importantes utilizados na quimiometria e é a base para diversos métodos de reconhecimento de padrões, classificação e calibração multivariada. Normalmente, a PCA é utilizada com o objetivo de visualizar a estrutura dos dados, encontrar similaridades entre amostras, detectar amostras anômalas (*outliers*) e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados. A proposta da PCA é expressar as informações mais significativas contidas nas variáveis originais em um pequeno número de novas variáveis (LYRA *et al.*, 2010).

A PCA é um método que permite a redução da dimensionalidade através da representação do conjunto de dados em um novo sistema de eixos, denominados componentes principais (PC), permitindo a visualização da natureza multivariada dos dados em poucas dimensões. No espaço original, as amostras são pontos localizados em um espaço n -dimensional, sendo n igual ao número de variáveis. Com a redução de dimensionalidade proporcionada pela PCA, as amostras passam a ser pontos localizados em espaços de dimensões reduzidas definidos pelas PCs, por exemplo, bi ou tridimensionais. Matematicamente, na PCA, a matriz X é decomposta em um produto de duas matrizes, denominadas escores (T) e pesos (P), mais uma matriz de erros (E), como mostrado na Equação 1 (SOUZA, & POPPI, 2012):

$$X = TP^T + E \quad (1)$$

Os *escores* representam as coordenadas das amostras no sistema de eixos formados pelos componentes principais. Cada componente principal é constituído pela combinação linear das variáveis originais e os coeficientes da combinação são denominados pesos. Matematicamente, os pesos são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e os componentes principais (PC), representando, portanto, o quanto cada variável original contribui para uma determinada PC. A primeira componente principal (PC1) é traçada no sentido da maior variação no conjunto de dados; a segunda (PC2) é traçada ortogonalmente à primeira, com o intuito de descrever a maior porcentagem da variação não explicada pela PC1 e assim por diante; enquanto os *escores* representam as relações de similaridade entre as amostras. (SOUZA *et al.*, 2012).

A avaliação dos pesos permite entender quais variáveis mais contribuem para os agrupamentos observados no gráfico dos *scores*. Através da análise conjunta do gráfico de *scores* e *loadings*, é possível verificar quais variáveis são responsáveis pelas diferenças observadas entre as amostras. O número de componentes principais a ser utilizado no modelo PCA é determinado pela porcentagem de variância explicada. Assim, seleciona-se um número de componentes de tal maneira que a maior porcentagem da variação presente no conjunto de dados originais seja capturada (HOLLER *et al.*, 2009).

Assim, a primeira PC sempre explica a maior variância dos dados, a segunda PC é ortogonal à primeira e explica a variância dos dados que a primeira PC não explicou, a terceira componente principal, também ortogonal as outras, explica o máximo de variância que a primeira e a segunda PC's não explicaram e assim sucessivamente (CARVALHO, 2015).

3.5 Investigação da Atividade Antimicrobiana de Droga Vegetal

As plantas medicinais têm sido o recurso tradicional mais importante do homem para tratar infecções microbianas, e constituem uma importante fonte na busca de novos fármacos com atividades terapêuticas, em especial pela crescente resistência dos microrganismos aos fármacos atuais, e a aparição de novas espécies patogênicas, de origem viral ou fúngica (DE ALMEIDA FREIRES, *et al.*, 2011).

A *Schinus terebinthifolius*, planta nativa da região nordeste do Brasil, apresenta diversas propriedades farmacológicas, como atividade antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante, que estão relacionadas com componentes químicos presentes na planta, como taninos, flavonóides e triterpenos. Devido a essas propriedades, a planta apresenta um amplo emprego na medicina popular, o que permite sua escolha em estudos clínicos, farmacológicos e químicos, visando sua confirmação como medicamento eficaz e seguro (SOARES, 2010).

Após a descoberta da penicilina desenvolveu-se a pesquisa de substâncias antimicrobianas nos vegetais. Os alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos e óleos essenciais são compostos originários de várias vias metabólicas. Eles têm importância nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores, como fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos e animais superiores. Essas substâncias podem apresentar também ação antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, mycobacterium, leveduras e fungos filamentosos (GONÇALVES, 2010).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de

macrodiluição e microdiluição. Para determinar a CMI ou a Concentração Mínima Inibitória (CMI) de extratos ativos de plantas, tem-se utilizado um método sensível de microdiluição desenvolvido por Eloff em 1998 (DE BONA, 2014).

A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL. Eloff, em 1998, utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais e observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão. Ainda, compostos presentes em alguns extratos precipitavam, e a coloração verde da clorofila em concentração muito alta interferia na análise.(OSTROSKY, 2008)

Diversos são os fatores que afetam a suscetibilidade do método de difusão e de diluição, há assim, a necessidade do conhecimento das condições experimentais e padronização rigorosa na execução do teste. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (MELIM, 2011).

Todavia, concluiu que o método de microplacas é barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente (SILVA, 2012).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

As folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi utilizadas para obtenção do extrato vegetal foram coletadas no mês de outubro nas capitais da região nordeste do Brasil (Quadro 2).

Quadro 2 – Locais de coleta das amostras de folhas de *S. terebinthifolius*.

	Estado/Cidade	Localização
1	BA – Salvador	13000'13.8"S /38030'33.2"W
2	AL – Maceió	9039'45.0"S /35042'33.1"W
3	PI – Teresina	5001'55.9"S /42048'32.2"W
4	PB – João Pessoa	7008'10.4"S/34050'32.3"W
5	MA – São Luís	2030'27.2"S/44015'15.8"W
6	PE – Recife	8002'48.7"S/34056'52.7"W
7	CE – Fortaleza	3045'09.8"S/38031'34.5"W
8	RN – Natal	5052'20.9"S/35011'08.2"W
9	SE – Aracaju	10054'32.5"S/37004'17.7"W

BA – Bahia; AL – Alagoas; PI – Piauí; PB – João Pessoa; MA – Maranhão; PE – Pernambuco; CE – Ceará; RN – Rio Grande do Norte; SE – Sergipe.

Fonte: Próprio Autor.

A identificação botânica foi realizada por Dra. Rita de Cássia Pereira da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). Os dados climáticos do período de colheita foram obtidos do Centro de previsão de tempo e estudos climáticos (CPETEC, 2015).

4.2 Método de Preparo dos Extratos Brutos

4.2.1 Extração por Turbólise

Para as extrações foram utilizadas folhas frescas de *S. terebinthifolius* pesando aproximadamente 10 g, foi utilizada uma proporção droga:solvente de 1:2, empregando como líquido extrator água e etanol (80%). Para operação de turbólise, utilizou-se um ultra-turrax[®] T18 basic (IKA, modelo T-18, Frankfurt, Alemanha) na rotação de 11000 rpm. A extração foi conduzida por 20 min. A operação foi realizada em quatro ciclos de 5 min com intervalos de 30 segundos para que a temperatura não excedesse 35°C.

4.2.2 Processamento dos Extratos

Após realização das operações de extração, os extratos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório (RV10 Basic, IKA[®]) para eliminação do solvente orgânico, empregando temperatura entre 40 e 50 °C. Os resíduos aquosos dos extratos foram congelados em freezer -80 °C por três dias e em seguida liofilizados (Modelo L101, Liotop[®]), originando os extratos brutos liofilizados (EB).

4.3. Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência

4.3.1 Preparação da Amostra

Para a análise por CCD-AE, as amostras dos extratos liofilizados foram diluídas em metanol na proporção (1mg/mL). Os padrões de ácido gálico e catequina foram preparados em metanol (1 mg/mL). As análises foram realizadas empregando cromatoplasmas de vidro para HPTLC de sílica gel 60 F₂₅₄.

4.3.2 Condições Cromatográficas

Alíquota de 25,0 µL de cada amostra e dos padrões foram aplicados em forma de bandas com 7 mm de largura, com o auxílio de sistema de aplicação de amostras semi-automático Linomat V (Camag[®]), munido de seringa de 100 µL (Hamilton[®]) e controlado por programa computacional winCATS[®]. As bandas foram aplicadas em placas de alumínio revestidas com sílica gel 60 F₂₅₄, 20 × 10 cm; 250 µm espessura (Merck[®]). A ordem de aplicação das amostras de *S. terebinthifolius* foi a mesma descrita no quadro 1 (1- 9), seguidas pelos padrões: ácido gálico (98%, Sigma-Aldrich[®]), ácido clorogênico (USP) e catequina (96%, Sigma-Aldrich[®]).

As placas foram desenvolvidas em câmara vertical de vidro (20 x 10 cm; Camag[®]) utilizando tolueno: acetato de etila: metanol: ácido fórmico (75:25:10:6 v/v/v/v) como a fase móvel. A câmara foi saturada com a fase móvel durante 30 min sob temperatura ambiente (25 ± 2°C). Todos os solventes empregados foram de grau P.A. (JT Baker[®], USA). Após desenvolvimento, a placa foi seca em capela e os componentes foram visualizados sob luz UV em 254 nm. Em seguida, a placa foi derivatizada com os reagentes NEU (difetilbórico ácido-β-etilamino éster-difetilboriloxietilamina) + PEG (Polietilenoglicol 4000) e visualizada sob luz UV em 365 nm. Cada análise foi realizada em duplicata. As cromatoplasmas foram digitalizadas com o auxílio de

fotodocumentador MultiDoc-It[®] (UVP[®], USA) munido de fontes de radiação UV (254 e 365 nm), câmera fotográfica digital EOS 1100D (Canon[®], Japão) e controlado por sistema computacional Doc-ItLS (UVP[®], USA).

4.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

4.4.1 Preparação de Amostra

Para a análise quantitativa por CLAE-DAD dos extratos brutos, cerca de 0,0250 g de cada amostra liofilizada foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico com capacidade de 25 mL e diluídos com 20 mL de água ultra pura. Após dissolução total da amostra em banho de ultrassom durante 30 min, o volume foi aferido com água ultra pura.

As amostras foram individualmente filtradas em membrana de fluoreto de polivideno (PVDF) com tamanho de poro igual a 0,45 µm e diâmetro de 25 mm e acondicionadas em vial para análise.

4.4.2 Condições Cromatográficas

A quantificação do ácido gálico e catequina foi conduzida em Cromatógrafo Líquido (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific[®]), acoplado com Detector de Arranjo de Fotodiodos (DAD; Thermo Fisher Scientific[®]) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific[®]), degaseificador e amostrador automático com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific[®]). Os dados cromatográficos foram processados com o auxílio do programa computacional Chromeleon versão 6.0 (3000 RS Dionex, Thermo Fisher Scientific[®]). O comprimento de onda foi fixado em 280 nm, de acordo com o máximo de absorção observado no espectro de varredura capturado pelo DAD. A separação cromatográfica foi realizada com coluna C18 (250 mm x 4.6 mm d.i., tamanho de partícula 5 µm; Dionex[®]) protegida por pré-coluna (C18, 4 mm x 3.9 µm, Phenomenex[®]). As separações foram realizadas com temperatura do forno da coluna a 24 °C. A fase móvel foi água ultra pura (A) e metanol (B) ambos acidificados com 0,05% de ácido trifluoracético, com fluxo ajustado a 0,8 mL/min. Um programa gradiente foi aplicado como segue: 0–10min, 10–25% B; 10–20min, 25–40% B; 20–25min, 40–75% B; 25–28 min, 75–10% B; 28–30min, 75–10% B.

Foram injetados, separadamente, 20 μ L das soluções padrão e solução amostra, e, os cromatogramas foram registrados para mensurar as áreas dos picos. O resultado foi expresso em % área de ácido gálico e % área de catequina.

4.5 Análise por Cromatografia Gasosa

4.5.1 Preparação da amostra

O extrato bruto de folhas frescas de *S. terebinthifolius*, pesando aproximadamente 10 g, foi obtido por turbólise, filtrado e submetido a um processo de extração líquido-líquido (1:2) utilizando 1 parte do extrato bruto para 2 partes de hexano. As amostras foram individualmente filtradas em membrana de fluoreto de polívideno (PVDF) com tamanho de poro igual a 0,45 μ m e diâmetro de 25 mm e acondicionadas em vial para análise e submetidas à análise por cromatografia gasosa.

4.5.2 Condições Cromatográficas

Os extratos foram analisados utilizando um GC-MS Ultra, (Shimadzu, modelo GC-2010 Plus, Japão) equipado com coluna capilar Rtx-5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m), gás carreador hélio, com taxa de fluxo de 1,0 mL/min e programação da temperatura inicial da coluna de aquecimento de 60°C a 200°C com uma taxa de aquecimento de 10°C/min e uma taxa de aquecimento de 20°C/min de 200°C a 280°C. O volume de injeção foi de 1,0 μ l. As temperaturas do injetor e do detector foram, respectivamente, 260°C e 280°C.

4.6 Análise Quimiométrica

Os dados cromatográficos obtidos por GC-MS foram analisados por análise de componentes principais (PCA). Para executar a análise PCA, cada variável (a intensidade m/z de cada pico) foi subtraída da média variável. Assim, todos os resultados seriam interpretados em termos da variação média. (IORGULESCU *et al.*, 2016).

O software XCMS Online (<https://xcmsonline.scripps.edu/>) e o pré-processamento (centrados na média) dos dados originais foram utilizados para calcular os coeficientes de correlação dos padrões cromatográficos entre amostras com base no coeficiente de correlação (mediana). Foi realizada a análise de similaridade dos cromatogramas como também o coeficiente de correlação foi utilizado para calcular os resultados. A classificação dos perfis cromatográficos foi realizada por análise de componentes principais com o auxílio deste software.

4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.7.1 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos extratos de folhas de *S. terebinthifolius*

Os extratos de *S. terebinthifolius* foram testados na concentração de 1024 µg/mL até 32µg/mL e solubilizado em dimetilsulfóxido-DMSO, numa proporção de 10%. Para o controle de atividade antimicrobiana foi usado Cloranfenicol (100 µg/mL) para bactérias, Nistatina (100 UI/mL) para leveduras e Fluconazol (50 µg/mL) para fungos filamentosos. Os mesmos foram adquiridos comercialmente da SIGMA-ALDRICH® /USA. Os ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica foram realizados em meio líquido Caldo “Brain Heart Infusion” (Caldo BHI) para bactérias (DIFCO LABORATORIES/France/USA) e RPMI 1640 para leveduras e fungos filamentosos (SIGMA-ALDRICH® /USA). Os meios de cultura foram preparados e usados conforme as instruções de cada fabricante.

4.7.2 Microorganismos

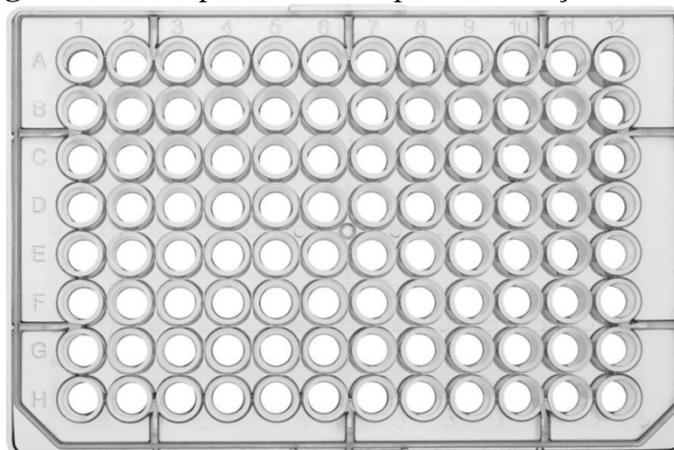
Nos ensaios para avaliação da atividade biológica *in vitro* das nove amostras de extratos de *S. terebinthifolius* foram incluídas as cepas de leveduras: *Candida albicans* ATCC-76645, *C. albicans* LM-108, *Candida tropicalis* ATCC-13803, *C. tropicalis* LM-7; as cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC-13150, *S. aureus* LM-117, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25853; *P. aeruginosa* P-03; e as cepas de fungos filamentosos: *Aspergillus flavus* LM-714, *A. flavus* LM-247.

As cepas foram adquiridas na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)/RJ, e no Laboratório de Micologia e de Microbiologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. As mesmas foram mantidas em meios de cultura apropriados, Agar Nutriente-AN para bactérias e Agar Sabouraud Dextrose- ASD para fungos (DIFCO LABORATORIES/France/USA) e conservadas a 4 °C e a 37 °C, respectivamente. A suspensão dos microorganismos foi preparada conforme o tubo 0.5 da Escala McFarland, ajustada através de leitura espectrofotométrica (Leitz-Photometer 340-800), para 90% T (530 nm), correspondendo, aproximadamente, a 10⁶ UFC/mL (HADACECK; GREEGER, 2000; NCCLS, 2000; CLEELAND; SQUIRES, 1991).

4.7.3 Determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM dos extratos testados foi realizada pela técnica de microdiluição, com placas de microdiluição contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” (Figura 3) e em duplicata. Nos orifícios da placa, foram adicionados 100 μL do meio líquido BHI (bactérias – linhas A-G / colunas 1-4) e RPMI (leveduras e fungos – linhas A-G / colunas 5-10). Posteriormente, 100 μL da solução das amostras, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa (linha A, colunas 1-10). As colunas 1-10, linhas B-G, foram utilizadas para avaliação das amostras vegetais. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 $\mu\text{g/mL}$ até 32 $\mu\text{g/mL}$, de modo que na linha B da placa se encontrará a maior concentração e na linha G, a menor concentração. Cada coluna da placa referiu-se, especificamente, a uma cepa. Foram depositados 10 μL de cada inóculo dos microrganismos nas cavidades (Linha B, colunas 1-10). Na linha H; coluna 1-4: controle de crescimento de bactéria; coluna 5-8: controle de crescimento levedura e coluna 9-10: controle de crescimento fungo, foram depositados 100 μL do meio e adicionados 100 μL de cada inóculo. Na linha A, colunas 11-12 foram depositados 150 μL do meio mais 50 μL da amostra para controle de esterilidade da amostra. Na linha B, colunas 11-12 foram adicionados 200 μL dos meios para controle de esterilidade do meio de cultura. Na linha C, colunas 11-12, foram depositados 50 μL do meio, adicionados 50 μL do solvente utilizado para o preparo da amostra e 100 μL do inóculo para o controle negativo do solvente. E nas linhas D-H, colunas 11-12, foram depositados 50 μL do meio, adicionados 50 μL dos antibióticos e 100 μL do inóculo para controle positivo dos antibióticos.

Figura 3 - Microplaca utilizada para a avaliação da CIM.



Linhas B-G, colunas 1-10: avaliação da amostra vegetal. Linha H, colunas 1-4: controle de crescimento bactéria; coluna 5-8: controle de crescimento levedura; coluna 9-10: controle de crescimento fungo. Linha A, colunas 11-12: controle de esterilidade do meio de cultura; Linha B, colunas 11-12: Controle de esterilidade do meio de cultura; Linha C, colunas 11-12: controle negativo solvente. Linha D-H, colunas 11-12: Controle positivo dos antibióticos.

Fonte: <https://online-shop.eppendorf.com.br/BR-pt/Puntas-tubos-y-placas-44512/Placas-44516/Eppendorf-Assay-Reader-Microplates-PF-16863.html> Acesso em: 10 de dezembro de 2016.

O controle de crescimento dos microrganismos no meio de cultura foi realizado com Nistatina (100 UI) para leveduras; Cloranfenicol (100 µg/mL) para bactérias; e Fluconazol (50µg/mL) para fungos filamentosos. As microplacas foram seladas e incubadas a 35 °C por 24 horas para ensaios com bactérias e leveduras e a 28 °C por 48 horas para ensaios com fungos filamentosos. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano verificado nas cavidades, quando comparado com o crescimento controle. Para determinar a CIM bacteriana, foi adicionado 20µL de solução do corante resazurina a 0,01% (INLAB). Dessa maneira, a mudança de coloração (azul para vermelho) confirma o crescimento microbiano e quando não ocorrer a alteração da cor significa a ausência de crescimento microbiano (MANN E MARKHAM, 1998). A CIM foi considerada como a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento da cepa ensaiada, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos dois ensaios (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; SOUZA *et al.*, 2007).

A atividade antimicrobiana dos produtos foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; >acima de 1500 µg/mL= fraca atividade ou produto inativo(SARTORATTO *et al.*, 2004; HOUGHTON *et al.*; 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta, tratamento e caracterização de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Práticas não convencionais de saúde, tais como acupuntura e fitoterapia tem ganhado espaço de modo a complementar as terapias medicamentosas alopáticas. Isso se deve ao fato das plantas medicinais apresentam baixo custo e fácil acesso em contrapartida aos medicamentos sintéticos que são vistos como caros e agressivos ao organismo. O Brasil possui destaque por ter um terço da flora mundial sendo considerado a maior reserva de produto natural com ação fitoterápica do planeta (OMS, 2016)

O Ministério da Saúde vem investindo no uso da fitoterapia como complemento para o SUS considerando a biodiversidade do Brasil e a melhoria da saúde da população. Diversos programas de fitoterapia tem sua implantação incentivada pelas políticas públicas com o objetivo de facilitar o acesso da população, de forma segura, às plantas medicinais/fitoterápicos (SANTOS *et al.*, 2011).

A *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida por aroeira, pertencente ao bioma Caatinga e Mata Atlântica, apresenta interesse científico por seu grande potencial terapêutico. Estudos químicos e farmacológicos tem mostrado que o extrato de aroeira possui efeitos antiinflamatórios e cicatrizante. (ANDRADE, 2016).

Neste estudo, as folhas de *S. terebinthifolius* foram coletadas em outubro de 2015. De acordo com CPETEC (2015), durante os meses de setembro a novembro, a maior parte da região Nordeste esteve em sua estação seca, predominando o período de estiagem e os totais acumulados de chuva foram baixos, entre 25 mm e 100 mm, no norte do Piauí e na maior parte dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba.

Para a avaliação das amostras foram utilizadas folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi, coletadas nos estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio grande do Norte, Ceará, Maranhão e Piauí. Foi utilizado como critério de escolha das áreas de coleta locais onde o material vegetal estivesse sendo utilizado pela população e/ou empresa de medicamento fitoterápico para produção de produto fitoterápico.

Os critérios de qualidade para insumos farmacêuticos de origem vegetal são importantes para garantir a manutenção da eficácia do produto final, principalmente devido à complexidade na composição destas matérias-primas e às variações ligadas a complexidade química, às condições de cultivo e coleta do vegetal, métodos de extração, secagem e condições de armazenamento. Estes fatores aumentam a dificuldade dos processos de avaliação e enfatizam a importância da realização de um rigoroso controle de qualidade em todas as etapas do processo (BARNI *et al.*, 2009).

Do processo de colheita ao produto final os marcadores químicos desempenha um papel importante na avaliação da qualidade do fitoterápico. O estudo de marcadores se aplica na área de pesquisa na autenticação de uma espécie vegetal, otimização de métodos de extração, etc. Assim, a quantidade de um marcador químico é um indicativo da qualidade do medicamento fitoterápico. (BONOMINI, 2013).

A extração é a etapa inicial para obtenção do fitoterápico a partir da droga vegetal. O processo de extração deve considerar o método, a relação planta-solvente, a facilidade operacional e o gasto de tempo. No processo de extração ocorrem: a lixiviação de substâncias solúveis de células rompidas e a dissolução e difusão das substâncias solúveis das células intactas. (COUTO, 2010).

Os derivados de droga vegetal foram obtidos de folhas frescas de *S. terebinthifolius* pelo processo de extração por turbólise resultando em um extrato bruto etanólico, conforme metodologia descrita no item 4.2.

De acordo com Falkenberg e colaboradores (2010) a utilização de material vegetal fresco pode ser indispensável para detecção de alguns componentes específicos, visto que seu emprego traz a vantagem de evitar a presença de substâncias provenientes do metabolismo de fenecimento vegetal.

