



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA, FÍSICO-
QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS FOLHAS DE ANANI
(*Symphonia globulifera* Linn. f, Clusiaceae)**

Eliane Moraes da Silva

Belém – PA
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICA

Eliane Moraes da Silva

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA, FÍSICO-
QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS FOLHAS DE ANANI
(*Symphonia globulifera* Linn. f., Clusiaceae)**

Orientador: Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira

Co- Orientador: Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Belém – PA

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Silva, Eliane Moraes da.

Caracterização farmacognóstica, físico-química e microbiológica das folhas de anani (*symphonia globulifera* linn. f. clusiaceae) / Eliane Moraes da Silva ; orientador, José Maria dos Santos Vieira. — 2011

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2011.

1. Anani. 2. Plantas medicinais. 3. *Symphonia globulifera*. 4. Extratos vegetais. 5. Atividade antimicrobiana de plantas. I. Título.

CDD 22.ed. : 615.321

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eliane Moraes da Silva

Caracterização farmacognóstica, físico-química e microbiológica das folhas de anani (*Symphonia globulifera* Linn. f., Clusiaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacéuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira

Trabalho defendido e aprovado em: 29 / 08 / 2011

Banca Examinadora

Prof. Dr. Moisés Batista da Silva

Instituição UFPA

Assinatura

Prof. Dr. José Otávio Câmara Silva Junior

Instituição UFPA

Assinatura

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira

Instituição UFPA

Assinatura

Dedicatória

“AOS MEUS PAIS: EDSON & MARIDALVA”

Agradecimientos

A Deus, por todo amor diariamente recebido

Ao Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira, pela aceitação como orientanda e pela confiança depositada

Ao Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Júnior por todas as oportunidades cedidas

Ao Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa, pela colaboração

Ao Prof. Dr. Flávio Vasconcelos, pelo apoio e amizade

A Profª. Drª. Marta Chagas pelo ensinamento e exemplo de docência

Aos amigos da pós-graduação, em especial ao Heitor Ribeiro da Silva, pelos bons momentos.

Aos docentes e técnicos da FCFRP-USP, os quais sempre estiveram abertos para dúvidas e experimentações.

A Coordenação de Pós-Graduação e seus funcionários.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho se tornasse realidade.

Aos meus pais pelo amor, carinho, confiança, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu amor, João Junior

A minha querida avó Edith (in memorian)

A meus tios, tias, primos e prima Gisely

A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro

Muito obrigada!

*"Confia os teus cuidados ao Senhor, e ele te susterá;
jamais permitirá que o justo seja abalado."*

Salmo 55:22

RESUMO

SILVA, E. M. **Caracterização farmacognóstica, físico-química e microbiológica das folhas de Anani** (*Symphonia globulifera* Linn. f., Clusiaceae). 2011.xxp. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

Symphonia globulifera Linn. f., popularmente comumente conhecida como anani, citada em relatos de utilização popular em diferentes países, como Camarões, e em várias regiões do Brasil, principalmente na Amazônia, no tratamento de inflamações na pele, tônico geral e laxante para mulheres grávidas, além de sua seiva/látex ser empregada contra reumatismo e tumores. Embora alguns trabalhos tenham descrito o perfil fitoquímico de *S. globulifera*, não existem estudos, até o presente, avaliando as propriedades botânicas, químicas (análise térmica) e farmacêutica (*spray dryer*) desta planta. Assim, foram utilizadas metodologias clássicas contidas em farmacopéias e métodos analíticos mais modernos. Os resultados obtidos para a caracterização botânica são: as células epidérmicas de ambas as faces da folha são heterodimensionais. O complexo estomático é do tipo anomocítico encontrado apenas na face abaxial. O pecíolo apresenta-se plano-convexo revestido por células quadrangulares e espessa cutinização. A caracterização do pó são: a análise granulométrica classifica-o como sendo grosso. Na perda por dessecação foi de 9%; no teor de cinzas totais foi de 4,3%; com a análise térmica foi possível verificar em TG entre 31 a 100°C a primeira perda de massa de 7,8%, em DTA a 64°C um evento endotérmico e em DSC a 84°C um evento endotérmico de 169 J/g; o perfil espectroscópico na região do IV sugere a presença de compostos fenólicos. Enquanto os resultados para a tintura e extrato liofilizado são: densidade aparente de 0,97%g/mL; pH de 6; percentual de resíduo seco de 9%; na prospecção química verificou-se a presença de saponinas, açúcares redutores e fenóis e taninos para o extrato e algumas frações; na análise térmica em TG foi encontrado uma perda de massa de 6,55% entre 28 a 100°C, em DSC somente um evento exotérmico a 169°C; o perfil espectroscópico na região do IV apresentou bandas de absorção forte características de alcoóis e fenóis. No processo de secagem, os excipientes que apresentaram os melhores resultados foram aerosil 40% e celulose microcristalina mais aerosil na proporção de 35:5. O extrato apresentou características antioxidantes. A matéria-prima vegetal também foi

testada quanto a sua atividade antimicrobiana e antifúngica, fornecendo resultados positivos para algumas cepas testadas e apresentado atividade bactericida para frações acetato de etila e hexânica. O extrato e a fração hexânica apresentaram atividade fungistática, Todos esses resultados contribuem para futuros estudos com essa planta, aumentando assim seu valor agregado.

Palavras-chave: análise farmacognóstica, anani, controle de qualidade fitoterapia, *Symphonia globulifera* Linn. f..

ABSTRACT

SILVA, E. M. **Pharmacognostic Characterization, Physico-Chemical and Microbiological Sheets Anani** (*Symphonia globulifera* Linn. f., Clusiaceae). 2011.xxp. Dissertation (Master) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

Symphonia globulifera Linn. f., commonly known as anani cited in reports of popular use in different countries such as Cameroon, and in several regions of Brazil, mainly in the Amazon, in the treatment of skin inflammations, general tonic and laxative for pregnant women, and its latex to be employed against rheumatism and tumors. Although some studies have described the phytochemical profile of *S. globulifera*, there are no studies to date, assessing the botanical properties, chemical properties (thermal analysis) and pharmaceuticals (spray dryer) of this plant. Thus, classic methodologies were used contained in pharmacopoeias and modern analytical methods. The results for the botanical characterization are: the epidermal cells of both sides of the sheet are heterodimensionais. The stomatal complex is anomocytic type found only on the abaxial surface. The petiole is presented coated plano-convex cells cutinização square and thick. The characterization of the powder are: particle size analysis classifies it as being rude. Loss on drying was 9% in total ash content was 4.3%, with the thermal analysis we observed in TG between 31 and 100°C at the first mass loss of 7.8% in the DTA 64°C and a DSC endothermic event at 84°C an endothermic event of 169 J/g, the spectroscopic profile in the region of the IV suggests the presence of phenolic compounds. While the results for the dye and dried extract are: bulk density of 0.97% g/mL, pH 6; percentage of dry weight of 9% in chemical prospecting verified the presence of saponins, reducing sugars and phenols and tannins to extract and some fractions, the thermal analysis TG was found in a mass loss of 6.55% from 28 to 100°C, only one event in DSC exotherm to 169°C, the spectroscopic profile in the region IV showed bands of strong absorption features of alcohols and phenols. In the study using a spray dryer, excipients that showed the best results were 40% aerosil more aerosil and microcrystalline cellulose in the proportion of 35:5. The extract showed antioxidant properties. The vegetable raw material was also tested for their antimicrobial and antifungal activity, providing positive results for some strains tested and shown bactericidal activity for fractions of

ethyl acetate and hexane. The extract and the hexane fraction showed fungistatic activity, all these results contribute to future studies with this Plant, thereby increasing their value.

Keywords: analysis pharmacognostic, anani, quality control, herbal, *Symphonia globulifera* Linn. f..

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fotografias das folhas, flores, frutos e raízes (saponemas) de <i>S. globulifera</i>	27
Figura 2-	Representação esquemática do ensaio do DPPH [•] : redução do radical difenilpicrilhidrazila (A) à molécula difenilpicrilhidrazina (B)	29
Figura 3-	Representação esquemática do ensaio antioxidante utilizando o sistema xantina/xantina oxidase/ luminol	30
Figura 4-	Estrutura dos compostos (1)- globulixantonas A; (2)- globulixantonas B; (3)- globulixantonas C; (4)- globulixantonas D; (5)- globulixantonas E; (6)- gaboxantona; (7)- globuliferin; (8)- symphonin e (9)- guttiferona A.	31
Figura 5-	Núcleo básico das xantonas	32
Figura 6-	Fotografia de uma exsicata de <i>S. globulifera</i> Linn. f.	41
Figura 7-	Fluxograma esquemático do processo utilizado para a obtenção dos extratos de <i>S. globulifera</i> .	46
Figura 8-	Fluxograma do roteiro experimental utilizado para obtenção das frações de <i>S. globulifera</i>	47
Figura 9-	Diagrama esquemático do equipamento <i>spray dryer</i> utilizado	49
Figura 10-	Esquema ilustrativo de uma microplaca utilizada no teste da CIM	61
Figura 11	Cortes histológicos de folhas de <i>Symphonia globulifera</i> em microscopia de luz e MEV. A. Face adaxial; B. Face abaxial; C. Corte transversal do limbo foliar em MEV; D. Margem; E. Detalhe do feixe vascular; F. Nervura central (bp:bainha parenquimática, c:cutícula; d:drusa, ec:esclerênquima, es: epiderme superior, f: floema, fl: flange; fv: feixe vascular, vl: vaso laticífero, x: xilema).	66
Figura 12-	Cortes histológicos de folhas e pecíolos de <i>Symphonia globulifera</i> em microscopia de luz e MEV. A. Detalhe do tecido vascular da nervura central; B. Detalhe da região plana e do tecido vascular do pecíolo; C. Vista geral do pecíolo em MEV; D. Detalhe de drusa no córtex do pecíolo em MEV (d:drusa, vl:vaso laticífero).	67
Figura 13-	Cortes histológicos de folhas de <i>Symphonia globulifera</i> . A-B. Corte transversal do mesofilo com compostos fenólicos, B. Detalhe da ocorrência de compostos fenólicos; C-D. Teste para alcaloides, C. Feixe vascular, D. Detalhe da nervura central; E-F. Teste para açúcares redutores, E. Nervura central, F. Detalhe do tecido	69

floemático; G. Teste de flavonoides no mesofilo; H-I. Teste de ocorrência de substâncias graxas, H. margem, I. Detalhe de vaso na nervura central.

- Figura 14-** Determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de *S. globulifera* 71
- Figura 15-** DTG e curvas TG e DTA do pó das folhas de *S. globulifera* 73
- Figura 16-** Curva DSC do pó das folhas de *S. globulifera* 75
- Figura 17-** Gráfico de teor de polifenóis totais 80
- Figura 18-** DTG e curvas TG e DTA do extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera* 81
- Figura 19-** Curva DSC do extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera* 82
- Figura 20-** Espectro na região do infravermelho do pó das folhas de *S. globulifera* 84
- Figura 21-** Espectro na região do infravermelho do extrato liofilizado de *S. globulifera* 85
- Figura 22-** Curva da medida da atividade doadora de H⁺ ao radical DPPH • para o extrato liofilizado de *S. globulifera*. Os resultados representam a média de três determinações ± EPM. A linha de tendência foi construída usando regressão não linear (hipérbole). 87
- Figura 23-** Curva de inibição da emissão da luz gerada pela reação luminescente xantina/luminol/XOD encontrada para ELS. Os resultados representam a média de três determinações ± EPM. A linha de tendência foi construída usando regressão não linear (hipérbole). 88
- Figura 24-** Placas do teste de difusão em disco do extrato liofilizado de *S. globulifera* diluído em DMSO mostrando os halos de sensibilidade de *Cândida albicans* e *Bacillus subtilis* nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25mg/mL. 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Variáveis analisadas no processo de secagem	50
Tabela 2-	Caracterização físico-química do pó das folhas de <i>S. globulifera</i>	72
Tabela 3-	Perfil termogravimétrico do pó das folhas de <i>S. globulifera</i>	73
Tabela 4-	Perfil analítico térmico diferencial do pó das folhas de <i>S. globulifera</i>	74
Tabela 5-	Perfil calorimétrico exploratório diferencial do pó das folhas de <i>S. globulifera</i>	75
Tabela 6-	Densidade aparente, pH e percentual de resíduo seco da tintura do pó das folhas de <i>S. globulifera</i>	76
Tabela 7	Variáveis analisadas no processo de spray drying	77
Tabela 8-	Prospecção química da tintura e das frações de <i>S. globulifera</i>	79
Tabela 9-	Perfil termogravimétrico do extrato liofilizado da tintura de <i>S. globulifera</i>	81
Tabela 10-	Perfil calorimétrico exploratório diferencial extrato liofilizado da tintura de <i>S. globulifera</i>	83
Tabela 11-	Número de onda (cm ⁻¹) e suas respectivas ligações características no espectro da região do infravermelho para o pó das folhas de <i>S. globulifera</i>	84
Tabela 12-	Número de onda (cm ⁻¹) e ligações características no espectro da região do infravermelho para extrato liofilizado da tintura de <i>S. globulifera</i>	85
Tabela 13-	Comparação dos valores de CI ₅₀ encontrado para ELS na atividade antioxidante.	88
Tabela 14-	Avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica do extrato liofilizado da tintura de <i>S. globulifera</i> em diferentes concentrações e os halos de inibição	90
Tabela 15-	Avaliação das concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida/bacteriostática mínima do extrato liofilizado da tintura de <i>S. globulifera</i> em µg/mL	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
COFID	Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos
COX'S	Ciclo-oxigenases
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH·	Radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazila
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise térmica Diferencial
ELS	Extrato Liofilizado de <i>S. globulifera</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
F.A.A. 70	Formaldeído, Álcool e Acetona a 70%
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Human Immunodeficiency Vírus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
ICB/UFPA	Instituto de Ciências Biológicas
ICEN/UFPA	Ciências Exatas e Naturais
IV	Infravermelho
KBr	brometo de potássio
LAPROFAR	Laboratório de P & D em Processos Farmacêuticos
MAO	Mono-aminoxidase
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MPEG	Museu Paraense Emílio Goeldi
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNPMF	Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos
RDC	Resolução de Diretora Colegiada
T	Temperatura
t	Tempo
TG	Termogravimetria
v/v	Volume/volume
XOD	Xantina Oxidase
Xp	Umidade residual
ΔT	Varição de Temperatura

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Aspectos botânicos	24
2.2 Aspectos biológicos	27
2.2.1 Atividade antioxidante	28
2.2.1.1 Determinação da atividade redutora de DPPH•	28
2.2.1.2 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol	29
2.3 Aspecto químico	30
2.4 Métodos analíticos utilizados na avaliação e controle de qualidade de fitoterápicos	33
2.4.1 Análise térmica	33
2.4.2 Espectroscopia nas regiões do infravermelho	34
2.5 Spray drying	35
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Material botânico	40
4.2 Caracterização botânica	41
4.2.1 Anatomia estrutural por microscopia de luz	41
4.2.2 Anatomia ultra-estrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	42
4.2.3 Testes microquímicos	42
4.3 Caracterização física e físico-química do pó das folhas de <i>S. globulifera</i>	42
4.3.1 Secagem	42
4.3.2 Determinação da distribuição granulométrica	42
4.3.3 Determinação da perda por dessecação	43
4.3.4 Determinação do teor de cinzas totais	43
4.3.5 Análise térmica	44
4.3.5.1 Termogravimetria (TG/TGA) e termogravimetria derivada (DTG)	44
4.3.5.2 Análise térmica diferencial (DTA)	44
4.3.5.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	44
4.3.6 Perfil espectroscópico na região do infravermelho (IV)	45
4.4 Obtenção dos extratos e das frações	45
4.5 Caracterização química e físico-química da tintura de <i>S. globulifera</i>	47
4.5.1 Determinação da densidade aparente	47
4.5.2 Determinação do pH	47
4.5.3 Determinação do teor de sólidos	48
4.5.4 Secagem por aspersão (<i>spray drying</i>)	48
4.5.4.1 Preparação do extrato seco	49
4.5.4.2 Umidade residual (Xp)	50
4.6 Caracterização química e físico-química do extrato liofilizado de <i>S. globulifera</i> (ELS)	50
4.6.1 Screening fitoquímico do extrato liofilizado e das frações	50
4.6.2 Determinação do teor de polifenóis totais	56
4.6.3 Obtenção do perfil térmico do extrato liofilizado	56
4.6.3.1 Termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial	57
4.6.4 Obtenção do perfil espectroscópico na região do infravermelho	57
4.6.5 Determinação da atividade antioxidante	57
4.6.5.1 Determinação da atividade redutora do DPPH•	57
4.6.5.2 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol	58
4.7 Caracterização Microbiológica	58
4.7.1 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado e das frações de <i>S. globulifera</i>	59

4.7.2 Microdiluição em caldo - determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e das concentrações bactericidas mínimas (CBM) do extrato e das frações	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1 Caracterização botânica	63
5.1.1 Análise da anatomia estrutural e ultra-estrutural e dos testes microquímicos	63
5.2 Caracterização física e físico-química do pó das folhas de <i>S. globulifera</i>	69
5.2.1 Determinação da distribuição granulométrica	70
5.2.2 Determinação da perda por dessecação	71
5.2.3 Determinação teor de cinzas totais	71
5.2.4 Perfil térmico	72
5.2.4.1 Termogravimetria e análise térmica diferencial	72
5.2.4.2 Calorimetria exploratória diferencial	74
5.3 Caracterização química e físico-química do extrato fluido de <i>S. globulifera</i>	75
5.3.1 Determinação da densidade aparente, ph e teor de sólidos	76
5.3.2 <i>Spray drying</i>	77
5.3.3 Prospecção química da tintura e das frações	78
5.3.4 Teor de polifenóis totais	79
5.3.5 Perfil térmico do extrato liofilizado	80
5.3.5.1 Termogravimetria e análise térmica diferencial	81
5.3.5.2 Calorimetria exploratória diferencial	82
5.3.6 Perfil espectroscópico na região do infravermelho do pó e do extrato liofilizado da tintura	83
5.3.7 Atividade antioxidante	86
5.3.7.1 Atividade redutora do DPPH*	86
5.3.7.2 Atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol	87
5.4 Caracterização Microbiológica	89
5.4.1 Atividade antimicrobiana do extrato liofilizado e das frações de <i>s. globulifera</i>	89
5.4.1.1 Teste de difusão em disco em meio sólido	89
5.4.1.2 Microdiluição em caldo - determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e das concentrações bactericidas mínimas (CBM) do extrato e das frações	92
6 CONCLUSÕES	94
7 REFERÊNCIAS.....	96

Introdução

1 INTRODUÇÃO

É crescente o interesse em terapias alternativas e na utilização de produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas, pela importância que representa para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2003).

O Governo brasileiro, visando a importância desse segmento na economia, lançou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), aprovada pelo Decreto nº 5.813/06 (ANVISA) e em dezembro de 2008 foi publicada a Portaria nº 2.960, que aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (COFID). Um dos objetivos do programa é construir e aperfeiçoar o marco regulatório em todas as etapas da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicas, a partir dos modelos e experiências existentes no Brasil e em outros países (BRASIL, 2008).

E, para isso, faz-se necessário, cada vez mais, estudos sobre espécies vegetais. Nesse contexto, insere-se o projeto “Desenvolvimento e Avaliação da Permeação *in vitro* de Formulações Fitoterápicas Antimicrobianas de Uso Tópico” que se propõe a investigar três espécies vegetais de uso corrente na região amazônica, com um elevado potencial mercadológico e excelente viabilidade técnica, requisitos que associados aos dados, a serem produzidos com o desenvolvimento do projeto, poderão contribuir para a inclusão delas na nova edição da Farmacopéia Brasileira.

As três espécies vegetais são: o mata-pasto ou fedegoso (*Heliotropium indicum* (L.) DC - Boraginaceae), o lacre (*Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy - Clusiaceae) e o anani (*Symphonia globulifera* L. F. - Clusiaceae). Essas espécies propostas no referido projeto apresentam aspectos econômicos, acadêmicos e etnofarmacêuticos que justificam sua escolha para investigação. Os vegetais, se aproveitados em produtos farmacêuticos, podem ser cultivados na região, e têm sido frequentemente citados em levantamentos e abordagens etnofarmacêuticas realizadas em diferentes municípios do Brasil e, em particular, do Estado do Pará.

No presente trabalho foi estudada a espécie *Symphonia globulifera* Linn. f. (Clusiaceae), que no Brasil é comumente conhecida como anani, citada em relatos de utilização popular em diferentes países, como Camarões, e em várias regiões do

Brasil, principalmente na Amazônia, no tratamento de inflamações na pele, tônico geral e laxante para mulheres grávidas (AUBREVILLE, 1950; IRVINE, 1961), além de sua seiva/látex ser empregada contra reumatismo e tumores (AMOROZO e GÉLY, 1988; REVILLA, 2002). Há estudos que comprovam a eficácia de suas folhas na atividade antiplasmodial e como antioxidante (NGOUELA et al. 2006), suas raízes demonstraram atividade antimicrobiana (NKENGFAK et al. 2002a).

A partir do exposto, adota-se como premissa a caracterização da espécie vegetal e dos seus derivados (pó e extratos), no sentido de contribuir para estudos direcionados à busca de novos fitoterápicos, visando o controle de qualidade das etapas de desenvolvimento tecnológico utilizando matérias-primas vegetais e para provável inclusão dessa espécie na Farmacopéia Brasileira.

Para atingirmos nossos objetivos, fez-se necessária a criação de uma equipe multidisciplinar trabalhando em conjunto, como esperado de um estudo para a avaliação de uma planta. Assim, este trabalho foi realizado em colaboração com pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP/RP), fitoquímicos, químicos, microbiologistas e farmacêuticos responsáveis pelas avaliações fitoquímicas, por testes relacionados a controle de qualidade e pela avaliação da concentração inibitória mínima da amostra, e com pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa/PA) juntamente com pesquisadores do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFPA), botânicos, responsáveis pelo estudo químico-botânico da espécie, e também com pesquisadores do Instituto de Ciências Exatas e Naturais (ICEN/UFPA), químicos e engenheiros químicos responsáveis pelo perfil térmico do pó e do extrato liofilizado juntamente com as análises do infravermelho, firmando-se assim uma integração interinstitucional e promovendo um compartilhamento de experiências, tão importantes para o progresso científico.

*Revisão de
Literatura*

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos botânicos

No Brasil ocorrem várias espécies da família Clusiaceae, algumas delas de valor medicinal. Essa família foi descrita por Antonie Laurent de Jussieu e compreende aproximadamente 1.370 espécies, dentro de 45 gêneros de ocorrência em regiões tropicais (MABBERLEY, 1997). No Brasil ocorrem 21 gêneros, com aproximadamente 131 espécies de ampla distribuição por todo o território (BARROZO, 1991). A família Clusiaceae ou Guttiferae (*nomina conservandum*), pertence à ordem Theales, subclasse Dilleniidae, classe Magnoliopsida e divisão Magnoliophyta. Essas angiospermas são compostas por árvores, subarbustos e poucas ervas.

