



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PATRÍCIA ÉRIKA RABELO E SILVA CORAZZA

**ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS, BIOLÓGICOS, VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA  
ANALÍTICA E DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA SEMI-SÓLIDA A  
PARTIR DE EXTRATO DA AROEIRA DA PRAIA (*Schinus terebinthifolius* RADDI)**

MARINGÁ

2009

PATRÍCIA ÉRIKA RABELO E SILVA CORAZZA

**ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS, BIOLÓGICOS, VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA  
ANALÍTICA E DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA SEMI-SÓLIDA A  
PARTIR DE EXTRATO DA AROEIRA DA PRAIA (*Schinus terebinthifolius* RADDI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:  
Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello  
Co-orientadora:  
Profa. Dra. Marli Mírian de Souza Lima

MARINGÁ

2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

C787e Corazza, Patrícia Érika Rabelo e Silva  
Estudos físico-químicos, biológicos, validação de metodologia analítica e desenvolvimento de forma farmacêutica semi-sólida a partir de extrato da aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI)/ Patrícia Érika Rabelo e Silva Corazza. -- Maringá : [s.n.], 2009.  
100 f. : il. color.

Orientador : Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2009.

1. Aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) - Extrato - Análise. 2. Aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) - Físico-químico, biológico - Validação de metodologia. 3. Aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) - 4.I. Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. II. Título.

CDD 21.ed.615.321

Aos meus pais, **Percídio e Rose**;

pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu esposo **Lisandro**,

pelo amor, paciência e companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus por sempre estar presente em minha vida e iluminar meu caminho.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello por sua orientação, amizade e confiança.

À Prof. Dra. Marli Mírian de Souza Lima pela co-orientação, apoio e amizade.

Ao Dr. Luís Carlos Marques pela oportunidade, apoio e amizade

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura pela realização de ensaios microbiológicos, em especial à Eliana.

À Prof. Dra. Ciomar Aparecida Bersani Amado e aos técnicos do laboratório de inflamação pela realização dos ensaios.

À Prof. Dra. Tânia Ueda Nakamura pela colaboração nos ensaios antivirais, em especial à Karine.

À Dra Ivânia T. A. Schuquel pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Cláudio Roberto Novello pelo auxílio, paciência e amizade.

À amiga Gisely pela força, colaboração, paciência e amizade.

À Maria Cristina Diciaula e Fabiana pela colaboração no projeto, apoio e amizade.

À Vanessa Canteli pela colaboração no projeto.

A todos amigos de laboratório pela colaboração e companheirismo, em especial, Karina, Flávia, Paulo, Ana Cristina, Fábio, Andressa, Renata e Traudi.

Aos amigos do programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial à Kelly Sivocy e ao Cleyton.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade do Lepemc – UEM e à farmacêutica responsável, Cristiane Moriwaki.

Ào meu irmão Robson, sua esposa Adriana e filha Ana Clara pela força e incentivo.

À minha nova família Maria Vicentina, José Francisco, Lúgia e Márcio pela compreensão e incentivo.

A todos os amigos que acompanharam e apoiaram esta etapa, à Ana Carolina que, mesmo de longe esteve sempre presente.

A todos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos conhecimentos transmitidos.

À Helena e Sonia pela amizade e companheirismo.

Aos colegas de departamento Érika, Marli, Rose, Admir, Clemensau e Nina pela colaboração e companheirismo.

À APSEN Farmacêutica S.A. pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá.

"Deus dá a todos uma estrela.  
Uns fazem da estrela um sol.  
Outros nem conseguem vê-la".