Os extratos foram obtidos por turbólise onde as partes vegetais são submersas em solvente frio e submetidas a elevadas forças de cisalhamento cuja extração ocorre simultaneamente com a redução do tamanho da partícula, onde o conseqüente rompimento das células favorecem a rápida dissolução das substâncias resultando em tempos de extração da ordem de minutos e o quase esgotamento da droga (SIMÕES, C., 2010).

A vasta distribuição de *S. terebinthifolius*, a frequente utilização na medicina popular, o potencial terapêutico confirmado em estudos pré-clínicos e o conhecimento fitoquímico desta espécie vegetal, incitam o estudo tecnológico como matéria-prima farmacêutica. O presente estudo contribui para o controle de qualidade desta espécie.

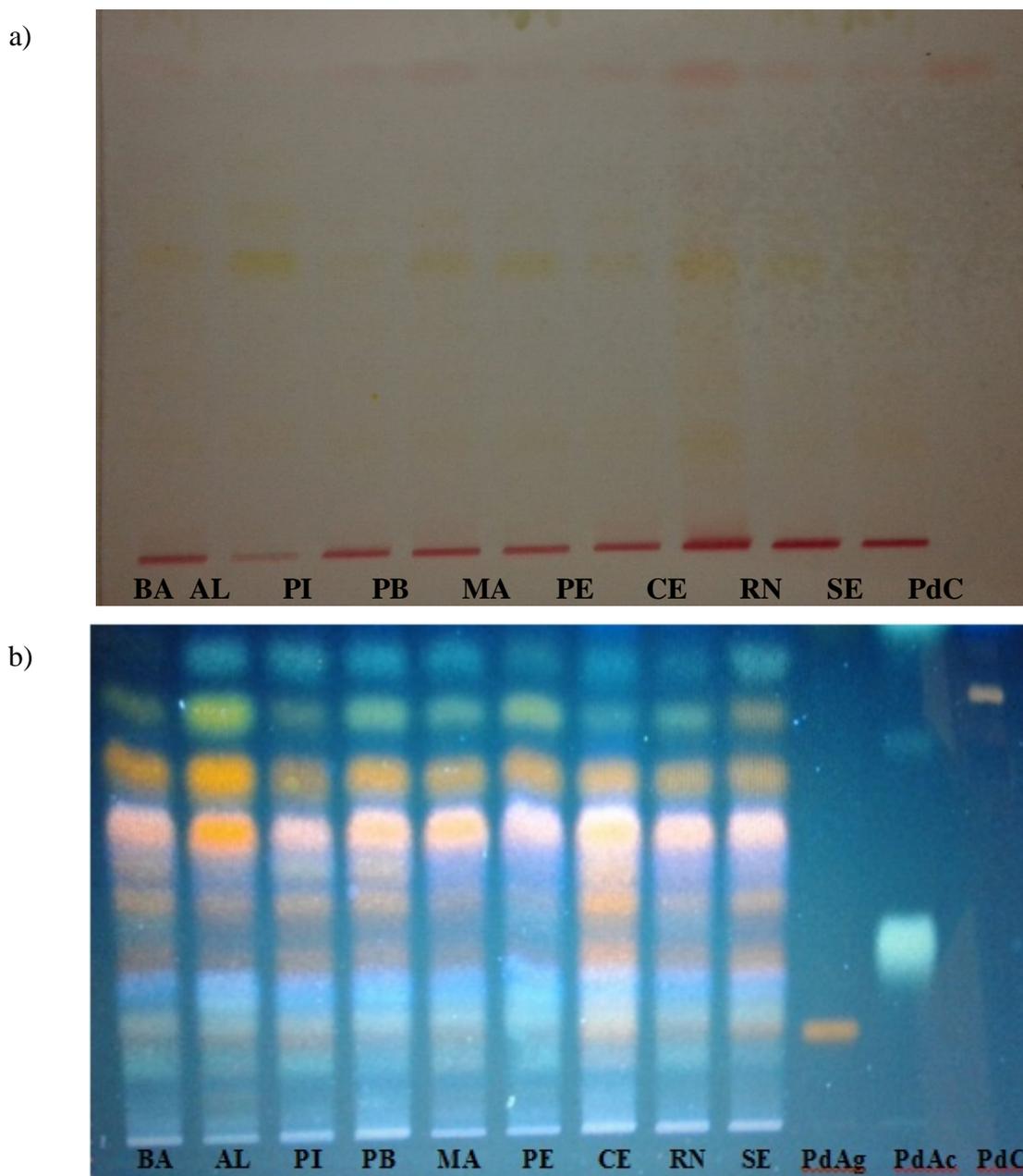
5.2 Perfil químico obtido por cromatografia em camada delgada de classes metabólicas presentes nos extratos brutos de *S. terebinthifolius*

Para análise do perfil químico dos extratos brutos foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE), cuja análise foi desenvolvida conforme metodologia descrita no item 4.3. Procurou-se avaliar os componentes presentes nos derivados de droga vegetal obtidos, quanto a separação de seus componentes pela migração diferencial das substâncias sobre a camada adsorvente da cromatoplaca.

O sistema cromatográfico adotado na triagem dos extratos de *S. terebinthifolius* permitiu a detecção de bandas cromatográficas características de ácido gálico e catequina confirmadas pela adição de padrões de referência essas classes metabólicas são típicas de compostos fenólicos, caracterizadas por colorações que variam do laranja-esverdeado ao amarelo (NUNES *et al.*, 2009).

As bandas obtidas foram caracterizadas neste estudo sob radiação UV em 254 nm antes da derivatização, e em 365 nm após derivatização com reagente NEU + PEG. Em seguida, os valores de Fator de Retenção (Rf) foram calculados e comparados com os padrões utilizados (Figura 4)

Figura 4 - Determinação do perfil cromatográfico por CCD-AE de folhas de *S. terebinthifolius*.



a) Placa antes da derivatização; b) Placa após derivatização com reagente NEU + PEG; amostras: A1–A9; PdAg: Padrão de ácido gálico; PdAc: Padrão de ácido clorogênico e PdC: Padrão de catequina.

Fonte: Dados da pesquisa.

O perfil cromatográfico revelou bandas de ácido gálico e catequina em todas as amostras (1-9) confirmadas com adição dos padrões de ácido gálico e catequina, e apresentaram valor de Rf para o ácido gálico 0,22 e para a catequina Rf 0,83. Dado semelhante foi registrado na literatura por Braz e colaboradores (2011) utilizando padrão de ácido gálico (Rf=0,20) e de catequina (Rf=0,81), na identificação de metabólitos presentes no extrato de aroeira. El-Massry e colaboradores (2009) também confirmam a presença de compostos fenólicos nas folhas identificados como: ácido caféico, ácido cumárico, ácido elágico, ácido gálico e catequina.

Foi adicionado padrão de ácido clorogênico que apresentou uma banda cromatográfica de coloração fluorescente azul e Rf de 0,51. Porém não foi observada a presença deste marcador na amostra.

Nas cromatoplasmas, após derivatização, o ácido gálico apresentou banda de coloração laranja, e a catequina coloração laranja-esverdeada. Considerando esta metodologia, a derivatização com NEU seguido de PEG e a subsequente visualização em 365 nm foi apropriada para detecção das bandas.

Nesse estudo, a CCD-AE foi essencial na observação da uniformidade e intensidade das bandas relacionadas aos compostos presentes nos extratos brutos de *S. terebinthifolius*. Após derivatização em 365 nm, bandas correspondentes aos padrões foram evidenciadas em todos os extratos, sendo a banda correspondente ao ácido gálico de coloração laranja e Rf 0,22 e a catequina coloração laranja-esverdeada e Rf 0,83. Adicionalmente, os perfis típicos das diversas amostras apresentaram diferenças quanto à intensidade de bandas observadas.

As diferentes amostras de *S. terebinthifolius* apresentaram perfil fitoquímico típico de polifenóis. Considerando os diferentes locais de coleta das plantas, as variações observadas na intensidade das bandas podem ser devido aos fatores ambientais. Fatores como: diferentes locais de coleta, variações de clima, diferentes condições de solo, idade ou estágio de desenvolvimento do indivíduo, disponibilidade de água e radiação incidente podem afetar a composição química das plantas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A combinação tolueno: acetato de etila: metanol: ácido fórmico (75:25:10:6) como fase móvel da análise de CCD-AE resultou em bandas bem separadas e simétricas, sendo possível estabelecer perfis químicos típicos dos extratos de *S. terebinthifolius*. Os perfis de CCD-AE apresentaram comportamento semelhante, com intensidade de bandas variável, sugerindo similaridade de conteúdo químico, porém em concentrações diferentes.

Dessa forma, o perfil qualitativo obtido com o auxílio da técnica de CCD-AE e as condições estabelecidas para análise foram adequadas para a identificação de ácido gálico e da catequina no extrato bruto de *S. terebinthifolius*.

5.3 Perfil químico obtido por CLAE-DAD nos extratos brutos de *S. terebinthifolius*

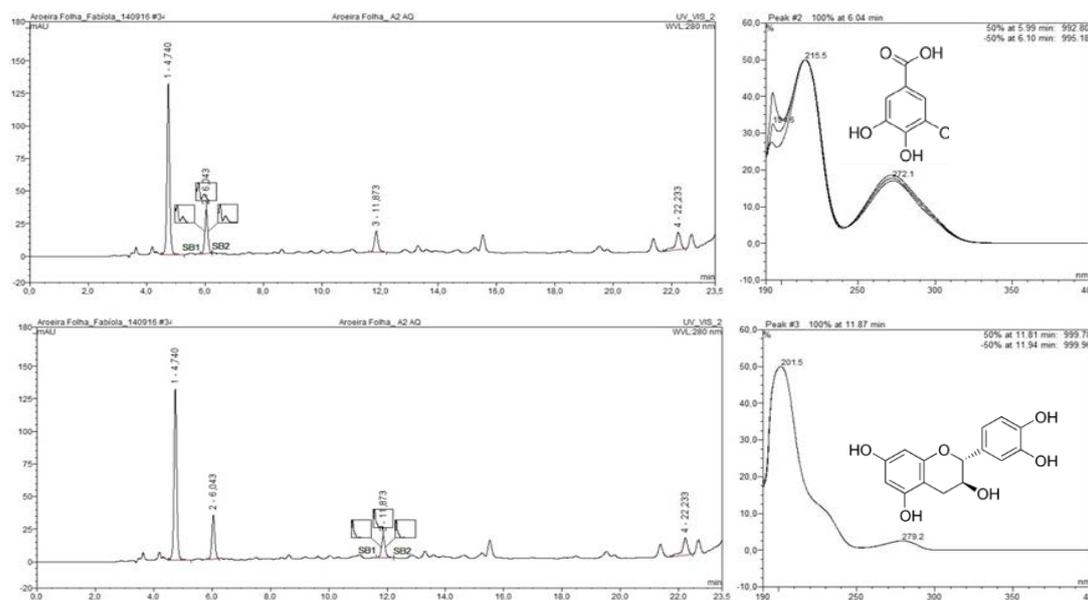
Para análise dos extratos brutos foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD), cuja análise foi desenvolvida conforme metodologia descrita no item 4.3.

Empregou-se para análise do perfil químico dos extratos brutos a técnica de cromatografia líquida com detector por arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD). A condição cromatográfica utilizada em razão da polaridade dos componentes de interesse utilizou gradiente de eluição empregando água ultrapura (A) e metanol (B), acidificados com 0,05% de ácido trifluoracético para ajuste do pH e prevenção da ionização dos grupos hidroxila promovendo maior eficiência de separação, com fluxo 0,8 mL/min e gradiente de eluição de 0–10 min, 10–25% B; 10–20 min, 25–40% B; 20–25 min, 40–75% B; 25–28 min, 75–10% B; 28–30 min, 75–10% B.

A análise por CLAE/DAD permitiu a separação dos constituintes químicos presentes nos extratos de folhas de *S. terebinthifolius*. Foi utilizado como parâmetro qualitativo a leitura do intervalo no tempo de retenção (t) no cromatograma das amostras analisadas. O cromatograma desenvolvido para o extrato de *S. terebinthifolius* detectou grupos metabólicos com tempo de retenção (t), variando de 3,5 a 23,5 min.

Conforme característica fenólica apresentada pelo extrato, o ácido gálico e catequina foram utilizados como marcadores da espécie. Os cromatogramas foram monitorados a 280 nm com tempo de análise cromatográfica de 23,5 minutos (Figura 5).

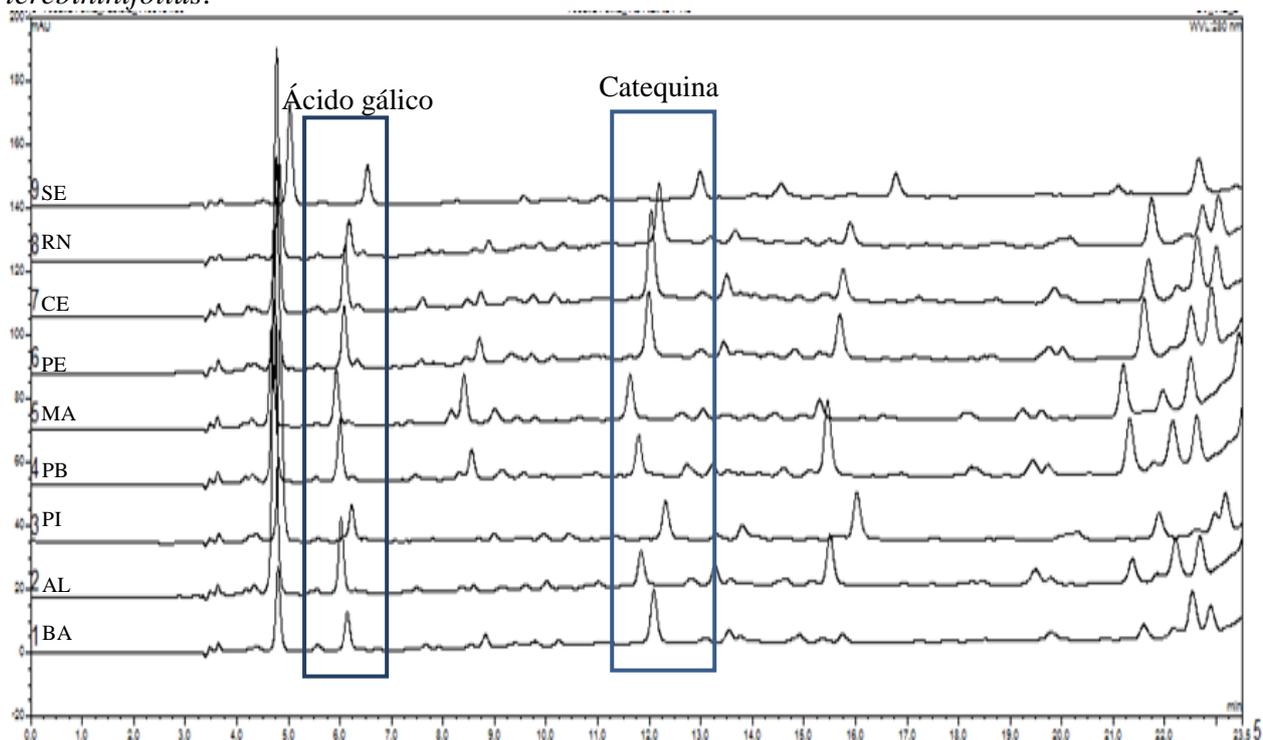
Figura 5—Cromatogramas e espectros de varredura correspondentes ao ácido gálico (a) e a catequina (b).



Fonte: Dados da pesquisa.

Foi possível visualizar nos cromatogramas (Figura 6) regiões características dos padrões nas nove amostras de *S. terebinthifolius*, os tempos de retenções ocorreram no intervalo entre 5,8 e 6,2 min correspondendo à presença do ácido gálico (6,043 min); e entre 11,5 e 12,5 min, à presença da catequina (11,873 min).

Figura 6 - Perfil Cromatográfico obtido por CLAE-DAD das amostras dos extratos de folhas de *S. terebinthifolius*.



Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com os perfis cromatográficos obtidos e áreas de pico observadas na Tabela 1 é possível assegurar que os extratos correspondentes às amostras 1 (BA) e 2 (AL) apresentaram maior concentração do ácido gálico. Os extratos referentes às amostras 3 (PI), 4 (PB), 5 (MA), 6 (PE), 7 (CE), 8 (RN) e 9 (SE) foram aqueles que apresentaram maior concentração de catequina. Os picos que correspondem aos marcadores apresentam-se bem definidos e isolados dos demais picos. Os perfis químicos obtidos por CLAE-DAD para o extrato bruto estão representados no apêndice A.

Tabela 1–Áreas de pico de ácido gálico e catequina obtido por CLAE-DAD em amostras das folhas de *S. terebinthifolius*.

Amostra	Área (%)	
	Ácido gálico	Catequina
Salvador - BA	5,55 ($\pm 0,73$)	1,56 ($\pm 1,02$)
Maceió- AL	3,10 ($\pm 0,62$)	1,95 ($\pm 1,48$)
Teresina - PI	1,96 ($\pm 1,41$)	3,42 ($\pm 0,75$)
João Pessoa - PB	1,41 ($\pm 0,62$)	4,11 ($\pm 1,12$)
São Luiz - MA	1,26 ($\pm 1,20$)	2,42 ($\pm 1,04$)
Recife - PE	1,33 ($\pm 1,38$)	3,20 ($\pm 1,11$)
Fortaleza - CE	2,21 ($\pm 0,84$)	5,88 ($\pm 0,94$)
Natal - RN	1,38 ($\pm 1,03$)	3,49 ($\pm 1,03$)
Aracaju - SE	2,48 ($\pm 1,22$)	3,32 ($\pm 1,52$)

Os dados foram expressos como área média (desvio padrão relativo). BA: Bahia; AL: Alagoas; PI: Piauí; PB: Paraíba; MA: Maranhão; PE: Pernambuco; CE: Ceará; RN: Rio Grande do Norte; SE: Sergipe.

Fonte: Dados da pesquisa.

Pilan e colaboradores (2011), em um estudo para avaliar o teor e a composição química do derivado de droga vegetal de populações de *S. terebinthifolius*, observaram em suas análises uma grande variabilidade em relação ao teor de óleo e a composição química entre as populações, evidenciando a importância do quimiotipo de interesse para uma determinada ação farmacológica.

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

De acordo com Lúcio (2000), os resultados da triagem fitoquímica constituem uma orientação e devem ser interpretados junto com os resultados da atividade farmacológica, pois quando uma planta revela uma ação durante uma triagem farmacológica e presença de grupo de substâncias na triagem fitoquímica, é provável que a ação farmacológica seja devida a fração da substância ou associação delas, corroborando assim para a importância do controle de qualidade biológico.

5.4 Relação entre cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjo fotodiodo (CLAE-DAD)

Atualmente CCD-AE é frequentemente usada como uma alternativa para CLAE por causa de sua simplicidade, precisão, custo-eficácia e rapidez (WASIM AKTAR *et al.*, 2008). Na CCD-AE a impressão digital é apresentada com boa precisão em um menor tempo sendo considerada uma opção racional para satisfazer a necessidade de uma avaliação de qualidade. (PAWAR *et al.*, 2011).

A CLAE é a técnica analítica mais popular na ciência da separação e é considerada como o padrão na autenticação de medicamentos e fitoterápicos, devido à sua precisão, sensibilidade e reprodutibilidade. Entretanto, alguns fatores encarecem as análises por CLAE como: alto custo instrumental, tempo analítico relativamente longo e grande consumo de solventes orgânicos utilizados nas análises. Assim, o método de cromatografia de camada delgada é considerado um dos métodos de autenticação fundamentais pelas Farmacopeias Chinesas e Europeias (SHERMA, 2012).

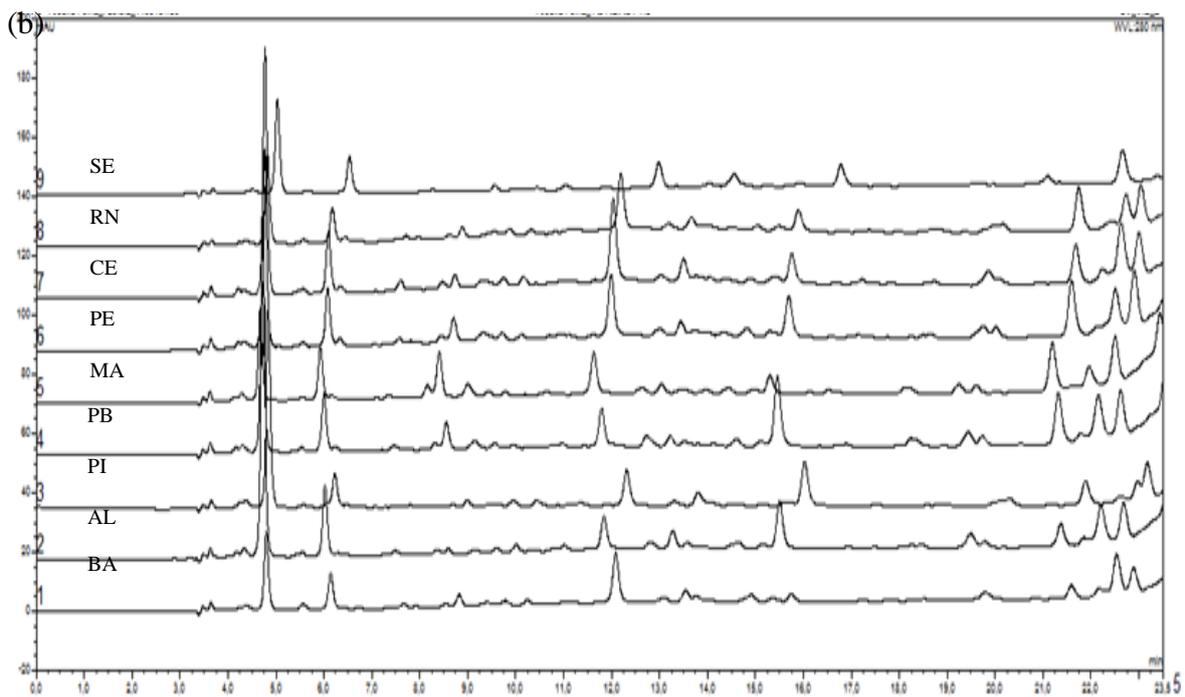
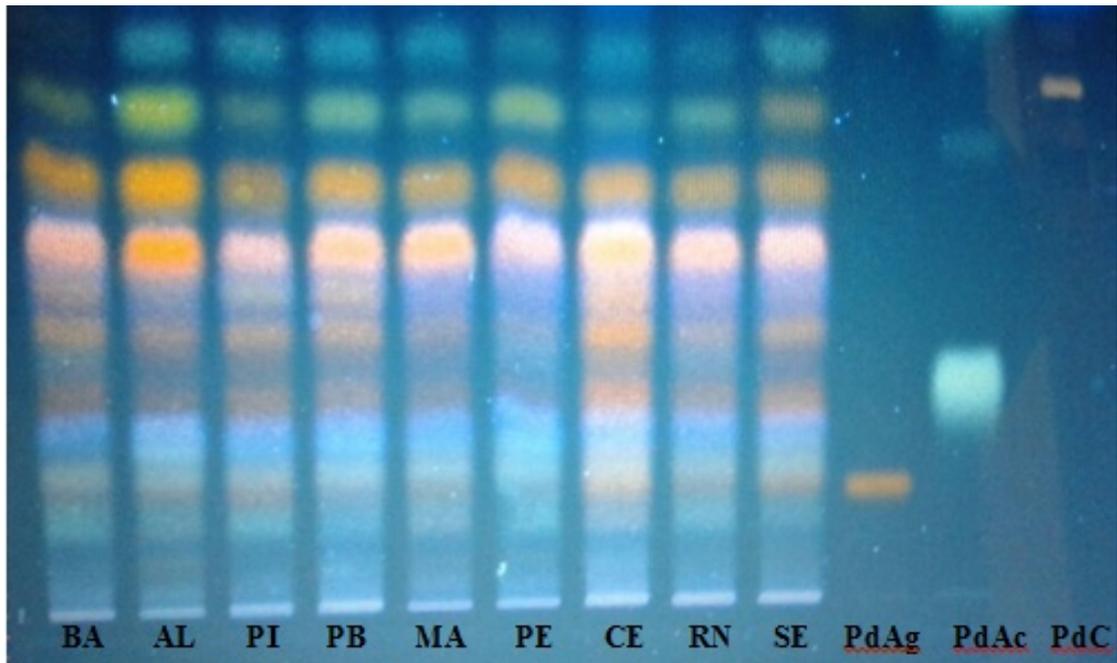
Neste estudo, os dados cromatográficos obtidos por CCD-AE e por CLAE-DAD foram comparados por meio dos sinais dos marcadores e demonstraram em CCD-AE na cromatoplaça a presença de manchas confirmadas pelos padrões de ácido gálico e catequina, e em CLAE áreas de pico do ácido gálico (intervalo 5,8-6,2 min) e da catequina (intervalo 11,5-12,5 min), assim confirmando a presença destes compostos por ambas as técnicas cromatográficas (Figura 7).