São plantas caracterizadas por possuírem folhas opostas ou alternas, sendo elas simples, sem estípulas e com várias nervuras secundárias delgadas. Raramente encontram-se flores solitárias. As inflorescências são vistosas, compostas por flores geralmente assimétricas, contendo de 2 a 5 sépalas distintas e 4 ou 5 pétalas persistentes, andróginas ou unissexuadas. O androceu em geral é constituído de muitos estames, filetes filiformes, espessados ou nulos e anteras bitecas e rimosas. Os grãos de pólen produzidos possuem tamanho variado. O ovário é súpero, formado de 3 a 15 carpelos, com um a muitos óvulos em cada lóculo. Os frutos podem ser cápsula, quando secos e baga ou drupa, quando carnosos. Na família são encontradas, com grande freqüência, células secretoras de compostos fenólicos dispersas, geralmente produzindo proantocianidinas e armazenando vários tipos de xantonas (CRONQUIST, 1981).

Alguns gêneros dessa família são, destacando-se os com importância medicinal no Brasil, *Hypericum*, *Clusia*, *Calophyllum*, *Garcinia* e *Symphonia*, além de possuírem espécies econômicas para a produção de madeiras, gomas, pigmentos, óleos essenciais e resinas (DI STASI e LIMA, 2002). O gênero *Symphonia* consiste de 18 espécies distribuídas desde a América do Sul até África e Madagascar. Assim como o gênero *Vismia* são de interesse farmacêutico, esse pertencente também à família estudada, tem como espécie principal a *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy, popularmente conhecida como lacre, destacando-se principalmente pela sua

utilização no tratamento de dermatoses e por possuir propriedades antipiréticas e anti-reumáticas (LORENZI e MATOS, 2002). As antraquinonas são metabólitos típicos que constituem esse gênero (MIRAGLIA et al. 1981) e a ocorrência de antraquinonas preniladas é limitado apenas a três gêneros da família Clusiaceae: *Vismia*, *Hurungana* e *Psorospermum* (DELLE MONACHE, 1985). Há ainda outros componentes também encontrados nesse gênero, tais como vários triterpenóides, diantraquinonas, benzofenonas e lignanas (NAGEN e De OLIVEIRA, 1997).

Enquanto no gênero *Calophyllum*, destaca-se a espécie *Calophyllum brasiliense*, conhecida popularmente como guanandi ou jacareúba, cuja infusão da casca é um remédio popular utilizado para o tratamento de reumatismo, varicoses, hemorróidas e úlceras crônicas (CORRÊA, 1978). Segundo Cronquist (1981), uma das características anatômicas marcantes da família Clusiaceae é a presença de canais e cavidades secretores esquizógenos em todos os tecidos, onde são elaborados e secretados diversos metabólitos secundários. Suas folhas apresentam cavidades secretoras resiníferas, sendo algumas delas produtoras de resinas aromáticas que, somadas aos canais secretores, promovem o acúmulo de diversos tipos de metabólitos secundários, tais como xantonas e cumarinas (CARDONA et al. 1990; CORTEZ et al., 1999) podendo estar na forma isolada ou agrupar-se com cristais oxalato de cálcio.

Diversas cumarinas e xantonas isoladas de representantes do gênero *Calophyllum* apresentaram importantes atividades moluscicida, antitumoral, antiviral e antimicrobiana (GUILLET, 2001). Segundo Oliveira e colaboradores (1998) outro fator importante para a diagnose de drogas vegetais, além da descrição anatômica, corresponde às inclusões celulares tanto de natureza orgânica (amido, compostos fenólicos, gotículas de óleo etc.) como inorgânicas (cristais de oxalato de cálcio, carbonato de cálcio etc.) e estas inclusões podem ser evidenciadas por meio de reações histoquímicas adequadas.

A espécie *Symphonia globulifera* Linn. f. (Figura 1) é uma árvore de ocorrência principalmente na Mata de várzea amazônica. Da mesma família botânica do bacuri (*Platonia insignis* Mart.), pode ser encontrada na Amazônia, Maranhão, Rio de Janeiro, nas Guianas, America Central (México), África e Madagascar. É conhecida como marecage ou Manil na Guiana Francesa, árvore Buckwax na Guiana e Suriname e Anani ou Ananin no Brasil. Uma de suas características são suas enormes sapopemas (raiz que cresce com o tronco e forma em volta dele divisões achatadas, caracterizando a raiz tabular), resultante da

adaptação da espécie ao ambiente alagado. Quando ocorre no ambiente de terra firme, seu caule é reto sem a presença de sapopemas. É uma árvore de grande porte que pode atingir 30m de altura. A espécie produz uma resina amarela contida no caule, folhas e frutos (PESCE, 2009).

Suas inflorescências são vermelhas e florescem durante os meses de julho a setembro (JARDIM e ZOGHBI, 2008). As folhas são opostas, sem estípulas, oblongas, pecíolo muito curto e possui flores. Estas são polinizadas por beija-flores e outros pássaros (BITTRICH e AMARAL 1996; GILL et al. 1998; LASPRILLA e SAZIMA, 2004). O pólen fica nas tecas misturado com uma substância oleosa e é assim depositado no poro do estigma. Foi observado na Amazônia e na América Central que as flores, que produzem bastante néctar, são às vezes comidas por macacos quando outras fontes de alimento são escassas (RIBA-HERNÁNDEZ e STONER 2005). As bagas são dispersas por morcegos. O fruto é comestível por animais silvestres, sendo uma esfera ovóide de 2,5cm de comprimento de cor marrom claro composta de uma massa de cor amarela e estão maduros entre os meses de dezembro a janeiro. A semente contém 35% de uma gordura preta, em que sua colheita é de pouca importância (PESCE, 2009). O caule/tronco é comercializado e usado na construção civil (JARDIM e ZOGHBI, 2008), a resina é usada misturada com carvão de imbaúba para preparar um betume preto para encerar fios de vela (PESCE, 2009), calafetar embarcações e é usado pela população local da Amazônia como cura para várias doenças (RIBEIRO et al. 1999), a semente produz uma gordura que pode ser empregada no preparo de sabões de qualidade inferior, em mistura com outras gorduras (PESCE, 2009), A espécie que origina o nome do município Ananindeua (lugar de anani) ainda pode ser encontrada em suas florestas de várzea.

Essa espécie foi citada em relatos de utilização popular em diferentes países, como Camarões, e em diferentes regiões do Brasil, em particular na Amazônia. Destacando-se pela sua utilização no tratamento de inflamações na pele, apresentando-se como tônico geral e laxante para mulheres grávidas (IRVINE, 1961; AUBREVILLE, 1950), além de sua seiva/látex ser empregada contra rasgadura, reumatismo e tumores (REVILLA, 2002; AMOROZO e GÉLY, 1988), suas folhas apresentam atividade antiplasmodial, antioxidante (NGOUELA et al. 2006) e inibição nas atividades de leishmania e colinesterase (LENTA et al. 2007), suas raízes possuem atividade antimicrobiana (NKENGACK et al. 2002b). E ainda possui ação inibitória - HIV *in vitro* com extratos de *S. globulifera* (GUSTAFSON et al. 1992).



Figura 1 – Fotografias das folhas, flores, frutos e raízes (saponemas) de *S. globulifera*. fonte: www.tropicos.org

2.2 Aspectos biológicos

O extrato das raízes de *S. globulifera* tem mostrado forte citotoxicidade contra a linhagem celular KB (carcinoma epidermóide oral); duas xantonas oxigenadas com isoprenóides são responsáveis por essa atividade, as globulixantonas A e B (NKENGFACK et al. 2002a).

Os estudos de Nkengfack e colaboradores (2002b) utilizando o método de difusão em meio sólido, confirmaram a ação antimicrobiana dos extratos diclorometano e metanólico bruto das cascas da raiz de *S. globulifera*, por meio das globulixantonas C, D e E, frente aos seguintes microorganismos gram-positivos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Vibrio anguillarum*.

Ngouela e seus colaboradores (2006) detectaram a presença de compostos fenólicos nas cascas de semente de *S. globulifera* capazes de exercer atividade antiplasmodial contra *Plasmodium falciparum*, cepa W₂, que é resistente a cloroquina e outros antimaláricos e atividade antioxidante (estresse oxidativo). Esses compostos fenólicos foram a gaboxantona, symphonin, globuliferin e guttiferona A.

Os estudos de Lenta e seus colaboradores (2007) registram a ocorrência das atividades leishmanicida e da anticolinesterásica *in vitro* por compostos fenólicos presentes em folhas de *S. globulifera*. Os extratos metanólicos e seus compostos puros tiveram significativa atividade contra amastigotas de *Leishmania donovani* e

contra as colinesterases A e B, que representam o alvo mais atraente para o desenvolvimento de drogas e descoberta de mecanismos dos inibidores baseados no tratamento de doenças degenerativas como a doença de *Alzheimer*. Os compostos puros responsáveis por essas atividades foram a guttiferona A e globulixantona C.

2.2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Um antioxidante pode ser definido como uma substância ou conjunto de substâncias que, em baixa concentração, diminuem ou previnem a oxidação de extratos oxidáveis, como gorduras, proteínas, carboidratos ou DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

É amplamente reconhecida a importância da oxidação no organismo. O metabolismo oxidativo gera as chamadas “espécies reativas de oxigênio” (EROs) que estão relacionadas com a produção de energia, fagocitose, controle do crescimento celular e sinalização intercelular e síntese de compostos biologicamente importantes. No entanto, quando produzidas em grande quantidade, essas espécies podem causar uma série de danos celulares. As EROs mais importantes nos organismos vivos incluem hidroxil ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e peroxil ($\text{RO}_2\cdot$) (ARUOMA, 1999).

Os mecanismos de ação antioxidante podem incluir: supressão da formação de EROs tanto pela inibição de enzimas ou pela quelação de elementos envolvidos na produção de radicais livres; sequestro de EROs e aumento ou proteção das defesas antioxidantes do organismo (PIETTA, 2000). Portanto, a atividade antioxidante deve ser avaliada por diversas metodologias, envolvendo diferentes mecanismos, pois o potencial de um composto pode ser diferente de acordo com o ensaio empregado (MOURE et. al. 2001).

2.2.1.1 Determinação da atividade redutora do DPPH \cdot

O DPPH \cdot , radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila, é caracterizado como um radical estável devido a deslocalização de um elétron desemparelhado por toda a molécula

(Figura 2). Por isso esse radical não dimeriza como seria o caso para a maioria dos radicais livres. A deslocalização eletrônica é também responsável pela sua cor violeta característica. Quando uma solução etanólica de DPPH[•] é misturada com uma ou mais substâncias que podem doar um átomo de hidrogênio, a molécula de DPPH[•] passa para a forma reduzida (Figura 2) com perda da coloração violeta e aparecimento de uma cor residual amarela devido à presença do grupo picril (BLOIS, 1958; MOLYNEUX, 2004). Um parâmetro bastante utilizado para a interpretação dos resultados obtidos é a CI₅₀, definida como a concentração de substrato que causa 50 % de perda da atividade de DPPH[•] (coloração).



Figura 2 – Representação esquemática do ensaio do DPPH[•]: redução do radical difenilpicrilhidrazila (A) à molécula difenilpicrilhidrazina (B).

2.2.1.2 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol

Fisiologicamente a principal função da enzima xantina oxidase (XOD) é oxidar a hipoxantina à xantina e a xantina à ácido úrico. Durante a reoxidação da XOD, o oxigênio molecular pode agir como um aceptor de elétrons, produzindo os ânions superóxido. O ânion superóxido apresenta baixa reatividade, no entanto, ele reage facilmente com peróxido de hidrogênio gerando o radical hidroxila, bem mais danoso às células do organismo (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1988).

No ensaio usando o sistema xantina/XOD/luminol ocorre a produção de ânions superóxido, que por sua vez oxidam o luminol, uma substância utilizado como detector. Essa oxidação faz com que a molécula de luminol, se rearrange liberando um fóton de energia, fenômeno denominado de luminescência. Como a emissão luminescente é causada por uma reação química, utiliza-se o termo

quimioluminescência. Desta forma, a quantidade de luz emitida é proporcional a quantidade ânions superóxido produzida pela enzima xantina oxidase (Figura 3).

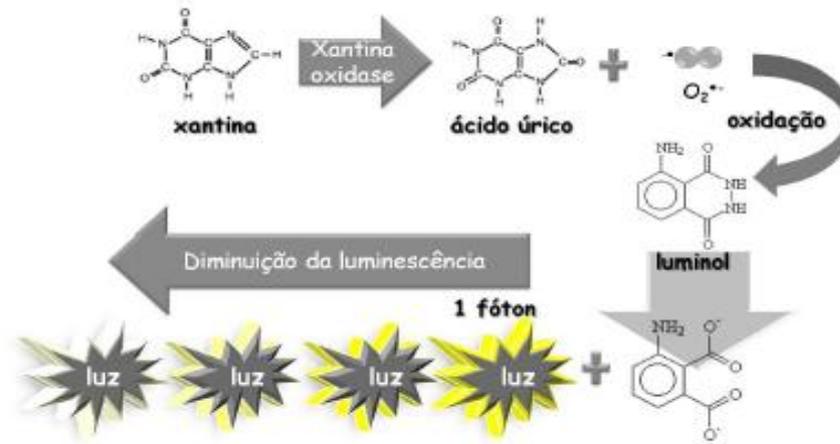


Figura 3 – Representação esquemática do ensaio antioxidante utilizando o sistema xantina/xantina oxidase/ luminol.

2.3 Aspectos químicos

Para a espécie em estudo, alguns metabólitos secundários já foram identificados na sua constituição: globulixantonas A (1) e B (2) (NKENGFACK et al. 2002a), globulixantonas C (3), D (4) e E (5) (NKENGFACK et al. 2002b), gaboxantona (6), globuliferin (7) e symphonin (8) (NGOUELA et al. 2006), guttiferona A (9) (LENTA et al. 2007), conforme mostrado na Figura 4. Poucos estudos sobre *S. globulifera* foram realizados até então, mas alguns metabólitos secundários já foram isolados como xantonas e benzofenonas das suas folhas, raízes e sementes (NKENGFACK et al. 2002a).

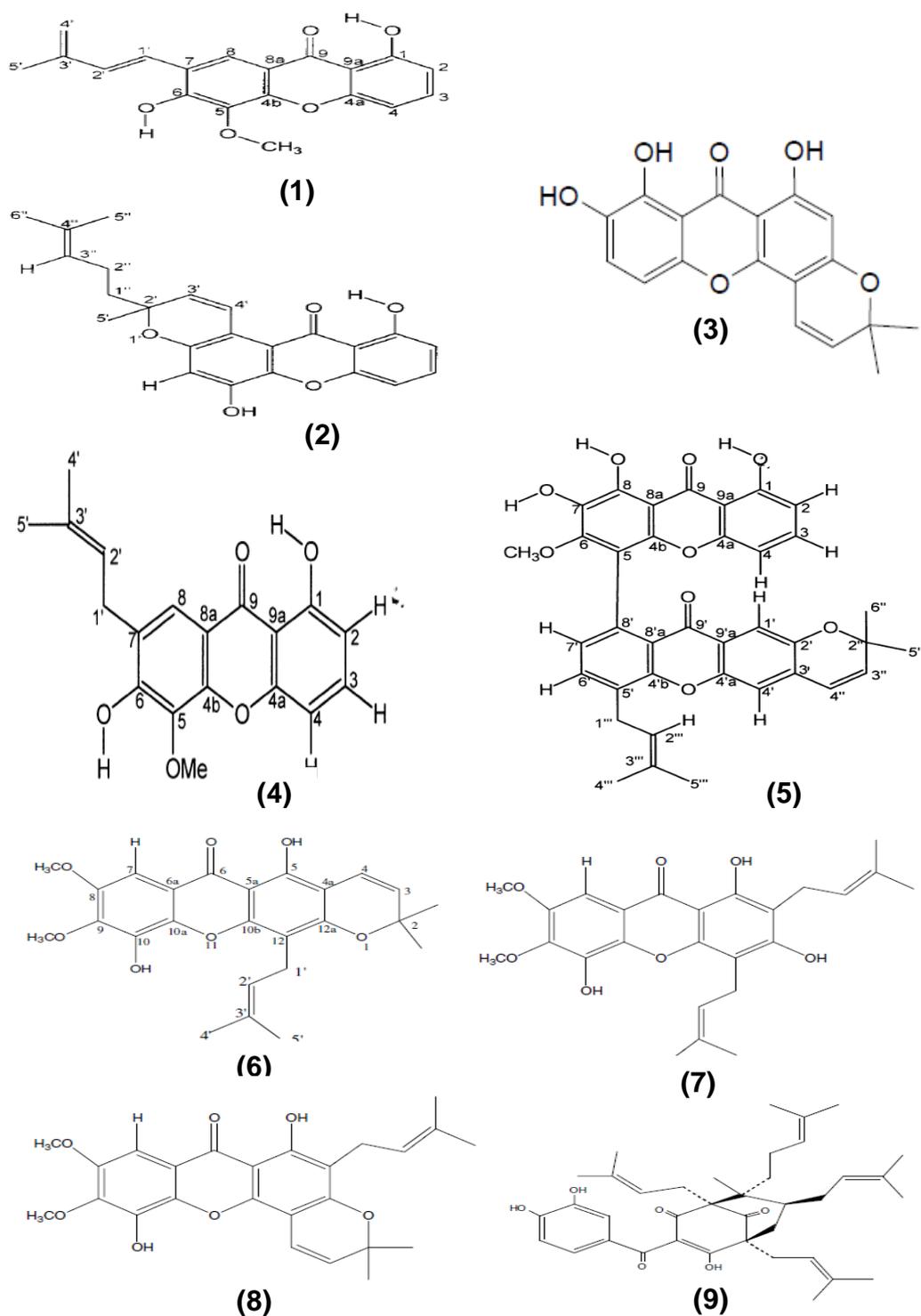


Figura 4 – Estrutura dos compostos (1)- globulixantonas A; (2)- globulixantonas B; (3)- globulixantonas C; (4)- globulixantonas D; (5)- globulixantonas E; (6)- gaboxantona; (7)- globuliferin; (8)- symphonin e (9)- guttiferona A.

As xantonas são metabólitos secundários encontradas em algumas famílias de plantas, fungos e líquenes e compreendem uma importante classe de heterociclos oxigenados. O núcleo da xantona é conhecido como dibenzo- γ -pirona (Figura 3), os carbonos 1 a 4 são derivados da via metabólica do acetato-malonato e

formam o anel A, e os carbonos 5 a 8 são derivados do ácido chiquímico e formam o anel B (SIMÕES et al. 2000).

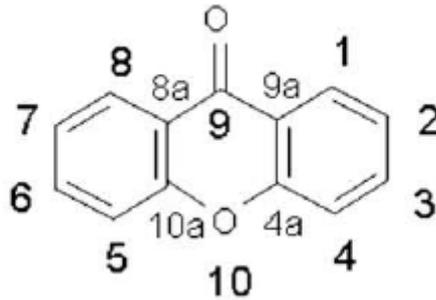


Figura 5 - Núcleo básico das xantonas.

As xantonas foram classificadas em cinco grupos: xantonas oxigenadas simples, xantonas glicosíladadas, xantonas preniladas, xantonolignoides e xantonas diversas (SULTANBAWA, 1980; JIANG et al. 2004). A rota biossintética mais frequentemente aceita, considera que as xantonas são produzidas a partir de dois precursores biogénéticos distintos: Ácido chiquímico e malonilCoA. Isso leva a formação de um intermediário comum, a benzofenona, com um núcleo proveniente da rota do ácido chiquímico e outro da rota do malonil-CoA.

A ocorrência de xantonas preniladas é comumente descrita em espécies das famílias Clusiaceae (NGOUELA et al. 2006; NKENGFACK et al. 2002). De todas as atividades biológicas apresentadas por elas, talvez a mais interessante seja a ação inibitória da enzima monoamino oxidase (MAO). Níveis aumentados ou diminuídos de atividade da MAO em indivíduos já foram relacionados a uma série de distúrbios neuropsiquiátricos como fobia, depressão, abuso de drogas e outros. As xantonas apresentam um grande potencial de utilização por terem demonstrado atividade inibitória potente, seletiva e reversível desta enzima (GNERRE et al. 2001). Muitos trabalhos têm apresentado esse metabólito como potenciais substâncias para o tratamento do câncer (ASANO et al. 1996; PERMANA et al. 1994). Algumas xantonas (naturais e sintéticas) apresentam ainda, ação antimicrobiana, antifúngica (ROCHA et al. 1994), entre outras. Por outro lado, a toxicidade delas é ainda pouco estudada, e esse é um dos passos limitantes ao emprego terapêutico.

2.4 Métodos analíticos utilizados na avaliação e controle de qualidade de fitoterápicos

As análises físico-químicas utilizadas para o controle de qualidade de um medicamento fitoterápico juntamente com o controle do processo produtivo da planta medicinal, buscam favorecer a obtenção de um produto final padronizado com garantias de segurança e eficácia.

Os métodos atualmente mais empregados em muitas indústrias para avaliação e controle de qualidade da matéria-prima são as análises térmicas e a espectroscopia na região do infravermelho.

2.4.1 ANÁLISE TÉRMICA

As potenciais aplicações da análise térmica na indústria farmacêutica são inúmeras em torno da investigação físico-química de produtos farmacêuticos. Por isso, tem sido extensivamente utilizada como ferramenta analítica confiável e essencial para o controle de qualidade e desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, bem como para o estudo da estabilidade, compatibilidade e das possíveis interações entre fármacos e excipientes e suas misturas, contribuindo dessa forma para estudos de pré-formulação (SANTOS et al. 2008).

As técnicas de análise térmica são aquelas nas quais uma propriedade física de uma substância ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura. Usualmente, a substância é submetida a um programa de temperatura durante a análise. Os resultados são fornecidos na forma de curvas (termograma ou curva de decomposição térmica), as quais contêm as informações a respeito da variação do parâmetro medido (HOLLER et al. 2009). Dentre as técnicas termoanalíticas empregadas com maior frequência na indústria farmacêutica estão a termogravimetria (TG); análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) (ARAÚJO et al. 2006).

Na termogravimetria (TG ou TGA) o parâmetro a ser medido é a massa, por meio da utilização de uma termobalança que permite medir o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra em função de uma variação controlada de

temperatura. O transdutor ou sensor utilizado na TG é uma balança registradora (HOLLER et al. 2009). As curvas obtidas fornecem informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado. Dada a natureza dinâmica da variação de temperatura da amostra para originar curvas TG, fatores instrumentais [razão de aquecimento, atmosfera (N_2 , ar ou outros), vazão de gás, composição do cadinho, geometria do porta amostra e tamanho e forma do forno] e relacionados às características da amostra podem influenciar a natureza, a precisão e a exatidão dos resultados experimentais (SILVA et al. 2007). A partir da derivada primeira da curva TG obtém-se a curva termogravimétrica derivada (DTG) (HOLLER et al. 2009).

A análise térmica diferencial (DTA) é a técnica pela qual a diferença de temperatura (ΔT) entre a substância e o material de referência (termicamente estável) é medida em função da temperatura, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. As variações de temperatura na amostra são devido às transições entálpicas ou reações endotérmicas e exotérmicas. As curvas DTA representam os registros de variação em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos são apresentados na forma de picos. Os picos ascendentes caracterizam os eventos exotérmicos, desprendimento de calor, e os descendentes os endotérmicos, o calor sendo absorvido (WENDLANDT, 1986; SILVA et al. 2007).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi desenvolvida com o intuito de evitar as dificuldades encontradas na DTA ou compensá-las, criando um equipamento capaz de quantificar a energia envolvida nas reações de entalpia. Os processos comumente estudados por DSC são os que envolvem troca de calor como transição vítrea (troca de linha de base), cristalização (transição exotérmica) e fusão (transição endotérmica) (RODRIGUES e MARCHETTO, 2002).