Helena Kolody

## RESUMO

*Schinus terebinthifolius* Raddi é uma árvore típica das caatingas nordestinas, encontrada desde o Ceará até o Rio Grande do Sul, além de Paraguai e Argentina. Na medicina popular, suas cascas são empregadas devido sua ação adstringente, tônica e estimulante, além da ação antimicrobiana e regeneradora dos tecidos. Em função da importância desta espécie, este trabalho tem como objetivo realizar o controle de qualidade, avaliar a atividade antimicrobiana e a capacidade antioxidante do extrato seco de *S. terebinthifolius*, desenvolver uma forma farmacêutica contendo o extrato seco e validar a metodologia analítica. O controle de qualidade foi realizado seguindo parâmetros farmacopéicos, como perda por dessecação (PD), teor de extrativos em água (TE), análise granulométrica (GA) e teor de taninos totais (TT). Os resultados obtidos foram: PD=11,8±0,4 (CV%=3,5), TE=17,59±0,52 (CV%=2,95), diâmetro médio da partícula de 0,36 mm e TT=11,01±0,13 (CV%=1,18). O extrato seco também foi avaliado quanto aos seus teores em taninos e polifenóis totais, sendo os valores encontrados de 32,0±0,26 (CV%=0,82) e 34,98±0,29 (CV%=0,82), respectivamente. A metodologia analítica do extrato seco e da forma farmacêutica produzida foi realizada por espectrofotometria UV-VIS e validada estatisticamente. A capacidade antioxidante do extrato seco, que corresponde a 9,50±0,43 (CV%=4,55), é comparável, estatisticamente, à da vitamina C, 7,48±1,24 (CV%=16,6). O extrato seco e as frações aquosa e acetato de etila foram testados frente às leveduras *Candida albicans* e *C. parapsilosis*, e às bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Tanto o extrato quanto as frações apresentaram atividade antimicrobiana frente as leveduras e frente as bactérias a fração acetato foi a que apresentou melhor atividade. Para o estudo preliminar da estabilidade, amostras foram testadas nos tempos 0 e 24 horas, 7, 14, 21 e 30 dias, sendo observado um decréscimo no teor de polifenóis totais entre o primeiro e o último teste realizado.

**Palavras-chave:** Anacardiaceae, *Schinus terebinthifolius*, polifenóis totais, validação, capacidade antioxidante, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

*Schinus terebinthifolius* Raddi is a typical tree of northeastern caatingas, found from Ceara to Rio Grande do Sul, besides Paraguay and Argentina. In folk medicine, its bark was used as astringent, tonic and stimulant and also for antimicrobial activity and regenerating tissue. Due to large utilization of this plant, the aim of this study was to realize the quality control, to evaluate the antimicrobial activity and antioxidant capacity of the crude extract of *S. terebinthifolius* and to produce a medicinal form containing the crude extract and validate the analytical methodology. The quality control of the bark of *S. terebinthifolius* was carried out based on pharmacopoeia assays: loss of drying (PD), determination of extractive (TE), granulometric analysis (GA) and total tannins content (TT). The results found for the bark were: PD =  $11.8 \pm 0.4$  (DPR%=3.5), TE =  $17.59 \pm 0.52$  (DPR% = 2.95), mean diameter of 0.36 mm and TT =  $11.14 \pm 0.11$  (DPR% = 1.02). Besides, the crude extract was evaluated in tannins and polyphenolics content, showing values of  $32.0 \pm 0.26$  (DPR% = 0.82) and  $34.98 \pm 0.29$  (DPR% = 0.82), respectively. The analytical methodology of the crude extract and medicinal form production were realized by spectrophotometry UV-VIS and statistically validated. The antioxidant capacity of the crude extract was:  $9.50 \pm 0.43$  (DPR%=4.55), and it was statistically comparable with ascorbic acid  $7.48 \pm 1.24$  (CV%=16.6). The antimicrobial activity of the crude extract and the aqueous and ethyl-acetate fractions were tested against the yeast *Candida albicans* and *C. parapsilosis*, and the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. The crude extract and fractions showed antimicrobial activity against the yeast. The ethyl-acetate fraction showed the best antimicrobial activity against the bacteria. For the preliminary study of stability, samples were tested at 0 and 24 hours, 7, 14, 21 and 30 days, when a decrease was observed in polyphenolics content between the first and the last test.

Key-words: Anacardiaceae, *Schinus terebinthifolius*, polyphenolics content, validation, antioxidant capacity, antimicrobial activity.

## NOTA BIOGRÁFICA



Patrícia Érika Rabelo e Silva Corazza nasceu em Umuarama, PR, no dia 12 de julho de 1977. Concluiu o ensino médio no Colégio Nobel, em 1995. Em 1999 iniciou o curso de Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá, neste período realizou estágios no Laboratório de Farmacotécnica e Farmacognosia desta Instituição. Realizou estágio curricular para conclusão do curso no laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico da Medley Indústria Farmacêutica. Concluiu o curso com habilitação em Indústria Farmacêutica no ano de 2003. Atuou como analista júnior no laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico na unidade de Botucatu do Grupo Centroflora no período de 2004 a 2005. Em 2006 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas realizando atividades no laboratório de Farmacognosia sob a orientação do professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Atualmente atua como farmacêutica co-responsável na Pharmavet Farmácia de Manipulação Veterinária.