O estabelecimento de impressões digitais químicas por CCD-AE e CLAE-DAD como parâmetro de qualidade demonstra relevância na investigação de materiais vegetais, a técnica de cromatografia líquida, que é mais sofisticada, confirmou os dados obtidos por CCD-AE, sendo esta, neste estudo, uma alternativa para CLAE. Segundo Wong e colaboradores (2014), a reprodutibilidade das impressões digitais químicas obtidos por CCD-AE sugerem que os cromatogramas poderão ser empregados em estudos de classificação e quantificação a partir de bancos de imagens digitalizadas.

Os avanços recentes na cromatografia em camada delgada, especialmente o desenvolvimento de cromatografia em camada fina de alta eficiência (CCD-AE), tornaram-na uma alternativa atraente para o controle de qualidade de medicamentos à base de plantas. A CCD-AE oferece várias vantagens sobre os métodos analíticos convencionais devido aos seus méritos de confiabilidade, simplicidade, flexibilidade, tempo analítico rápido, baixo custo de operação, baixo consumo de solvente orgânico e a possibilidade de analisar numerosas amostras simultaneamente (WONG *et al.*, 2014).

Figura 7 - Cromatogramas obtidos por CCD-AE (a) e CLAE-DAD (b).

(a)



Fonte: Dados da pesquisa.

A impressão digital cromatográfica otimizada não é apenas uma ferramenta analítica alternativa para autenticação, mas também uma abordagem para expressar os vários padrões de compostos químicos distribuídos nas drogas à base de plantas. Na CCD-AE a análise de impressão digital tornou-se a ferramenta mais potente para o controle de qualidade de medicamentos à base de plantas por causa de sua simplicidade e confiabilidade. Ela pode servir como uma ferramenta para

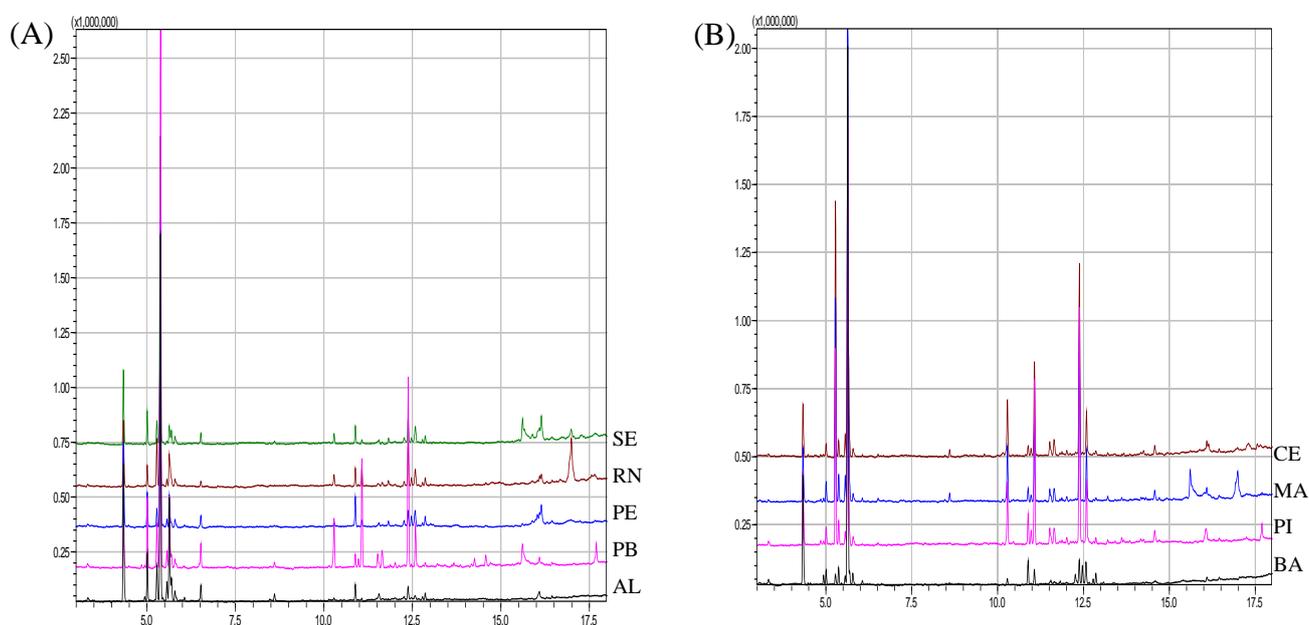
identificação, autenticação e controle de qualidade de drogas à base de plantas (RAM MAUJI *et al.*,2011).

Assim, a análise por CCD-AE e CLAE-DAD foi útil na separação e identificação de polifenóis em folhas de *S. terebinthifolius*, tornando possível separar e identificar os compostos de interesse. Foi possível demonstrar que todas as amostras apresentaram resultado positivo para a presença do ácido gálico e catequina, confirmando a presença destes compostos fenólicos.

5.5 Caracterização dos extratos das folhas de *Schinus terebinthifolius* por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas e análise quimiométrica

As plantas foram coletadas em outubro de 2015. De acordo com a CPETEC, durante os meses de setembro a novembro, a maior parte da região Nordeste esteve em sua estação seca, exceto nos estados do Piauí, Maranhão e oeste da Bahia (CPETEC, 2015). Cromatogramas para as amostras são apresentados na Figura 8. A análise qualitativa dos cromatogramas mostrou pequena diferença entre os perfis químicos, em especial para os picos majoritários.

Figura 8 - Perfis cromatográficos de amostras de *S. terebinthifolius* referentes a coletas realizadas nos estados.



Fonte: Dados da pesquisa.

A análise por cromatografia gasosa permitiu a separação e identificação dos componentes voláteis, onde os que apresentaram maiores concentrações foram α -pineno, limoneno, careno e felandreno (Tabela 2), além dos componentes majoritários citados, os extratos também apresentaram

o myrceno, δ -elemeno, A-cubeno, γ -cadineno e α -copaeno. O limoneno é o componente de maior concentração nas amostras BA, PI e MA, o careno nas amostras AL, PE, SE, PB e RN e o felandreno na amostra CE. Embora o α -pineno não tenha sido o de maior concentração ele está presente em todas as amostras podendo este ser um pico padrão de referência.

Os principais compostos identificados para as amostras utilizadas neste estudo mostram semelhança qualitativa com os dados anteriormente relatados na literatura para as folhas de *S. terebinthifolius*. Jamal e Augusta (2001) na Índia, em seu estudo sobre as folhas da planta detectaram 3-careno, α -pineno, β -pineno, α -felandreno, d-limoneno, sabineno, p-cimeno, β -cimeno, β -elemeno, isociarileno, a-cubeno.

No Zimbábue, Gundidza et al. (2009) detectou em folhas da planta o α -pineno (30,27%), canfeno (0,58%), p-mirceno (6,60%), β -pineno (7,96%), mirceno (1,63%), α -felandreno (9,76%), α -terpineno (0,77%), sabineno (40,66%), trans-p-ocimeno (0,30%), y-terpineno (0,77%) e 3-ciclohexen-1-ol (0,61%).

Tabela 2 - Principais componentes identificados por GC-MS na amostras de *S. terebinthifolius*.

Locais de coleta	Area (%)			
	α -Pineno	Limoneno	Careno	Felandreno
BA - Salvador	16,02 \pm 0,06	77,27 \pm 0,03	--	--
AL - Maceió	20,66 \pm 0,02	12,36 \pm 0,01	53,80 \pm 0,02	4,76 \pm 0,03
PI - Teresina	5,36 \pm 0,05	30,06 \pm 0,01	1,71 \pm 0,01	14,07 \pm 0,04
PB - João Pessoa	3,40 \pm 0,06	4,96 \pm 0,01	47,52 \pm 0,04	3,42 \pm 0,01
MA - São Luís	4,52 \pm 0,05	44,17 \pm 0,01	2,11 \pm 0,01	16,14 \pm 0,04
PE - Recife	16,97 \pm 0,02	6,23 \pm 0,02	61,11 \pm 0,03	3,46 \pm 0,01
CE - Fortaleza	6,01 \pm 0,02	22,83 \pm 0,04	22,38 \pm 0,04	27,80 \pm 0,02
RN - Natal	17,55 \pm 0,03	--	46,33 \pm 0,04	11,30 \pm 0,04
SE - Aracaju	16,49 \pm 0,05	--	66,58 \pm 0,03	4,82 \pm 0,03

Os valores representados nas tabelas são médias sd (desvio padrão N = 3).

-- = não detectado.

Fonte: Dados da pesquisa.

A variabilidade dos principais componentes das amostras coletadas nos estados da região nordeste do Brasil pode estar relacionada aos microclimas de cada região, uma vez que o conteúdo de metabólitos secundários de plantas medicinais pode variar dependendo de vários fatores como sazonalidade, período circadiano, idade, desenvolvimento da planta, disponibilidade de nutrientes e água no solo (CZELUSNIAK *et al.*, 2012).

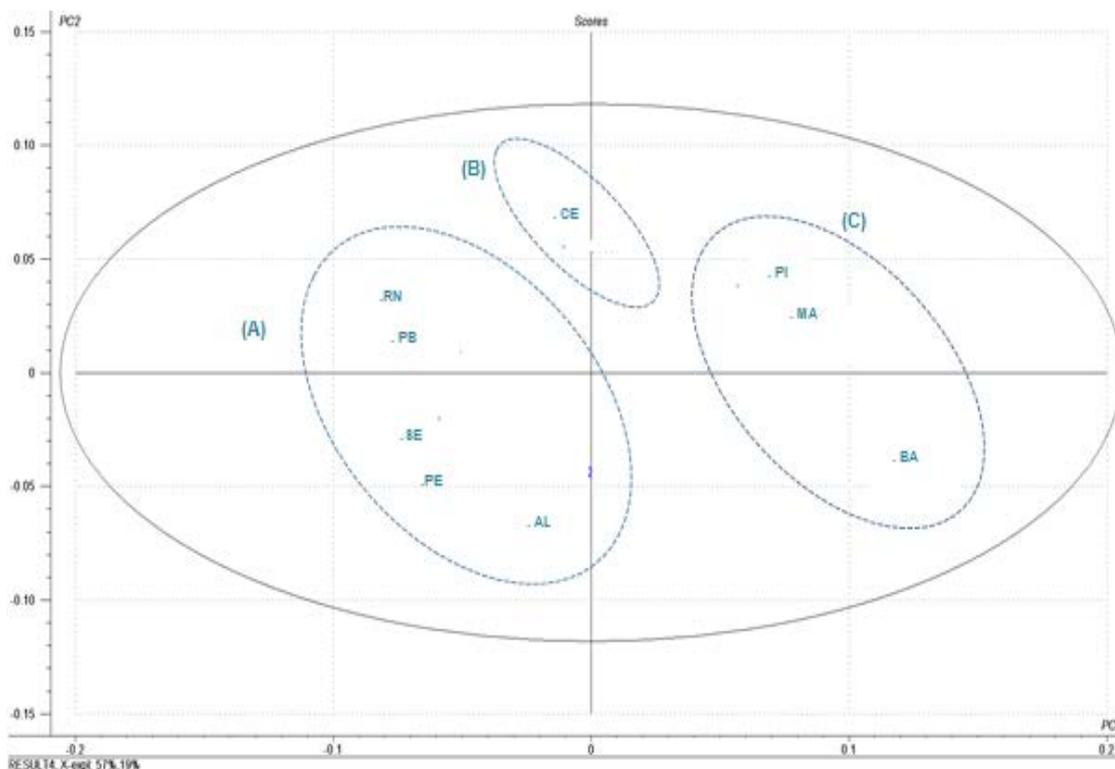
Estudo realizado por Barbosa (2007) o teor de óleo nas folhas de *S. terebinthifolius* mostra algumas pequenas mudanças ao longo de um ano, essas alterações foram geralmente insignificantes. O teor de óleo atingiu um pico (0,65-0,69%) entre março e setembro, e subiu (0,45-0,55%) entre outubro e fevereiro, o que coincidiu com a floração e frutificação. O óleo extraído dos ramos de folhas sem flor apresentaram α -pineno, felandreno, myrceno, δ -elemeno, γ -cadineno e α -copaeno, coincidindo com os resultados encontrados neste estudo.

A aplicação de técnicas quimiométricas proporciona a interpretação de dados com melhor qualidade, permitindo a classificação e discriminação entre as amostras (ZENG *et al.*, 2014).

Para verificar o grau de similaridade entre as amostras, os dados foram processados por análise de componentes principais (PCA) para identificar grupos formados que possuem as mesmas características cromatográficas. Os perfis cromatográficos obtidos foram organizados em uma matriz de dados contendo 36 linhas (amostras) e 882 variáveis (fragmento de íon e tempo de retenção combinado, m/z - tempo) e após o pré-tratamento de alinhamento dos picos, os cromatogramas foram avaliados por Análise de Componentes Principais (PCA).

A análise dos componentes principais foi aplicada para avaliar os dados dos compostos determinados por CG-EM, reduzindo o número de dimensões do conjunto de dados sem a perda de informações relevantes, para se obter um menor número de novas variáveis (componentes principais) que facilite a interpretação dos dados. A análise forneceu uma representação dos agrupamentos de dados que permitiu a identificação de valores semelhantes entre as amostras. O Componente Principal 1 (PC1) explicou 57% da variância total dos dados e o componente principal 2 (PC2) explicou 19%. Assim, o gráfico PC1 X PC2 representa a variância de 76% dos dados, ou seja, apresenta o conjunto de dados obtidos em função da média aritmética dos pontos (Figura 9). Desta forma, pontos próximos no gráfico representam amostras com características semelhantes.

Figura 9—Gráfico de *scores* dos dados de GC-MS a partir de amostras de *S. terebinthifolius*.

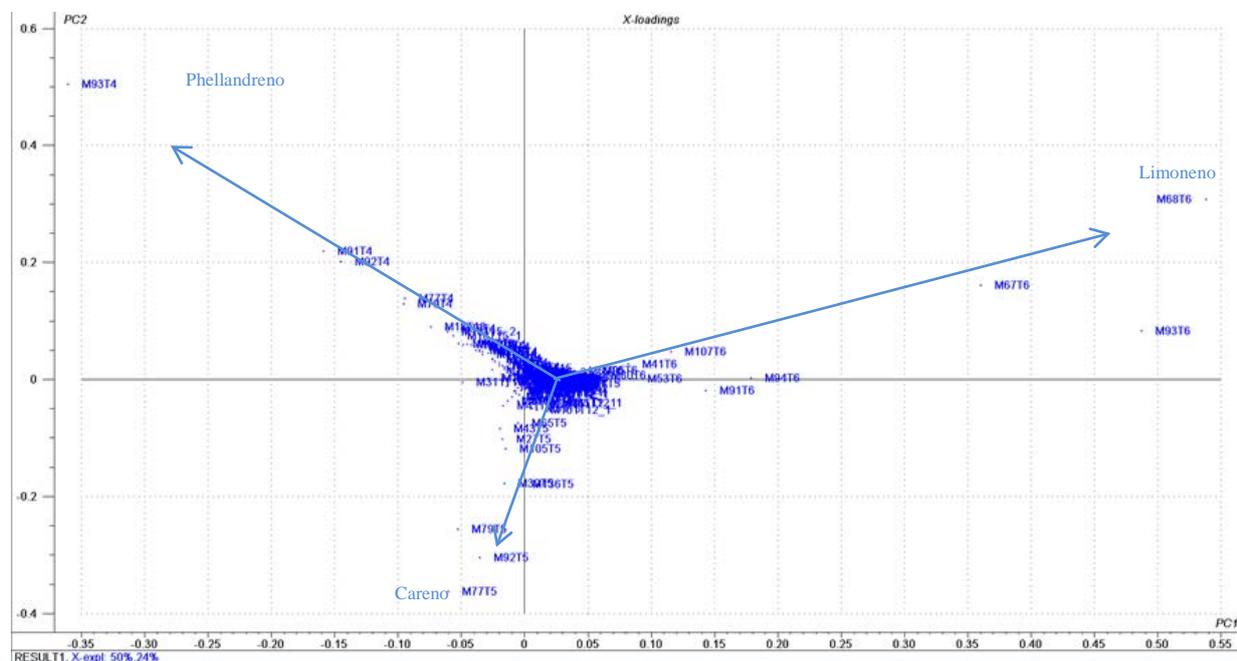


Fonte: Dados da pesquisa.

Os dados foram normalizados entre -0,2 e +0,2, tanto para PC1 como para PC2, a Figura 2 mostra que em PC1 há agrupamento das amostras PI e MA em valores de scores positivos e da amostra BA em valores de scores negativos. Analisando as amostras em PC2, é possível observar as amostras de PB, RN e CE em valores de scores positivos; e as amostras SE, PE e AL em valores de scores negativos. Na Figura 2 pode-se observar a formação dos grupos A, B e C que ocorreu em virtude das semelhanças entre amostras pertencentes a cada um deles.

Observando o gráfico de *loadings* (Figura 10), que fornece a variável que influencia a formação dos grupos, podemos explicar a construção dos principais componentes (PC1 e PC2) através da similaridade entre as amostras. E, conseqüentemente, a projeção das amostras no gráfico de scores (PRADO *et al.*, 2012).

Figura 10–Gráfico de *loadings* (PC1 versus PC2) das amostras de *S. terebinthifolius*.



Fonte: Dados da pesquisa

De acordo com a Figura 10 que apresenta o gráfico de *loading* para o modelo, observamos que o fragmento de agrupamento para área do primeiro quadrante é 93 m/z com tempo de retenção de 4 min, característica de felandreno; no segundo quadrante 68 m/z com tempo de retenção de 6 min, característica do limoneno e no terceiro quadrante 92 m/z com tempo de retenção de 5 min, característica do careno.

Assim, as amostras do grupo A (RN, PB, SE, PE, AL), B (CE) e C (PI, MA, BA) são agrupadas pela presença de careno, felandreno e limoneno, respectivamente.

Dessa forma, o gráfico de dispersão fornecido pelo PCA foi uma ferramenta importante, uma vez que permitiu comparar e explorar dados complexos e multivariados projetando as amostras em um gráfico bidimensional onde o cromatograma foi tratado não como um conjunto de quaisquer picos, mas como um único sinal multivariado, facilitando comparações entre eles. Assim, é possível assumir que a análise quimiométrica de componentes principais (PCA) foi uma abordagem adequada para verificar a semelhança entre amostras.

5.6 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em placas da atividade antimicrobiana dos extratos de folhas *Schinus terebinthifolius* Raddi

Os testes de microdiluição em placas foram realizados conforme descritos na metodologia para a avaliação da atividade antimicrobiana no item 4.7. As amostras avaliadas foram representadas pelos extratos de *S. terebinthifolius* obtidos conforme a metodologia descrita no item 4.2.

Os resultados dos ensaios para avaliar a atividade biológica dos nove extratos (técnica de microdiluição) sobre bactérias e fungos estão registrados na Tabela 3. Todos os extratos nas concentrações testadas de 1024 a 32 µg/mL não produziram inibição sobre o crescimento das cepas de bactérias e de fungos.

Tabela 3 - Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima de extratos contra cepas de microorganismos.

Amostras (µg/mL)	<i>S. aureus</i> ATCC-13150	<i>S. aureus</i> LM-117	<i>P. aeruginosa</i> ATCC- 25853	<i>P. aeruginosa</i> P-03	<i>C. albicans</i> ATCC-76645	<i>C. albicans</i> LM-108	<i>C. tropicalis</i> ATCC -13803	<i>C. tropicalis</i> LM-117	<i>A. Flavus</i> B. LM-714	<i>A. flavus</i> B. LM-247
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Meio de cultura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antibacteriano	-	-	-	-	----	----	----	----	----	---
Antifúngico	----	----	----	----	-	-	-	-	-	-

Fonte: Dados da pesquisa.

O fato de não ter ocorrido atividade inibitória em função da concentração (CIM), dos derivados vegetais avaliados, frente ao crescimento dos micro-organismos testados, indica que não houve atividade antimicrobiana nesta concentração, o que não quer dizer que a amostra vegetal não tenha atividade contra os micro-organismos testados em concentrações superiores a esta (SALVI, 2013).

Ainda que o extrato tenha apresentado pouca ou nenhuma atividade este desempenho pode ser explicado pelas condições experimentais empregadas em cada estudo, tais como: quantidade de extrato, solvente utilizado na obtenção da solução extrativa, método de extração, estágio de desenvolvimento do indivíduo, assim como a origem geográfica do material vegetal (FERREIRA, 2012).

Freire e colaboradores (2010), verificou atividade antibacteriana da aroeira contra o *S. mutans* na concentração 3,125 mg/mL (3125 µg/mL), estando a tintura em uma concentração inicial de 10%. Frente à *L. casei*, foram obtidos resultados mais satisfatórios, posto que a Aroeira foi capaz de inibir o crescimento bacteriano numa concentração de 1,562 mg/mL (1562 µg/mL).

Alves e colaboradores (2009) avaliaram a ação antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico da aroeira sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis* e *Lactobacillus casei*, verificando atividades bacteriostática e bactericida do produto sobre os microrganismos testados. Além disso, também exerceu ação antifúngica sobre *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*.

Salvi Júnior (2013) em estudo realizado com extratos brutos diclorometânicos (EBd) e etanólicos (EBet) obtidos de folhas de *S. terebinthifolius*, relata que, o EBet, obtido pelo método de extração soxlet apresentaram atividade inibitória em função da concentração contra *C. albicans* (CIM 312 µg/mL), seguido dos extratos, EBd obtido por soxlet que apresentou atividade contra *C. albicans* e *S. mitis* (CIM 625 µg/mL); EBet e EBd obtidos por maceração, que apresentaram atividade contra *C. albicans* (CIM 625 µg/mL).

Estudo realizado por Lopes (2016), o óleo essencial extraído das folhas de *S. terebinthifolius*, na concentração de 512 µg/mL, inibiu o crescimento de 75% das cepas fúngicas demonstrando uma atividade moderada. As cepas de *C. tropicalis* (ATCC-13803 e LM-6) foram resistentes ao referido óleo essencial. Dentre as cepas bacterianas, apenas *S. aureus* ATCC-25923 e *S. aureus* M-117 apresentaram sensibilidade ao produto, onde a CIM foi de 512µg/mL demonstrando uma atividade moderada. As cepas bacterianas que apresentaram resistência foram *S. aureus* LM-197, *P. aeruginosa* ATCC-25853, A-03 e LM-260.

Tabela 4 – Síntese de trabalhos publicados sobre concentração inibitória mínima com a droga vegetal *S. terebinthifolius*.