A pequena quantidade de amostra utilizada, a rapidez de resultados, a limpeza da técnica e a possibilidade de visualização do seu perfil termoanalítico, fazem dessas técnicas poderosas ferramentas no estudo de padronização das matérias-primas vegetais e ensaios de pré-formulação para o desenvolvimento tecnológico de medicamentos fitoterápicos (ARAÚJO et al. 2006; SILVA JÚNIOR, 2006a; ALVES, 2008).

2.4.2 ESPECTROSCOPIA NAS REGIÕES DO INFRAVERMELHO

O espectro no IV de um composto químico é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, por conta disto, a espectroscopia na região do IV tem extensa aplicação na identificação de compostos. Quase todos os compostos contendo ligações covalentes absorvem várias frequências da radiação eletromagnética na região do IV no espectro eletromagnético. A radiação infravermelha na faixa aproximada de 10.000 a 100 cm^{-1} quando absorvida, converte-se em energia de vibração molecular e, como resultado, as ligações químicas sofrem deformações (axiais e angulares). Este processo é quantizado, porém o espectro vibracional costuma aparecer como uma série de bandas ao invés de linhas. As linhas se sobrepõem dando lugar às bandas observadas. São estas bandas de vibração-rotação, particularmente as que ocorrem entre 4.000 e 400 cm^{-1} , a porção de maior interesse para a investigação das informações estruturais úteis de moléculas orgânicas (SILVERSTEIN et al. 2007).

2.5 *Spray drying*

Na indústria farmacêutica o uso adequado de adjuvantes tecnológicos durante a secagem de extratos vegetais, tem um importante papel na estabilidade e na qualidade do produto. Uma das principais funções desses adjuvantes é elevar a temperatura de transição vítrea do material a ser seco, reduzindo assim sua tendência à aglomeração durante a secagem e armazenamento do produto, conferindo ao produto um maior tempo de prateleira (*shelf life*). Dentre os adjuvantes tecnológicos amplamente utilizados no processo de desidratação de extratos vegetais podem ser citados os amidos de milho, mandioca e arroz, amidos modificados, maltodextrinas, dióxido de silício coloidal, goma arábica e ciclodextrinas. Estes compostos podem ser utilizados na secagem de forma isolada ou em associações, sendo as proporções ideais estabelecidas para cada caso específico tanto no que diz respeito ao tipo de extrato a ser seco quanto ao método de secagem indicado. Os efeitos da adição destes carreadores de secagem são

relativamente bem conhecidos para a secagem em *spray dryer*, sendo tema de inúmeros trabalhos científicos apresentados na literatura (OLIVEIRA et al. 2006).

No desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, a técnica de secagem por nebulização "*Spray drying*" tem sido bastante empregada com intuito de se obter produtos intermediários com maior concentração de constituintes químicos e com melhores características tecnológicas (SILVA JUNIOR, 2006a). Os produtos secos apresentam vantagens relacionadas com a homogeneidade de distribuição dos constituintes da preparação e maior estabilidade física (CASADEBAIG et al. 1989; MOURA et al. 1994; GONZÁLES e SCHMIDT, 1995; SENNA et al. 1997; VASCONCELOS et al. 2005).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar parâmetros de qualidade e caracterização foliar, físico-químicas e biológicas da espécie vegetal *S. globulifera* Linn. f.

3.2 Específicos

- Analisar as características estruturais, ultra estruturais e microquímicas de folhas e pecíolos de *S. globulifera*;
- Caracterizar propriedades físicas e físico-químicas a partir da obtenção do pó;
- Obter e caracterizar propriedades químicas e físico-químicas da tintura;
- Traçar um perfil térmico;
- Avaliar a atividade antioxidante;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica do extrato liofilizado e de suas frações;

*Material e
Métodos*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

Foram utilizados, para o estudo, cerca de 8kg de folhas com pecíolos de *S. globulifera* pertencente à família *Clusiaceae*, as quais foram adquiridas junto à associação dos vendedores de ervas do mercado do Ver-o-Peso (Ver-as-Ervas), procedentes da região metropolitana de Belém-PA, distrito de Icoaraci (latitude 1° 17' 46" S e longitude 48° 27' 58.02" O) coletadas ao final do mês de março de 2009. Posteriormente, a lavagem das folhas foi realizada com água corrente para a retirada das sujidades e álcool a 70% (v/v), a fim de se promover a desinfecção e retardar o metabolismo vegetal, sendo submetidas à secagem por aproximadamente 4 dias, à temperatura ambiente. Após esta etapa, o material vegetal foi mantido por 3 dias em uma estufa de ar circulante a uma temperatura entre $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A determinação científica do material botânico foi realizada por comparação com outras já existentes pelo colaborador Prof. Dr. Mário Augusto Gonçalves Jardim, do Setor de Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). A exsicata da planta encontra-se depositada no herbário do MPEG sob o número de registro MG: 156324. Ver fotografia de uma exsicata de *S. globulifera* na Figura 6.



Figura 6 - Fotografia de uma exsicata de *S. globulifera* Linn. f. (Fonte: www.tropicos.org)

4.2 Caracterização botânica

4.2.1 ANATOMIA ESTRUTURAL POR MICROSCOPIA DE LUZ

Para a realização da análise anatômica por microscopia de luz, o material botânico foi fixado em formaldeído, álcool e acetona (F.A.A. 70) (BERLYN e MIKSCHE, 1976) por 48h e conservado em álcool 70%(v/v). Para as secções processou-se bateria de hidratação com gradual redução da concentração de álcool em intervalos de 30min, totalizando 2h. Os cortes foram corados com fucsina básica e Astrablau (MACHADO, 1988) para confecção de lâminas semi-permanentes. Realizou-se dissociação de epiderme utilizando hipoclorito de sódio comercial (MENDONÇA, 1983) para separação das epidermes adaxial e abaxial para posterior observação em microscópio óptico e fotomicrografado (Medlux[®], modelo XSZ-150Ai).

4.2.2 ANATOMIA ULTRA-ESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os fragmentos foram submetidos ao processo de obtenção de ponto crítico e metalização com pó de ouro, para deposição, devidamente organizados, em suportes circulares de metal (*stubs*), com a finalidade de obtenção de fotos em MEV (Jeol[®], modelo JMS-5400LV) (SOUZA, 1998). Anteriormente o material foi submetido ao processo de desidratação em série etanólica (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%v/v) por 2h e 20min.

4.2.3 TESTES MICROQUÍMICOS

Para os testes microquímicos foram feitos cortes transversais da lâmina foliar a mão-livre para os testes de ocorrência de compostos fenólicos com cloreto férrico a 10% e substâncias graxas com Sudan IV (JOHANSEN, 1940); alcaloides com reativo de Dragendorff e antraquinonas com hidróxido de potássio a 5% (COSTA, 1982); açúcares redutores com reativo de Fehling (PURVIS et al. 1964) e amido com lugol (KRAUS e ARDUIN, 1997).

4.3 Caracterização física e físico-química do pó das folhas de *S. globulifera* (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4. ed., 1988)

4.3.1 SECAGEM

O material botânico seco foi pulverizado em moinho de facas inoxidável para obtenção do pó. Logo após, foi retirada uma amostra do pó de *S. globulifera* para análise granulométrica.

4.3.2 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA

O perfil granulométrico do pó de *S. globulifera* foi determinado pelo método de tamisação, empregando-se um conjunto de tamises com abertura de malha variando de 125µm a 1700mm. Aproximadamente 10g do pó foram pesados e colocados no agitador de tamises (Bertel[®]) durante 20 min. Concluída a tamisação, realizou-se a pesagem dos tamises e prato, e por diferença de massa determinou-se a porcentagem de partículas retidas em cada tamis, de acordo com a equação 1:

$$\% \text{ retida} = \frac{M_2 \times 100}{M_1} \quad (1)$$

onde: M_1 é a massa total da amostra e M_2 é a massa de amostra retida em cada tamis (g).

4.3.3 DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO

Exatamente 2g do pó foram transferidos para pesa-filtro previamente dessecado e tarado. A amostra foi submetida a aquecimento em estufa (Biopar[®], modelo S805T) a 105°C durante 2h, seguida de resfriamento em dessecador e pesagem. A operação foi repetida até obtenção de peso constante. Os resultados de três determinações foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra, utilizando a equação 2:

$$\% \text{ perda} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad (2)$$

onde: P_a é o peso da amostra; P_u é o peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação e P_s é o peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação (g).

4.3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS

Exatamente 3g do pó foram transferidos para cadinhos de porcelana previamente calcinados, resfriados e pesados. As amostras foram carbonizadas em mufla (Engro[®], modelo 3551) e incineradas a 450°C por 2h. Após resfriamento em dessecador, as mesmas foram pesadas em balança analítica (Gehaka[®], modelo BK 500) repetindo-se o procedimento até a obtenção de peso constante. A porcentagem de cinzas, obtidas em triplicata, foi calculada em relação à droga seca.

4.3.5 ANÁLISE TÉRMICA (SILVA JUNIOR, 2006b)

4.3.5.1 Termogravimetria (TG/TGA) e termogravimetria derivada (DTG)

As curvas TG foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 750°C, utilizando termobalança (Shimadzu[®], modelo DTG-60H) sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C min⁻¹, utilizando cadinho de platina, contendo massa de amostra em torno de 7±0,5mg. Os cálculos de perda de massa e a derivada da TG foram feitos com auxílio do programa TA-60WS (Shimadzu[®]).

4.3.5.2 Análise térmica diferencial (DTA)

Os mesmos procedimentos utilizados em TG. Os cálculos foram feitos com auxílio do programa TA-60WS (Shimadzu[®]).

4.3.5.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas pelos mesmos procedimentos utilizados em TG, exceto pelo equipamento que foi em célula calorimétrica (Shimadzu[®], modelo DSC-60).

4.3.6 PERFIL ESPECTROSCÓPICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV) (SILVA JUNIOR, 2006b)

Para a obtenção do perfil na região espectral do IV foi utilizado espectrofotômetro (FTIR, modelo Nicolet 6700), contendo cerca de $7 \pm 0,5$ mg de amostra comprimida com brometo de potássio (KBr). As leituras foram realizadas na radiação com número de onda que varia de 4000 a 400cm^{-1} por transmitância em porcentagem.

4.4 Obtenção dos extratos e das frações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 2. ed., 1959)

Para obtenção da tintura de *S. globulifera* utilizou-se o processo de maceração. Nesse processo, o pó permaneceu por 10 dias em temperatura ambiente dentro de um percolador tampado (recipiente de aço inoxidável, hermeticamente fechado), periodicamente agitado, usando-se a proporção de 1000g do pó da planta para obtenção de 5000mL de tintura. O sistema solvente empregado para a espécie foi uma mistura hidroetanólica 70% (v/v). Durante todo o processo, o material esteve ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Após a maceração, a tintura foi filtrada, armazenada em recipiente escuro e colocada sob refrigeração. O rendimento do extrato obtido foi calculado pela relação do volume de extrato obtido, após maceração, e o volume de solução hidroetanólica adicionada ao pó da planta inicialmente. Utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = \frac{V_f}{V_i} \times 100$$

Onde, V_f = volume final, após a maceração e V_i = volume inicial.

Para obtenção do extrato seco ou bruto foram adicionados 1000mL do extrato fluido de *S. globulifera* em um balão de fundo redondo acoplado a um evaporador rotativo (Fisatom[®], modelo 802 série 72025) para concentração desse extrato,

evaporando-se o líquido extrator (etanol) em pressão reduzida. A retirada do extrato do balão volumétrico foi feita com metanol, auxiliada por um banho de ultra-som (Maxiclean[®], modelo 1450 Unique) e transferido para uma placa de Petri devidamente tarada e pesada para secagem em liofilizador (Thermo Savent[®], modelo VLP200) sob vácuo, resultando no extrato liofilizado (Figura 7). O produto obtido foi acondicionado em frasco de cor âmbar e armazenado a baixa temperatura (4°C).

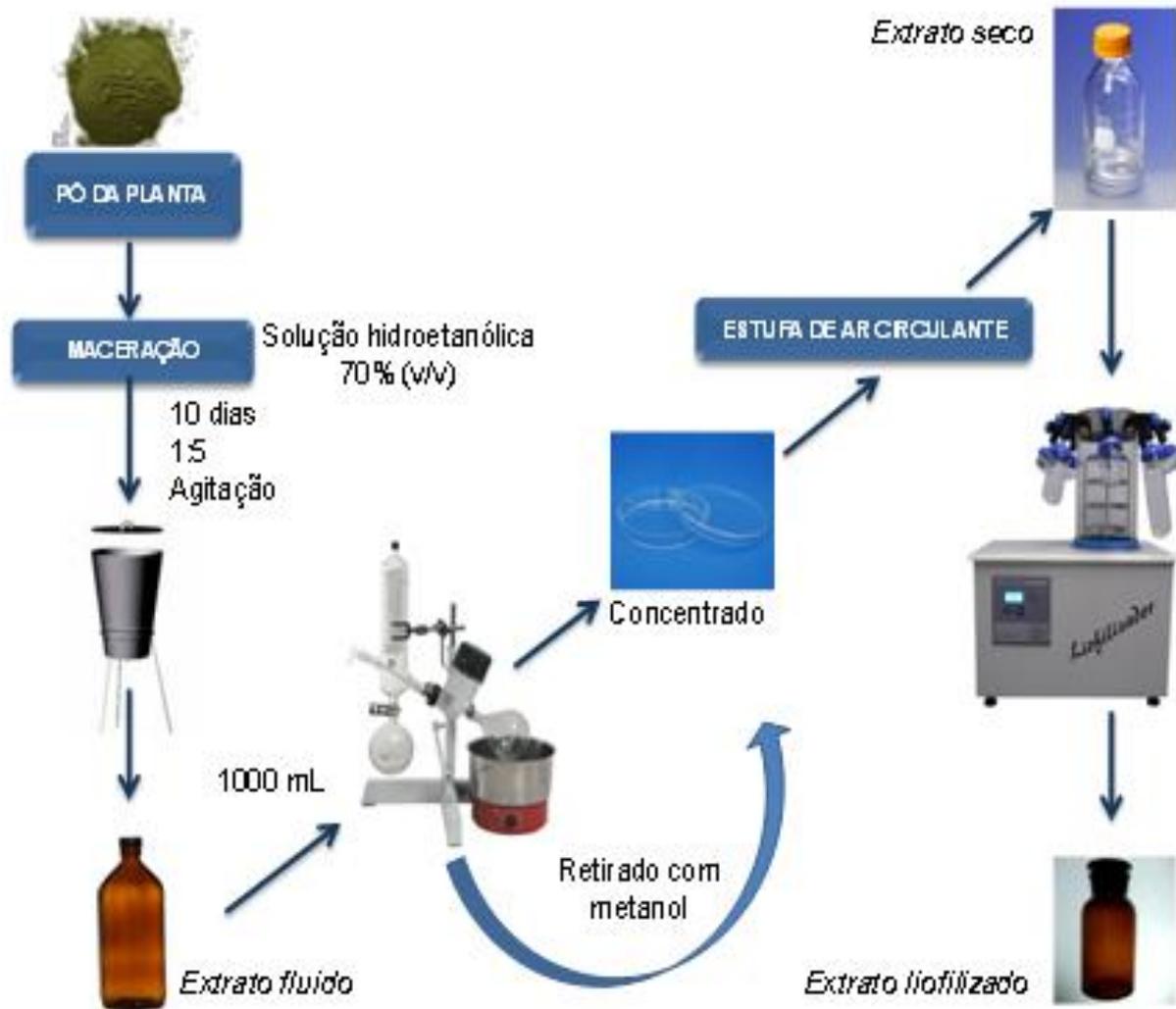


Figura 7 – Fluxograma esquemático do processo utilizado para a obtenção dos extratos de *S. globulifera*.

Para obtenção das frações foram pesados 10g do extrato seco submetido à partição sólido-líquido com 5 alíquotas de 10mL de hexano, em seguida esse volume foi filtrado em papel de filtro e reservado em balão de fundo redondo; a extração foi finalizada com a obtenção de uma solução clara e límpida. Após a obtenção da fração hexânica, esse mesmo procedimento foi realizado para mais três

solventes, clorofórmio, acetato de etila e metanol, respectivamente para obtenção das frações clorofórmica, acetato de etila e metanólica (Figura 8). Todas essas frações foram concentradas em evaporador rotativo.

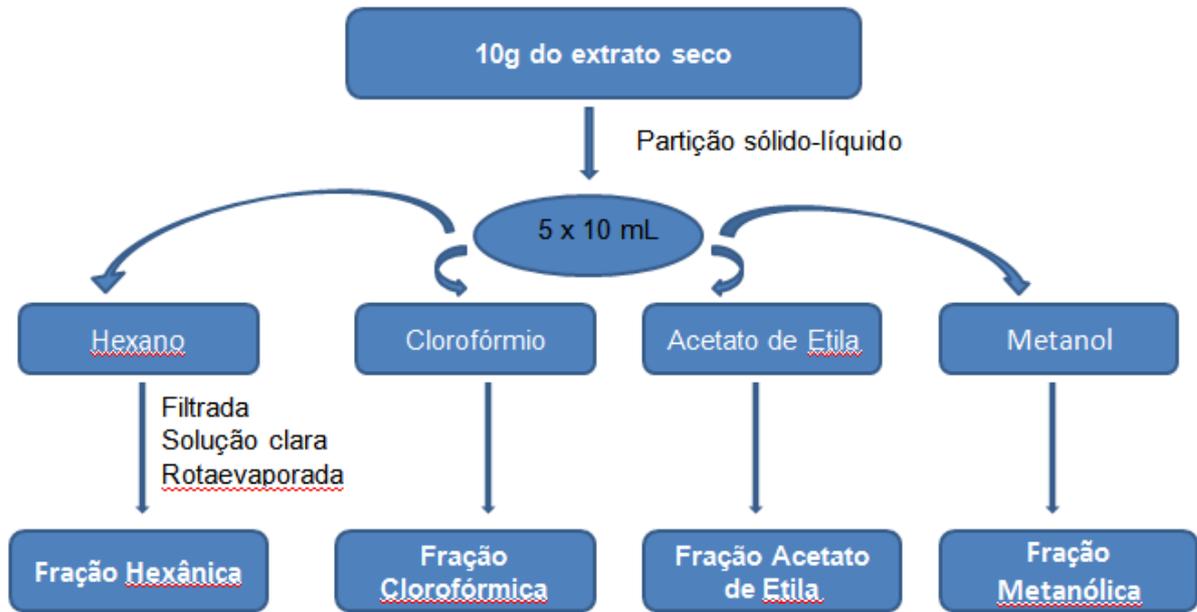


Figura 8 – Fluxograma do roteiro experimental utilizado para obtenção das frações de *S. globulifera*.

4.5 Caracterização química e físico-química da tintura de *S. globulifera* (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4. ed., 1988)

4.5.1. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE APARENTE

Um picnômetro com capacidade para 5mL, previamente tarado, foi preenchido com o líquido padrão (água recém-destillada e fervida) e pesado. Em seguida o picnômetro foi preenchido com 5mL da amostra e pesado. A relação, em triplicata, entre o peso da amostra e do padrão, em um volume fixo à temperatura de 20°C forneceu o valor da densidade relativa da tintura de *S. globulifera*.

4.5.2 DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro (pHTek[®], modelo pHS3B) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 e os resultados correspondem à média de três determinações.

4.5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS

Cerca de 2g da tintura foram pesados e transferidos para pesa-filtro previamente tarado. Posteriormente, as amostras, em triplicata, foram levadas à secura em placa aquecedora e dessecadas em estufa a 105°C durante 2h. Após este período, o pesa-filtro foi resfriado em dessecador e pesado em balança analítica (Bioprecisa[®], modelo FA2104N). O teor de sólidos foi calculado em relação à 100g do extrato seco, pela média de três determinações.

4.5.4 SECAGEM POR ASPERSÃO (*SPRAY DRYING*)

A operação de secagem foi realizada em um *spray dryer* (Lab-plant[®], modelo SD-05). A câmara de secagem possui diâmetro de 215 mm e altura de 500 mm. Os principais componentes do sistema estão representados na Figura 9.

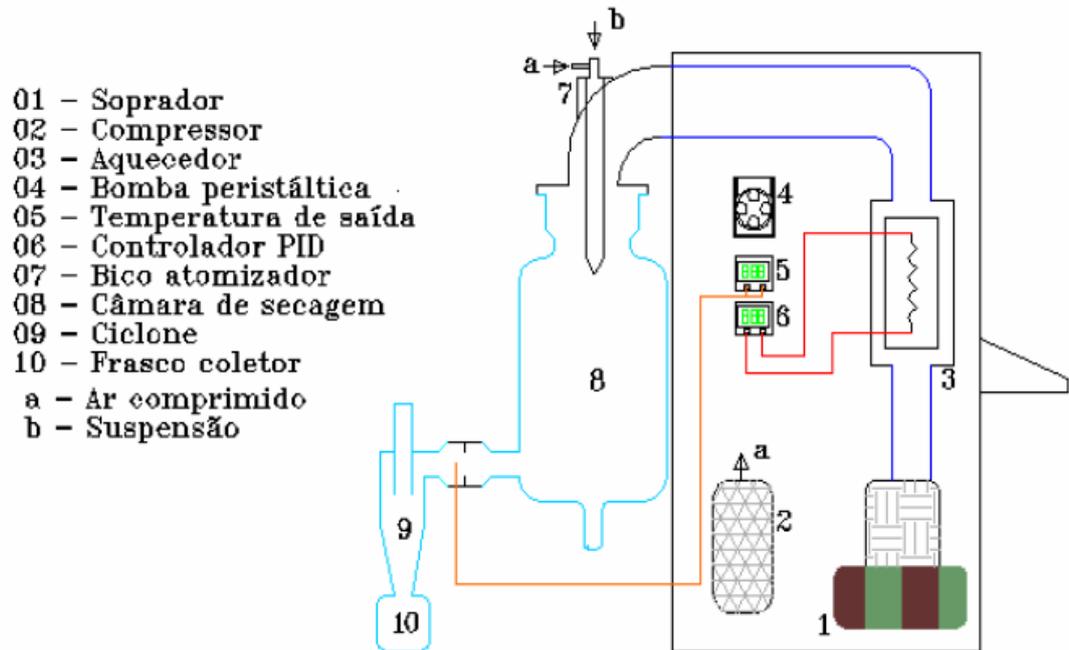


Figura 9 - Diagrama esquemático do equipamento *spray dryer* utilizado (Fonte: Oliveira et al. 2006)

4.5.4.1 Preparação do extrato seco

A tintura foi concentrada em evaporador rotativo até a concentração de sólidos de 10,51%, e posteriormente foi dividida em 5 amostras. Na primeira foi acrescentado o adjuvante aerosil[®] dióxido de silício coloidal) na concentração de 40% em relação a concentração de sólidos; na segunda 20% do mesmo adjuvante; na terceira 5% de aerosil[®] e 35% de celulose microcristalina; na quarta 5% de aerosil[®] e 15% de celulose microcristalina e na última não houve acréscimo de adjuvante, sendo utilizado 50g do concentrado para essa e 100g para as demais, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1- Variáveis analisadas no processo de secagem.