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1a	Exemplar Individual de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi no Câmpus da Universidade Estadual de Maringá.....	28
1b	Folhas e flores de <i>S. terebinthifolius</i> .....	28
1c	Folhas e flores de <i>S. terebinthifolius</i> .....	28
2	Substâncias fenólicas isoladas das folhas de <i>S. terebinthifolius</i> (galato de etila (1), miricetrina (2), quercitrina (3), galato de metila (4) e miricitina (5)).....	29
3	Representação do extrato obtido após 15 h de repouso sob refrigeração (item 4.4.7).....	44
4	Gráfico de distribuição granulométrica, sendo fração residual por intervalo de classes, das cascas moídas, em moinho de martelos, de <i>S. terebinthifolius</i> .....	61
5	Curvas acumulativas de retenção e passagem após tamisação da matéria-prima vegetal <i>S. terebinthifolius</i> . (■ fração de passagem/● fração retida acumulada).....	62
6	Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,998, obtida pela relação de cinco diferentes massas de CFST06 e a média de suas absorvâncias.....	68
7	Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos das amostras de CFST06.....	69
8	Gráfico da distribuição normal dos resíduos das amostras de CFST06	69
9	Representação gráfica, em escala decrescente, da média das absorvâncias de diferentes massas de CFST06 utilizadas na determinação do intervalo de quantificação.....	71

10	Representação da curva de calibração, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,9902, dos pontos que formam o intervalo do limite de quantificação.....	71
11	Representação gráfica, em escala decrescente, da média das absorbâncias de diferentes massas de CFST06 utilizadas para a determinação do limite de detecção.....	74
12	Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,998, obtida pela relação de cinco diferentes massas (g) de CFST06 + 80 mg de substância referência pela média de suas absorbâncias.....	75
13	Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de linearidade das amostras de CFST06 + substância referência..	76
14	Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de linearidade das amostras de CFST06 + substância referência.....	77
15	Representação da comparação das curvas de linearidade, das massas de CFST06 e das massas de CFST06 + substância referência pela média de suas respectivas absorbâncias.....	78
16	Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,998, obtida pela relação de cinco diferentes concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1 pela média de suas absorbâncias.....	83
17	Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos das amostras de diferentes concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1.....	84
18	Gráfico da distribuição normal dos resíduos das amostras de diferentes concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1.....	84
19	Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,997, obtida pela relação de cinco diferentes concentrações de CFST06 incorporadas à BCG1 acrescida de substância referência (75 mg/100 g) pela média de suas absorbâncias.....	87

20	Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos das amostras de diferentes concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1 acrescida de substância referência.....	87
21	Gráfico da distribuição normal dos resíduos das amostras de diferentes concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1 acrescida de substância referência.....	88
22	Representação da comparação das curvas de linearidade, das concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1 e das concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1 acrescida de substância referência pela média de suas respectivas absorbâncias.....	89

#### LISTA DE FLUXUOGRAMAS

Fluxuograma		Página
1	Procedimentos iniciais de trabalho com a droga vegetal <i>Schinus terebinthifolius</i> .....	40
2	Preparação de extratos semipurificados a partir do extrato APST06, utilizados na avaliação das atividades biológicas de <i>S. Terebinthifolius</i> .....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Resultados, expressos em percentagem, dos testes realizados para o controle de qualidade das cascas de <i>S. terebinthifolius</i> .....	59
2	Análise granulométrica por tamisação das cascas de <i>S. terebinthifolius</i> .....	61
3	Resultados, em percentagem, do resíduo seco em diferentes soluções extrativas de amostras de cascas de <i>S. terebinthifolius</i> .....	62
4	Resultados, em percentagem, do teor de taninos e polifenóis totais do extrato CFST06.....	64
5	Resultados da análise microbiológica dos extratos e frações de <i>S. terebinthifolius</i> .....	66
6	Teores de polifenóis calculados, em percentagem, através da média da absorbância medida de diferentes massas do extrato CFST06 utilizadas para obtenção da curva de calibração.....	67
7	Teores de polifenóis calculados, em percentagem, através da absorbância medida de diferentes massas do extrato CFST06 utilizadas na determinação do intervalo de quantificação.....	70
8	Teores de polifenóis totais calculados a partir das absorbâncias de 6 soluções mães 0,240 g ml <sup>-1</sup> de CFST06.....	72
9	Teores de polifenóis calculados, em percentagem, através da absorbância medida de diferentes massas do extrato CFST06 utilizadas na determinação do limite de detecção.....	73
10	Teores de polifenóis calculados, em percentagem, através da média da absorbância medida de diferentes massas do extrato CFST06 acrescidas de substância referência, ácido gálico (80 mg), utilizadas para obtenção da curva de calibração.....	75