Freire et al., 2010.		
<i>S. mutantis</i>	3.125 µg/mL	Tintura
<i>L. casei</i>	1.562 µg/mL	
Sá Júnior, 2016.		
<i>P. aeruginosa</i>	200.000 µg/mL	Extrato aquoso
<i>S. aureus</i>		
Menezes et al., 2016.		
<i>C. albicans; C. krusei; C. glabrata; tropicalis.</i>	Não apresentou atividade	Extrato aquoso
Silva, 2015.		
<i>C. albicans</i>	1000 µg/mL	Óleo essencial
<i>S. aureus; E. coli; S. enteritidis</i>	Não apresentou atividade até a concentração de 2000 µg/mL	
Lopes, 2016		
<i>A.flavus</i>	512 µg/mL	Óleo essencial
<i>C. tropicalis; P. aeruginosa</i>	Não apresentou atividade	
Salvi Júnior, 2013.		
<i>C. albicans</i>	312 µg/mL	EBet/soxlet
<i>C. albicans; S. mitis</i>	625 µg/mL	EBd/soxlet
<i>C. albicans</i>	625 µg/mL	EBet;EBd/maceração

Estudo realizado por Sá Júnior e colaboradores (2016), a análise do extrato aquoso, de *S. terebinthifolius* demonstrou atividade antimicrobiana sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na concentração de 200 mg/mL (200000 µg/mL).

O extrato aquoso de *S. terebinthifolius* não demonstrou propriedade antifúngica in vitro frente às cepas *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*(MENEZES, et al., 2016)

O óleo essencial de *S. tereinthifolius* apresentou moderado potencial antifúngico frente à *Candida albicans* ATCC 10231 CIM = 1 mg/mL (1000 µg/mL), e nenhuma atividade contra as cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11775 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, até a concentração de 2 mg/mL (2000 µg/mL) (SILVA, L.R.A., 2015).

Tais estudos sugerem que extratos vegetais apresentam um grande potencial para síntese de moléculas com atividade antibacteriana.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Nas impressões digitais obtidas por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE) e por Cromatografia Líquida acoplada a detector fotodiodo (CLAE-DAD), para as diferentes amostras de extratos das folhas de *S. terebinthifolius*, foi possível associar as áreas de pico obtidas por CLAE-DAD com as bandas observadas nos cromatogramas de CCD-AE ressaltando o perfil de taninos e flavonoides.

A análise por CCD-AE das folhas de *S. terebinthifolius* apresentou impressões digitais convencionais com o sistema solvente selecionado e pode ser utilizada como referência para a identificação e controle de qualidade desta espécie como uma ferramenta farmacognóstica na identificação desta planta medicinal. A vantagem da CCD-AE é a rapidez e a possibilidade de analisar muitas amostras ao mesmo tempo sob as mesmas condições cromatográficas.

Os perfis cromatográficos obtidos por CG-EM tiveram os dados tratados por análise de componentes principais (PCA). Esta análise possibilitou investigar a similaridade dos componentes químicos presentes nas amostras de folhas de *S. terebinthifolius* de diferentes estados do nordeste brasileiro.

Na análise de impressões digitais de amostras de *S. terebinthifolius*, foi possível identificar os componentes majoritários e detectar as variações na composição química das amostras.

Na correlação do gráfico de *scores* com o de *loadings* obtidos a partir da combinação de PC1 x PC2, foi possível observar a separação das amostras em 3 grupos. O grupo A formado pelos estados de RN, PB, SE, PE, AL, grupo B formado pelo estado do CE e o grupo C formado pelos estados de PI, MA, BA apresentaram respectivamente careno, felandreno e limoneno. Estes marcadores influenciaram na formação dos grupos por similaridade. Assim, pode-se afirmar que as plantas pertencentes ao mesmo grupo são semelhantes porque apresentam os mesmos metabólitos secundários.

O modelo obtido com a análise de componentes principais (PCA) foi eficaz na interpretação dos dados analisados revelando a correlação das impressões digitais de uma variedade de plantas da espécie *S. terebinthifolius* é uma abordagem promissora para comparação entre amostras de diferentes estados da região nordeste do Brasil e avaliação da qualidade química.

A partir dos resultados obtidos na análise da concentração mínima inibitória (CIM) foi possível observar que, nas condições experimentais deste estudo (1024 µg/mL a 32 µg/mL), os extratos de *S. terebinthifolius* não apresentaram atividade inibitória antimicrobiana (CIM) frente aos microorganismos testados: cepas de leveduras: *Candida albicans* ATCC-76645, *C. albicans* LM-108, *Candida tropicalis* ATCC-13803, *C. tropicalis* LM-7; as cepas de bactérias:

Staphylococcus aureus ATCC-13150, *S. aureus* LM-117, *Epidermidis* ATCC- 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC- 25853; *P. aeruginosa* P-03; e as cepas de fungos filamentosos: *Aspergillus flavus* LM-714, *A. flavus* LM-247.

O fato de não ter havido CIM não significa que a amostra vegetal não tenha atividade. Concentrações superiores às testadas podem apresentar atividade. Estudos relatados sobre atividade antimicrobiana de *S. terebinthifolius* apresentaram pouca ou nenhuma atividade, na concentração entre 1024 μ g e 32 μ g, devendo ser observadas outras condições experimentais no que diz respeito ao método de extração, solventes utilizados e etc.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância pelo estudo de *S. terebinthifolius* decorre do seu amplo emprego de indicações terapêuticas pela população, a qual utiliza a casca do tronco para tal finalidade, podendo vir acarretar impacto ambiental, relacionada à coleta incorreta do material vegetal, o que pode vir a suprimir a existência da espécie, assim surge o interesse em se estudar o extrato obtido de folhas.

Os dados apresentados neste trabalho demonstraram que o perfil químico obtido de folhas de *S. terebinthifolius*, apresentaram zonas cromatográficas fluorescentes por CCD-AE características dos polifenóis da classe dos flavonoides e taninos. Confirmados por CLAE-DAD que quantificou o ácido gálico e a catequina nos nove exemplares obtidos nos estados nordestinos.

Na identificação dos constituintes químicos dos nove extratos por CG-EM houve predominância monoterpênica do limoneno, α -pineno, careno e felandreno. A análise quimiométrica de componentes principais agrupou os estados por similaridade sendo o grupo A formado pelos estados de RN, PB, SE, PE, AL, o grupo B formado pelo estado do CE e o grupo C formado pelos estados de PI, MA, BA apresentaram respectivamente careno, felandreno e limoneno como marcadores que influenciaram no agrupamento, podendo-se afirmar que as plantas pertencentes ao mesmo grupo são semelhantes porque apresentam os mesmos metabólitos secundários.

Os extratos brutos obtidos a partir de folhas frescas de *S. terebinthifolius*, numa proporção droga:solvente de 1:2, líquido extrator etanol (80%), extraídas por turbólise, concentrados sob pressão reduzida, congelados e liofilizados foram submetidos a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos pelo método de microdiluição em placas. Os resultados dos ensaios nas concentrações testadas de 1024 a 32 $\mu\text{g/mL}$ não produziram inibição sobre o crescimento das cepas de bactérias e de fungos. Indicando que não houve atividade antimicrobiana nesta concentração, o que não significa não tenha atividade contra os micro-organismos testados em concentrações superiores.

Como perspectiva propõe-se estudo sazonal que possa avaliar a concentração dos marcadores químicos nos diferentes meses do ano. Análise microbiológica de extratos obtidos por diferentes métodos de extração e em concentrações entre 1024 a 32 $\mu\text{g/mL}$ e superior a estas.

REFERÊNCIAS

AFFONSO CRG. Avaliação toxicológica do óleo essencial dos frutos da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* raddi) e do impacto sobre a performance reprodutiva e desenvolvimento da prole em ratos [Mestrado]: FUFPI; 2009.

ALAERTS, G., PIETERS, S., LOGIE, H., VAN ERPS, J., MERINO-ARÉVALO, M., DEJAEGHER, B., VANDER HEYDEN, Y. Exploration and classification of chromatographic fingerprints as additional tool for identification and quality control of several *Artemisia* species. **Journal Pharmacy Biomedical Analysis**, 95, 34-46, 2014.

ALBERTASSE P.D, THOMAZ L.D, ANDRADE M.A. Medicinal plants and their uses in Barra do Jucu community, Vila Velha Municipality, Espírito Santo State, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 12(3):250-60, 2010.

ALBUQUERQUE U.P, MONTEIRO J.M, RAMOS M.A, AMORIM E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 110(1):76 – 91, 2007.

ALLIGIANAIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p.4168-4170, 2001.

ALMEIDA, L.S. **Avaliação Morfológica de mudas de *Allophylus edulis* (A. ST. (A. ST.- HIL., A. JUSS. & CAMBESS.) RADL. (Vacum) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) produzidas em diferentes substratos.** 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, 2005

ALONSO, R. J. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas.** Buenos Aires: ISIS, 1039 p., 1998.

ALVES PM, QUEIROZ LMG, PEREIRA JV, PEREIRA MSV. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, 42(2): 1-3, 2009.

AMORIM MMRD, SANTOS LC. Treatment of bacterial vaginosis with *Schinus terebinthifolius* Raddi vaginal gel: a randomized controlled trial. **Revista Brasileira de Ginecologia e obstetrícia**. 25(2):95-102, 2003.

ANDRADE, S. F. V. de. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi. através de análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e de cavidade em placa.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas)- Universidade Estadual da Paraíba, 2016.

ANTONIO, G. D., TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Contribuições das plantas medicinais para o cuidado e a promoção da saúde na atenção primária. **Interface-Comunicação Saúde Educação**, 17(46), 615-33, 2013.

ASSIS CPO, GONDIM MGC, SIQUEIRA HAA, CÂMARA CAG. Toxicity of essential oils from plants towards *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) and *Suidasia pontifica Oudemans* (Acari: Astigmata). **Journal of Stored Products Research**. 47(4):311-5, 2011.

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

BARBOSA, C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D. Seasonal Variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Química Nova**, Viçosa, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007.

BARNI, SAMYRA T.; CECHINEL-FILHO, VALDIR; COUTO, ANGÉLICA G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 19.4: 865-870, 2009.

BENDAOU H, ROMDHANE M, SOUCHARD JP, CAZAUX S, BOUJILA J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinusterebinthifolius Raddi* berries essential oils. **Journal Food Science**. 75(6):C466-72, 2010.

BERNARDES NR. **Estudo da composição química e dos efeitos imunofarmacológicos do extrato dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*)**. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Norte Fluminense; 2010.

BEZERRA, BEATRIZ PINHEIRO. **Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de teor de ácido gálico e catequina no fitoterápico sanativo® por cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

BOCHNER, R., FISZON, J. T., ASSIS, M. A., & AVELAR, K. E. S. Problems associated with the use of medicinal plants commercialized in "Mercadão de Madureira", Rio de Janeiro City, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 537-547, 2012.

BONOMINI, TIAGO JOSÉ. **Padronização de metodologia para extração do fitoconstituente majoritário das flores de *Allamanda cathartica* L.(APOCYNACEAE)**. Dissertação de Mestrado – Universidade do Vale do Itajaí; 2013.

BOSCOLO OH, MENDONCA-FILHO RFW, MENEZES FS, SENNA-VALLE L. The antioxidant power of some restinga plants cited as medicines. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 9(1):8-12, 2007.

BRAZ, R.; WOLF, L.G.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P DE. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. 2011. **Revista brasileira de farmacognosia**, Curitiba, v. 22, n. 5, Oct. 2012.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de ciência, tecnologia e insumos estratégicos. Departamento de assistência farmacêutica e insumos estratégicos. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos**. Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**. Brasília, 2001. Disponível em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd03_18.pdf>. Acesso em: 13 mai. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 3.916, de 30 de outubro de 1998. **Aprova a política nacional de medicamentos**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 nov. 1998c. Seção 1, p. 18.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 254, de 31 janeiro de 2002. **Aprova a política nacional de atenção à saúde dos povos indígenas**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 06 fev. 2002a. Seção 1. p. 46.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução CIPLAN n.º 08, de 08 de março de 1988. **Implanta a prática da fitoterapia nos serviços de saúde**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, mar. 1988b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 665, de 25 de agosto de 1998. **Institui a subcomissão nacional de assessoramento em fitoterapia (CONAFIT) da CONATEM, vinculada à SVS**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 ago. 1998d.

BRERETON, R.G. **Applied Chemometrics for Scientists John Wiley & Sons Ltd**, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England, 2007.

CABRAL, ELAINE CRISTINA. **Utilização da técnica de Fingerprinting por Espectrometria de Massas para a Análise de Extratos de Produtos Naturais**. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, 2010.

CARLINI EA, DUARTE-ALMEIDA JM, RODRIGUES E, TABACH R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 20(2):140-6, 2010.

CARVALHER-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.O.M. The anti-allergic activity to the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **International Immunopharmacology**, v.8, p. 1552-1560, 2008.

CARVALHO, R. Combinação de ferramentas quimiométricas e infravermelho próximo para análise de material desfibrado de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Carlos, 2015.

CARVALHO MCRD, BARCA FNTV, LIMA LFA, MEDEIROS SRB. CARVALHO, M. C. R. D.; BARCA, F. N. T. V.; LIMA, L. F. A.; MEDEIROS, S. R. B. Evaluation of Mutagenic Activity in an Extract of Pepper Tree Stem Bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 42(3):185-91, 2003.

CARVALHO, M. G.; MELO, A. G. N.; ARAGÃO, C. F. S.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L., *Schinus terebinthifolius* Raddi: composição química, propriedades biológicas e toxicidade. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 158-169, 2013.

- CARVALHO, A. C. B. **Plantas medicinais e fitoterápicos: regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil**. Tese de doutorado – Universidade de Brasília, 2011.
- CARVALHO, F. I. M.; DANTAS FILHO, H. A. Estudo da qualidade da gasolina e sua composição química empregando análise de componentes principais. **Quimica Nova**, v. 37, n. 1, p. 33-38, 2014.
- CERUSK, M.; ORIANA, P.R.; FÁVERO, A.; LAGO, J.H.G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (anacardiaceae), **Quimica nova**. V.30, p. 597-599, 2007.
- CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.
- CPETEC, 2015. Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasil. Disponível em: <http://www.cptec.inpe.br/> Acessado em: 20 de Dezembro de 2015.
- COLE, E. R., DOS SANTOS, R. B., LACERDA JÚNIOR, V., MARTINS, J. D. L., GRECO, S. J., & CUNHA NETO, A. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, 45(3), 821-828, 2014.
- COUTO, A.G.; SILVA, R.M.L.; VITORINO, J.C. Tecnologia e garantia da qualidade de fitoterápicos. In: BRESOLIN, T.M.B; CECHINEL FILHO, V. **Farmacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, p. 241-308, 2010.
- CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L., Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.
- DE ALMEIDA FREIRES, I., ALVES, L. A., DE CARVALHO JOVITO, V., & DE CASTRO, R. D. Atividade antifúngica de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) sobre cepas do gênero *Candida*. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 20, n. 52, 2011.
- DE ALSINA, O. L. S., **Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos**. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Campina Grande, 2007.
- DE BONA, E., DA SILVA PINTO, F. G., FRUET, T. K., JORGE, T. C. M., & DE MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, 81(3), 218-225, 2014.
- DOS SANTOS, S. L. F. Uso de plantas medicinais nos serviços do sistema único de saúde: uma revisão narrativa. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 5, n. 3, p. 63-80, 2016.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciência agrotecnologia, Lavras**, v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005.
- DEGÁSPARI, C. H. Propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). 104f. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Paraná, 2004.

DEMEESTERE K, DEWULF J, ROO K, WISPELAERE P, LANGENHOVE H.V., Quality control in quantification of volatile organic compounds analysed by thermal desorption-gas-chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1186, p. 348-357, 2008.

DRASARA P, MORAVCOVA J 2004. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. **Journal Chromatography B**. 812: 3-21, 2004.

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

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Médica** 64: 711-713, 1998.

ERNST M. E, KLEPSEK M. E, WOLFE E. J, PFALLER, M. A. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* ssp. **Diagnostic Microbiological Infectious Disease**, 26(3-4):125-131, 1996.

ESPINEL-INGROFF, A.; ESPINEL-INGROFF, A. Standardized disk diffusion method for yeasts. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 29, n. 13, p. 97-100, 2002.

ESTEVAO L. R. M.; MEDEIROS, J. P.; SIMÕES, R. S.; ARANTES, R. M. E.; RACHID, M. A.; SILVA, R. M. G.; MENDONÇA, F. S.; NETO, J. E., Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with Brazilian pepper essential oil (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 289-295, 2015.

FAMEI L, ZHILI X, XIUMEI L, FENG Q, XIAOQIN L. Strategy and chromatographic technology of quality control for traditional chinese medicines. **Chinese Journal Chromatography**. 24: 537-544, 2006.

FALKENBERG, M. DE B. Quinonas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRS, p. 263-288, 2010.

FERREIRA, MAGDA RHAYANNY ASSUNÇÃO. **Triagem antifúngica de extratos obtidos de espécies vegetais do nordeste brasileiro**. Dissertação de Mestrado – UFRN, 2012.

FERREIRA, S. N.; SAMPAIO, M. J. A. M.; BERNARDOCKI, A.; TESCARI, A. S.; OLIVEIRA, A. C. D. D.; MOSSRI, B. D. B.; CUNHA, E. Â. B. D. **Biodiversidade e conhecimentos tradicionais associados: implementação da legislação de acesso e repartição de benefícios no Brasil**, 2013.

FLEIG, M. Anacardiáceas. In: REITZ P, editor. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: IOESC; 1989.

FREIRES, I. D. A., ALVES, L. A., JOVITO, V. D. C., ALMEIDA, L. D. F. D. D., CASTRO, R. D. D., PADILHA, W. W. N. Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, v. 9, n. 2, p. 139-143, 2010.

GAD H.A., EL-AHMADY S.H., ABOU-SHOER M.I., AL-AZIZI M.M., Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: a review, **Phytochemical Analysis**, 24; 1-24, 2013.

GARREC RBL, BENOIT E, SAUVIAT MP, LEWIS RJ, MOLGO J, LAURENT D. Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent the in vitro neurotoxicity produced by sodium channel activators. **Toxicol.** 46(6):625-34, 2005.

GOBBO-NETO, L., LOPES, N.P., Planta medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. 30, 374-381, 2007.

GONÇALVES, J. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e triagem fitoquímica dos extratos de espécies da família asteraceae encontradas no semi-árido baiano**, Dissertação de Mestrado -Universidade Estadual Feira de Santana, 2010.

GUNDIDZA M, GWERU N, MAGWA ML, MMBENGWA V, SAMIE A., The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe. **Afr. journal Biotechnology**. 8:71647169, 2009.

HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HOLETZ, F. B.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

HERINGER AP. **Aspectos químicos, ecológicos e farmacológicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi**.Dissertação de Mestrado -Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2009.

HOUGHTON, P. J., HOWES, M. J., LEE, C. C., STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

IORGULESCU, E., VOICU, V. A., SÂRBU, C., TACHE, F., ALBU, F., MEDVEDOVICI, A., Experimental variability and data pre-processing as factors affecting the discrimination power of some chemometric approaches (PCA, CA and a new algorithm based on linear regression) applied to (+/-) ESI/MS and RPLC/UV data: Application on green tea extracts. **Talanta**, 155, 133-144, 2016.

JAMAL Y, AGUSTA A., Chemical composition of essential oil *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves. Indonesian. **Journal Pharmaceutical** 12:135-139, 2001.

J. SHERMA, **Biennial review of planar chromatography: 2009-2011**, J. AOAC. Int., 566. 992-1009, 2012.

JOHNSONA, P.; ARTHANARISWARANC, P. A Review-Importance of RP-HPLC in Analytical Method Development.**International Journal Of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences**, 2013.

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

JOHANN S, SA NP, LIMA LA, CISALPINO PS, COTA BB, ALVES TM, ET AL. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**. 9:30, 2010.

JORGE A, ARROTEIA K, SANTOS ICARO, ANDRES E, MEDINA S, FERRARI C, ET AL. A mixture of *Schinus terebinthifolius* Raddi extract and linoleic acid from *Passiflora alata* oil synergically decreases the level of melanin synthesis in human reconstituted epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**.132:S123, 2012.

JORGE ATS, ARROTEIA KF, SANTOS IA, ANDRES E, MEDINA SPH, FERRARI CR, ET AL. *Schinus terebinthifolius* Raddi extract and linoleic acid from *Passiflora edulis* synergistically decrease melanin synthesis in B16 cells and reconstituted epidermis. **International Journal of Cosmetic Science**. 34(5):435-40, 2012.

KRUEL, V. S. F.; PEIXOTO, A. L. Etnobotânica na reserva extrativista marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. **Acta Bonariense Brasileira**. v.18, n.1, p. 177-190. 2004.

KULKARNI, K. M., PATIL, L. S., KHANVILKAR, V. V., & KADAM, V. J. Fingerprinting techniques in herbal standardization. **Journal of Pharm Research**, v. 4, n. 2, p. 1049-1062, 2014.

LARSEN T O, HANSEN M AE. **Dereplication and discovery of natural products by UV spectroscopy**. In: Colegate SM, Molyneux RJ, editors *Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination*, 2nd Edition. London; CRC Press 221-44, 2008.

LEÃO, K. V., **Aplicação das técnicas espectroscópicas e quimiométricas no estudo do controle de qualidade das drogas vegetais: embaúba, malva e ginseng brasileiro**. Tese de Doutorado – Universidade federal de São Carlos, 2010.

LEITAO F, DA FONSECA-KRUEL V.S, SILVA I.M, REINERT F. Urban ethnobotany in Petropolis and Nova Friburgo (Rio de Janeiro, Brazil). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 19(1 B):333-42, 2009.

LI, B. Y., HU, Y., LIANG, Y. Z., XIE, P. S., & DU, Y. P., Quality evaluation of fingerprints of herbal medicine with chromatographic data. **Analytica Chimica Acta**, 514(1), 69-77, 2004.

LIANG, Y. Z., XIE, P., & CHAN, K., Quality control of herbal medicines. **Journal of chromatography B**, 812(1), 53-70,2004

LIMA, E. O. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: avaliação de espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 83-86, 2004.

LIMA, JOCIMAR LANES. **Estudo de caso de análise de custos das atividades da fase Fitoquímica do projeto de pesquisa e desenvolvimento de um medicamento à base de uma espécie vegetal**. Tese de Doutorado – Instituto Tecnológico -FIOCRUZ, 2015.

LIPINSKI, L. C., DE FIGUEIREDO WOUK, A. F. P., DA SILVA, N. L., PEROTTO, D., & OLLHOFF, R. D., Effects of 3 topical plant extracts on wound healing in beef cattle. **African journal of traditional, complementary and alternative medicines**. 9(4), 542-547, 2012.

LOPES, P. Q. **Desenvolvimento de sistemas emulsionados para veiculação dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Schinus terebinthifolius* e *Plectranthus amboinicus***. Tese de doutorado - Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

LOPES, G. C., SANCHES, A. C. C., TOLEDO, C. E. M. D., ISLER, A. C., & MELLO, J. C. P. D., Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 45(1), 135-143, 2009.

LORENZI, H., **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. v.1. São Paulo: Instituto Plantarum, 368p, 2002.

LORENZI H; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 512 - 544p, 2008.

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

LUPI, E.P.V; BRIZUELA, C.I.S; JEIFETZ, F.C; ACOSTA, C.J.S. Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. **Revista Cubana de Farmácia**.;43(4):74-84, 2009.

LYRA, W.S., SILVA, E.C., UGULINO, M.C., FRAGOSO, W.D., Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar componentes principais. **Química Nova**, 1594-1597, 2010.

MACHADO, S.R.; GUERREIRO, S. M. C. Estrutura de desenvolvimento de canais secretores em frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Acta Botânica**. Brasília. v.15, n. 2, p. 189-195, 2001.