Variáveis estudadas	
Excipiente	%*
	20
Aerosil®	40
Celulose microcristalina	35:05:00
+	15:05
Aerosil®	
Sem excipiente	0

*Porcentagem calculada em relação à concentração de sólidos totais.

As amostras foram secas em *spray dryer* em condição operacional pré definida em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa LAPROFAR (SOUZA, 2003; OLIVEIRA et al. 2006) temperatura de ar de secagem/entrada (T_{ge}) de 150°C; vazão da bomba peristáltica (W_{susp}) de 4g/min; vazão de ar de secagem (W_g) de 60m³/h; diâmetro do bico atomizador de 1mm; pressão do ar comprimido (P_{atm}) 2kgf/cm² e vazão do ar comprimido (W_{atm}) de 15 L/min. O rendimento do processo (Rec), a eficiência térmica (η) e as perdas durante o processo foram calculadas. Os extratos secos obtidos foram identificados e armazenados em frascos âmbar e mantidos na geladeira.

4.5.4.2 Umidade residual (X_p)

Amostras de 2g de extrato seco foram mantidas em estufa a 102±1°C até peso constante, segundo metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (1988).

4.6 Caracterização química e físico-química do extrato liofilizado de *S. globulifera* (ELS)

4.6.1 SCREENING FITOQUÍMICO DO EXTRATO LIOFILIZADO E DAS FRAÇÕES (BARBOSA, 2003)

A prospecção química do extrato liofilizado e das frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e metanólica (FM) foi direcionada para verificar a presença de constituintes químicos naturais, tais como: ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcaloides, aminoácidos, antraquinonas, catequinas, depsídeos, depsídonas, derivados da cumarina, esteroides, fenóis, flavonoides (antocianinas, antocianidinas, auronas, catequinas (taninos catéquicos), chalconas, flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanonóis, leucoantocianidinas, xantonas), glicosídeos cardíacos, polissacarídeos, proteínas, purinas, saponinas, sesquiterpenolactonas e outras lactonas, taninos e triterpenóides. As análises dos metabólitos secundários foram realizadas em triplicata, na concentração de 5mg/mL e estão descritos a seguir:

Saponinas espumílicas

Foram dissolvidos 25mg do extrato liofilizado/fração em 5mL de água destilada. Em seguida, diluídos para 15mL e agitado vigorosamente durante 2min em tubo fechado. A camada de espuma permanecendo estável por mais de 30min, o resultado considerado positivo.

Açúcares redutores

Foram dissolvidos 25mg do extrato liofilizado/fração em 5mL de água destilada e filtrados. Adicionaram-se 2mL do reativo de Fehling A e do reativo de Fehling B. Aqueceu-se em banho de água em ebulição durante 5min. Se houver o aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, resultado considerado positivo.

Polissacarídeos

Foram dissolvidos 25mg do extrato liofilizado/fração em 5mL de água destilada e filtrados. Adicionaram-se II gotas de lugol. O aparecimento de coloração azul, resultado considerado positivo.

Proteínas e aminoácidos

Foram dissolvidos 15mg do extrato liofilizado/fração em 3mL de água destilada e filtrada. Adicionou-se 0,5mL de solução aquosa de Nihidrina a 0,1% e aqueceu-se até ebulição. O aparecimento de coloração violeta persistente, indica resultado positivo.

Fenóis e taninos

Foram dissolvidos 25mg do extrato liofilizado/fração em 5mL de água destilada e filtrados. Adicionaram-se II gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1%. Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativa de reação positiva, quando comparado com o teste em branco. Coloração inicial entre o azul e o vermelho, é indicativa da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo; precipitado escuro de tonalidade azul indica presença de taninos pirogálicos, e verde, presença de taninos catéquicos.

Flavonoides

Geral

Foram dissolvidos 25mg do extrato liofilizado/fração em 5mL de metanol e filtrados. Adicionaram-se 5 gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

Por classes (realizado somente para as frações)

a) Antocianidinas, antocianinas, flavonas, flavononóis, xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis

Foram dissolvidos 35mg da fração em 20mL de água destilada e filtrados. Transferiu-se para três tubos de ensaio, 3mL da solução (para cada tubo). Acidulou-se um a pH 3, alcalinizou-se os dois restantes a pH 8.5 e 11;

- A presença de coloração vermelha em pH 3, lilás em pH 8.5 e azul púrpura em pH 11 indica resultado positivo para antocianidinas e antocianinas;

- A presença de coloração amarela em pH 11 indica resultado positivo para flavonas, flavonóis, xantonas;

- A presença de coloração vermelha em pH 3 e vermelho púrpura em pH 11 indica resultado positivo para chalconas, auronas;

- A presença de coloração vermelho-laranja em pH 11 indica resultado positivo para flavanonóis.

b) Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Foram dissolvidos 10mg da fração em 5mL de água destilada e filtrados. Transferiu-se para dois tubos de ensaio, 3mL da solução (para cada tubo). Acidulou-se um a pH 1-3 com HCl e alcalinizou-se os outros a pH 11 com solução de NaOH. Aqueceu-se com auxílio de uma lâmpada de álcool durante 2-3 minutos e observou-se se houve modificação na coloração, comparando-se com os tubos utilizados no teste anterior (para antocianidinas, antocianinas, flavonas, flavononóis, xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis).

- A presença de coloração vermelho em pH ácido indica resultado positivo para Leucoantocianidinas;
- A presença de coloração pardo -amarela em pH ácido indica resultado positivo para catequinas (taninos catéquicos);
- A presença de coloração vermelho-alaranjado em pH alcalino indica resultado positivo para flavanonas.

c) Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Transferiu-se para um tubo de ensaio, 3mL da solução extrativa usada no teste anterior e acrescentou-se alguns miligramas de magnésio em raspas, e 0,5mL de HCl concentrado. Aguardou-se o término da efervescência e observou-se por comparação a mudança na coloração em relação aos tubos acidificados dos testes anteriores. O aparecimento ou intensificação da cor vermelha é indicativo da presença dos metabólitos acima citados.

Glicosídeos cardíacos

Foram dissolvidos 25mg do extrato liofilizado/fração em 5mL de metanol e filtrados. Separou-se em duas porções de 2mL cada e adicionou-se gotas do reativo de Keede. O aparecimento de coloração azul ou violeta indica reação positiva.

Catequinas

Foram dissolvidos 15mg do extrato liofilizado/fração em 3mL de metanol e filtrados. Juntou-se 1mL de solução aquosa de vanilina a 1% e 1mL de HCl concentrado. O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positivo.

Derivados benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas

Foram dissolvidos 15mg do extrato liofilizado/fração em 3mL de metanol e filtrados. Adicionaram-se II gotas de Na_2CO_3 a 25%, II gotas de Formaldeído a 4% e II gotas de o-dinitrobenzeno a 5%. Aqueceu a mistura em banho-maria. A coloração violeta indica reação positiva.

Lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas

Foram dissolvidos 15mg do extrato liofilizado/fração em 3mL de metanol e filtrados. Adicionaram-se XII gotas de solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina a 10% e II gotas de solução metanólica de KOH a 10%. Aqueceu-se suavemente em banho-maria durante 2min. Em seguida resfriou-se e acidulou-se com solução de HCl a 1N e adicionou-se I gota de FeCl_3 1%. O surgimento de uma coloração violeta indica reação positiva.

Esteroides e triterpenoides

Foram dissolvidos 50mg do extrato liofilizado/fração em 10mL de clorofórmio e filtrados sobre carvão ativado. Transferiu-se o filtrado para um tubo de ensaio completamente seco e adicionou-se 1mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Em seguida, adicionaram-se, cuidadosamente, III gotas de H_2SO_4 concentrado e agitou-se novamente. O rápido desenvolvimento de cores, que vão do azul evanescente, ao verde persistente indicam resultado positivo.

Azulenos

Foram dissolvidos 10mg do extrato liofilizado/fração em 2mL de clorofórmio e filtrados. Concentrou-se até 0,5mL em banho-maria e adicionou 2,5mL da solução p-

dimetilaminobenzaldeído. Aqueceu em banho-maria por 5min, e após esfriar em um funil de decantação, agitou com 10mL de éter de petróleo. Após as duas fases ficarem distintas, observou-se a fase aquosa. Se houver presença de proazulenos, a fase aquosa adquire coloração azul, porém, quando estes estão em pequena quantidade, a coloração observada é esverdeada.

Carotenoides

Foram dissolvidos 15mg do extrato liofilizado/fração em 2mL de clorofórmio e filtrados. Juntou-se 2mL de clorofórmio saturado com tricloreto de antimônio. O aparecimento da coloração azul indica resultado positivo.

Alcaloides

Foram dissolvidos 25mg do extrato liofilizado/fração em 5mL de solução de HCl a 5% e filtrados. Separaram-se quatro porções de 1mL em placa de toque e adicionaram-se III gotas dos reativos de Bouchard, Dragendorff e Mayer. Precipitação ou turvação em pelo menos um tubo é indicativa de resultado positivo.

Purinas

Numa cápsula de porcelana, juntou-se 5mg do extrato liofilizado/fração, III gotas de solução de HCl 6N e II gotas de H₂O₂ concentrado (30%) e evaporou-se em banho-maria até a formação de um resíduo corado de vermelho. Juntaram-se III gotas de solução de NH₄OH (6N). O surgimento de coloração violeta indica reação positiva.

Depsídeos e depsidonas

Foram dissolvidos 25mg do extrato liofilizado/fração em 5mL de éter etílico e filtrados. Evaporou-se todo o éter em banho-maria e juntou-se ao resíduo 3mL de metanol. Após agitação, adicionaram-se III gotas de solução de FeCl₃ a 1%. O aparecimento de coloração verde, azul ou cinza, indica reação positiva.

Derivados da cumarina

Foram dissolvidos 25mg do extrato liofilizado/fração em 5mL de éter etílico e concentrados em banho-maria até 0,5mL. Em papel filtro, aplicaram-se gotas da solução etérea, de modo que se formaram duas manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro cada. A uma destas, adicionou-se 1 gota de solução de NaOH a 1N. Cobriu-se a metade da mancha com papel escuro, e expôs-se a outra metade a luz ultravioleta. Descobriu-se e compararam-se as manchas. O aparecimento de fluorescência azul na parte exposta da mancha indica reação positiva.

Antraquinonas

Foram dissolvidos 25mg do extrato liofilizado/fração em 5mL de tolueno e filtrados. Adicionaram-se 2mL de solução de NH₄OH a 10% e agitou-se suavemente. O aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indica reação positiva.

4.6.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS

Foi construída uma curva analítica com ácido gálico (Merck®). A amostra foi preparada diluindo o extrato liofilizado em água na proporção de 1:2. Foram adicionados a 250 µL da amostra ou soluções de ácido gálico, 125 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Merck®) e 625 µL de solução de Na₂CO₃ (10%). Assim, a concentração do extrato no meio reacional (1mL) foi de 112,5 µg/mL. Todos os tubos foram homogeneizados e tampados com papel alumínio. Após 30min de incubação à temperatura ambiente, foi realizada leitura da absorbância das amostras e do branco (onde uma alíquota da amostra foi substituída pela mesma quantidade de água) à 735nm. O ensaio foi realizado em duplicata (SINGLETON; ORTHOFER e LAMUELA-RAVENTOS, 1999; SILVA et al. 2007).

4.6.3 OBTENÇÃO DO PERFIL TÉRMICO DO EXTRATO LIOFILIZADO (SILVA JUNIOR, 2006b)

4.6.3.1 Termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial

Os mesmos procedimentos adotados para o pó de *S. globulifera*, item 4.3.5.

4.6.4 OBTENÇÃO DO PERFIL ESPECTROSCÓPICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (SILVA JUNIOR, 2006b)

Os mesmos procedimentos adotados para o pó de *S. globulifera*, item 4.3.6.

4.6.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do extrato foi avaliada em diferentes sistemas *in vitro*, os quais simulam a formação de diferentes espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo possível avaliar quais EROs o extrato de *S. globulifera* é capaz de inibir. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição versus a concentração de extrato no meio reacional. A porcentagem de inibição foi estabelecida pela equação 3:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{\text{Resposta da amostra}}{\text{Resposta do grupo controle}} \times 100 \right) \quad (3)$$

4.6.5.1 Determinação da atividade redutora do DPPH•

Para avaliação da atividade antioxidante, o extrato foi diluído em água na concentração de 3mg/mL. Assim, as concentrações da amostra no meio reacional contemplaram uma faixa de 7,5 a 60µg/mL. Logo em seguida, em tubo de ensaio foram adicionados 1mL de tampão acetato de sódio (100mM) pH 5,5, 1mL de álcool

etílico, 50µL de amostra e 500µL solução alcoólica de DPPH[•] (200mM). Depois de 15min foi realizada a leitura da absorbância das amostras, do branco (sem DPPH[•] e amostra) e do controle positivo (sem amostra) em 517nm (BLOIS, 1958). O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração do extrato e os resultados foram expressos considerando a concentração de extrato contida no meio reacional.

4.6.5.2 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol

As amostras de extrato de *S. globulifera* utilizadas neste ensaio foram preparadas diluindo-se o extrato previamente em água na concentração de 600µg/mL. E a partir desta foram preparadas diluições subseqüentes contemplando a faixa de 0,28 a 8,95µg/mL no meio reacional.

Para a determinação da atividade seqüestradora do extrato de *S. globulifera*, foram pipetados em tubo de ensaio, 400µL de solução preparada acrescentando EDTA (1mM) à solução tampão glicina (0,1M), pH 9,4. Então, foram adicionados 150µL de xantina (6mM), 10µL de amostra e 10µL de solução de luminol (0,6mM). A reação foi iniciada com a adição de 100µL de solução recém preparada de xantina oxidase (20mU/mL), mantida resfriada no gelo. A medida da atividade seqüestradora foi realizada durante 5min a 25°C em luminômetro Autolumat LB 953 (HIRAYAMA et al. 1997; PASCUAL; GONZÁLEZ e TORRICELLA, 1994).

4.7 Caracterização Microbiológica

4.7.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO LIOFILIZADO E DAS FRAÇÕES DE *S. globulifera* (CLSI, 2003)

A avaliação preliminar da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método Kirby-Bauer ou difusão em disco (BAUER et al., 1966; CLSI, 2003a; KARTAL et al., 2003) onde foram testadas as cepas das seguintes bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus*

faecalis (ATCC 29212), gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e o fungo leveduriforme *Candida albicans* (ATCC 0175) oriundos da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). Antes de serem utilizadas, as células cresceram em caldo nutritivo de infusão (*Brain heart infusion-BHI*, Difco®) por 18-24h a 37°C.

Após o crescimento, foram preparados inóculos dos microrganismos a testar, tomando-se de 2 a 3 colônias do isolado mantidos em Ágar Müller-Hinton e diluídos em caldo Müeller-Hinton até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, correspondendo aproximadamente a 2×10^8 UFC/mL de cada microrganismo (CLSI, 2003a).

Cada suspensão de microrganismo foi semeada em triplicata com auxílio de um *swab* descartável em toda a superfície do meio Ágar Müller-Hinton contidos em placas de Petri. Em seguida, foram adicionados discos de papel filtro quantitativo de 6mm de diâmetro impregnados com 10µL do extrato liofilizado de *S. globulifera* e das frações obtidas (FH, FC, FAE e FM) nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25mg/mL, diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (1:6), discos estes previamente preparados e deixados na estufa por 24h à 35 °C. O cloranfenicol e a nistatina foram preparados de acordo com o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003b) como controles positivos, respectivamente, para bactérias e fungo. Em seguida, as placas foram incubadas na estufa à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h para as bactérias e por 48h para o fungo. Após esse período, foi realizada a leitura dos resultados, caso houvesse formação de halo ao redor dos discos contendo o extrato e as frações o resultado seria considerado positivo, e o valor do halo medido em mm com ajuda de um paquímetro (CLSI, 2003b; PAREKH e CHANDA, 2007; SANTOS et al. 2007).

4.7.2 MICRODILUIÇÃO EM CALDO - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DAS CONCENTRAÇÕES BACTERICIDAS MÍNIMAS (CBM) DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES

O teste de microdiluição em caldo para a determinação da CIM, foi realizado segundo a metodologia de Bicalho et al. (2003). Inicialmente, preparou-se uma solução com 1mg das amostras diluída em 125µL de DMSO cada. Desta solução, foi

retirado 10µL e acrescentado 70µL de caldo nutriente, resultando assim na solução mãe. Posteriormente, foram distribuídos 80µL de caldo nutriente na primeira fileira (A) em placas de 96 poços, conforme Figura 10. Em seguida, foram adicionados 80µL da solução mãe contendo extrato (400µg/mL) no poço A1, nos demais poços, diluições seriadas A1 à A12), com fator de diluição de dois, foram realizadas e, finalmente, foram adicionados 20µL da suspensão da bactéria ou inóculo (10^6 células/mL). A concentração no meio reacional das amostras variou de 400µg/mL a 0,195µg/mL. O mesmo procedimento foi adotado nos poços B (B1 a B12), C (C1 a C12), D (D1 a D12) e E (E1 a E12), respectivamente para as frações metanólica, acetato de etila, clorofórmica e hexânica. Na fileira F foi realizado o controle positivo, penicilina (5,9µg/mL a 0,00575µg/mL) para bactérias gram positivas; estreptomicina (5,9µg/mL a 0,00575µg/mL) para bactérias gram negativas e miconazol para fungos leveduriformes. Na fileira G, o controle do diluente/solvente (DMSO). Na fileira H, no poço H1 realizou-se o controle da cultura (80µL de caldo mais 20µL de inóculo); no poço H7, controle do extrato [80µL da solução D12 (volume retirado após a diluição seriada no poço A12) mais 20µL de caldo]; H8 a H11, respectivamente as frações metanólica, acetato de etila, clorofórmica e hexânica; e por fim H12 o controle do caldo (100µL de caldo).

As placas foram incubação por 24h, a 37°C em estufa. A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi efetuada visualmente 4h após aplicação do reagente resorcina. As bactérias utilizadas nos experimentos foram *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. E o fungo *Candida albicans* ATCC 94548. Para o teste da CBM dos extratos e frações foi utilizada placa de Petri contendo o meio Ágar Müller-Hinton. A partir da CIM encontrada para cada teste foi retirada uma amostra com palito e aplicada na referida placa. Havendo o crescimento de bactérias e fungos eram determinados os valores do CBM.

Para a interpretação dos resultados foram considerados que a inibição no ensaio de CIM e crescimento do microrganismo na subcultura (CBM) significa ação bacteriostática e a ausência de crescimento na subcultura significa ação bactericida (BARON e FINEGOLD, 1990).

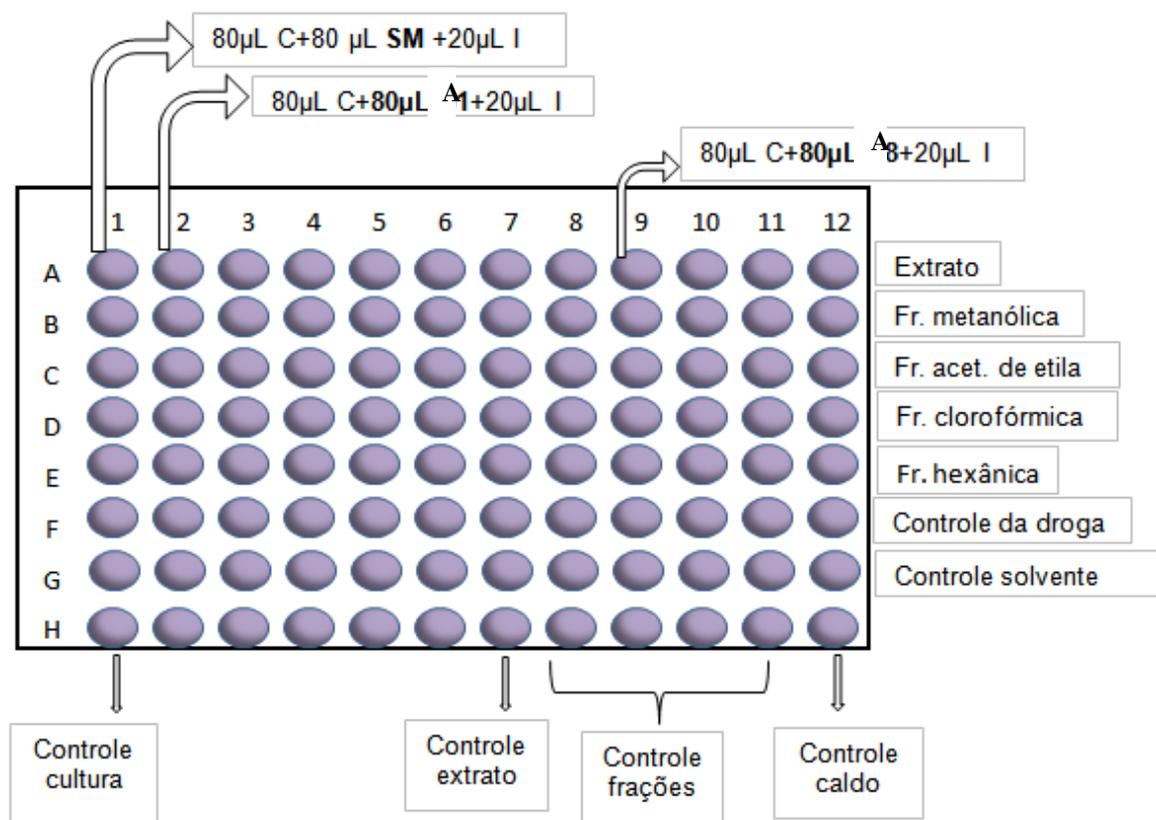


Figura 10. Esquema ilustrativo de uma microplaca utilizada no teste da CIM.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização botânica

Neste trabalho foi realizada, primeiramente, a etapa botânica, fundamental na identificação e confirmação do material aqui analisado. E também, contribuir mais para futuros estudos, haja vista a escassez de pesquisa com folhas e pecíolos dessa espécie vegetal, sendo que os relacionados com as raízes são os mais estudados, seguido pelas flores, abordando processo de polinização.

5.1.1 ANÁLISE DA ANATOMIA ESTRUTURAL, ULTRA-ESTRUTURAL E DOS TESTES MICROQUÍMICOS

Em vista frontal, as células epidérmicas de ambas as superfícies da lâmina são heterodimensionais e têm forma poligonal, sem distinção entre as células costal e intercostal (Figuras 11A- B). Na adaxial e as superfícies abaxial, as paredes celulares são retas (Figuras 11A-B). Em vista transversal, em ambos os lados da epiderme, as células são tabulares com paredes retas e há uma fina camada de cutícula (Figuras 11A-B). O complexo estomático é anomocítico, cercado por 4-6 células, encontrado apenas na superfície abaxial (Figura 11B). Drusas de cristais foram identificados no interior das células da epiderme (Figuras 11A-B). Na seção transversal da lâmina é observado mesofilo dorsiventral e consistem de duas a três camadas de células parênquima paliçádico na região superior e na posição oposta, há várias camadas de células heterodimensional com forma poligonal e grandes espaços intercelulares que compõem o parênquima esponjoso. Idioblastos com drusas de cristais também são encontrados no interior das células do mesofilo (Figura 11C). Estudos de Almeida-Cortez e Melo-de-Pinna (2006), também relataram a presença de idioblastos contendo cristais em mesofilo e células secretoras estão presentes apenas no parênquima esponjoso de *Vismia guianensis* Choisy (Aubl). Metcalfe e Chalk (1950) e Cronquist (1981) delinearam algumas características do limbo para representantes da família Clusiaceae, como uma

hipoderme para várias camadas de células em contato com a epiderme adaxial em diversos gêneros; cristais de oxalato de cálcio no mesofilo; folha dorsiventral em vários gêneros e sub-centricos e outros. Nossos resultados confirmam essa informação.

A margem da lâmina é dobrada em direção à face abaxial papilosa com células epidérmicas com cutícula espessa e flanges em relação ao resto do parênquima. O parênquima fundamental é composto de células limitado por um número de células esclerenquimáticas (Figura 12A). Camelo (2010) encontrou os mesmos resultados para *Vismia guianensis* (Aubl) Choisy e Júnior et al (2005) encontraram na região de fronteira da cutícula espessa lâmina e da epiderme formada por uma camada de células com tamanho menor, quando comparado com outras células epidérmicas de *Calophyllum brasiliense* Cambess, que pertence à mesma família das espécies estudadas neste trabalho.

Externamente ao feixe vascular, geralmente em grupos, são encontrados vasos laticíferos (Figura 11E). Uma camada de células parenquimáticas ao redor dos feixes vasculares limitados nas regiões superior e inferior por um conjunto de células esclerenquimáticas (Figura 11E). As células do xilema ocorrem na região superior e existem alguns grupos isolados de células do floema na região inferior (Figura 11E). Há feixes e os vasos de látex estão associados a veias primárias e secundárias e a nervura central (Figura 11E). Na família Clusiaceae, ductos esquizógenos são encontrados em folha, perto dos feixes vasculares ou de forma independente no mesofilo (METCALFE e CHALK, 1950). Gasparotto-Junior et al. (2005) mencionam a presença de canais secretores esquizógenos com compostos fenólicos espalhados sobre o parênquima e sistema vascular nas folhas de *C. brasiliense*. As folhas da família Clusiaceae têm cavidades secretoras, alguns delas produzindo resinas aromáticas, que, somadas às condutas secretoras promovem a acumulação de vários tipos de metabólitos secundários, tais como xantonas, que podem ser isoladas ou agrupadas com cristais de oxalato de cálcio (CARDONA et al, 1990; CORTEZ et al. 1999).

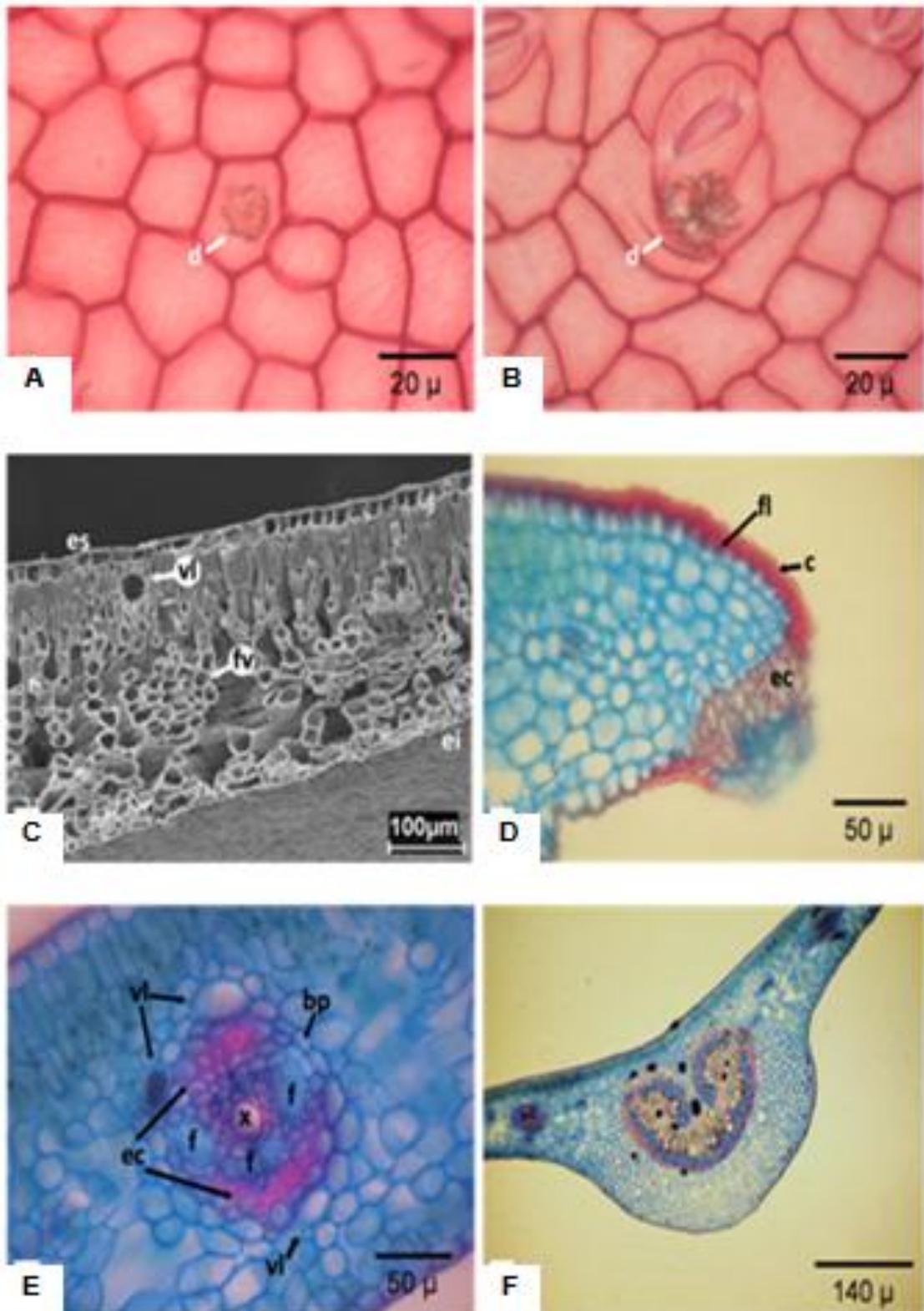
A nervura central é mostrada na face superior e de destaque na inferior. Em secção transversal, as células epidérmicas na face adaxial diminuir seu tamanho quando se aproxima da região central (Figuras 11F E 12A). Sob a epiderme, há várias camadas de células redondas heterodimensional com drusas de oxalato de cálcio e espaços intercelulares. Há vários vasos laticíferos na periferia do tecido vascular, que é cercada por tecido esclerenquimático (Figuras 11 F e 12 A). O mais

periférico é em forma de arco parcialmente fechado para o lado adaxial e composto por feixes colaterais (Figuras 12A e B)

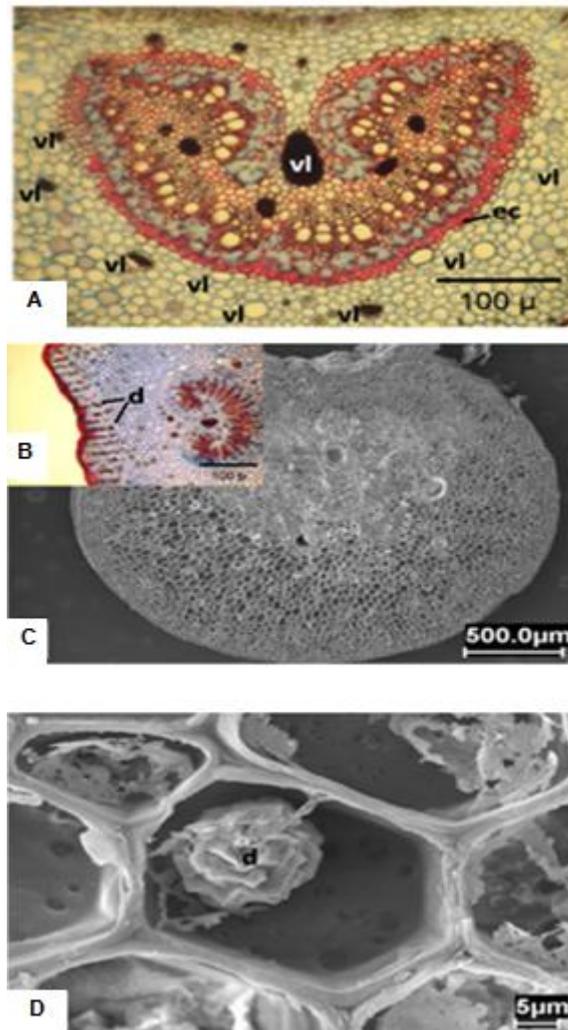
Na seção transversal, o pecíolo é plano convexo revestido com células quadrangular e espessa cutinização. O córtex é composto de células parenquimáticas com poucos espaços intercelulares e a presença de drusas isoladas na parte convexa, e em cachos na parte plana (Figuras 12B e C). Vasos laticíferos são encontrados distribuídos ao redor do feixe vascular central que tem uma forma semelhante à nervura central, mas é limitado por um conjunto de células parenquimáticas compactas (Figuras 12B a D).

As características anatômicas de folhas de *S. globulifera* foram fundamentais na identificação das espécies, como estudos sobre a anatomia foliar desta espécie não existia, e os relacionados com as raízes são os mais estudados, juntamente com flores, sobre o processo de polinização.

Podemos concluir que o estudo anatômico das folhas foi de relevância e contribuiu para obter informações sobre esta planta. Foi possível obter parâmetros de controle de qualidade através da identificação da espécie, visando contribuir para a análise farmacobotânica das matérias-primas a partir de espécies como o ponto de partida para estudos posteriores.



Figuras 11A-F – Cortes histológicos de folhas de *Symphonia globulifera* em microscopia de luz e MEV. A. Face adaxial; B. Face abaxial; C. Corte transversal do limbo foliar em MEV; D. Margem; E. Detalhe do feixe vascular; F. Nervura central (bp:bainha parenquimática, c:cutícula; d:drusa, ec:esclerênquima, es: epiderme superior, f: floema, fl: flange; fv: feixe vascular, vl: vaso laticífero, x: xilema.)

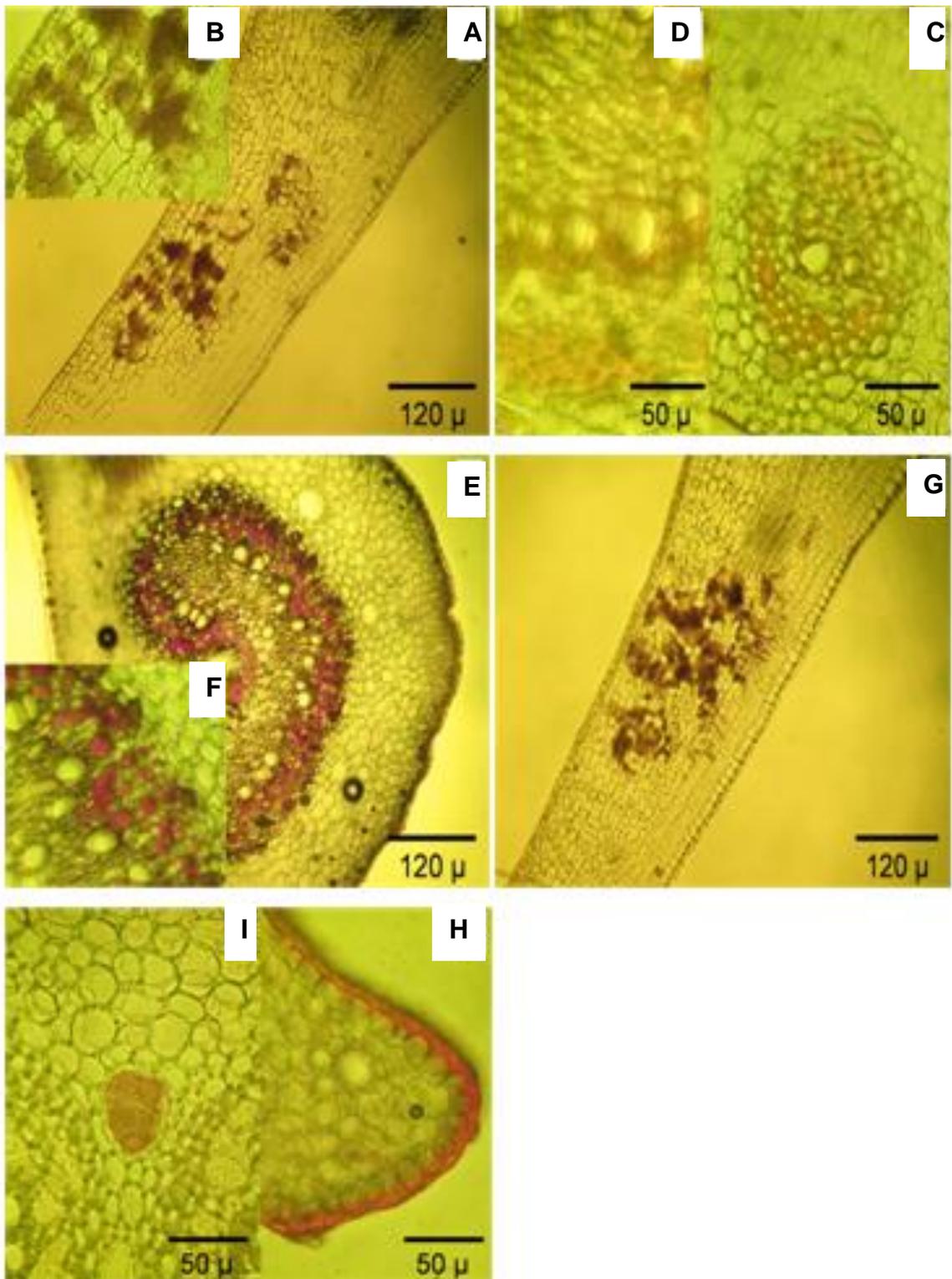


Figuras 12A-D – Cortes histológicos de folhas e pecíolos de *Symphonia globulifera* em microscopia de luz e MEV. A. Detalhe do tecido vascular da nervura central; B. Detalhe da região plana e do tecido vascular do pecíolo; C. Vista geral do pecíolo em MEV; D. Detalhe de drusa no córtex do pecíolo em MEV (d:drusa, vl:vaso laticífero).

Costa (2000) afirmam que além do valor na localização microquímica dos princípios farmacologicamente ativos, os testes microquímicos contribuem, ainda, na identificação dos vegetais e em particular de seus pós quer pela natureza física, de suas características morfológicas e natureza de suas fraudes ou falsificações. Nos testes microquímicos pode-se verificar a presença de metabólitos secundários na lâmina foliar de *S. globulifera*. A realização desses testes detectou a presença de compostos fenólicos dispersos nas células do parênquima lacunoso (Figuras 13A e B) Este resultado está de acordo com Cronquist (1981), o qual afirma que na família Clusiaceae são encontradas, com grande freqüência, células secretoras de compostos fenólicos dispersas, geralmente produzindo proantocianidinas e armazenando vários tipos de xantonas. Há alcaloides nas calotas de células

esclerenquimáticas dos feixes vasculares e no tecido parietal das células do xilema (Figuras 13C e D), sendo que com a triagem fitoquímica foi observado somente um indicativo para alcaloides, provavelmente houve interferência de outros compostos sobre o resultado. Foi detectada a presença de açúcares redutores no tecido floemático (Figuras 13E e F), esse resultado está também relacionado com o *screening* fitoquímico realizado com o extrato e com as frações das folhas de *S. globulifera*. Assim como houve grande concentração de flavonoides dispersos no mesofilo e em concentração reduzida nas paredes das células esclerenquimáticas e do xilema (Figura 13G), porém, no *screening* fitoquímico não foi detectado flavonoides para o extrato e sim, classes de flavonoides para duas das quatro frações (FM e FAE). E substâncias graxas como conteúdo dos vasos laticíferos e na cutícula da superfície epidérmica, principalmente na margem (Figura 13H e I). Para os testes de amido e antraquinonas, o resultado foi negativo.

As características morfológicas e anatômicas das folhas de *S. globulifera* ajudaram na identificação da espécie, assim como traçaram aspectos da superfície das mesmas. Desses aspectos depende, em grande parte, a adaptação das plantas ao seu ambiente, pois são as características químicas e/ou morfológicas da superfície foliar que condicionam, por exemplo, a quantidade de luz absorvida ou refletida, o grau de hidrofobia do órgão, a pressão de vapor do ar em contato com as folhas, a eficiência do órgão em defender-se de parasitas e patógenos, a quantidade de poluentes ou defensivos absorvida e, evidentemente, a magnitude da transpiração cuticular (SALATINO et al. 1986).



Figuras 13A-I– Cortes histológicos de folhas de *Symphonia globulifera*. A-B. Corte transversal do mesofilo com compostos fenólicos, B. Detalhe da ocorrência de compostos fenólicos; C-D. Teste para alcaloides, C. Feixe vascular, D. Detalhe da nervura central; E-F. Teste para açúcares redutores, E. Nervura central, F. Detalhe do tecido floemático; G. Teste de flavonoides no mesofilo; H-I. Teste de ocorrência de substâncias graxas, H. margem, I. Detalhe de vaso na nervura central.

5.2 Caracterização física e físico-química do pó das folhas de *S. globulifera*

Após a confirmação da espécie, as folhas previamente selecionadas foram lavadas com etanol 70% (v/v) para controlar a carga microbiológica que possivelmente poderia estar presente no material vegetal; após essa fase a secagem das folhas em temperatura ambiente seguida de secagem a 40 ± 2 °C em estufa de ar circulante promoveu a estabilização química e a retenção dos microorganismos, pois a eliminação de maior parte do conteúdo de água conseguiu favorecer a inativação dos sistemas enzimáticos presentes no conteúdo celular destruindo um ótimo local para o desenvolvimento de microorganismos que a planta traz normalmente consigo (CUNHA, 2005). Após secagem, as folhas foram trituradas em moinho de facas até a obtenção de um pó, que foi caracterizado pela sua granulometria.

5.2.1 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA

Na análise granulométrica observou-se que as partículas passaram em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha 1700 μ m e menos de 40% das partículas do pó passou pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 μ m, o que caracteriza o pó como sendo grosso, segundo a Farmacopéia Brasileira 4. ed. (1988) visualizada na Figura 8. A distribuição granulométrica de drogas vegetais determina a superfície de contato disponível para interação com o solvente utilizado na obtenção do derivado vegetal, visto isso, é um parâmetro preliminar e importante para a escolha do processo de extração adequado, já que é uma influência direta sobre a eficiência do processo extrativo (SANTOS et al. 2000; MIGLIATO et al. 2007). Esse resultado foi determinante para a escolha do processo de maceração para a obtenção da tintura hidroalcoólica.

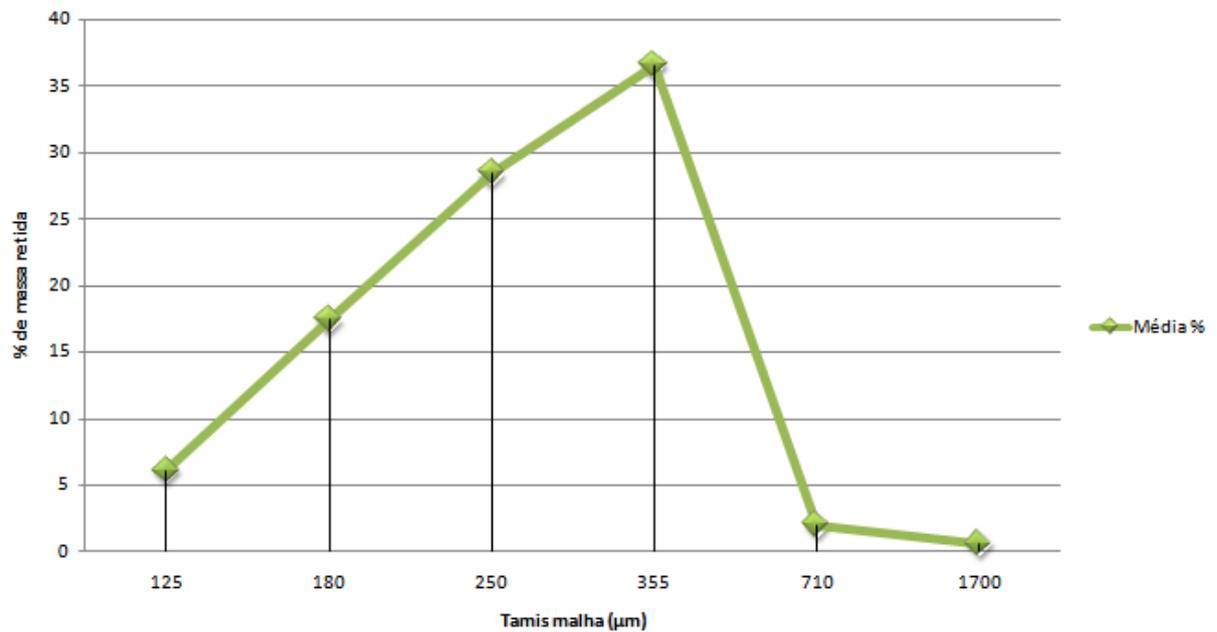


Figura 14 - Determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de *S. globulifera*

5.2.2 DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO

A presença de quantidades excessivas de água em drogas vegetais propicia o desenvolvimento de microrganismos, insetos, hidrólise e conseqüente deterioração dos constituintes da droga, por isso existe a necessidade do estabelecimento de limites de umidade para drogas vegetais (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4. ed., 1988). A média da porcentagem de perda por dessecação do pó foi de $9 \pm 1,24\%$ (p/p) (Tabela 1), o qual se encontra dentro do limite estabelecido por diferentes farmacopéias que está entre 8 e 14%, indicando uma boa conservação e uma secagem eficiente da matéria prima vegetal (SHARAPIN, 2000).

5.2.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS

A determinação da pureza da amostra foi realizada através da determinação do teor de cinzas totais permitindo a quantificação do resíduo não volátil inorgânico presente nas drogas vegetais como integrante natural destas, sendo constituído, em particular, por carbonatos, cloretos e diversos tipos de óxidos (COSTA, 2000). A

temperatura de 600 °C ou acima pode ser encontrado o teor de cinzas que corresponde aos sais minerais ou impurezas contidas na amostra (ARAUJO et al. 2006), que foi de $4,3 \pm 0,20\%$. A pequena variação de porcentagem obtida entre as triplicatas foi utilizada como parâmetro de controle de qualidade desse material vegetal, uma vez que a *S. globulifera* não possui monografia descrita em farmacopéias.

Tabela 2 - Caracterização físico-química do pó das folhas de *S. globulifera*

Determinações	Resultados
Perda por dessecação	$9 \pm 1,24\%$
Teor de cinzas totais	$4,3 \pm 0,20\%$

5.2.4 PERFIL TÉRMICO

O presente trabalho utilizou, além das metodologias clássicas contidas em farmacopéias, outras metodologias para a caracterização preliminar da matéria-prima vegetal e do produto intermediário. A escolha das análises térmicas e da espectrometria no IV para o desenvolvimento deste trabalho reside no fato de este grupo de técnicas ter despertado, nos últimos anos, um grande interesse de muitos pesquisadores para estudos que envolvam a caracterização preliminar de produtos fitoterápicos utilizando-se pequenas quantidades da matéria-prima vegetal e reduzindo-se o tempo gasto com a obtenção dos resultados. Apesar de tais metodologias necessitarem de mais investimentos com material tecnológico, o resultado final é compensador, pois geram resultados comprovadamente de maior credibilidade (SILVA JÚNIOR et al. 2006a; SILVA JÚNIOR, 2006b; ALVES, 2008; NUNES, 2008; NUNES et al. 2009). Além disso, podem ser utilizadas para a determinação do teor de cinzas como indicador da qualidade de sais minerais e possíveis adulterações do material com compostos inorgânicos, assim como, a obtenção de parâmetros cinéticos através de métodos de cálculos adequados (FELSNER e MATOS, 1998).