MAHMOUD TS, MARQUES MR, DO O PESSOA C, LOTUFO LVC, MAGALHAES HIF, DE MORAES MO, ET AL. In vitro cytotoxic activity of brazilian middle west plant extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 21(3):456-64, 2011.

MANIKANDAN A, AROKIA V.D.A. Evaluation of biochemical contents, nutritional value, trace Elements, SDS-PAGE and HPTLC profiling in the leaves of *Ruellia tuberosa* L. and *Dipteracanthus patulus* [Jacq.]. **Journal Chem. Pharm. Res**. 29(3): 295-303, 2010.

MANN, C. M., AND J. L. MARKHAM. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology** v. 84, n. 4, p. 538-544, 1998.

MARTÍNEZ, M. J.; GZÁLEZ, N. A.; BADELL, J. B. Actividad antimicrobiana del *Schinus terebinthifloius* Raddi (COPAL). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. 1(3):37-9, 1996.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2. ed. Fortaleza: UFC, 346 p, 2000.

MATSUO AL, FIGUEIREDO CR, ARRUDA DC, PEREIRA FV, BORIN SCUTTI JA, MASSAOKA MH, ET AL. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 411(2):449-54, 2011.

MELIM, C. **Avaliação do potencial antimicrobiano de quatro espécies de plantas medicinais da flora brasileira**. Dissertação de Mestrado – Universidade do Vale do Itajaí, 2011.

MENEZES TORRES, KÁTIA ANDREA; LIMA, SÔNIA MARIA ROLIM ROSA; UEDA, SUELY MITOI YKKO. Activity of the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi on strains of the Candida genus. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia/RBGO Gynecology and Obstetrics**, 2016.

MESQUITA ML. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal Ethnopharmacology**. 123(3):439-45, 2009.

MITSCHER, L. A.; LEU, R. P.; WU, N. W.; BEAL, J. L.; WHITW, R. Antibacterial agents from higher plants I: **Introduction, rationale and methodology**. *Llodya*, v.35, n.2, p.157-166, 1972, 1972.

MOK, D. K., & CHAU, F. T., Chemical information of Chinese medicines: A challenge to chemist. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 82(1), 210-217, 2006.

MONTANARI RM, BARBOSA LCA, DEMUNER AJ, SILVA CJ, CARVALHO LS, ANDRADE NJ. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from verbenaceae species: Alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D. **Quimica Nova**. 34(9):1550-5, 2011.

MOURA-COSTA GF, NOCCHI SR, CEOLE LF, MELLO JCPD, NAKAMURA CV, DIAS FILHO BP, et al. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Parana, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 143(2):631-8, 2012.

NAQVI, S. H.; KILIAN, M. S. Y.; VOHORA, S. B. Anti-bacterial, antifungal and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 62, n. 3, p. 221-228, 1991.

NASCIMENTO, A. R. **Aplicações em quimiometria**. 2016.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova. PA: NCCLS, 2000.

NICOLETTI, MARCELLO. "HPTLC fingerprint: a modern approach for the analytical determination of botanicals." **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 818-823, 2011.

NIKAM P, KAREPARAMBAN J, JADHAV A, KADAM V. Future Trends in Standardization of Herbal Drugs, **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. 02(06), 38-44, 2012.

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

OLIVEIRA JUNIOR, L. F. G., SANTOS, R. B., REIS, F. O., MATSUMOTO, S. T., BISPO, W. M. S., MACHADO, L. P., & OLIVEIRA, L. F. M., Fungitoxic effect of essential oil from aroeira

(*Schinus terebinthifolius* RADDI) on *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 15(1), 150-157, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Traditional medicine: definitions**. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/>>. Acessado em: 28 de dez. 2016.

OSTROSKY, E. A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E., KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O., & FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(2), 301-307, 2008.

PARREIRA, T. F. **Utilização de métodos quimiométricos em dados de natureza multivariada**. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, 2003.

PAWAR RK, SHARMA SHIVANI, SINGH KC, SHARMA RAJEEV KV. Physico-chemical standardization and development HPTLC method for the determination of Andrographonin in *KalmghNavyasLoha*. **An Ayurvedic formulation. Int.J Research in Ayurveda and Pharmacy**. 2(1): 295-301, 2011.

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

PIRES OC, CORSI TAQUEMASA AV, AKISUE G, DE OLIVEIRA F, PULZ ARAUJO CE. Preliminary comparative analysis of the acute toxicity and median lethal dose (LD50) of the fruit of the Brazilian black pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) and black pepper (*Piper nigrum* L.). **Acta Farmaceutica Bonaerense**. 23(2):176-82, 2004.

POMERANTSEV, A. L., RODIONOVA, O. Y. Concept and role of extreme objects in PCA/SIMCA. **JournalChemom.**, 28(5), 429-438, 2014.

PRADO, V. M. D. J., MORAES, V. R. D. S., NOGUEIRA, P. C. D. L., CRUZ, E. M. O., BLANK, A. F., PEREIRA-FILHO, E. R., MARTINS, L. R. R. Characterization of teas from *Lippia gracilis* schauer genotypes by HPLC-DAD chromatographic profile combined with chemometric analyses. **Química Nova**, 35(9), 1814-1818, 2012.

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 Reserch**, Attiki, v. 26, n.1A, p. 379-87, 2006.

RABELO, D. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Quantificação de fenóis totais presentes nas cascas de *Trichillia catigua* A. Juss (Meliaceae). **Revista brasileira plantas medicinais**, v. 15, n. 2, p. 230-236, 2013.

RAM MAUJI, ABDIN MZ, KHAN MA, JHA PRABHAKAr. **HPTLC fingerprint analysis: A Quality control of Authentication of Herbal Phytochemicals**. Springer Verlag Berlin Heidelberg, p.105, 2011.

RAMYA V, DHEENA DHAYALAN V AND UMAMAHESWARI S. In vitro studies on antibacterial activity and separation of active compounds of selected flower extracts by HPTLC. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. 2(6): 86-91, 2010.

RIZZINI, C. T. **Botânica econômica brasileira**. 2 ed. Revista ampliada, Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 248p, 1995.

ROBBINS R J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 51 2866-87, 2003.

RODRIGUES, M. V. N., REHDER, V. L. G., SARTORATTO, A., JÚNIOR, S. B., & DA SILVA SANTOS, A. (2006). O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **MultiCiências: Construindo a história dos produtos naturais**, 7(5), 2006.

RUIZ AR, DE LA TORRE RA, ALONSO N, VILLAESCUSA A, BETANCOURT J, VIZOSO A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Ethnopharmacology**. 52(3):123-7, 1996.

SÁ JUNIOR, P. F., MUNIZ, E. B., PEREIRA, N. A., & OLIVEIRA, M. A. S. Atividade antimicrobiana in vitro dos extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos de espécies da família Anacardiaceae. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.15, n1, 56-61, 2016.

SABIN, J.G., FERRÃO, M.F., FURTADO, J.C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação (SIMCA). **Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas**. N 40, 2004.

SALES, M.D.C. **Avaliação e caracterização de insumos bioativos da aroeira (*Schinus terebinthifolius raddi*) com potencial econômico para o desenvolvimento tecnológico de bioprodutos**. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.

SALVI JÚNIOR, A. ***Schinus terebinthifolius* Raddi: estudo anatômico e histoquímico das folhas e investigação do potencial farmacêutico do extrato etanólico e suas frações**. Dissertação – Universidade Estadual de São Paulo, 2009.

SALVI JÚNIOR, A. ***Schinus Terebinthifolius* Raddi: estudo farmacognóstico e investigação da atividade biológica de extratos e frações**. Doutorado – Universidade Estadual de São Paulo, 2013.

SANTANA JS, SARTORELLI P, GUADAGNIN RC, MATSUO AL, FIGUEIREDO CR, SOARES MG, et al. Essential oils from *Schinus terebinthifolius* leaves chemical composition and in vitro cytotoxicity evaluation. **Pharmaceutical Biologcal**. 50(10):1248-53, 2012.

SANTOS E.B, DANTAS G.S, SANTOS H.B, DINIZ M.F.F.M, SAMPAIO F.C. Ethnobotanical studies of medicinal plants for oral conditions in the municipality of João Pessoa, Brazil. **Revista brasileira farmacognosia**. 19(1b):321-4, 2009.

SANTOS, T. G., REBELO, R. A., DALMARCO, E. M., GUEDES, A., GASPER, A. L. D., CRUZ, A. B., NUNES, R. K. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf essential oil from *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova** v. 35, n. 3, p.477-481, 2012.

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

SANTOS, JR. H.M. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**. 64:231–8, 2010.

SANTOS, R. L., GUIMARAES, G. P., NOBRE, M. S. D. C., & PORTELA, A. D. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 13(4), 486-491, 2011.

SANTOS SBD, LIMA ACAD, MELO ARDS, FRAZÃO CDS, CHERPAK GL. Comparison of the efficacy of oral mastic (*Schinus terebinthifolius* Raddi) with omeprazole in patients with gastritis and dyspeptic symptoms: a randomized, double-blind. **GED Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva**. 29(4), 2010.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

SCALON, S.P.Q.; MUSSURY, R.M.; SCALON FILHO, H.; FRANCELINO, C. S. F. Desenvolvimento de mudas de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e sombreiro (*Clitoria fairchildiana*) sob condições de sombreamento. Comunicação. **Ciênciaagrotecnica**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 166-169, 2006.

SHARABY A, ABDEL-RAHMAN H, MOAWAD S. Biological effects of some natural and chemical compounds on the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera:Gelechiidae). **Saudi Journal of Biological Sciences**. 16(1):1-9, 2009.

SILVA AB, SILVA T, FRANCO ES, RABELO SA, LIMA ER, MOTA RA, ET AL. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi). **Brazilian journal microbiology**. 41(1):158-63, 2010.

SILVA AG, ALMEIDA DL, RONCHI SN, BENTO AC, SCHERER R, RAMOS AC, ET AL. The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolius* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). **Parasites and Vectors**. 3(1), 2010.

SILVA, I. F. D. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de novos compostos triazólicos**. Dissertação de Mestrado– Universidade Federal do Amazonas, 2012.

SILVA LBL, ALBUQUERQUE EM, ARAÚJO EL, SANTANA DP. Avaliação clínica preliminar de diferentes formulações de uso vaginal à base de aroeira (*Schinus terebinthifolius* raddi). **Revista Brasileira de Medicina**. 61(6):381-4, 2004.

SILVA, L. R. A. **Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano e toxidez do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi**. 2015. 23f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK. P.R.(Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 315p, 2010.

SOARES, D. G. D. S., DE OLIVEIRA, C. B., PAULO, M. D. Q., CARVALHO, M. D. F. F. P., & PADILHA, W. W. N., Avaliação clínica e microbiológica do tratamento da estomatite protética com tintura de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, 365-370, 2010.

SOUZA, A.M., BREITKREITZ, M.C., FILGUEIRAS, P.R., ROHWEDDER, J.J., POPPI, R.J., Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho. **Química Nova**, 1057-1065, 2013.

SOUZA, A. M., & POPPI, J.R., Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, 2012.

SOUZA, A.M., COELHO, M.R., FIGUEIRAS, P., CUNHA, T.A.F., DART, R.O., PARÉS, J.G., SIMON, P.L., CRUZ, B.G., POPPI, R.J. ISANTOS, M.M. Proposta de tutorial de quimiometria utilizando técnicas modernas para a análise de solos. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Sobral, CE , 2012.

SOUZA, G. H. B. de; MELLO, J. C. P. de; LOPES, N. P. (Orgs.). **Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais**. Ouro Preto: Editora UFOP, 2011. 252 p.

TISTAERT C., DEJAEGHER B., VANDER HEYDEN Y., Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review, **Analytica Chimica Acta.**, 690. 148-161, 2011.

TONIAL F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira)**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, 2010.

TSCHUMI, HENRIQUE DE SÁ. **Fluxo do conhecimento sobre plantas medicinais em uma rede de atores da Grande Florianópolis**. Tese de Doutorado – Universidade Federal de São Carlos, 2015.

VARELA-BARCA, F. N. T., AGNEZ-LIMA, L. F., & DE MEDEIROS, S. R. B. Base excision repair pathway is involved in the repair of lesions generated by flavonoid-enriched fractions of pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) stem bark. **Environmental and molecular mutagenesis**, 48(8), 672-681, 2007.

VESSECCHI, R., LOPES, N. P., GOZZO, F. C., DÖRR, F. A., MURGU, M., LEBRE, D. T., RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, 2011.

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

WASIM AKTAR MD, RAJLAKSHMI POI AND ANJAN BHATTACHARYA. Status of sennosides content in various Indian herbal formulations method standardization by HPTLC. **Bangladesh Journal Pharmacology**. 3: 64-68, 2008.

WOLFENDER J.L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Médica**. 75:719-734, 2009.

WOLFENDER J L, QUEIROZ E F, HOSTETTMANN K. The importance of hyphenated techniques in the discovery of new lead compounds from nature. **Expert Opin Drug Discovery**. 237-60, 2006.

WONG, K. H., RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V., LI, K. M., LI, G. Q., & CHAN, K. Differentiating *Puerariae Lobatae* Radix and *Puerariae Thomsonii* Radix using HPTLC coupled with multivariate classification analyses. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 95, 11-19, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO - 2011) – Intestinal worms. Soil-transmitted helminthes. Disponível em: http://www.who.int/intestinal_worms/en/ Acessado em: 13/09/2016.

WOUNG-LEUNG, Y. L. Antimicrobial activities of some Hon-Kong plants used in chinese medicine. **Fitoterapia**, v. 69, n.1, p. 11-16, 1988.

WU, H., GUO, J., CHEN, S., LIU, X., ZHOU, Y., ZHANG, X., & XU, X. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 72, 267-291, 2013.

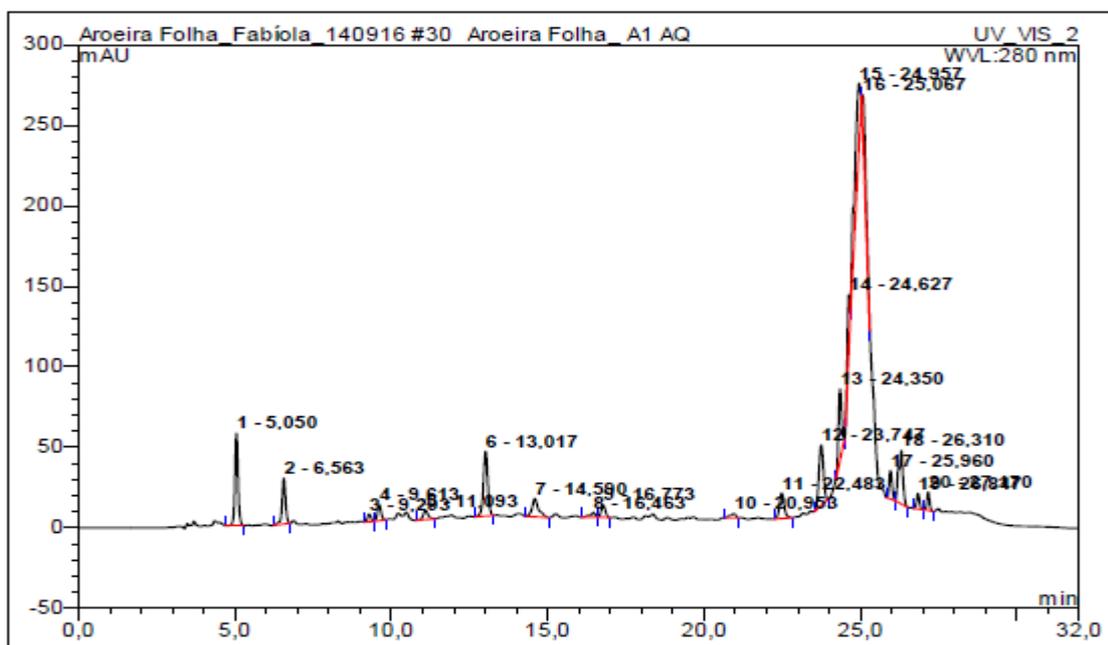
ZENG, Z., LI, J., HUGEL, H. M., XU, G., MARRIOTT, P. J. Interpretation of comprehensive two-dimensional gas chromatography data using advanced chemometrics. **Trends in Analytical Chemistry**, 53, 150-166, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Cromatogramas Obtidos por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CLAE) dos Extratos de *S. terebinthifolius*.

Figura 1 - Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado na BA - Salvador.

Sample Name:	Aroeira Folha_ A1	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	BA1	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	unknown	Wavelength:	280.0
Control Program:	Aroeira MET2	Bandwidth:	4
Quantif. Method:	Aroeira	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	16/01/2016 10:14	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	32,00	Sample Amount:	1,0000

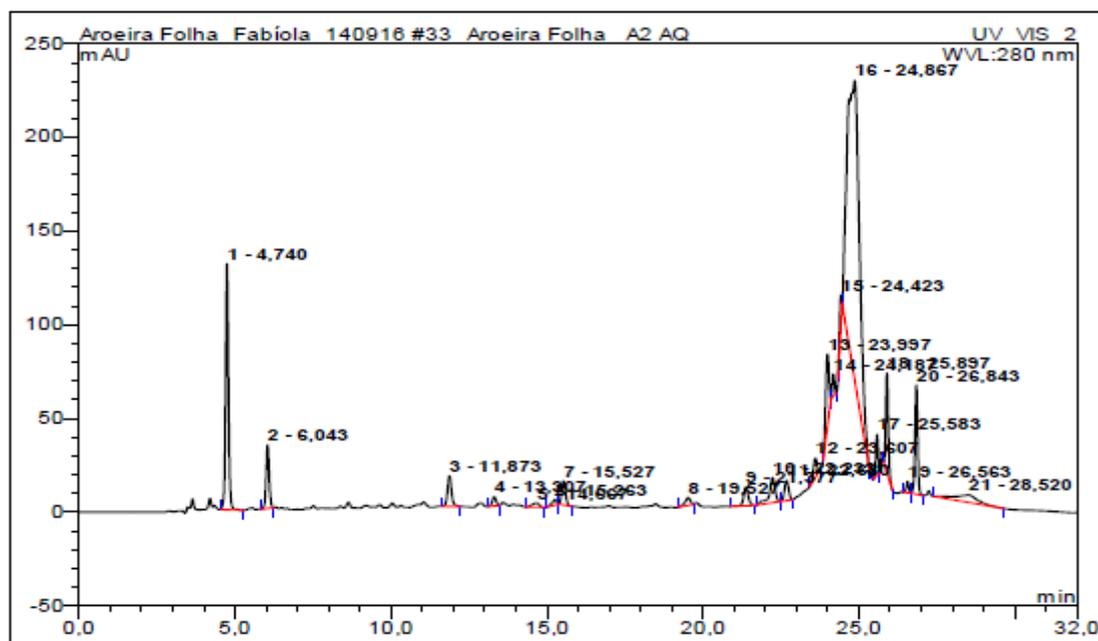


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	5,05	n.a.	57,271	6,679	10,12	n.a.	BMB
2	6,56	n.a.	28,406	3,663	5,55	n.a.	BMB
3	9,29	n.a.	4,581	0,597	0,90	n.a.	BMB
4	9,61	n.a.	9,941	1,363	2,06	n.a.	BMB
5	11,09	n.a.	5,533	1,028	1,56	n.a.	BMB
6	13,02	n.a.	40,137	6,501	9,85	n.a.	BMB
7	14,59	n.a.	11,367	2,702	4,09	n.a.	BMB
8	16,46	n.a.	2,865	0,578	0,88	n.a.	BMB
9	16,77	n.a.	7,566	1,165	1,76	n.a.	BMB
10	20,95	n.a.	2,671	0,559	0,85	n.a.	BMB
11	22,48	n.a.	15,693	2,766	4,19	n.a.	BMB
12	23,75	n.a.	37,321	6,390	9,68	n.a.	BMB
13	24,35	n.a.	44,008	5,241	7,94	n.a.	BMB
14	24,63	n.a.	36,377	2,994	4,53	n.a.	BMB
15	24,96	n.a.	38,863	10,119	15,33	n.a.	bMb
16	25,07	n.a.	15,345	4,267	6,46	n.a.	bMB
17	25,96	n.a.	17,695	1,916	2,90	n.a.	BMB
18	26,31	n.a.	33,101	5,356	8,11	n.a.	bMB
19	26,85	n.a.	9,590	1,026	1,55	n.a.	BMB
20	27,17	n.a.	11,418	1,110	1,68	n.a.	BMB
Total:			429,750	66,020	100,00	0,000	

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 2 - Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado em AL - Maceió.

Sample Name:	Aroeira Folha_ A2	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	BA2	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	unknown	Wavelength:	280.0
Control Program:	Aroeira MET2	Bandwidth:	4
Quantif. Method:	Aroeira	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	16/01/2016 10:48	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	32,00	Sample Amount:	1,0000

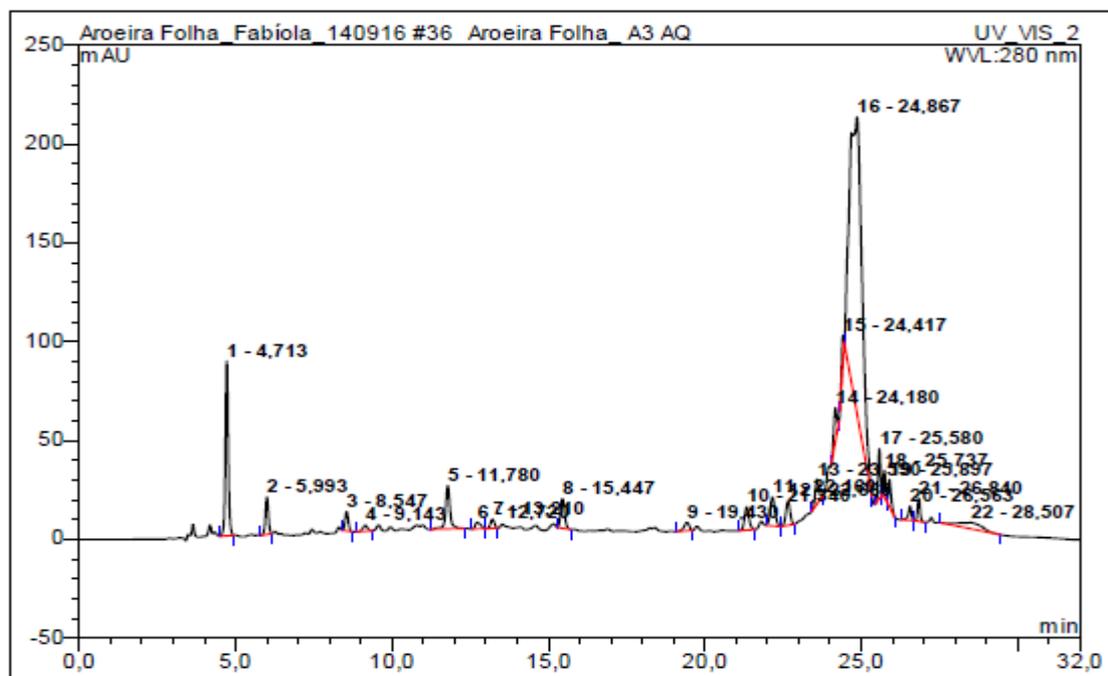


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	4,74	n.a.	131,365	13,987	11,13	n.a.	BMB
2	6,04	n.a.	33,755	3,898	3,10	n.a.	BMB
3	11,87	n.a.	16,268	2,445	1,95	n.a.	BMB
4	13,31	n.a.	4,851	0,687	0,55	n.a.	BMB
5	14,67	n.a.	2,249	0,566	0,45	n.a.	BMB
6	15,26	n.a.	2,954	0,501	0,40	n.a.	BMB
7	15,53	n.a.	12,751	1,860	1,48	n.a.	bMB
8	19,53	n.a.	4,193	0,816	0,65	n.a.	BMB
9	21,38	n.a.	9,977	1,730	1,38	n.a.	BMB
10	22,23	n.a.	13,239	2,872	2,29	n.a.	BMB
11	22,68	n.a.	10,703	1,658	1,32	n.a.	BMB
12	23,61	n.a.	9,956	1,324	1,05	n.a.	BMB
13	24,00	n.a.	37,624	4,620	3,68	n.a.	BMB
14	24,19	n.a.	11,568	0,963	0,77	n.a.	bMB
15	24,42	n.a.	15,636	1,251	1,00	n.a.	BMB
16	24,87	n.a.	159,873	70,052	55,74	n.a.	bMB
17	25,58	n.a.	21,808	1,871	1,49	n.a.	BMB
18	25,90	n.a.	52,961	4,963	3,95	n.a.	BMB
19	26,56	n.a.	5,990	0,560	0,45	n.a.	BMB
20	26,84	n.a.	58,286	5,694	4,53	n.a.	BMB
21	28,52	n.a.	3,992	3,354	2,67	n.a.	BMB
Total:			620,000	125,674	100,00	0,000	

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 3 - Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado em PI - Teresina.

Sample Name:	Aroeira Folha_ A3	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	BA3	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	unknown	Wavelength:	280.0
Control Program:	Aroeira MET2	Bandwidth:	4
Quantif. Method:	Aroeira	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	16/01/2016 11:22	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	32,00	Sample Amount:	1,0000

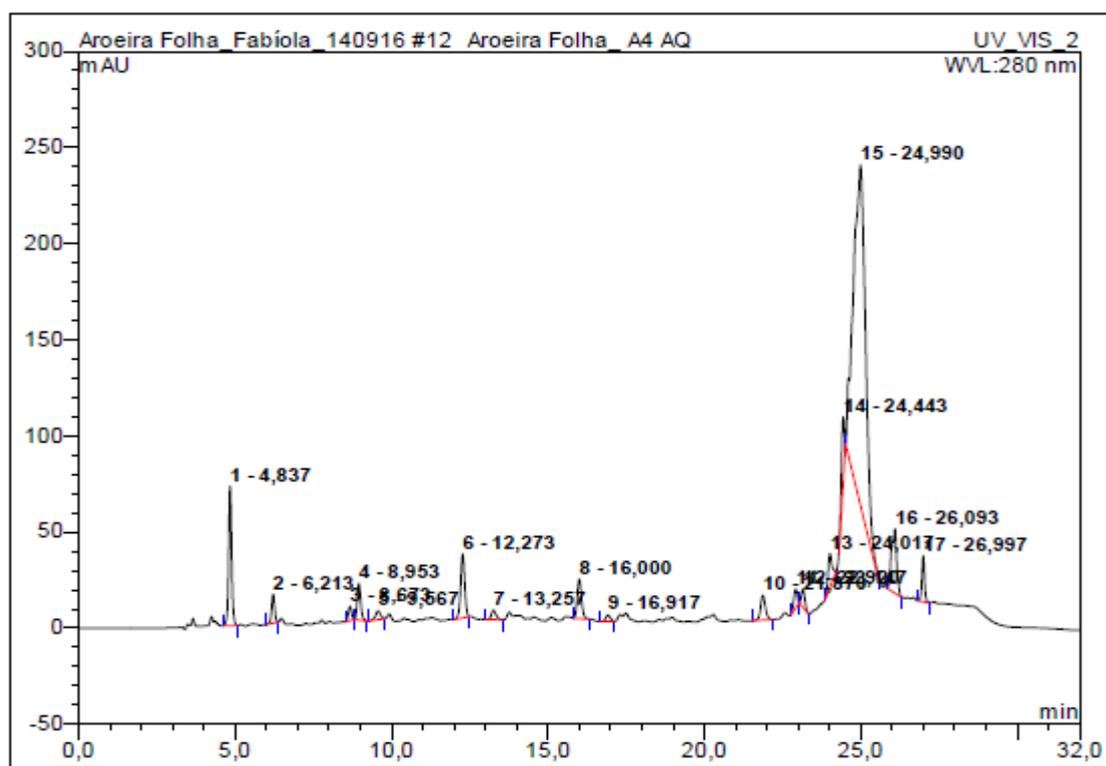


No.	Ret. Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %	Amount	Type
1	4,71	n.a.	88,424	9,334	8,63	n.a.	BMB
2	5,99	n.a.	18,885	2,119	1,96	n.a.	BMB
3	8,55	n.a.	9,763	1,168	1,08	n.a.	BMB
4	9,14	n.a.	2,999	0,524	0,48	n.a.	BMB
5	11,78	n.a.	21,844	3,700	3,42	n.a.	BMB
6	12,72	n.a.	3,231	0,651	0,60	n.a.	BMB
7	13,21	n.a.	4,504	0,659	0,61	n.a.	BMB
8	15,45	n.a.	14,909	2,207	2,04	n.a.	BMB
9	19,43	n.a.	4,125	0,816	0,75	n.a.	BMB
10	21,34	n.a.	11,759	1,979	1,83	n.a.	BMB
11	22,16	n.a.	14,482	2,573	2,38	n.a.	BMB
12	22,66	n.a.	12,075	1,909	1,77	n.a.	BMB
13	23,59	n.a.	12,291	1,714	1,59	n.a.	BMB
14	24,18	n.a.	16,530	1,898	1,76	n.a.	BMB
15	24,42	n.a.	13,918	1,100	1,02	n.a.	BMB
16	24,87	n.a.	149,927	66,532	61,54	n.a.	bMB
17	25,58	n.a.	25,043	2,162	2,00	n.a.	BMB
18	25,74	n.a.	13,726	0,999	0,92	n.a.	bMB
19	25,90	n.a.	13,415	1,416	1,31	n.a.	bMB
20	26,56	n.a.	7,144	0,844	0,78	n.a.	BMB
21	26,84	n.a.	11,791	1,105	1,02	n.a.	BMB
22	28,51	n.a.	3,222	2,694	2,49	n.a.	BMB
Total:			474,006	108,105	100,00	0,000	

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 4 - Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado na PB - João Pessoa.

Sample Name:	Aroeira Folha_A4	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	BA4	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	unknown	Wavelength:	280.0
Control Program:	Aroeira MET2	Bandwidth:	4
Quantif. Method:	Aroeira	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	16/01/2016 11:56	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	32,00	Sample Amount:	1,0000

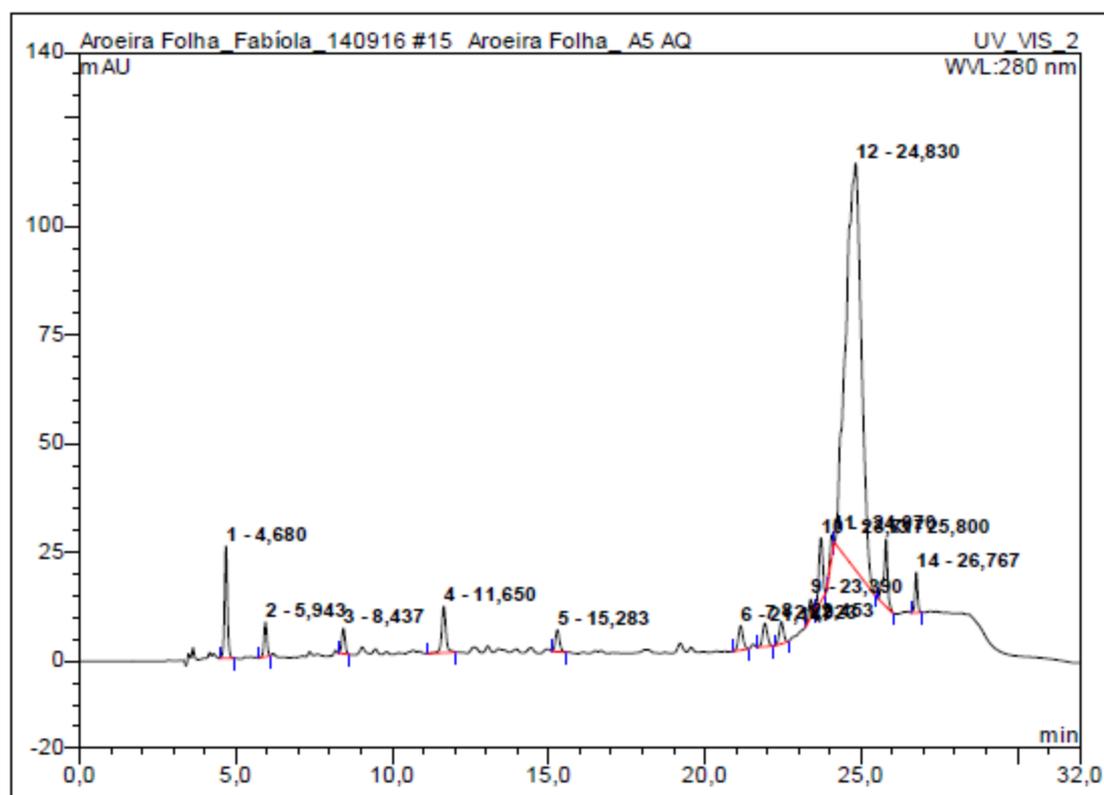


No.	Ret. Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %	Amount	Type
1	4,84	n.a.	72,597	8,104	6,69	n.a.	BMB
2	6,21	n.a.	15,057	1,704	1,41	n.a.	BMB
3	8,67	n.a.	7,516	0,912	0,75	n.a.	BMB
4	8,95	n.a.	19,052	2,523	2,08	n.a.	bMB
5	9,57	n.a.	4,531	0,841	0,69	n.a.	BMB
6	12,27	n.a.	33,274	4,985	4,11	n.a.	BMB
7	13,26	n.a.	4,969	0,877	0,72	n.a.	BMB
8	16,00	n.a.	20,515	3,269	2,70	n.a.	BMB
9	16,92	n.a.	3,175	0,526	0,43	n.a.	BMB
10	21,87	n.a.	12,946	2,303	1,90	n.a.	BMB
11	22,92	n.a.	9,729	1,299	1,07	n.a.	BMB
12	23,15	n.a.	9,269	1,213	1,00	n.a.	bMB
13	24,02	n.a.	17,344	2,515	2,08	n.a.	BMB
14	24,44	n.a.	33,093	3,758	3,10	n.a.	BMB
15	24,99	n.a.	176,753	77,572	64,03	n.a.	bMB
16	26,09	n.a.	33,438	6,410	5,29	n.a.	BMB
17	27,00	n.a.	23,813	2,341	1,93	n.a.	BMB
Total:			497,072	121,153	100,00	0,000	

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5 - Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado no MA - São Luís.

Sample Name:	Aroeira Folha_A5	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	BA5	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	unknown	Wavelength:	280.0
Control Program:	Aroeira MET2	Bandwidth:	4
Quantif. Method:	Aroeira	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	16/01/2016 11:30	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	32,00	Sample Amount:	1,0000

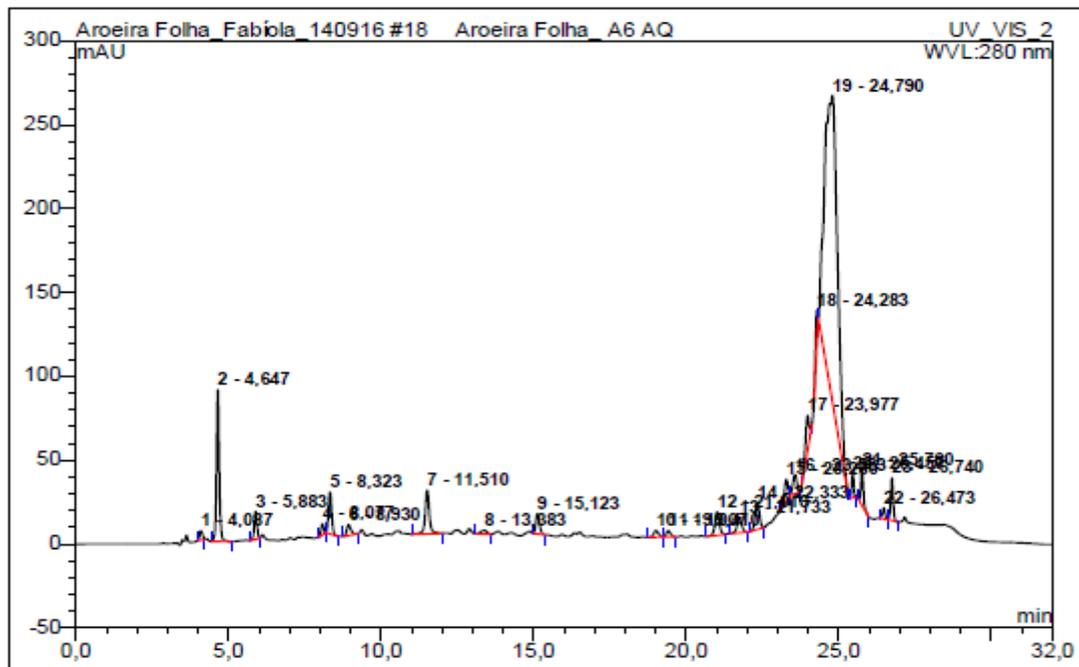


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	4,68	n.a.	25,791	2,746	3,94	n.a.	BMB
2	5,94	n.a.	7,990	0,879	1,26	n.a.	BMB
3	8,44	n.a.	5,806	0,713	1,02	n.a.	BMB
4	11,65	n.a.	10,679	1,681	2,42	n.a.	BMB
5	15,28	n.a.	4,983	0,752	1,08	n.a.	BMB
6	21,15	n.a.	5,619	0,961	1,38	n.a.	BMB
7	21,92	n.a.	5,330	0,929	1,33	n.a.	BMB
8	22,45	n.a.	5,031	0,810	1,16	n.a.	BMB
9	23,39	n.a.	4,256	0,562	0,81	n.a.	BMB
10	23,72	n.a.	14,557	2,137	3,07	n.a.	BMB
11	24,07	n.a.	4,950	0,582	0,84	n.a.	BMB
12	24,83	n.a.	93,581	53,659	77,08	n.a.	bMB
13	25,80	n.a.	15,512	2,316	3,33	n.a.	BMB
14	26,77	n.a.	9,286	0,884	1,27	n.a.	BMB
Total:			213,371	69,611	100,00	0,000	

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 6 - Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado em PE - Recife.

Sample Name:	Aroeira Folha_ A6	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	BA6	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	unknown	Wavelength:	280.0
Control Program:	Aroeira MET2	Bandwidth:	4
Quantif. Method:	Aroeira	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	16/01/2016 12:04	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	32,00	Sample Amount:	1,0000

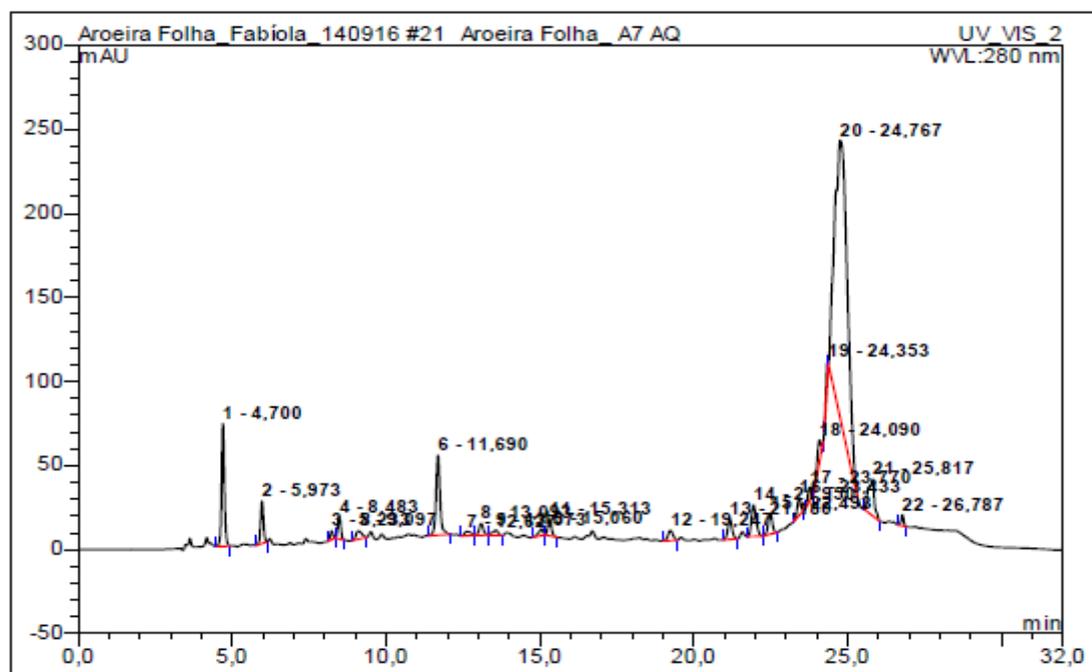


No.	Ret. Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %	Amount	Type
1	4,09	n.a.	5,550	0,608	0,46	n.a.	BMB
2	4,65	n.a.	90,565	9,592	7,26	n.a.	BMB
3	5,88	n.a.	16,623	1,760	1,33	n.a.	BMB
4	8,08	n.a.	6,638	0,683	0,52	n.a.	BMB
5	8,32	n.a.	25,004	3,093	2,34	n.a.	BMB
6	8,93	n.a.	6,400	1,026	0,78	n.a.	BMB
7	11,51	n.a.	26,123	4,226	3,20	n.a.	BMB
8	13,38	n.a.	2,262	0,517	0,39	n.a.	BMB
9	15,12	n.a.	11,974	1,721	1,30	n.a.	BMB
10	19,01	n.a.	3,939	0,708	0,54	n.a.	BMB
11	19,41	n.a.	3,742	0,591	0,45	n.a.	BMB
12	21,01	n.a.	13,954	2,383	1,80	n.a.	BMB
13	21,73	n.a.	9,234	1,667	1,26	n.a.	BMB
14	22,33	n.a.	15,815	2,570	1,95	n.a.	BMB
15	23,28	n.a.	12,932	1,677	1,27	n.a.	BMB
16	23,56	n.a.	11,192	1,639	1,24	n.a.	bMB
17	23,98	n.a.	20,497	3,023	2,29	n.a.	BMB
18	24,28	n.a.	20,573	1,912	1,45	n.a.	BMB
19	24,79	n.a.	182,593	86,427	65,43	n.a.	BMB
20	25,46	n.a.	13,964	1,102	0,83	n.a.	BMB
21	25,76	n.a.	21,505	2,083	1,58	n.a.	BMB
22	26,47	n.a.	6,798	0,678	0,51	n.a.	BMB
23	26,74	n.a.	25,378	2,407	1,82	n.a.	BMB
Total:			553,256	132,092	100,00	0,000	

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 7- Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado no CE - Fortaleza.

Sample Name:	Aroeira Folha_ A7	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	BA7	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	unknown	Wavelength:	280.0
Control Program:	Aroeira MET2	Bandwidth:	4
Quantif. Method:	Aroeira	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	16/01/2016 12:38	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	32,00	Sample Amount:	1,0000

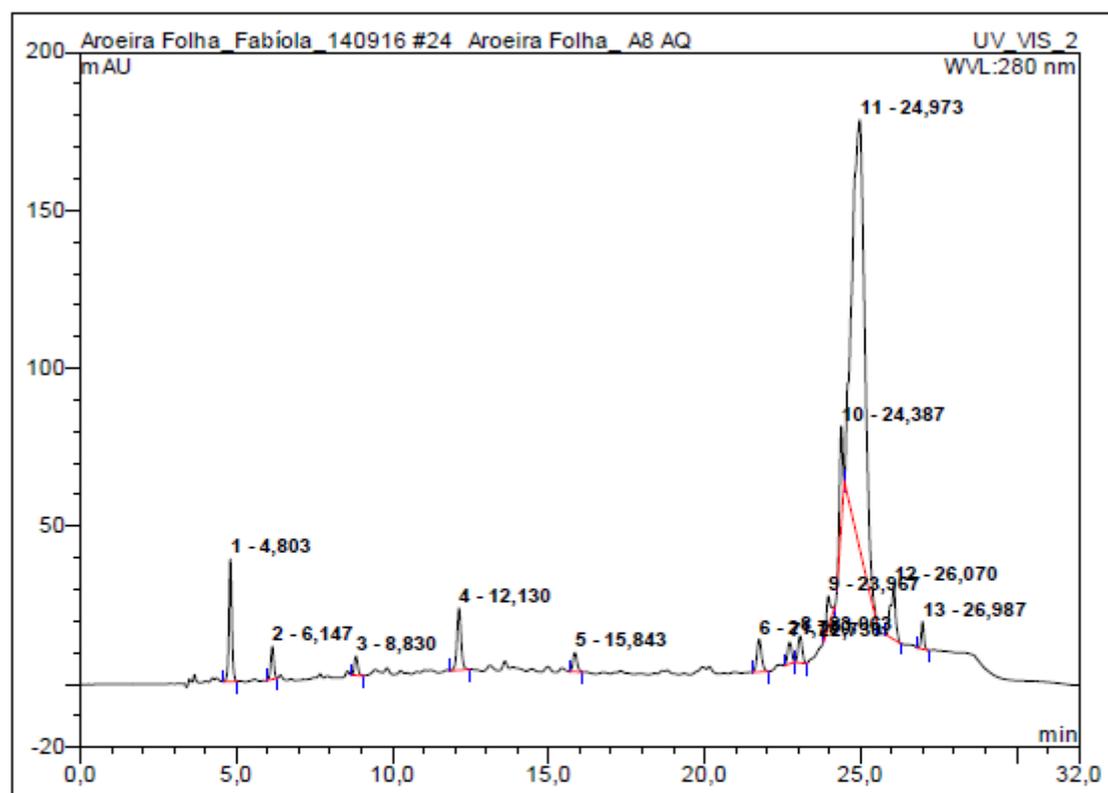


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	4,70	n.a.	73,045	7,810	6,32	n.a.	BMB
2	5,97	n.a.	25,146	2,730	2,21	n.a.	BMB
3	8,23	n.a.	5,082	0,544	0,44	n.a.	BMB
4	8,48	n.a.	13,026	1,514	1,23	n.a.	BMB
5	9,10	n.a.	4,959	1,093	0,88	n.a.	BMB
6	11,69	n.a.	47,380	7,270	5,88	n.a.	BMB
7	12,63	n.a.	2,499	0,573	0,46	n.a.	BMB
8	13,09	n.a.	6,947	1,067	0,86	n.a.	BMB
9	13,57	n.a.	3,016	0,651	0,53	n.a.	BMB
10	15,06	n.a.	4,053	0,676	0,55	n.a.	BMB
11	15,31	n.a.	9,914	1,363	1,10	n.a.	BMB
12	19,25	n.a.	6,045	1,131	0,91	n.a.	BMB
13	21,18	n.a.	11,840	1,946	1,57	n.a.	BMB
14	21,95	n.a.	18,581	3,327	2,69	n.a.	BMB
15	22,49	n.a.	12,218	1,918	1,55	n.a.	BMB
16	23,43	n.a.	10,469	1,429	1,16	n.a.	BMB
17	23,77	n.a.	8,394	1,038	0,84	n.a.	BMB
18	24,09	n.a.	13,086	1,844	1,49	n.a.	BMB
19	24,35	n.a.	10,220	0,967	0,78	n.a.	BMB
20	24,77	n.a.	165,525	79,253	64,14	n.a.	BMB
21	25,82	n.a.	21,793	4,810	3,89	n.a.	BMB
22	26,79	n.a.	6,601	0,616	0,50	n.a.	BMB
Total:			479,840	123,570	100,00	0,000	

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 8- Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado no RN - Natal.