5.2.4.1 Termogravimetria e análise térmica diferencial

A Figura 15 mostra as curvas ou termogramas TG e DTA do pó das folhas de *S. globulifera*. Os valores dos eventos da TG podem ser visualizados na Tabela 2. No entanto, em 581°C ainda há uma perda de massa de 74,90%, ou seja, a perda de massa final foi de 86%, por isso seria necessário continuar a análise em temperatura mais elevada e aumentando a razão de aquecimento. Esses resultados são confirmados pela DTG e pelos eventos energéticos endotérmicos e exotérmicos registrados na curva DTA e na DTG, cujos valores podem ser visualizados na Tabela 3.

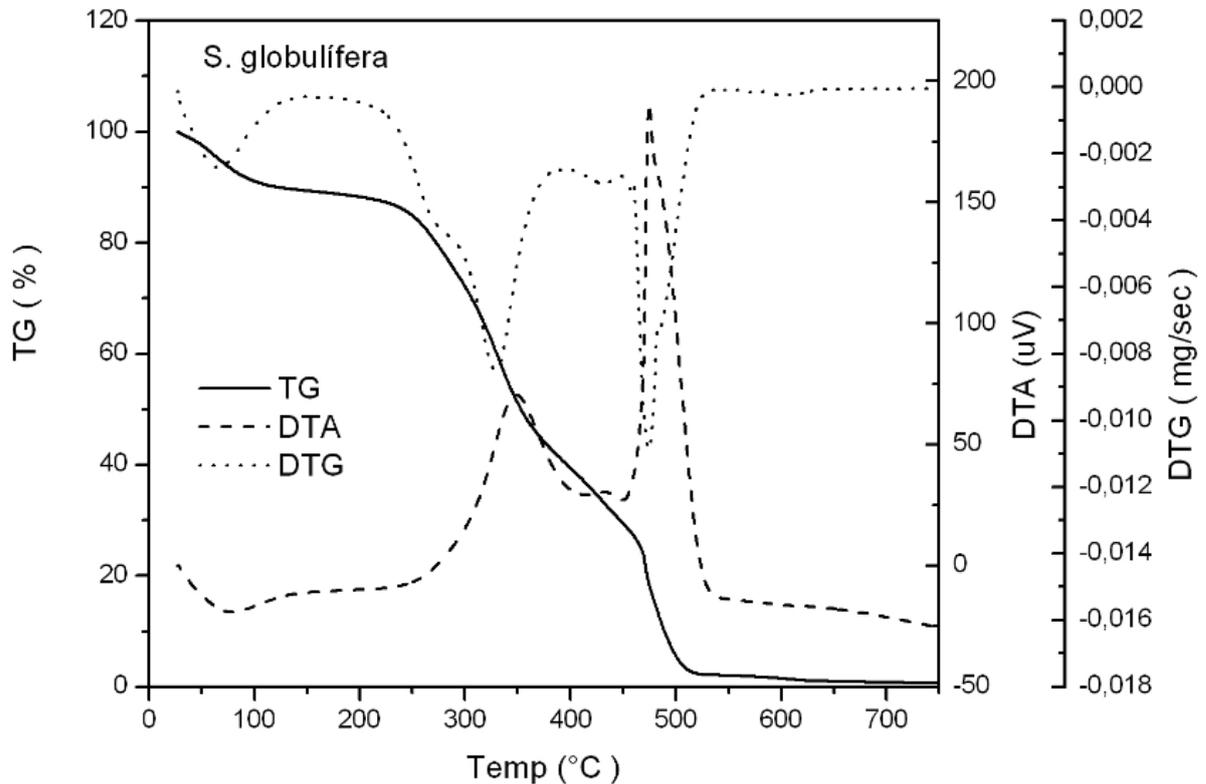


Figura 15 – DTG e curvas TG e DTA do pó das folhas de *S. globulifera*

Tabela 3 - Perfil termogravimétrico do pó das folhas de *S. globulifera*

Δ Temperatura °C	Δ massa
27 - 29	11,64%
29 - 750	99,13%

Tabela 4 - Perfil analítico térmico diferencial do pó das folhas de *S. globulifera*

Δ Temperatura °C	ΔH (J/g)	Evento
63,65	-473,45	endotérmico
352,93	1290	exotérmico
485,61	1020	exotérmico

Na Figura 15 pode-se observar a variação de perda de massa do pó das folhas de *S. globulifera* em função da temperatura, enquanto essa amostra foi submetida a uma programação controlada até 600 °C. O primeiro evento térmico (Tabela 3) registra uma perda de massa de valor aproximado de 8,0%, correspondente a perda de água superficial ou de umidade, semelhante ao teor de perda de massa ocorrido na perda por dessecação do pó $9 \pm 1,24\%$ (Tabela 2), aproximadamente 9% à temperatura de 105 °C. Após a desidratação do material, os próximos eventos acima de 200 °C registraram a decomposição dos componentes orgânicos do pó, porém não culminou na obtenção de suas cinzas até 600 °C, por isso a análise deverá ser repetida para saber a que temperatura final obtêm-se as suas cinzas submetida a uma programação controlada até 900 °C e aumentando a razão de aquecimento (ARAUJO et al. 2006); resultados confirmados com os seus eventos energéticos correspondentes na curva DTA (Tabela 4) e na DTG.

5.2.4.2 Calorimetria exploratória diferencial

O termograma da DSC do pó (Figura 16) demonstrou um evento endotérmico na temperatura de 83,43°C e dois eventos exotérmicos na faixa de temperatura de 425,02°C a 574,55°C, esses eventos e suas respectivas entalpias encontram-se demonstrados na Tabela 5.

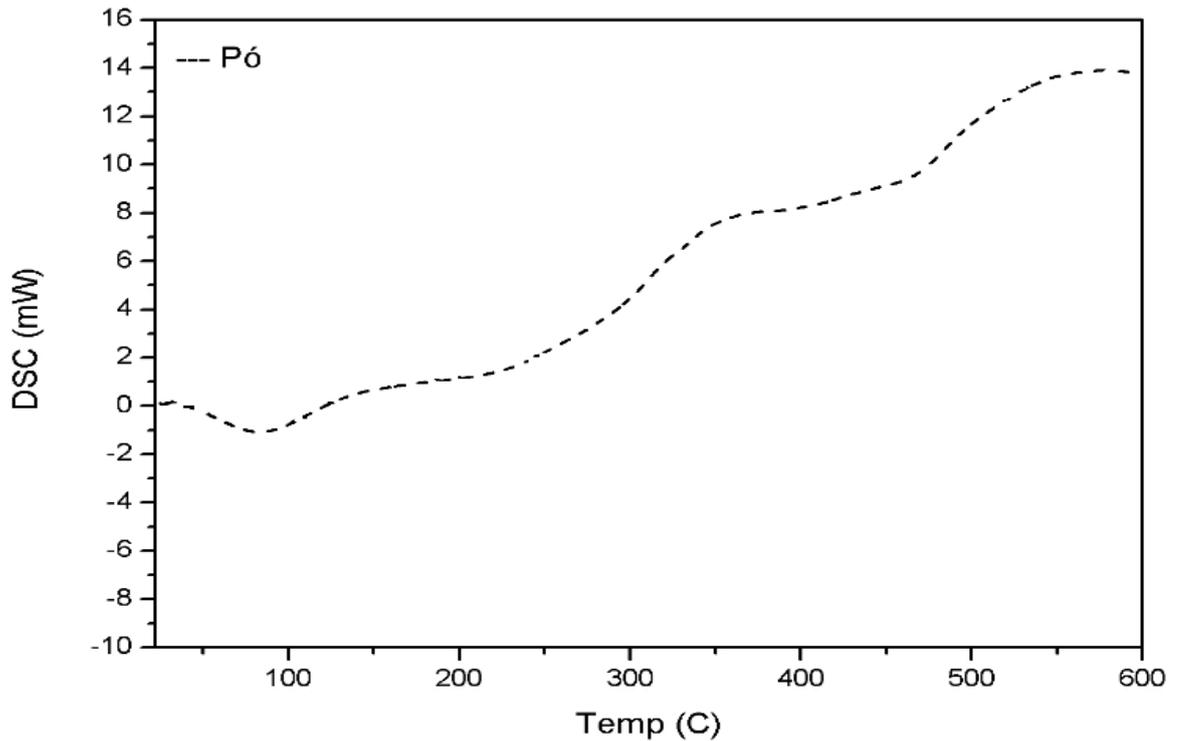


Figura 16 - Curva DSC do pó das folhas de *S. globulifera*

Tabela 5 - Perfil calorimétrico exploratório diferencial do pó das folhas de *S. globulifera*

Temperatura °C	ΔH (J/g)	Evento
83,43	-168,87	endotérmico
425,02	235,44	exotérmico
574,55	267,95	exotérmico

A curva DSC do pó (Figura 16) demonstrou inicialmente um pico endotérmico que corresponde a uma energia de 168,87 J/g, característico dos processos de liberação de água e umidade. Os processos de decomposição térmica do material tiveram início à temperatura de 200 °C, sendo evidenciados por dois eventos consecutivos exotérmicos (Tabela 5).

5.3 Caracterização química e físico-química da tintura de *S. globulifera*

Após a caracterização da droga seca pulverizada, obteve-se a tintura de *S. globulifera* a partir do pó de suas folhas, utilizando como líquido extrator o álcool etílico e sua mistura com água, formando uma solução hidroalcolica a 70%. A caracterização físico-química dessa tintura foi baseada na determinação de seu pH, densidade e perda por dessecação.

5.3.1 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE APARENTE, pH E TEOR DE SÓLIDOS

A densidade da tintura foi de $0,97 \pm 0,0025$ g/mL, dentro da faixa que varia de 0,87 a 0,98 g/mL, correspondente à densidade de tinturas a temperatura de 15 °C a 20 °C, utilizando-se o método do picnômetro (PRISTA et al. 1990).

O resultado do pH da tintura foi de $5,78 \pm 0,03$ caracterizando-a como ácida, provavelmente devido a presença dos grupos hidroxilas contidos na tintura.

O teor de sólidos é indicativo do teor de água e substâncias voláteis da tintura a 105 °C apresentou um valor de 9,0% (m/m) de resíduo seco, correspondente a $92,66 \pm 0,57$ % de umidade, fornecendo dados acerca do rendimento de extração, já que a secagem influi no estado de integridade das estruturas celulares, expondo-as mais ou menos ao contato com os solventes (HARBONE et al. 1986).

Os resultados da densidade aparente, pH e teor de sólidos podem da tintura das folhas de *S. globulifera* estão presentes na Tabela 6.

Tabela 6 - Densidade aparente, pH e percentual de resíduo seco da tintura do pó das folhas de *S. globulifera*

Determinações	Resultados
Densidade aparente	$0,97 \pm 0,0025$ g/mL
pH	$5,78 \pm 0,03$
Percentual de resíduo seco	9,0%

5.3.2 SPRAY DRYING

Avaliou-se a influência da adição de excipientes e suas concentrações na formulação a ser seca e características físico-químicas do produto seco obtido. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Variáveis analisadas no processo de spray drying

Variáveis estudadas		Respostas							
Excipiente	%*	Wreal (g/mim)	T _{gs} (°C)	Rec (%)	Perdas (%)	η	Xp (%)	Tamb (°C)	UR (%)
Aerosil®	20	3,58	107,4	49,55	50,45	34,6	1,20± 0,2	26,9	50,1
	40	3,63	107,2	51,18	48,81	34,65	1,60± 0,4	26,5	54,3
Celulose microcristalina + Aerosil	35:05	3,84	108,8	57,15	42,84	33,57	1,03± 0,4	27,3	44,5
	15:05	2,67	110,7	39,46	60,53	31,97	0,70± 0,4	27,1	50,1
Sem excipiente	0	4,28	106,8	47,26	52,73	35,46	0,46± 0,3	28,2	45,7

*Porcentagem calculada em relação à concentração de sólidos totais

A eficiência térmica é um parâmetro usualmente empregado para a otimização do secador *spray dryer* (BEVERIDGE e LYNE, 1976). Maiores valores de eficiência térmica são obtidos quando mais próximo da temperatura de saturação for o valor da temperatura de saída do gás de secagem. Porém, na maioria das vezes o processo é limitado não pela eficiência térmica, mas pela habilidade de adequadamente secar o produto. O valor do extrato seco sem excipiente (35,46) foi o que apresentou maior eficiência térmica. Já com a adição do excipiente aerosil® nas concentrações de 20 e 40% tivemos eficiências térmicas aproximadas, 34,60 e 34,65, respectivamente, porém essas eficiências foram baixas, pois uma boa eficiência fica em torno de 90%.

A umidade do produto é uma variável importante no processo de desidratação, sendo um indicador da eficiência do processo. Considerando-se o limite preconizado pela Farmacopéia Brasileira ($\leq 4\%$), observa-se que, para os excipientes celulose microcristalina mais aerosil® na proporção de 35:5 a umidade residual foi de $0,7\% \pm 0,4$, a menor, quando comparada a do extrato sem excipiente. Entretanto, mais análises como teor de ativos, tamanho de partícula, análise térmica e outras deverão ser realizadas para determinar a qualidade do produto final desse processo.

A taxa de recuperação do produto (Rec) foi definida pela relação percentual entre a massa de pó total coletada pelo ciclone e a massa de sólidos alimentada ao sistema (SOUZA, 2003). O extrato seco com a mistura de excipientes celulose microcristalina mais aerosil® na proporção de 35:5 foi o que apresentou a melhor taxa de recuperação, sendo de 57,15%.

Nesse estudo, os excipientes que apresentaram os melhores resultados foram aerosil 40% e celulose microcristalina mais aerosil na proporção de 35:5. Até o momento não foi encontrado nenhum trabalho utilizando *spray drying* para a espécie *S. globulifera* tampouco para a família Clusiacea, ficando assim sem padrões de comparação para essa espécie.

Os resultados aqui reportados contribuem para a caracterização inicial da *S. globulifera* Linn. f no processo *spray dryer* para obtenção de extratos secos. Porém, estudos são necessários visando a otimização do processo tanto no que se refere ao desempenho durante a secagem quanto à qualidade do produto obtido.

5.3.3 PROSPECÇÃO QUÍMICA DA TINTURA E DAS FRAÇÕES

A abordagem fitoquímica iniciou-se com um screening para se determinar qualitativamente os principais grupos de constituintes químicos da espécie vegetal, através de simples testes de reação de cor e precipitação; a partir daí direcionou-se o fracionamento do extrato para o isolamento dos grupos de maior interesse (SHARAPIN, 2000). A prospecção química da tintura mostrou resultado positivo para: saponinas espumídicas, açúcares redutores, fenóis e taninos e resultado indicativo para: alcalóides utilizando o reagente de Dragendorff. A prospecção das frações mostrou resultado positivo em todas as frações para saponinas espumídicas, açúcares redutores, fenóis e taninos; as frações metanólica e acetato de etila foram positivas para flavonóides classe flavonas, flavonóis e xantonas e a fração clorofórmica para flavonoídes classe flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas. O resultado do *screening* fitoquímico para a tintura e frações pode ser visualizado na Tabela 8.

Tabela 8 - Prospecção química da tintura e das frações de *S. globulifera*

Metabólitos secundários	Tintura	FH	FC	FM	FAE
Saponinas espumílicas	+	+	+	+	+
Açúcares redutores	+	+	+	+	+
Fenóis e taninos	+	+	+	+	+
Flavonóides	-	-	-	+	+
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	-	+	+
Flavanonas e flavanonóis	-	-	+	-	-
Alcalóides	i	-	-	-	-
Polissacarídeos	-	-	-	-	-
Proteínas e aminoácidos	-	-	-	-	-
Antocianinas e antocianidinas	-	-	-	-	-
Chalconas e auronas	-	-	-	-	-
Flavononóis	-	-	-	-	-
Glicosídeos cardíacos	-	-	-	-	-
Catequinas	-	-	-	-	-
Benzo., nafto e fenantraquinonas	-	-	-	-	-
Lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas	-	-	-	-	-
Esteróides e triterpenóides	-	-	-	-	-
Azulenos	-	-	-	-	-
Carotenóides	-	-	-	-	-
Purinas	-	-	-	-	-
Depsídeos e depsidonas	-	-	-	-	-
Derivados da cumarina	-	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-

Abreviaturas: i-indicativo; FH-fração hexânica; FC-fração clorofórmica; FM-fração metanólica e FAE-fração acet. de etila

Os primeiros passos para o controle de qualidade de determinado medicamento fitoterápico são a caracterização botânica do material vegetal e posteriormente a definição de qual/quais substâncias marcadoras devem estar presentes, de modo a assegurar a identidade da planta. No caso da espécie em estudo a literatura cita diferentes tipos de metabólitos secundários fazendo parte de sua constituição, sendo a classe das xantonas o metabólito mais citado.

5.3.4 TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS

Diversos trabalhos descrevem a importância dos polifenóis na atividade antioxidante. O método de Folin-Ciocalteu para determinação de polifenóis totais

tem como princípio a propriedade do íon fenolato ser oxidado. A reação de redução da mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico em meio alcalino a óxidos de tungstênio e molibdênio é causada pelos compostos fenólicos, formando um complexo de coloração azul (ADELMANN, 2005). O reagente de Folin-Ciocalteu reage completamente com compostos fenólicos presentes nas amostras, quando carbonato de sódio é adicionado ao meio reacional, isto se deve ao fato do íon fenolato ser completamente oxidado em pH 10 (SINGLETON; ORTHOFER e LAMUELA-RAVENTOS,1999).

O teor de polifenóis foi determinado através da equação da reta obtida pela curva de calibração com padrão de ácido gálico $y = 0,1326x - 0,0048$ ($r=0,9996$), onde x representa a concentração de polifenóis correspondente a ácido gálico e y representa a absorbância (Figura 17). O conteúdo de polifenóis totais encontrado para o extrato liofilizado de *S. globulifera* foi de $138,24 \pm 0,25$ mg/g (em relação ao peso seco).

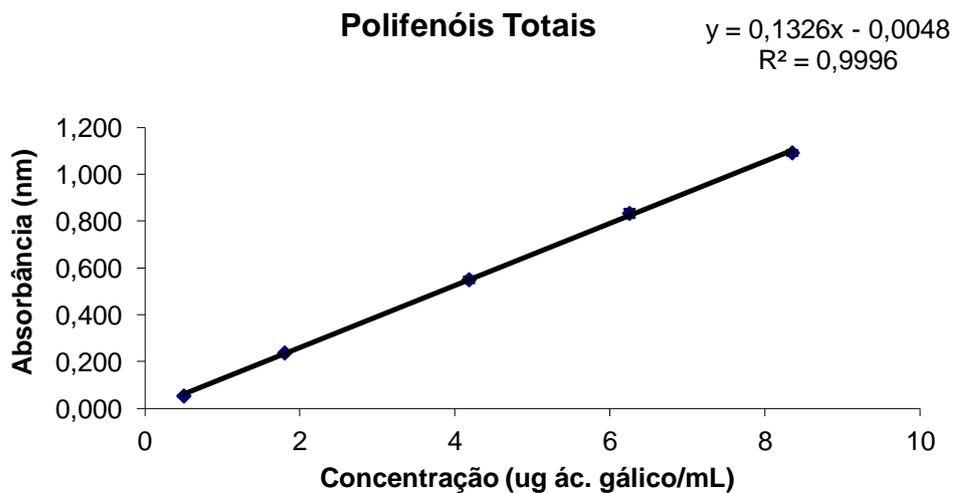


Figura 17- Gráfico de teor de polifenóis totais.

5.3.5 PERFIL TÉRMICO DO EXTRATO LIOFILIZADO

Os resultados dos perfis térmicos através da termogravimetria e de sua derivada, da análise térmica diferencial e da calorimetria exploratória diferencial quando comparados aos métodos convencionais: determinação da perda por dessecação e teor de cinzas totais, preconizados pela Farmacopéia Brasileira 4. ed.

(1988) mostram-se satisfatórios, possuindo resultados semelhantes, obtidos em um curto período de tempo.

5.3.5.1 Termogravimetria e análise térmica diferencial

A Figura 18 mostra o gráfico correspondente a DTG e às curvas TG e DTA do extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera*, no qual se observam vários eventos térmicos culminando em uma perda de massa de 35,5% (Tabela 8), devido a isso, será necessário repetir a análise elevando a temperatura e a razão de aquecimento.

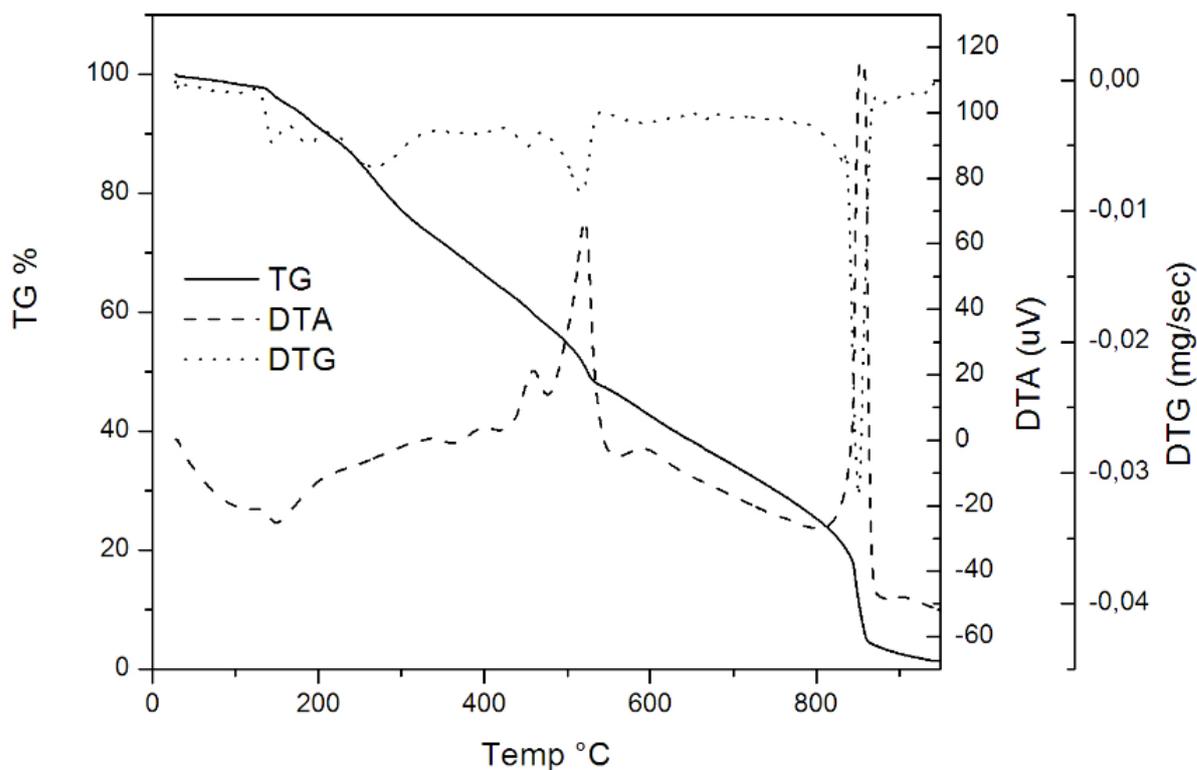


Figura 18 – DTG e curvas TG e DTA do extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera*

Tabela 9 - Perfil termogravimétrico do extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera*

Δ Temperatura °C	Δ massa
28 - 140	2,78%
28 - 950	98,2%

Analisando-se o perfil termoanalítico do extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera* sua perda de massa em função da temperatura, visualizada na Figura 18, inicia-se por dois eventos correspondentes à perda de água e substâncias voláteis (Tabela 9), após essa perda, outros eventos térmicos foram evidenciados, correspondentes ao início da decomposição térmica entre 100 e 140°C dos carboidratos e formação dos compostos carbonáceos, porém não culminou na formação de cinzas à temperatura de 600 °C, eventos confirmados também pela curva DTA e pela DTG (Figura 18).

5.3.5.2 Calorimetria exploratória diferencial

As curvas de DSC do extrato liofilizado representadas no gráfico abaixo (Figura 19) demonstraram sucessivos eventos de entalpia, quatro endotérmicos e um evento exotérmico a temperatura de 168,46 °C, valores que podem ser observados na Tabela 10.

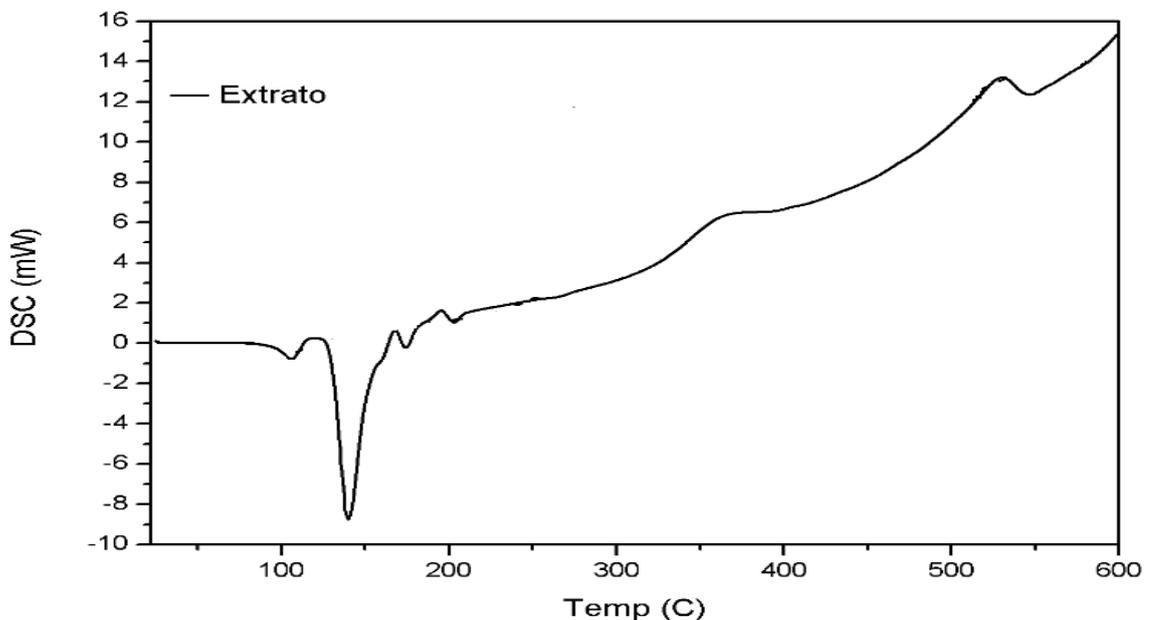


Figura 19 - Curva DSC do extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera*

Tabela 10 - Perfil calorimétrico exploratório diferencial extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera*

Temperatura °C	ΔH (J/g)	Eventos
107,29	-12,19	endotérmico
139,9	-153,54	endotérmico
168,46	17,69	exotérmico
172,95	-8,6	endotérmico
202,65	-6,63	endotérmico

E para a curva DSC do extrato (Figura 19) evidenciaram-se dois processos endotérmicos (Tabela 10), característicos do processo de liberação de água. Sendo que a decomposição térmica do extrato ocorreu com um desses eventos endotérmico à temperatura de 139,90 °C.

5.3.6 PERFIL ESPECTROSCÓPICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO PÓ E DO EXTRATO LIOFILIZADO DA TINTURA

O espectro na região do IV para o pó das folhas de *S. globulifera* apresentou bandas de absorção na região de 2917cm^{-1} características de vibração de estiramento C-H (alcano), banda forte de absorção na faixa de $2358\text{-}2339\text{ cm}^{-1}$ característica da ligação CO₂, banda fraca de absorção na região de $1715,20\text{ cm}^{-1}$ característica de ligação C=O e uma banda de absorção fraca na região 1614 cm^{-1} característica da ligação C=C, podendo ser visualizadas na Figura 20 e na Tabela 11.

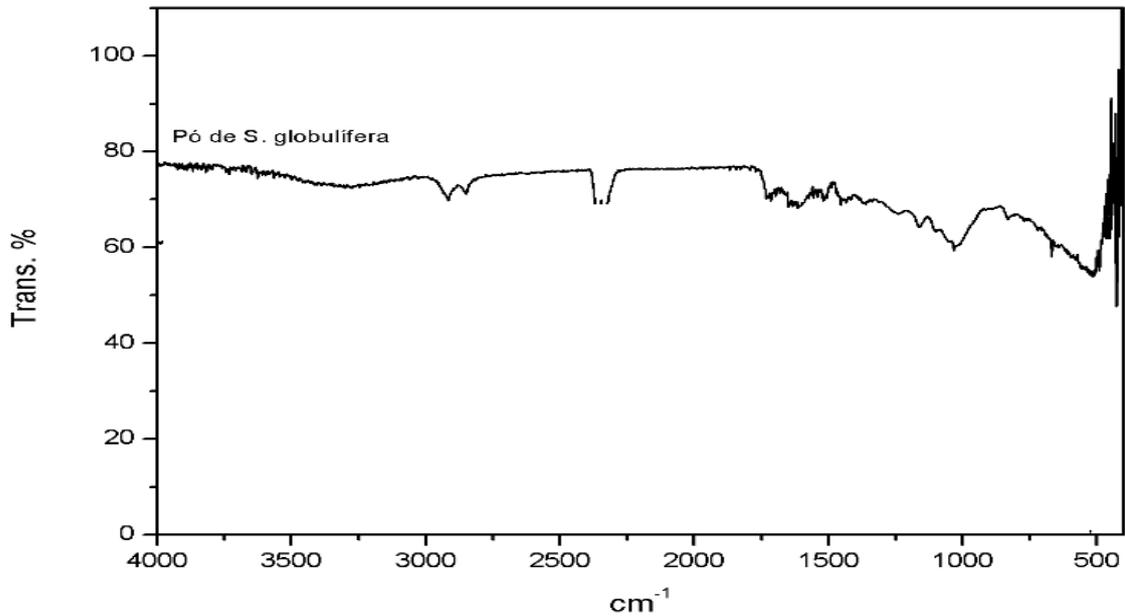


Figura 20 - Espectro na região do infravermelho do pó das folhas de *S. globulifera*

Tabela 11 - Número de onda (cm^{-1}) e suas respectivas ligações características no espectro da região do infravermelho para o pó das folhas de *S. globulifera*

Região de absorção (cm^{-1})	Tipo de ligação
3299 – 2917	C - H
2358 – 2339	CO_2
1715	C = O
1614	C = C
1519	C - NO_2
1455	C - H
1159	C - O

O espectro na região do IV para o extrato liofilizado (Figura 21) apresentou bandas de absorção forte e redonda na região de 3253 cm^{-1} característica da vibração de deformação axial O-H (de alcoóis e fenóis), uma banda forte e arredondada de absorção na faixa de absorção $2922,09 \text{ cm}^{-1}$ característica de estiramento C-H (alcano), uma banda de absorção fraca na região $2358,2 \text{ cm}^{-1}$ característica da ligação CO_2 e uma banda forte na região $1600,57 \text{ cm}^{-1}$ característica de ligação tipo C=C, sugerindo a presença de anéis aromáticos. As bandas de absorção e seus respectivos tipos de ligação encontram-se demonstrados na Tabela 12.

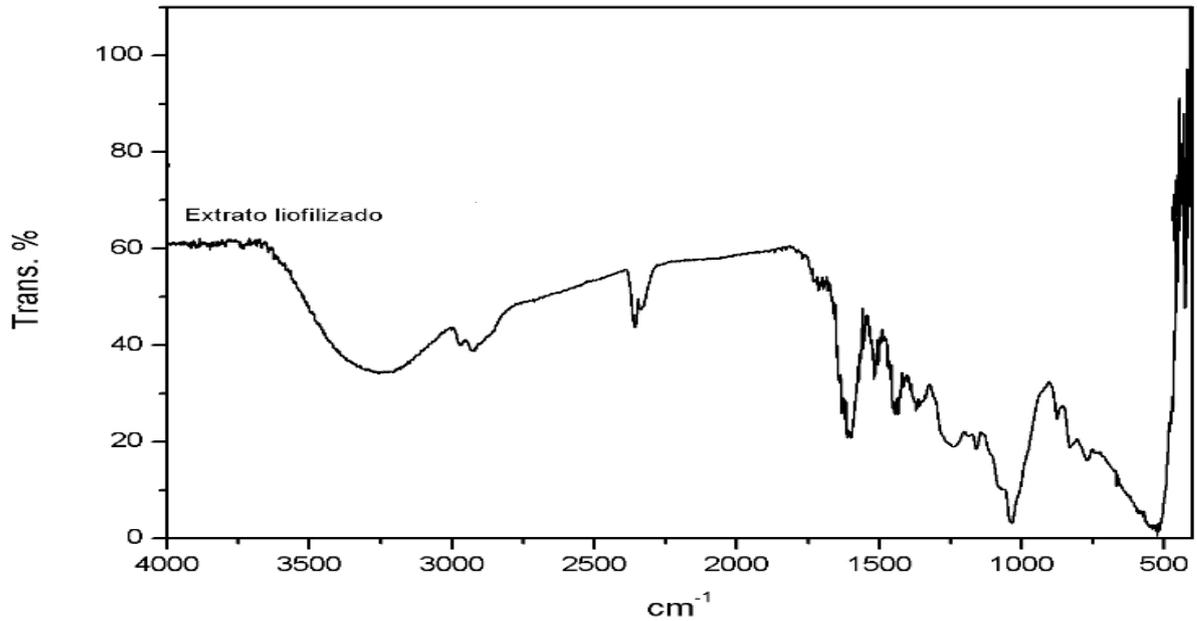


Figura 21 - Espectro na região do infravermelho do extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera*.

Tabela 12 - Número de onda (cm^{-1}) e ligações características no espectro da região do infravermelho para extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera*

Região de absorção (cm^{-1})	Tipo de ligação
3253,48	O – H
2922,09	C – H
2358,2	CO ₂
1600,57	C = C
1445,13 - 1434,43	C – H
1158,61 - 1033,26	C – O
523,82	C – Br

O espectro obtido no IV forneceu um agregado muito rico de bandas de absorção. A análise das bandas características de determinados grupos funcionais de uma molécula fornece, através de um simples exame do espectro e consulta a tabelas de dados, um conjunto valioso de informações sobre a estrutura da molécula (BARBETTA e MAGINI, 2006). Ao se analisar os espectros na região do IV para o pó das folhas e para o extrato liofilizado da tintura (Figuras 20 e 21 e Tabelas 11 e 12) notou-se que as regiões de absorção são bastante semelhantes entre elas. Provavelmente a substância em questão apresenta-se formada por hidroxilas provenientes de alcoóis ou fenóis, carbonilas e compostos aromáticos, identificados pelas suas regiões de absorção correspondentes a deformação axial de vários tipos de ligação (SILVERSTEIN et al. 2007).

5.3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Uma vez que existem várias maneiras pelas quais um extrato pode exercer sua atividade antioxidante, como por quelação de íons metálicos, impedindo a formação de radicais ou melhorando o sistema antioxidante endógeno, é importante comparar os diversos métodos antioxidantes, a fim de proporcionar uma melhor indicação do potencial antioxidante (PIETTA, 2002) do extrato de *S. globulifera*. Assim, decidimos avaliar o mecanismo antioxidante do extrato por meio de dois sistemas *in vitro*, que são capazes de gerar EROs envolvidas em diferentes tipos de iniciação oxidativa.

5.3.7.1 Atividade redutora do DPPH•

A atividade seqüestradora do radical livre DPPH• é um método simples e rápido para determinação da atividade antioxidante de compostos. A atividade seqüestradora do radical DPPH• por flavonóides e ácidos fenólicos tem sido amplamente estudada e é comumente utilizada para seleção de extratos ou compostos com atividade antioxidante. A atividade seqüestradora do radical livre DPPH• por antioxidantes pode ser devido a sua habilidade de doar H⁺ (CHEN e HO, 1995).

O extrato liofilizado de *S. globulifera* apresentou propriedade redutora do radical DPPH• de modo concentração dependente, revelando valor de CI₅₀ de 14,33 µL/mL (v/v)) (Figura 22).

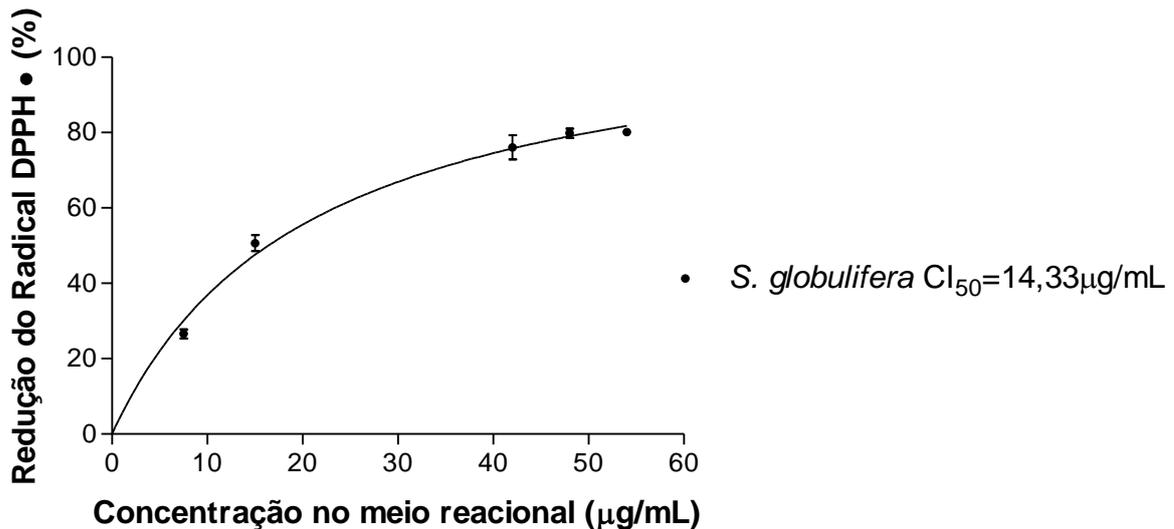
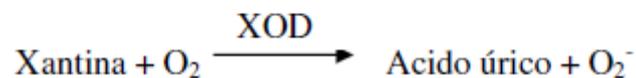


Figura 22. Curva da medida da atividade doadora de H⁺ ao radical DPPH• para o extrato liofilizado de *S. globulifera*. Os resultados representam a média de três determinações ± EPM. A linha de tendência foi construída usando regressão não linear (hipérbole).

5.3.7.2 Atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol

Neste ensaio foi possível avaliar a capacidade do ELS em seqüestrar os radicais superóxidos formados no sistema xantina/luminol/XOD de acordo com a seguinte reação:



O luminol é utilizado como um detector, o qual é oxidado pelo ânion superóxido (GIROTTI et al. 2000). Desta forma, a quantidade de luz emitida é proporcional a quantidade de ânions superóxido produzida pela enzima xantina oxidase.

A inibição da luz emitida neste sistema pode acontecer por inibição da enzima xantina oxidase ou por seqüestro dos radicais superóxido formados a partir da atividade desta (PIETTA, 2000).

O ânion superóxido ocorre em processos como reparação celular, transporte de elétrons pela membrana celular da mitocôndria de bactérias, ação enzimática de

xantina oxidase, aldeído oxidase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase ligada à membrana celular de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (PIETTA, 2000).

O ânion superóxido formado *in vivo* é quase completamente convertido pela superóxido dismutase ou por dismutação não enzimática em H_2O_2 . Ambos O_2^- e H_2O_2 podem encontrar algumas moléculas alvo nas quais podem causar danos diretos (HALLIWELL et al. 1995).

ELS reduziu a emissão da luz produzida pelo radical superóxido gerado no sistema xantina/luminol/XOD de modo concentração dependente, revelando valor de CI_{50} de 1,26 $\mu L/mL$ (v/v) (Figura 23).

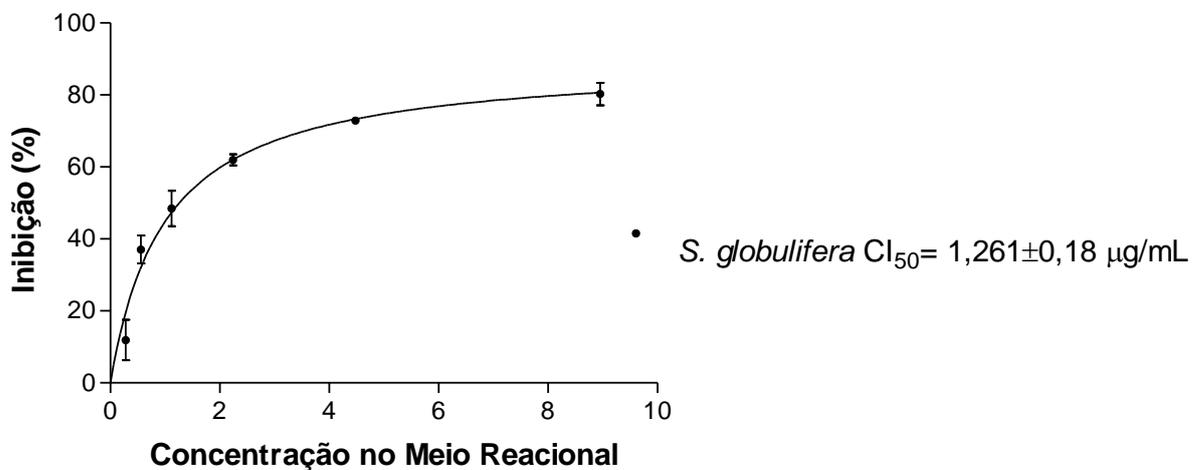


Figura 23-Curva de inibição da emissão da luz gerada pela reação luminescente xantina/luminol/XOD encontrada para ELS. Os resultados representam a média de três determinações \pm EPM. A linha de tendência foi construída usando regressão não linear (hipérbole).

Na tentativa de avaliar qual EROs o ELS foi capaz de inibir mais eficientemente, o CI_{50} (concentração inibitória de 50%) dos métodos propostos foram comparados (Tabela 13).

Tabela 13- Comparação dos valores de CI_{50} encontrado para ELS na atividade antioxidante.

Método de avaliação da atividade antioxidante	CI_{50}^a ($\mu g/mL$)*
Atividade doadora de H^+ ao radical DPPH •	14,33 \pm 0,1
Atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol	1,26 \pm 0,18

^a IC_{50} = Concentração inibitória de 50%.

* $p < 0,05$ diferença significativa entre todos os grupos pelo teste t de Student's.

Os resultados representam a média \pm DP de três determinações.

Foi observada diferença significativa entre todos os métodos avaliados (teste t de Student's), sendo que o método de avaliação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol (seqüestro de radicais superóxido) foi o método que apresentou menor valor de CI_{50} . Desta forma, o ELS foi capaz de inibir mais eficientemente radicais superóxido, seguido por radical DPPH.

5.4 Caracterização Microbiológica

5.4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO LIOFILIZADO E DAS FRAÇÕES DE *S. globulifera*

As propriedades antimicrobianas a partir de produtos vegetais têm sido comprovadas através de intensas pesquisas em todo o mundo. Assim como no presente trabalho, estas geralmente são estudadas, avaliadas e confirmadas ou não, através de ensaios *in vitro*, como o teste de susceptibilidade (SOUZA et al. 2003) e nos testes abaixo descritos.

5.4.1.1 TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO EM MEIO SÓLIDO

A avaliação da atividade antimicrobiana através da técnica de difusão em disco determinou o halo de inibição formado ao redor dos discos com o auxílio de um paquímetro em mm nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5 e 31,25mg/mL da tintura em solução de DMSO (DMSO em água) (1:6). Os antimicrobianos (fármacos) utilizados como controle foram solução de cloranfenicol 4mg/mL para bactérias e solução de nistatina 100.00UI/mL para o fungo. O controle negativo é composto pela solução de DMSO, diluição (1:6). Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 14 e também podem ser visualizados na Figura 24.

Tabela 14 - Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana e antifúngica do extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera* em diferentes concentrações e os halos de inibição

Concentração mg/mL	Microrganismos testados					
	<i>E.faecalis</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.albicans</i>
500	8,96*	8,30	5,42	-	-	10,66
250	6,88	8,35	4,2	-	-	10,5
125	2,04	6,25	-	-	-	8,05
62,5	-	5,59	-	-	-	5,66
31,25	-	-	-	-	-	-
Controle + DMSO	12,19	15,57	14,07	8	9,1	16,67
	-	-	-	-	-	-

*Halo em mm

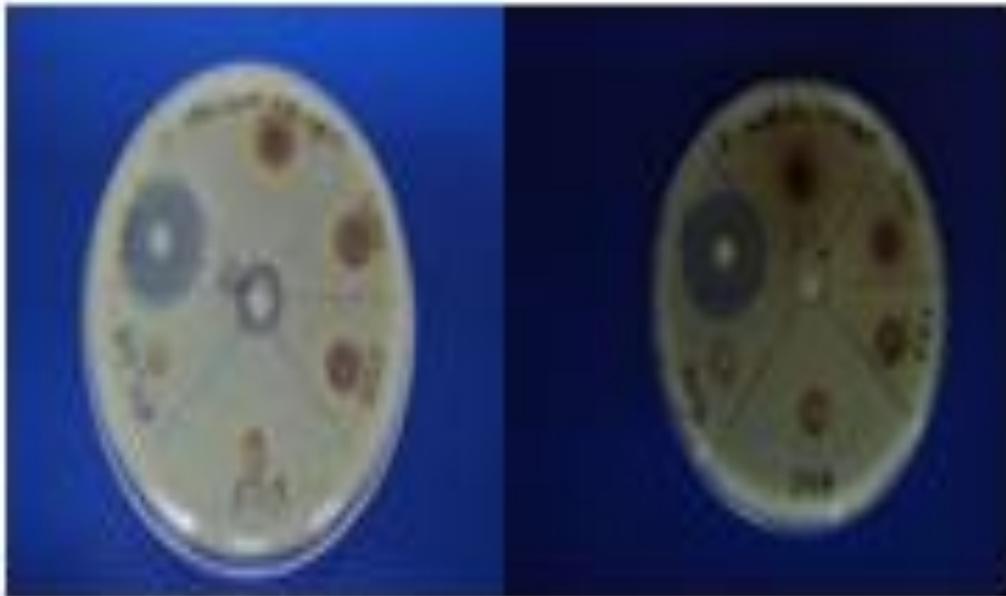


Figura 24 - Placas do teste de difusão em disco do extrato liofilizado de *S. globulifera* diluído em DMSO mostrando os halos de sensibilidade de *Cândida albicans* e *Bacillus subtilis* nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25mg/mL.