Sample Name:	Aroeira Folha_ A8	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	BA8	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	unknown	Wavelength:	280.0
Control Program:	Aroeira MET2	Bandwidth:	4
Quantif. Method:	Aroeira	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	16/01/2016 13:12	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	32,00	Sample Amount:	1,0000

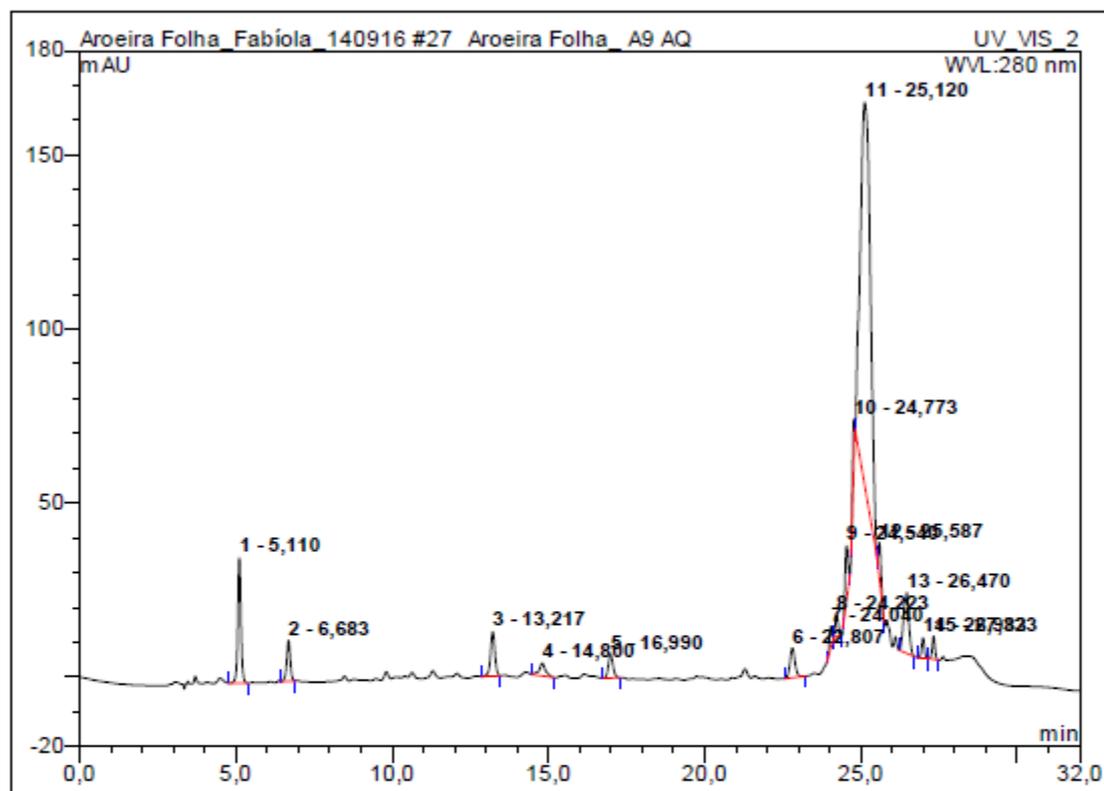


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	4,80	n.a.	38,722	4,236	4,92	n.a.	BMB
2	6,15	n.a.	10,412	1,191	1,38	n.a.	BMB
3	8,83	n.a.	6,053	0,773	0,90	n.a.	BMB
4	12,13	n.a.	19,605	3,004	3,49	n.a.	BMB
5	15,84	n.a.	6,077	0,939	1,09	n.a.	BMB
6	21,75	n.a.	10,371	1,789	2,08	n.a.	BMB
7	22,73	n.a.	6,850	1,049	1,22	n.a.	BMB
8	23,06	n.a.	8,479	1,292	1,50	n.a.	bMB
9	23,97	n.a.	9,794	1,447	1,68	n.a.	BMB
10	24,39	n.a.	30,938	3,591	4,17	n.a.	BMB
11	24,97	n.a.	135,646	62,745	72,91	n.a.	bMB
12	26,07	n.a.	17,020	3,151	3,66	n.a.	BMB
13	26,99	n.a.	8,723	0,857	1,00	n.a.	BMB
Total:			308,691	86,063	100,00	0,000	

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 9- Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado em SE - Aracaju.

Sample Name:	Aroeira Folha_A9	Injection Volume:	20,0
Vial Number:	BR9	Channel:	UV_VIS_2
Sample Type:	unknown	Wavelength:	280.0
Control Program:	Aroeira MET2	Bandwidth:	4
Quantif. Method:	Aroeira	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	16/01/2016 13:56	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	32,00	Sample Amount:	1,0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	5,11	n.a.	36,025	4,318	6,88	n.a.	BMB
2	6,68	n.a.	11,719	1,556	2,48	n.a.	BMB
3	13,22	n.a.	12,782	2,085	3,32	n.a.	BMB
4	14,80	n.a.	3,666	0,859	1,37	n.a.	BMB
5	16,99	n.a.	6,719	1,171	1,86	n.a.	BMB
6	22,81	n.a.	8,524	1,584	2,52	n.a.	BMB
7	24,04	n.a.	6,119	0,648	1,03	n.a.	BMB
8	24,22	n.a.	6,217	0,652	1,04	n.a.	bMB
9	24,54	n.a.	15,523	1,687	2,69	n.a.	BMB
10	24,77	n.a.	13,195	1,065	1,70	n.a.	BMB
11	25,12	n.a.	110,149	41,431	65,97	n.a.	bMB
12	25,59	n.a.	10,132	1,084	1,73	n.a.	bMB
13	26,47	n.a.	17,451	3,389	5,40	n.a.	BMB
14	26,98	n.a.	5,859	0,619	0,99	n.a.	BMB
15	27,32	n.a.	6,599	0,659	1,05	n.a.	bMB
Total:			270,679	62,808	100,00	0,000	

Fonte: Dados da pesquisa

APÊNDICE B - Cromatogramas Obtidos por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) dos Extratos de *S. terebinthifolius*

Figura 1 - Cromatograma obtidos extratos de *S. terebinthifolius* coletado na BA - Salvador.

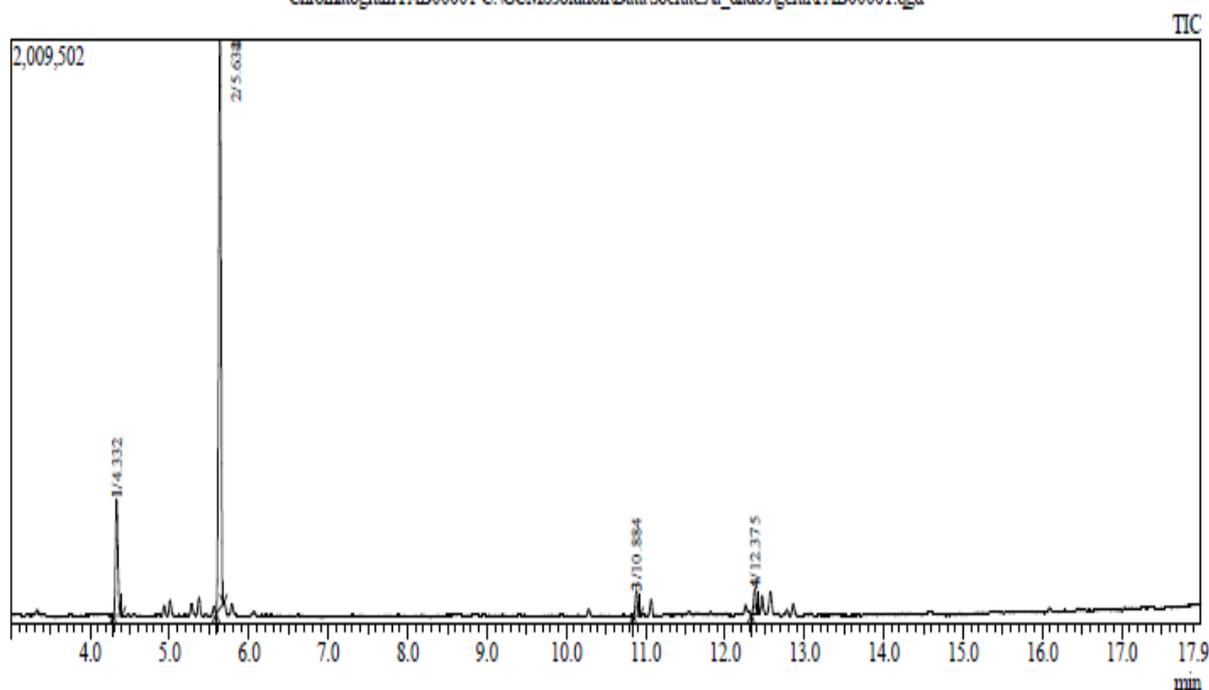


INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
Unidade de Caracterização e Análise / UNICAL | www.ufpb.br/ipefarm | unical@lf.ufpb.br | 11.2015
Arquivo: FAB00001.qgd / Data: 04/11/2015

Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas: Modelo: GCMS-QP2010 Ultra | Marca: Shimadzu
Coluna: marca: RTX-SMS capilar (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane)
Tamanho: 30 m (comprimento) / 0.25 mm de Diâmetro Interno / 0.25 µm df

Chromatogram FAB00001 C:\GCMSsolution\Data\socrates\1a_dados\geral\FAB00001.qgd



Peak Report TIC

Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Name	Base m/z
1	4.332	4.290	4.400	829665	16.02	1R- alpha -Pinene	93.10
2	5.634	5.585	5.680	4001749	77.27	Limonene	68.10
3	10.884	10.840	10.930	170203	3.29	Copaene	119.10
4	12.375	12.330	12.420	177484	3.43	Cubebene <beta->	161.15
				5179101	100.00		

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 2 - Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado em AL - Maceió.

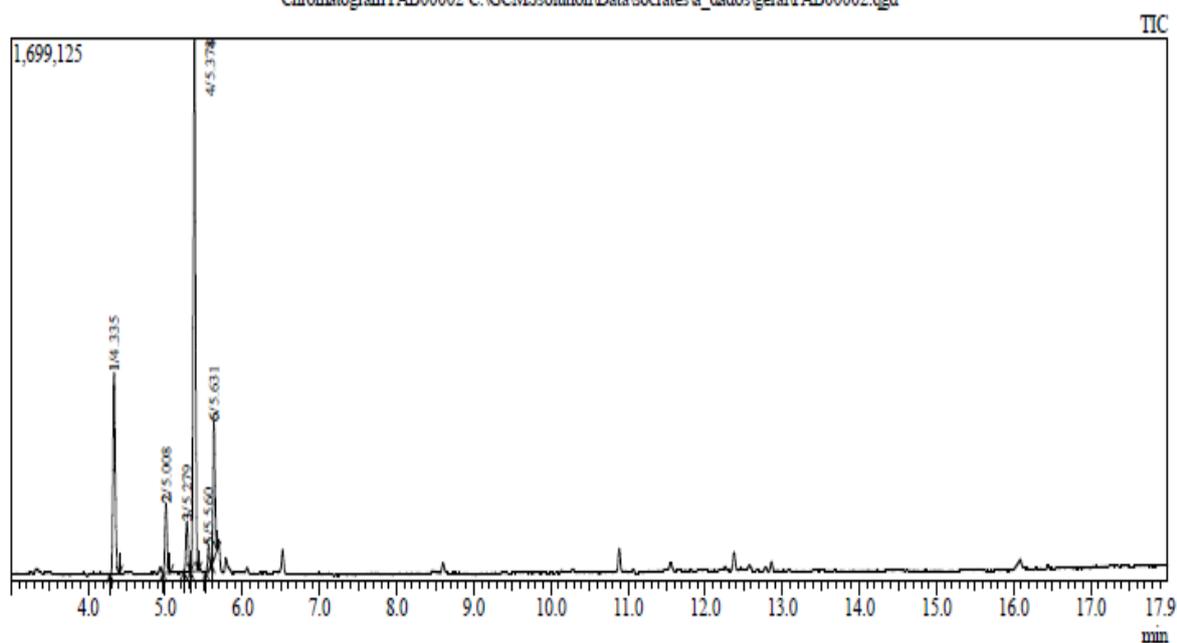


INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
 Unidade de Caracterização e Análise / UNICAL | www.ufpb.br/ipefarm | unical@lhf.ufpb.br | 11.2015
 Arquivo: FAB00002.qgd / Data: 04/11/2015

Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas: Modelo: GCMS-QP2010 Ultra | Marca: Shimadzu
 Coluna: marca: RTX-5MS capilar (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane)
 Tamanho: 30 m (comprimento) / 0.25 mm de Diâmetro Interno / 0.25 um df

Chromatogram FAB00002 C:\GCMSolution\Data\socrates\l_dados\geral\FAB00002.qgd



Peak Report TIC

Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Name	Base m/z
1	4.335	4.280	4.405	1305206	20.66	1R- alpha -Pinene	93.10
2	5.008	4.970	5.060	407613	6.45	Myrcene	41.10
3	5.279	5.240	5.325	300527	4.76	Phellandrene <alpha->	93.05
4	5.378	5.325	5.430	3399502	53.80	Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl-, (1S	93.10
5	5.560	5.525	5.600	122896	1.94	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	119.10
6	5.631	5.600	5.670	783214	12.39	D-Limonene	68.10
				6318958	100.00		

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 3 - Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado em PI - Teresina.

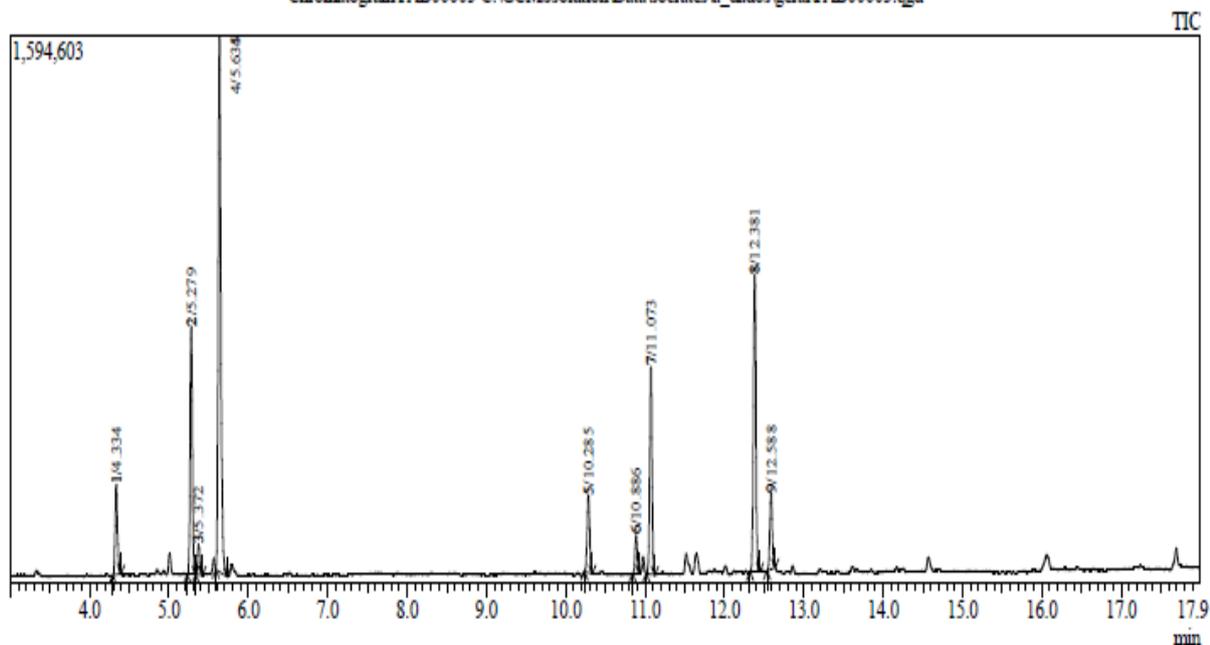


INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
 Unidade de Caracterização e Análise / UNICAL | www.ufpb.br/ipefarm | unical@lf.ufpb.br | 11.2015
 Arquivo: FAB00003.qgd / Data: 04/11/2015

Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas: Modelo: GCMS-QP2010 Ultra | Marca: Shimadzu
 Coluna: marca: RTX-SMS capilar (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane)
 Tamanho: 30 m (comprimento) / 0.25 mm de Diâmetro Interno / 0.25 µm df

Chromatogram FAB00003 C:\GCMSsolution\Data\socrates\la_dados\geral\FAB00003.qgd



Peak Report TIC

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Name	Base m/z
1	4.334	4.290	4.395	531861	5.36	1R- α -Pinene	93.10
2	5.279	5.230	5.335	1396448	14.07	Phellandrene α->	93.10
3	5.372	5.335	5.420	169529	1.71	3-Carene	93.10
4	5.635	5.590	5.735	3578021	36.06	Limonene	68.10
5	10.285	10.235	10.335	475904	4.80	Elemene δ->	121.10
6	10.886	10.840	10.930	215226	2.17	Copaene	119.10
7	11.073	11.015	11.125	1228431	12.38	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-me	81.10
8	12.381	12.320	12.445	1861377	18.76	Cadinene γ->	161.15
9	12.588	12.535	12.640	465235	4.69	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methyle	121.10
				9922032	100.00		

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 4 - Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado na PB - João Pessoa.

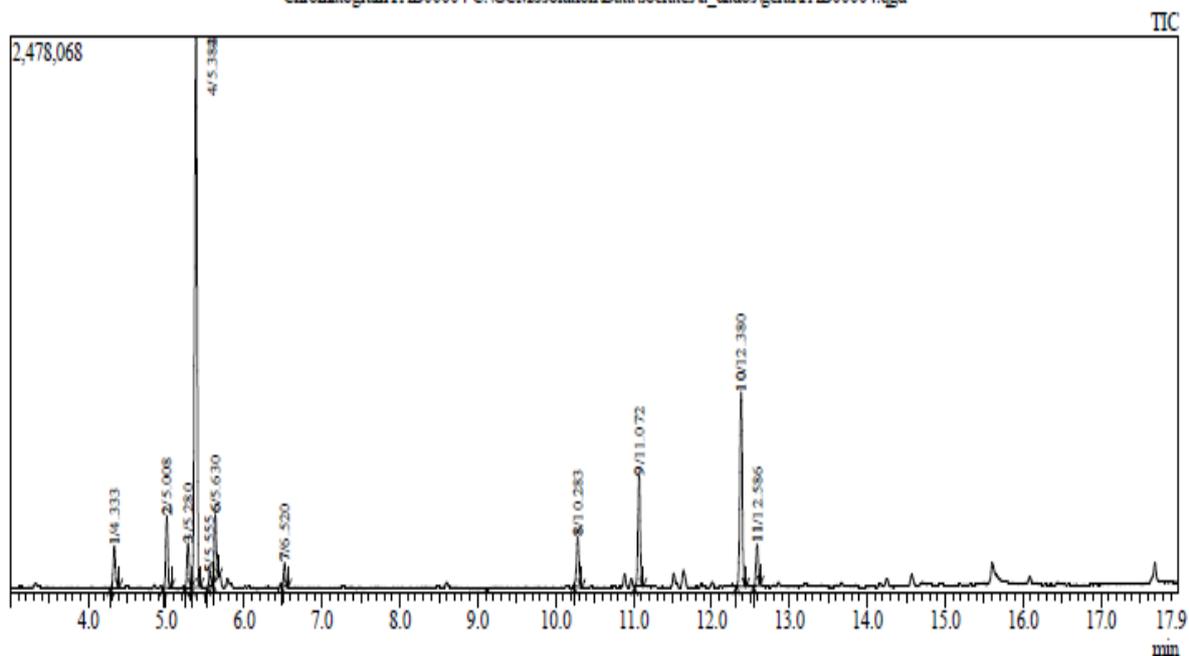


INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
 Unidade de Caracterização e Análise / UNICAL | www.ufpb.br/ipefarm | unical@lf.ufpb.br | 11.2015
 Arquivo: FAB00004.qgd / Data: 04/11/2015

Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas: Modelo: GCMS-QP2010 Ultra | Marca: Shimadzu
 Coluna: marca: RTX-5MS capilar (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane)
 Tamanho: 30 m (comprimento) / 0.25 mm de Diâmetro Interno / 0.25 um df

Chromatogram FAB00004 C:\GCMSolution\Data\socrates\l_dados\geral\FAB00004.qgd



Peak Report TIC

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Name	Base m/z
1	4.333	4.285	4.395	384538	3.40	1R- α -Pinene	93.10
2	5.008	4.960	5.065	598491	5.29	Myrcene	41.05
3	5.280	5.240	5.325	386836	3.42	Phellandrene α->	93.05
4	5.382	5.325	5.435	5381555	47.52	Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl-, (1S	93.05
5	5.555	5.530	5.600	116879	1.03	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	119.10
6	5.630	5.600	5.675	561594	4.96	D-Limonene	68.10
7	6.520	6.475	6.565	178125	1.57	Bicyclo[4.1.0]hept-2-ene, 3,7,7-trimethyl-	121.10
8	10.283	10.230	10.335	480251	4.24	Elemene δ->	121.10
9	11.072	11.015	11.125	1003363	8.86	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-me	81.05
10	12.380	12.320	12.440	1867594	16.49	Camphene γ->	161.10
11	12.586	12.540	12.625	364420	3.22	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methyl	121.10
				11323646	100.00		

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5 - Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado no MA - São Luís.

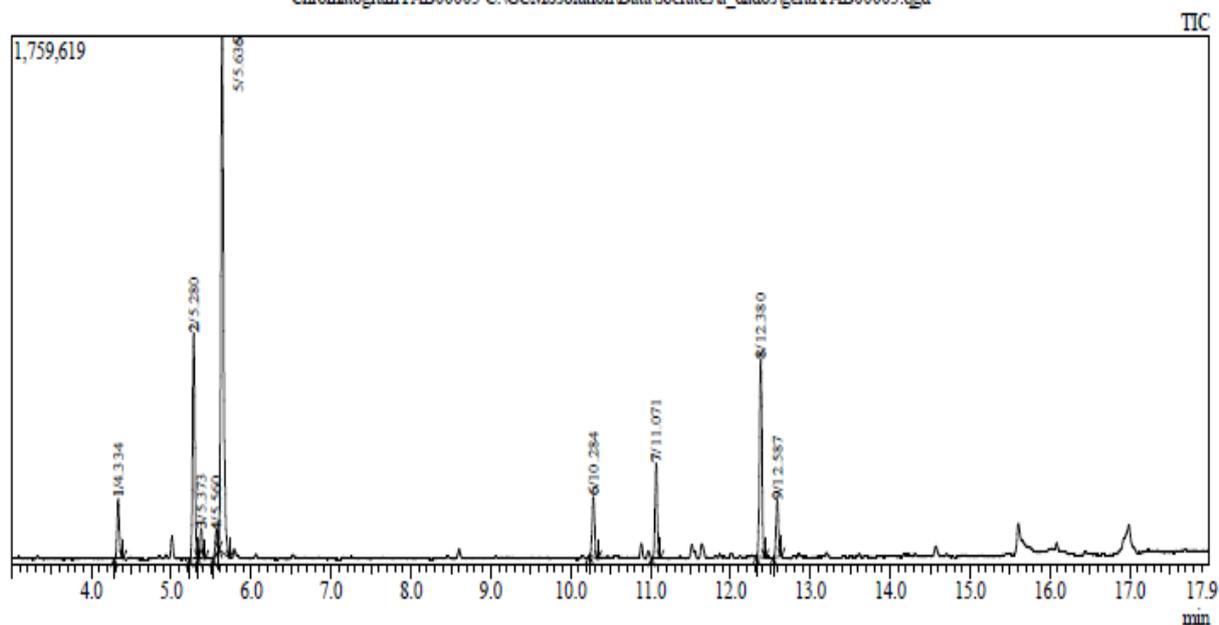


INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
 Unidade de Caracterização e Análise / UNICAL | www.ufpb.br/ipefarm | unical@lf.ufpb.br | 11.2015
 Arquivo: FAB00005.qgd / Data: 04/11/2015

Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas: Modelo: GCMS-QP2010 Ultra | Marca: Shimadzu
 Coluna: marca: RTX-5MS capilar (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane)
 Tamanho: 30 m (comprimento) / 0.25 mm de Diâmetro Interno / 0.25 µm df

Chromatogram FAB00005 C:\GCMSsolution\Data\socrates\l_a_dados\geral\FAB00005.qgd

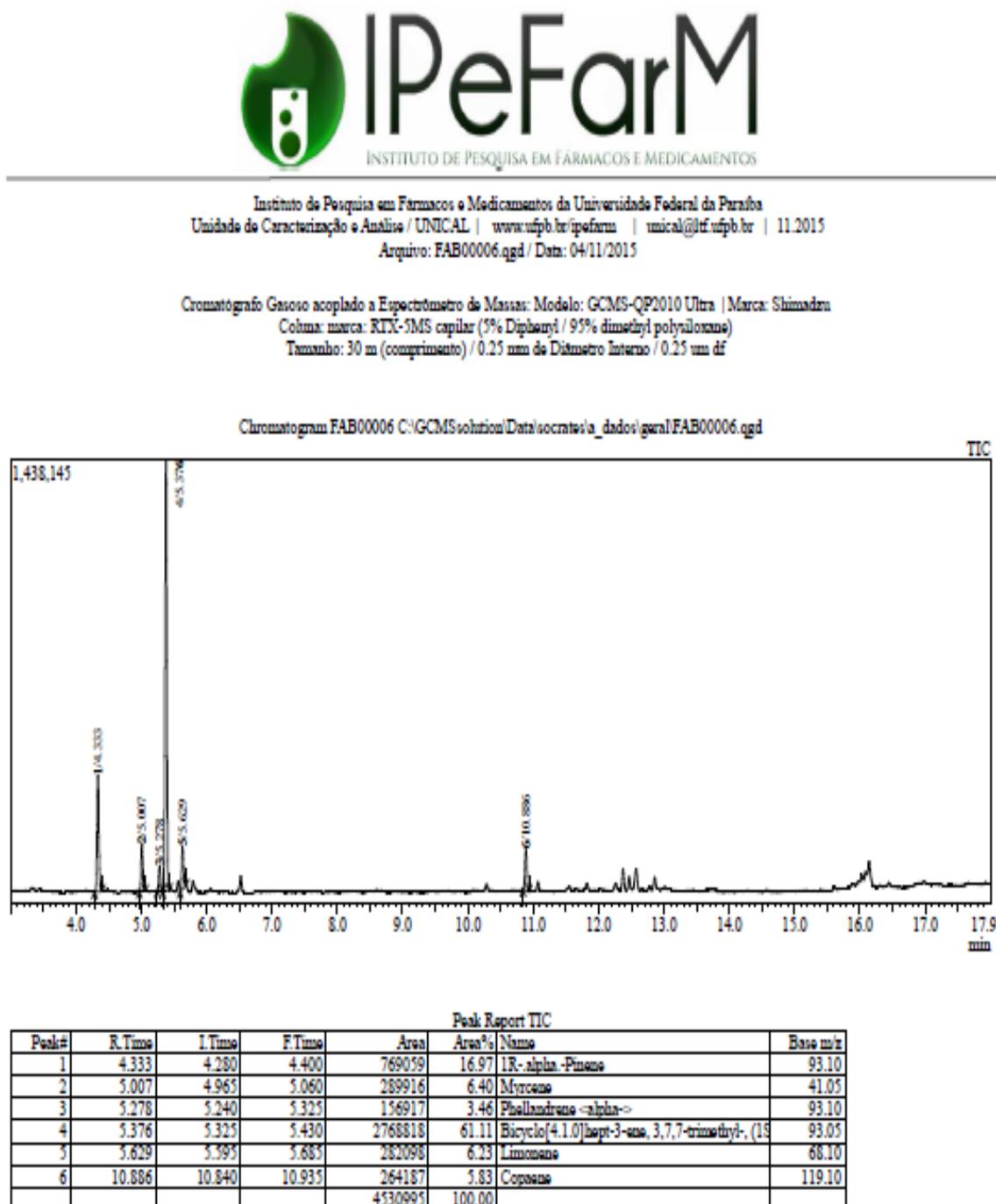


Peak Report TIC

Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Name	Base m/z
1	4.334	4.285	4.395	406095	4.52	1R- α -Pinene	93.05
2	5.280	5.230	5.335	1449725	16.14	Phellandrene α->	93.05
3	5.373	5.335	5.420	189576	2.11	Carene δ-3->	93.10
4	5.560	5.525	5.595	132129	1.47	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	119.10
5	5.636	5.595	5.735	3967044	44.17	D-Limonene	68.10
6	10.284	10.235	10.340	423270	4.71	Elemene δ->	121.10
7	11.071	11.015	11.125	623959	6.95	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methyl-2-propenyl)-	81.05
8	12.380	12.325	12.435	1395552	15.54	Cadinene γ->	161.15
9	12.587	12.535	12.640	393703	4.38	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethyl)-	121.10
				8981053	100.00		

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 6 - Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado em PE - Recife.



Fonte: Dados da pesquisa

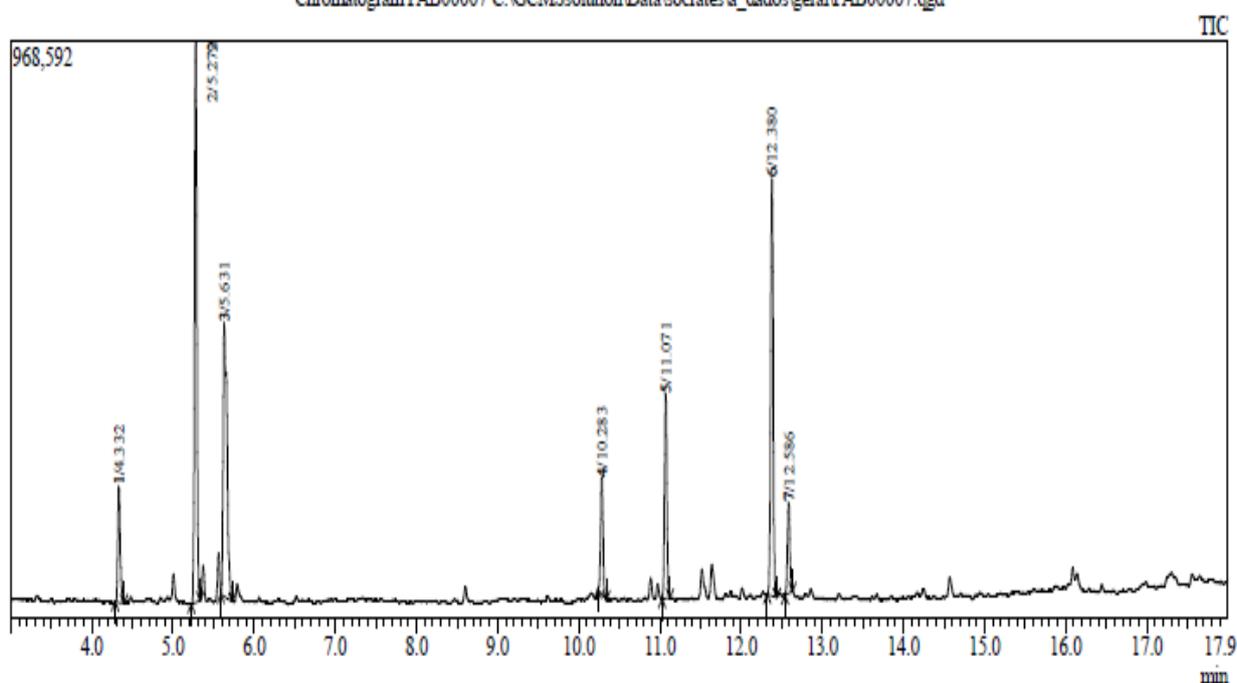
Figura 7- Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado no CE - Fortaleza.



Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
Unidade de Caracterização e Análise / UNICAL | www.ufpb.br/ipefarm | unical@lff.ufpb.br | 11.2015
Arquivo: FAB00007.qgd / Data: 04/11/2015

Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas: Modelo: GCMS-QP2010 Ultra | Marca: Shimadzu
Coluna: marca: RTX-5MS capilar (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane)
Tamanho: 30 m (comprimento) / 0.25 mm de Diâmetro Interno / 0.25 µm df

Chromatogram FAB00007 C:\GCMSolution\Data\socrates\la_dados\geral\FAB00007.qgd



Peak Report TIC

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Name	Base m/z
1	4.332	4.285	4.395	398727	6.01	1R- α -Pinene	93.05
2	5.279	5.225	5.335	1843633	27.80	Phellandrene α->	93.10
3	5.631	5.590	5.730	1514473	22.83	Limonene	68.10
4	10.283	10.235	10.340	405228	6.11	Elemene δ->	121.10
5	11.071	11.025	11.125	676891	10.21	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-me	81.05
6	12.380	12.320	12.440	1484192	22.38	Cubebene β->	161.15
7	12.586	12.540	12.635	309691	4.67	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methyl	121.10
				6632835	100.00		

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 8- Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado no RN - Natal.

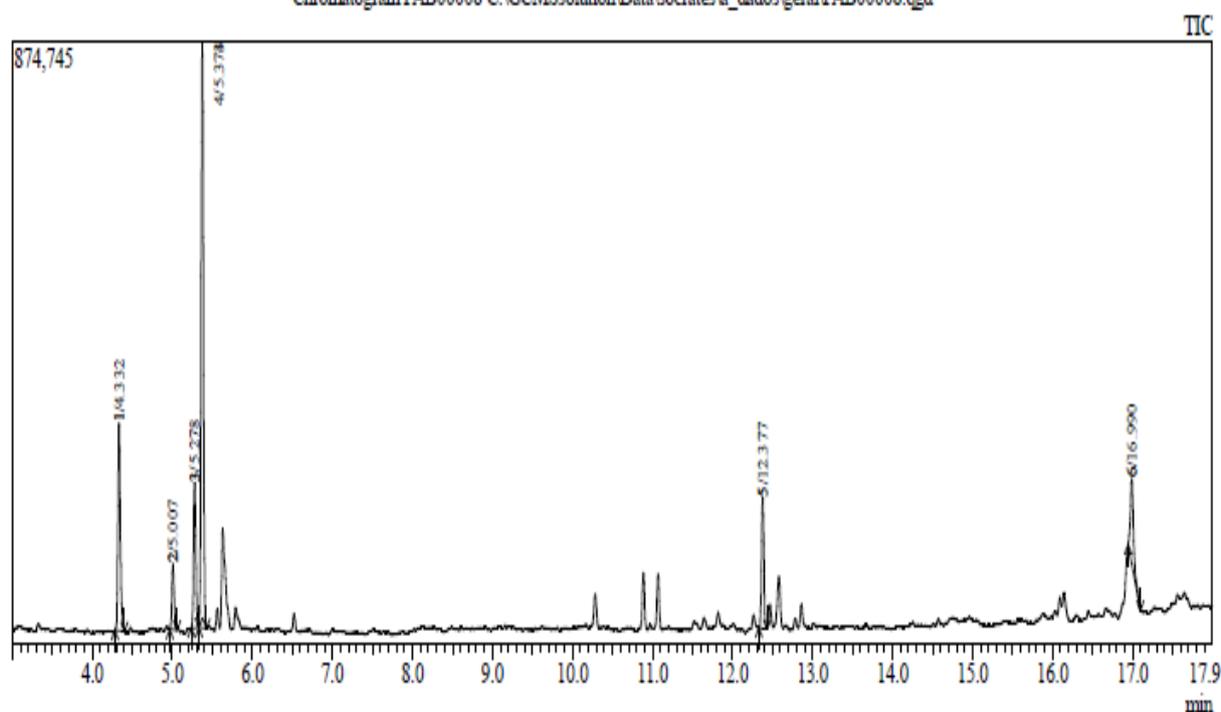


INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
 Unidade de Caracterização e Análise / UNICAL | www.ufpb.br/ipefam | unical@lft.ufpb.br | 11.2015
 Arquivo: FAB00008.qgd / Data: 04/11/2015

Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas: Modelo: GCMS-QP2010 Ultra | Marca: Shimadzu
 Coluna: marca: RTX-5MS capilar (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane)
 Tamanho: 30 m (comprimento) / 0.25 mm de Diâmetro Interno / 0.25 µm df

Chromatogram FAB00008 C:\GCMSolution\Data\socrates\la_dados\geral\FAB00008.qgd



Peak Report TIC

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Name	Base m/z
1	4.332	4.280	4.400	628586	17.55	1R- α -Pinene	93.05
2	5.007	4.965	5.055	175052	4.89	Myrcene	41.05
3	5.278	5.235	5.330	404550	11.30	Phellandrene α->	93.10
4	5.373	5.330	5.425	1658851	46.33	Carene δ-3->	93.05
5	12.377	12.330	12.430	389708	10.88	Cubebene β->	161.15
6	16.990	16.945	17.095	323941	9.05	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexane, 2,6,10,15,19,23-	69.10
				3580688	100.00		

Fonte: Dados da pesquisa

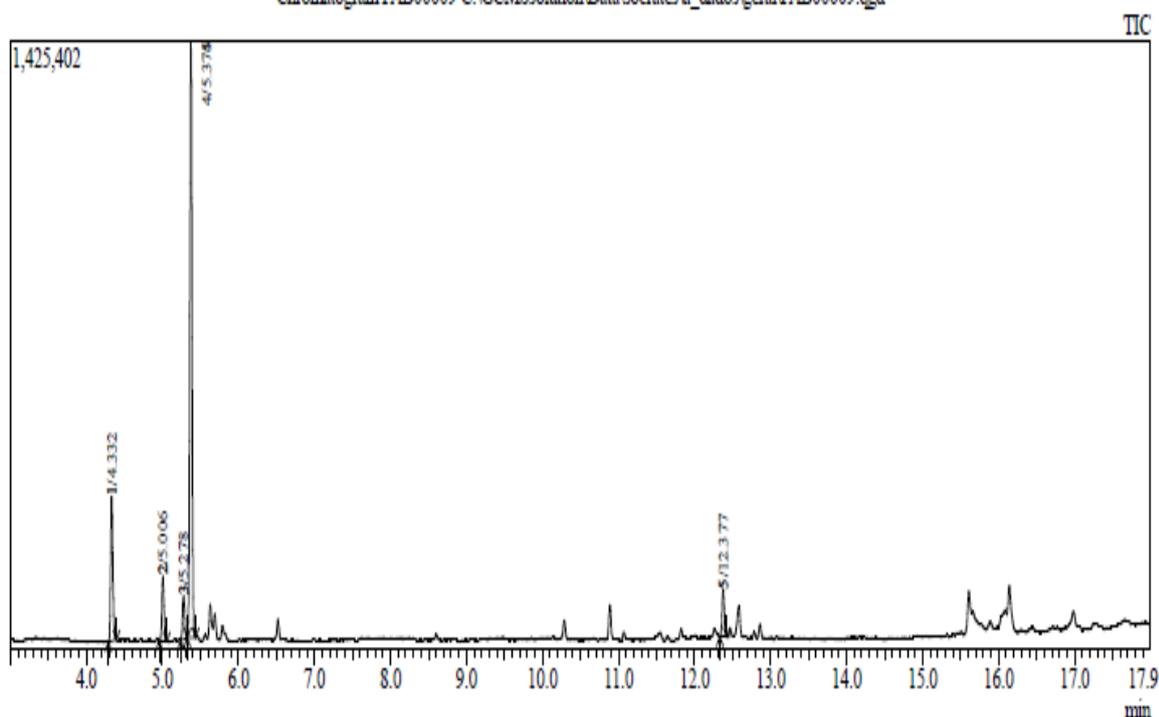
Figura 9- Cromatograma obtido dos extratos de *S. terebinthifolius* coletado em SE - Aracaju.



Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
Unidade de Caracterização e Análise / UNICAL | www.ufpb.br/ipefarm | unical@lf.ufpb.br | 11.2015
Arquivo: FAB00009.qgd / Data: 04/11/2015

Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas: Modelo: GCMS-QP2010 Ultra | Marca: Shimadzu
Coluna: marca: RTX-5MS capilar (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane)
Tamanho: 30 m (comprimento) / 0.25 mm de Diâmetro Interno / 0.25 µm df

Chromatogram FAB00009 C:\GCMSolution\Data\socrates\l_dados\geral\FAB00009.qgd



Peak Report TIC

Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Name	Base m/z
1	4.332	4.290	4.395	681547	16.49	1R- α -Pinene	93.05
2	5.006	4.960	5.055	279529	6.76	Myrcene	41.05
3	5.278	5.240	5.325	199368	4.82	Phellandrene α->	93.05
4	5.375	5.325	5.435	2751929	66.58	Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl-, (1S)	93.05
5	12.377	12.335	12.425	221066	5.35	Cadimene γ->	161.15
				4133439	100.00		

Fonte: Dados da pesquisa

ANEXOS

ANEXO A - Artigo

Revista: Pharmacognosy Magazine

JCR: 1.256

Qualis CAPES: B2

Status: Aceito

Pharmacogn. Mag.

A multibranched peer reviewed journal in the field of Pharmacognosy and Natural Products
www.phcogmag.com | www.phcogmag.net

ORIGINAL ARTICLE

Chromatographic Characterization by Gas Chromatograph Coupled to a Mass Spectrometer of Extracts from Leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi and Chemometric Analysis

Fabiola B. Carneiro¹, Pablo Q. Lopes^{1,2}, Ricardo C. Ramalho², Marcus T. Scott³, Sócrates G. Santos², Luiz A. L. Soares^{1,4}

¹777, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacológicas, Universidade Federal de Pernambuco, ²Departamento de Ciências Farmacológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521, Recife, Pernambuco, ³Departamento de Ciências Farmacológicas, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, ⁴777, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Similares Biotivos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

Submitted: 08-12-2016

Revised: 01-02-2017

Published: ??-??-????

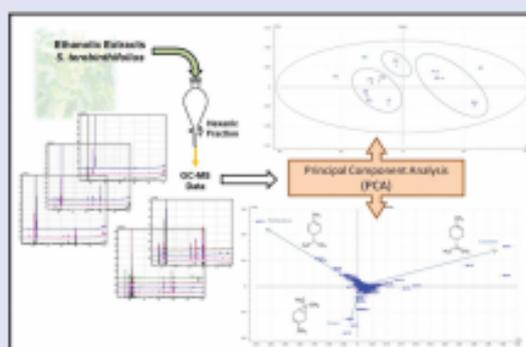
ABSTRACT

Background: *Schinus terebinthifolius* Raddi belongs to Anacardiaceae family and is widely known as "aroeira." This species originates from South America, and its extracts are used in folk medicine due to its therapeutic properties, which include antimicrobial, anti-inflammatory, and antipyretic effects. The complexity and variability of the chemical constitution of the herbal raw material establishes the quality of the respective herbal medicine products. **Objective:** Thus, the purpose of this study was to investigate the variability of the volatile compounds from leaves of *S. terebinthifolius*. **Materials and Methods:** The samples were collected from different states of the Northeast region of Brazil and analyzed with a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC-MS). The collected data were analyzed using multivariate data analysis. **Results:** The samples' chromatograms, obtained by GC-MS, showed similar chemical profiles in a number of peaks, but some differences were observed in the intensity of these analytical markers. The chromatographic fingerprints obtained by GC-MS were suitable for discrimination of the samples; these results along with a statistical treatment (principal component analysis [PCA]) were used as a tool for comparative analysis between the different samples of *S. terebinthifolius*. **Conclusion:** The experimental data show that the PCA used in this study clustered the samples into groups with similar chemical profiles, which builds an appropriate approach to evaluate the similarity in the phytochemical pattern found in the different leaf samples.

Key words: Chemometrics, fingerprint, gas chromatograph coupled to a mass spectrometer, principal component analysis, *Schinus terebinthifolius*

SUMMARY

- The leaf extracts of *Schinus terebinthifolius* were obtained by turbo-extraction
- The extracts were partitioned with hexane and analyzed by gas chromatograph coupled to a mass spectrometer
- The chromatographic data were analyzed using the principal component analysis (PCA)
- The PCA plots showed the main compounds (phellandrene, limonene, and carene), which were used to group the samples from a different geographical location in accordance to their chemical similarity.



Abbreviations used: AL: Alagoas, BA: Bahia, CE: Ceará, CPETEC: Center for Weather Forecasting and Climate Studies, GC-MS: Gas chromatograph coupled to a mass spectrometer, MA: Maranhão, MVA: Multivariate data analysis, PB: Paraíba, PC1: Direction that describes the maximum variance of the original data, PC2: Maximum direction variance of the data in the subspace orthogonal to PC1, PCA: Principal component analysis, PE: Pernambuco, PI: Piauí, RN: Rio Grande do Norte, SE: Sergipe.

Correspondence:

Dr. Luiz A. L. Soares,
Department of Pharmaceutical Sciences,
Laboratory of Pharmacognosy, Federal University
of Pernambuco, Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade
Universitária, 50740-521 Recife, Pernambuco, Brazil.
E-mail: lala.ufpe@gmail.com
DOI: 10.4103/jpm.pm_555_16

Access this article online

Website: www.phcogmag.com

Quick Response Code:



INTRODUCTION

Schinus terebinthifolius Raddi belongs to Anacardiaceae family and originates from South America. It is distributed throughout Brazil and is more commonly known as "aroeira." This plant is widely used in folk medicine for its antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, and analgesic effects and also to treat urogenital diseases.¹⁻⁴

The studies by Cole *et al.*¹⁰ showed that *S. terebinthifolius* mainly presented monoterpenes (85.81%) on its chemical constitution, with the main compounds being: δ -3-carene (30.37%), limonene (17.44%), phellandrene (12.60%), pinene (12.59%), myrcene (5.82%), and *o*-cymene (3.46%); sesquiterpenes are shown in minor proportion (5.34%).

The characteristic fingerprint of the plant samples, obtained by an analytical method, allowed the separation of the largest possible

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: reprints@medknow.com

Cite this article as: Carneiro FB, Lopes PQ, Ramalho RC, Scott MT, Santos SG, Soares LA. Chromatographic characterization by gas chromatograph coupled to a mass spectrometer of extracts from leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi and chemometric analysis. *Phcog Mag* 2017;XX:XX-XX.

ANEXO B - Ficha de identificação botânica dos materiais vegetais coletados na BA - Bahia (1), AL - Alagoas (2), PI - Piauí (3), PB - Paraíba (4), MA - Maranhão (5), PE - Pernambuco (6), CE -Ceará (7), RN – Rio Grande do Norte (8) e SE - Sergipe (9).



Secretaria de
Agricultura e
Reforma Agrária



HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB Nº 101/2015

	Nº de Tombo	Nome popular	Família	Nome Científico	Identificada por
1	s/n	Aroeira da praia	Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	A. Bocage
2	s/n	Aroeira da praia	Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	A. Bocage
3	s/n	Aroeira da praia	Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	A. Bocage
4	s/n	Aroeira da praia	Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	A. Bocage
5	s/n	Aroeira da praia	Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	A. Bocage
6	s/n	Aroeira da praia	Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	A. Bocage
7	s/n	Aroeira da praia	Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	A. Bocage
8	s/n	Aroeira da praia	Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	A. Bocage
9	s/n	Aroeira da praia	Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	A. Bocage

Dr.^a Rita de Cássia Pereira
Curadora do Herbário IPA

Consulta: Fabíola Bernardo Carneiro

Procedência: PB - João Pessoa - diversas localidades.

Coletor: a mesma

Data de entrada no Laboratório de Botânica: 30/Outubro/2015.

Determinada em: 31/Outubro/2015.

Resultado encaminhado para o e mail: fabiolacarneiro2013@gmail.com

Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA
Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária
Av. Gal. San Martin, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022
CNPJ 10.912.293/0001-37 – PABX: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211
Home Page: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br

IPA – 77 anos semeando conhecimento