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera* foi realizada através do método de difusão em disco em meio sólido. Dentre as técnicas de difusão, esse método é o mais adequado para se trabalhar com extratos vegetais coloridos e/ou extraídos com solventes orgânicos, pois é possível evaporar o solvente do disco, antes da colocação deste no meio de cultura (RIOS et al. 1988) e a cor não interfere na leitura dos resultados. Nesse método, entretanto, a presença de matéria particulada na amostra pode interferir na difusão da substância antimicrobiana no Ágar, mas o pequeno volume necessário e a

possibilidade de testar vários compostos por placa (Figura 15) frente a um único microrganismo foram vantagens observadas no emprego desse método (VANDENBERGHE e VLIETINCK, 1991).

As concentrações do extrato liofilizado da tintura das folhas de *S. globulifera* foram sensíveis para o fungo leveduriforme *Candida albicans* (ATCC 0175) (Tabela 14). Para o *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) houve a formação de halos em duas concentrações: 500 e 250mg/mL; enquanto para a *Escherichia coli* (ATCC 8739) o extrato foi inativo, corroborando aos resultados obtidos nos estudos de Nkengfack e colaboradores (2002b). Para *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) o extrato foi ativo somente na concentração de 500mg/mL. E para *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) o extrato foi inativo em todas as concentrações.

5.4.1.2 MICRODILUIÇÃO EM CALDO - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DAS CONCENTRAÇÕES BACTERICIDAS MÍNIMAS (CBM) DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES

As bactérias utilizadas para a determinação da atividade antibacteriana foram: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, representantes do grupo das bactérias Gram- positivas, e *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, representantes do grupo Gram- negativo. E o fungo leveduriforme *Candida albicans* ATCC 94548.

Como podem ser observados na Tabela 15, os ensaios da atividade antimicrobiana revelam que o extrato não apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, porém apresentou atividade fungistática para *C. albicans*. A fração hexânica também apresentou atividade fungistática, além de ter atividade bactericida para *S. aureus*.

Em relação à Tabela 15, a fração hexânica de *S. globulifera* foi a que apresentou maior ação contra a bactéria *S. aureus*, seguida da fração acetato de etila. As outras frações não apresentaram atividade antibacteriana e/ou antifúngica. Essa mesma fração e o extrato liofilizado tiveram os mesmos resultados para o fungo *C. albicans*.

Tabela15- Avaliação das concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida/bacteriostática mínima do extrato liofilizado da tintura de *S. globulifera* em µg/mL

Material testado	Atividade antibacteriana/antifúngica (µg/mL)			
	<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM
EL	SA	SA	400	CA
Fr. AE	200	SA	SA	SA
Fr. H	100	SA	400	CA
Penicilina	0,0461	-	-	-
Miconazol	-	-	2,95	

Extrato liofilizado (EL); Fração acetato de etila (Fr. AE); Fração hexânica (Fr. H); *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*); *Candida albicans* (*C. albicans*); Sem atividade (SA); Com atividade (CA); Concentração inibitória mínima (CIM); Concentração bactericida mínima (CBM)

Quando comparada a fração acetato de etila, a fração hexânica demonstra ser mais ativa contra microrganismos, sugerindo que as substâncias ativas responsáveis pela ação antibacteriana/antifúngica encontram-se, provavelmente, em maior concentração nessa fração.

O extrato liofilizado não apresentou atividade até a concentração máxima testada para bactérias, que foi de 400µg/mL, assim como as frações metanólica e clorofórmica.

Na Tabela 15, também pode-se evidenciar os resultados da atividade bactericida da *S. globulifera*. O extrato e frações utilizadas nesse ensaio foram aqueles que apresentaram atividade antibacteriana/antifúngica no teste de CIM. Para o teste foi utilizada a metodologia descrita no item 4.7.2

A concentração bactericida mínima é a quantidade mínima de agente antimicrobiano necessário para inviabilizar a célula microbiana. Agentes antimicrobianos que possuem ação bactericida causam danos irreversíveis às bactérias. Os que são conhecidos como bacteriostáticos, atuam inibindo o crescimento bacteriano, prevenindo sua multiplicação, mas não causando sua morte. Quando os valores da CBM são comparados com a CIM, pode-se avaliar se a substância em análise é bactericida ou bacteriostático (BARON e FINEGOLD, 1990).

Portanto, as frações acetato de etila e hexânica apresentaram atividade bactericida, porém em elevadas concentrações quando comparadas a estudos de frações de outras plantas, como a *Eugenia umbelliflora* BERG. (MACHADO, 2005).

A atividade bactericida é considerada uma característica desejável para os agentes antimicrobianos, uma vez que agentes antimicrobianos bacteriostáticos apenas inibem o crescimento bacteriano, tornando-os clinicamente menos desejáveis que os bactericidas (BEVAN 1979).

A atividade antibacteriana para *S. globulifera* foi relatada em outros estudos também. No estudo de Nkengfack et al. (2002b), o extrato clorofórmico e metanólico testados contra cepas de bactérias Gram- positivas apresentaram valores de CIM de 50 e 500µg/mL, respectivamente. E nenhum dos compostos analisados foi positivo para bactérias Gram- negativas.

Há estudos de atividade antimicrobiana com outras espécies pertencentes à mesma família da *S. globulifera*, como por exemplo: *Vismia laurentii* De Wild (KUETE et al., 2007) e *Kielmeyera cuspidata* Saddi (SOBRAL et al., 2008),

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Com a realização de nosso trabalho podemos concluir que a análise anatômica das folhas e pecíolos foi de extrema relevância para a identificação da espécie estudada no presente trabalho, a *S. globulifera* e os testes microquímicos serviram de parâmetro inicial para futuras caracterizações fitoquímicas.

O processamento após a obtenção da espécie vegetal foi satisfatório, uma vez que ao se analisar os resultados obtidos através das caracterizações físicas, químicas e físico-químicas tanto do pó das folhas quanto da tintura, os mesmos atingiram parâmetros aceitáveis segundo a literatura específica para plantas medicinais.

O perfil térmico e o perfil espectroscópico na região do IV traçados para a matéria-prima vegetal (em pó) e seu derivado (o extrato liofilizado da tintura) foram de relevância para a caracterização inicial e controle de qualidade, servindo de parâmetros para futuros estudos com fitoterápicos, juntamente com as análises de *spray drying*.

O alto teor de polifenóis confirma juntamente com os resultados de IV a presença de grupos hidroxila. O extrato também apresentou uma alta atividade antioxidante.

Os resultados obtidos através da avaliação da atividade antimicrobiana corroboraram a hipótese da ação antimicrobiana e principalmente antifúngica do extrato liofilizado da tintura hidroalcoólica das folhas de *S. globulifera*, relatando sua eficácia sobre *Enterococcus faecalis*, *Bacilos subtilis* e *Candida albicans*, justificando dessa forma o prosseguimento do estudo.

Referências

7 REFERÊNCIAS

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ALVES, M. S. M. **Caracterização farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica* (HUBM. & Bonpl) B. Verlt.** 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

AMOROZO, M. C. M.; GÉLY, A. **Uso de plantas medicinais por caboclos do Baixo Amazonas**. Barcarena, PA, Brasil. Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica, v. 4, n. 1, 47-131, p. 92, 1988.

ARAÚJO, A. A. S. et al. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 2, p. 270-277, abr/jun, 2006.

ARUOMA, O. I., Free radicals, antioxidants and international nutrition. Asia Pacific Journal Clinical Nutrition, v.8, n.1, p.53-63, 1999.

ASANO, J. et al. Citotoxic xanthenes from *Garcinia hamburyi*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 815-820, 1996.

AUBREVILLE, A. Flore Forestiere Soudano-Guineene A. O. F. Cameroun. **A.E.F, Societe d' Edition Geographique Maritime et Coloniale**, Paris, p. 1597–1601, 1950.

BARBETTA, C. M.; MAGINI, M. R. Espectros eletromagnéticos na região do infravermelho: utilização na caracterização de novos materiais. In: X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 2006. **Anais** Universidade do Vale do Paraíba, v. 13, 2006.

BARBOSA, W. L. R. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**, Belém – PA: Revista Científica da UFPA, 2003. Disponível em <<http://www.ufpa.br/rcientifica.vol.4>>. Acesso em 20 jan 2010.

BARON, E. J.; FINEGOLD, S. M.; **Bailey & Scott's** – Diagnostic microbiology, 8 ed. The C. V. Mosby Co: St Louis, 1990.

BARROZO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, v. 3, p. 326, 1991.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibilities testing by standard single disc diffusion method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: The Iowa State Press, p. 326, 1976.

BEVAN, J. A. **Fundamentos de Farmacologia**. São Paulo: Harper & Row, 1979.

BEVERIDGE, G. S. G.; LYNE, C. W., Continuous Vacuum Band Dryer, **Chem. Eng.**, v. 311, p. 531, 1976.

BICALHO B; GONÇALVES R.A.C; ZIBORDI A.P; MANFIO G.P; MARSAIOLI A. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* ssp. (Clusiaceae) pollinating bees. *Verlag Z Naturforsch* 58c, p.746-751, 2003.

BITTRICH, V.; AMARAL , M . C. E. Pollination biology of *Symphonia globulifera* L. f. (Clusiaceae). **Plant Systematics Evolution**, v. 200, p. 101-110, 1996.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London,v. 26, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 2.960, de 09 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (COFID). **Diário oficial da União**, Brasília, 10 dez. 2008.

CAMELO, S. R. P. **Estudos de pré-formulação e formulação de *Vismia guianensis* (aubl.) Choisy**. 2010. 162 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

CASADEBAIG, J.; JACOB, M.; CASSANAS, G.; GAUDY, D.; BAYLAC, G.; PUECH, A. Physicochemical and pharmacological properties of spray drying powders from *Flaximus excelsior* lead extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, p. 211-216, 1989.

CARDONA, M. L.; FERNÁNDES, I.; PEDRO, J.R.;SERRANO, A. **Phytochemistry**, v. 29, n. 9, p. 3003-3006, 1990.

CARMICHAEL, J. *et al.* Evolution of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. **Cancer Research**, v. 47, p. 936-942, 1987.

CHEN, C.W.; HO, C.T. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. **Journal of Food Lipids**, Malden, v. 2, p. 35-46, 1995.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard.** 6th Edition. Wayne, Pennsylvania: CLSI, (CLSI document M7-A6), 2003b.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard-8th Edition.** CLSI, (CLSI document M2-A8), 2003a.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, Imprensa nacional, Rio de Janeiro, v. 3, p. 388, 1978.

CORTEZ, D. A. G.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. **Chromatographia**, v. 50, n. 1/2, p. 7-10, 1999.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3. ed, v. 3. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2000.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, p. 1260, 1981.

CUNHA, A.P. da. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, p. 317-336, 2005.

DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: the oldest modern science. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, n. 1, junho, p. 1–16, 1984.

DELLE MONACHE, D. F. Chemistry and biological activity of secondary metabolites of Vismieae. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 16, p. 5-15, 1985.

DI STASI, L. C.; LIMA, C. A. H. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**, 2. ed, rev. e ampl, São Paulo: Editora UNESP, p. 259, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2. ed. São Paulo: Gráfica Siqueira, 1959.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. Parte 2, São Paulo: Atheneu, 1988.

FELSNER, M. L.; MATOS, J. R. Análise da Estabilidade Térmica e Temperatura de Oxidação de Óleos Comestíveis Comerciais por Termogravimetria. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 47, n. 4, p. 308-318, 1998.

GASPAROTTO-JUNIOR, A. *et al.* Estudo morfo-anatômico das folhas e caule da *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 3, p.371-376, 2005.

GIROTTI, S.; FINI, F.; FERRI, E.; BUDINI, R.; PIAZZI, S.; CANTAGALLI, D. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta**, Amsterdam, v. 51, p. 685-692, 2000.

GILL JUNIOR, G. E.; FOWLER, R. T.; MORI, S. A. Pollination Biology of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae) in central French Guiana. **Biotropica**, v. 30, p. 139-144, 1998.

GNERRE, C. et al. Natural and synthetic xanthenes as monoamine oxidase inhibitors: biological assay and 3D-DSAR. **Helvetica Chimica Acta**, v. 84, p. 552-570, 2001.

GOLDFRANK, L. et al. The pernicious panacea: Herbal Medicine. **Hospital Physician** Oct, v. 10, p. 64–86, 1982.

GONZÁLEZ, G.O.; SCHMIDT, P.C. Obtención de comprimidos conteniendo extractos atomizados de flor de la pasión (*Pásiflora incarnata* L.) **Acta Farm Bonaerense**, v. 14, p. 173-180, 1995.

GUILLET, D. et al. **Journal Nature Products**, v. 64, p. 563-8, 2001.

GUSTAFSON, K. R. et al. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* e *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 28, n. 46, p. 10093 – 10102, 1992.

HALLIWELL, B.; AESHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

- HALLIWEE, B. GUTTERIDGE, J. M. C.; **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: University Press, 2007.
- HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The Flavonoids: Advances in Research**; Chapman and Hall: London, p. 56, 1986.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed., Porto Alegre: Bookman, p. 908-918, 2009.
- HIRAYAMA, O.; TAKAGI, M.; HUKUMOTO, K.; KATOH, S. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 247, p. 237-241, 1997.
- IRVINE, F. R. Woody Plants of Ghana. **Oxford University Press**, London, p. 150–151, 1961.
- JARDIM, M. A. G.; ZOGHBI, M. G. B. A flora da Resex Chocoaré – Mato Grosso (PA): Diversidade de usos. Belém: MPEG, p. 36-76, 2008.
- JIANG, D. J.; DAI, Z.; LI, Y. J. Pharmacological effects of xanthenes as cardiovascular protective agents. **Cardiovasc. Drug**, v. 22, p. 91–102, 2004.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, p. 523, 1940.
- JUNIOR, A. G., FERREIRA, I. C. P., NAKAMURA, C. V., FILHO, B. P. D., JACOMASSI, E., YOUNG, M. C. M, CORTEZ, D. A. G. Estudo morfo-anatômico das folhas e caule da *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. **Acta Farm Bonaer** v, 24, p. 371-376, 2005.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPÇU, G. Antimicrobial activity of própolis simples from two different regions of Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.86, p. 69-73, 2003.

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

KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p.372–379, 2007.

LASPRILLA, L. R.; SAZIMA, M. Linteracciones planta-colibrí en tres comunidades vegetales de la parte suroriental del parque nacional natural chiribiquete, colombia. **Ornitologia neotropical**, v. 15 (Suppl.), p. 183–190, 2004.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 206-251, 2008.

LENTA, B. N. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v. 12, p. 1548 – 1557, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil: Nativas e exóticas cultivadas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa: São Paulo, 512, 2002.

MABBERLEY, D. J. **The plant book. A portable dictionary of the vascular plants**, 2.ed, Cambridge: Cambridge University Press, p. 858, 1997.

MACHADO, K. E. **Atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas da *Eugenia umbelliflora* BERG**. 2005. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

MACHADO, R. D.; COSTA, C. G.; FONTENELLE, G. B. **Acta botânica brasileira**. v. 1, n. 2, p. 275-285. Supl, 1988.

MATSUMOTO K. et al. Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines. **Journal of Nature Products**, v. 66, n. 8, p. 1124-1127, 2003.

MENDONÇA, M. S. Estudo de plantas laticíferas. Aspectos anatômicos e distribuição de vasos laticíferos de *Manihot caerulenscens* Pohl. **Acta Amazônica**. v. 13, n. 3-4, p. 501-517, 1983.

METCALFE, C. R. CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. London: Clarendon Press, Oxford, v. 1, p. 724, 1957.

MIGLIATO, K. F. et al. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, jan/mar, 2007.

MIRAGLIA, M. C. M. et al. Anthraquinones from vismia species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2041-2042, 1981.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURA, T.; GAUDY, D.; JACOB, M.; TEROL, A.; PAUVERT, B.; CHAUVET, A. Vitamina C spray drying solution. **Pharm. Acta Helv.** V. 69, p.77-80, 1994.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural Antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, v. 72, p. 145- 171, 2001.

MUNDO,S.R.; DUARTE, M.R. Farmacobotânica foliar e caulinar de guanandi-*Calophyllum brasiliense* Cambess. (Clusiaceae). **Rev. Bras. Farm.**, v.89, n.2, p. 83-87, 2008.

NAGEN, T. J.; De OLIVEIRA, F. F. Xanthones and other constituents of *Vismia parviflora*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 8, p. 505-508, 1997.

NAKATANI K. et al. Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by gamma-mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 73-79, 2002.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard.** 6th Edition. Wayne, Pennsylvania: NCCLS (NCCLS document M7-A6), 2003.

NGOUELA, S. et al. Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. **Phytochemistry**, v. 67, p. 302-306, 2006.

NKENGFAK, A. E. et al. Globulixanthonones A and B, two New cytotoxic xanthonones with isoprenoid groups from the root bark of *Symphonia globulifera*. **Journal of Natural Products**, v.65, p. 734-736, 2002a.

NKENGFAK, A. E. et al. Globulixanthonones C, D and E: three prenylated xanthonones with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 181-187, 2002b.

NUNES, K. M. **Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo *Calendula officinalis* L.** 2008. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém 2008.

NUNES, K.M. *et al.* Padronização da Tintura de *Calendula officinalis* L. para seu Emprego em Formulações Semi-sólidas Fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 28, p. 344-350, 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, K.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. 2. ed. Atheneu, p. 412, 1998.

OLIVEIRA, W. P.; BOTT, R .F.; SOUZA, C. R. F. Manufacture of standardized dried extracts from medicinal brazilian plants. **Drying Technology**, v. 24, n. 4, p. 523-533, 2006.

PAREKH, J.; CHANDA, S. V. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turkish Journal of Biology**, v. 31, p. 53-58, 2007.

PASCUAL, C.; GONZALEZ, R.; TORRICELLA, R.G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 41, p. 9-13, 1994.

PERMANA, P.A. et al. Mechanism of action of the antileukemic xanthone psorospermin: DNA strand breaks, abasic sites, and protein-DNA cross-links. **Cancer Res**, v. 54, n. 12, p. 3191-3195, 1994.

PESCE, C. **Oleaginosas da Amazonia**, 2. ed. Belém: MPEG/NEAD. 2009.

PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V. L. From a medicinal plant to a pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. **Ciência e Cultura**, v. 49, n.5/6, p. 364-369, 1997.

PINTO, M. M. M.; SOUSA, M. E.; NASCIMENTO, M. S. J. Xanthenes derivatives: New insights in biological activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2517-2538, 2005.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. Pittsburgh, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. 3. ed, v. 2, p. 183-207, 1990.

PURVIS, M. J.; COLLIER, D. C.; WALLS, D. **Laboratory techniques in botany**. London: Butterworths, 1964.

RATES, S. M. K. Review: Plants as source of drugs. [Toxicon](#), v. 39, n. 5, maio, p. 603-613, 2001.

REVILLA, J. Plantas úteis da Bacia Amazônica. **INPA (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia**, co-edição SEBRAE, v. II- De N a Z, Manaus, p. 627, 2002.

RIBA-HERNÁNDEZ, P.; STONER, K. E. Massive Destruction of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae) flowers by Central American spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). **Biotropica**, v. 37, n. 2, p. 274-278, 2005.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. **Flora da Reserva ducke: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/DFID, Midas Printing, Manaus, Brasil, p. 816, 1999.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR. A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal os Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxido anion. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 5, p. 837- 841, 1988.

ROCHA, L. et al. An antifungal gamma-pyrone and xanthones with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1381-1385, 1994.

RODRIGUES, G.V.; MARCHETTO, O. Análises térmicas. In: XVII Seminário - Aplicação da Técnica de Análise Térmica voltada para Institutos Acadêmicos e Indústria. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002. Netzsch **CD-ROM**.

SALATINO, A.; MONTENEGRO, G.; SALATINO, M. L. F. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 9, p. 117-124, dez. 1986.

SANTOS, A. F. O. et al. Application of thermal analysis of binary mixtures with metformin. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 93, p. 361–364, 2008.

SANTOS, E. V. M. Extração de matérias-primas vegetais. In: SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Cyted, Santafé de Bogotá, p. 27-60, 2000.

SANTOS, S.C.; FERREIRA, F.S.; ROSSI-ALVA, J.C.; FERNANDEZ, L.G. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochiliocarpos* (Gomes) Barnaby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.215-219, 2007.

SENNA, E.L.; PETROVICK, P.R.; ORTEGA, G.G.; BASSANI, V.L. Preparation and characterization of spray drying powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) de extracts. **Phytother Res.** v. 11, p. 123-127, 1997.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Cyted, Santafé de Bogotá, p. 145-157, 2000.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152-172, 1999.

SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 3, jul./set., 2007.

SILVA, E. M. *et al.* Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007.

SILVA JÚNIOR, J. O. C. **Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semisólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinale* L. (confrei)**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2006a.

SILVA JÚNIOR, *et al.* Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 671-677, 2006b.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Tradução: Ricardo Bicca de Alencastro – Rio de Janeiro: LTC, p. 70-122, 2007.

SIMÕES, C. M. O. (Org.) *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, cap. 15, p. 371-400, 2003.

SIMÕES, C. M. O. (Org) *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis/Porto Alegre, p. 12, 2000.

SOUZA, W. (Ed.) **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, p. 1-44, 1998.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA – RAVENTOS. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means Folin – Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzimology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOBRAL, I.S.; SOUZA-NETA, L.C.; COSTA, G. A. N.; GUEDES, M. L. S.; MARTINS, D.; CRUZ*, F. G. Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmeyera cuspidata* Saddi, Clusiaceae. Rev. Bras. Farmacogn. v. 19, Jul./Set, 2009.

SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUHMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; BELLA CRUZ, R. C.; **Métodos de Avaliação de Atividade Biológicas de Produtos Naturais e Sintéticos**. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (Organizadores) Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: UNIVALI, 2003.

SUKSAMRARN S. et al. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 51, n. 7, p. 857-859, 2003.

SUKSAMRARN S. et al. Xanthenes from the green fruit hulls of *Garcinia mangostana*. **Journal of Nature Products**, v. 65, n. 5, p. 761-763, abril, 2002.

SULTANBAWA, M. U. S. Xanthonoids of tropical plants. **Tetrahedron**, v. 36, p. 1465– 1506, 1980.

TOLEDO, A. C. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n.1/2, p. 7-13, 2003.

VANDENBERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. **Methods in Plants Biochemistry**, v. 6, p. 47-49, 1991.

VASCONCELOS, E.A.F.; MEDEIROS, M.G.F.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil[®] 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. Brasil, v. 15 (3), p. 243-249, 2005.

WAGNER, H.; WIESENAUER, M. **Fitoterapia: fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas**. 2^a ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

WENDLANDT, W.W. **Thermal Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 3.ed. 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. Geneva, v. 1, 2003.