11	Comparação entre as absorvâncias de CFST06 e CFST06 + substância referência ácido gálico.....	77
12	Massas de CFST06 utilizadas na preparação das soluções-mãe para o teste de exatidão, suas respectivas absorvâncias e total de recuperação obtido.....	78
13	Resultados do teor de polifenóis totais, em porcentagem, da solução-mãe, 0,240 g de CFST06, em três diferentes tempos de leitura.....	79
14	Comparação do teor de polifenóis totais, em porcentagem, da solução-mãe, 0,240 g de CFST06, em dois comprimentos de onda diferentes	80
15	Resultado, em porcentagem, de polifenóis totais de 5 amostras de GAR2.5.....	81
16	Concentrações (p/p) do extrato CFST06 incorporadas à BGC1 e seus respectivos teores de polifenóis totais descritos em porcentagem..	82
17	Resultados das absorvâncias obtidas de 6 amostras de GAR2.5, em dois dias diferentes de teste, e os respectivos teores de polifenóis totais calculados.....	85
18	Teores de polifenóis totais calculados, em porcentagem, através da média das absorvâncias medidas (n=9) de diferentes concentrações (p/p) iniciais de CFST06 incorporadas à BGC1 acrescida da substância referência (75 mg/100 g).....	86
19	Comparação entre as absorvâncias de diferentes concentrações (p/p) de CFST06 incorporadas à BGC1 e à BGC1 acrescida de substância referência.....	89
20	Concentrações (p/p) de CFST06 incorporadas à BGC1 para a realização do teste de exatidão, suas respectivas absorvâncias e total de recuperação obtido.....	90
21	Comparação do teor de polifenóis totais em GAR2.5 em dois comprimentos de onda diferentes.....	91
22	Resultados dos teores de polifenóis totais obtidos nos diferentes dias	

do teste de estabilidade de GAR2.5 (n=3), seus respectivos desvios padrões e coeficientes de variação.....	91
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
AMH	Ágar Mueller Hinton
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APST06	Extrato de <i>Schinus terebinthifolius</i> preparado no laboratório de Farmacognosia – UEM
ASD	Ágar Sabraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
BGC1	Gel base Carbopol 940 a 1%
BHT	Butil hidroxi tolueno
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCI <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CFST06	Extrato comercial de <i>Schinus terebinthifolius</i> produzido por Anidro Extrações do Brasil (Centroflora)
CMH	Caldo Mueller Hinton
COSY <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H	Espectroscopia de correlação hidrogênio-hidrogênio
CSO	Caldo Sabraud Dextrose
CV%	Coefficiente de variação
DP	Desvio padrão do intercepto
DPPH●	(2,2-difenil-1-picrilhidrazila)
FAET	Fração acetato de etila
GAR2.5	Gel Aroeira 2,5%
HMQC	Correlação de múltiplas ligações
IC50	Quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH●
IC	Inclinação da curva de calibração
ICH	Internacional Conference on Harmonisation
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MBC	Concentração bactericida mínima
MIC	Concentração inibitória mínima
MPOS	Solução tampão ácido-3-[N-morfolino] ptopanossulfônico

m/v	Massa/volume
PNA	Polifenóis não adsorventes
PT	Polifenóis totais
RPMI	Meio Rosewell Park Memorial Institute
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SAQ1	Subfração aquosa 1
SAQ2	Subfração aquosa 2
SAQ3	Subfração aquosa 3
SM	Solução Mãe
TT	Taninos totais
USP	The United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	26
2.1	SISTEMÁTICA VEGETAL DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	26
2.1.1	<b>Família Anacardiaceae</b> .....	26
2.1.2	<b><i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi</b> .....	26
2.2	CONTEÚDO QUÍMICO DE <i>Schinus terebinthifolius</i> .....	29
2.3	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> .....	30
2.4	TANINOS.....	31
2.5	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	32
2.6	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	33
2.7	CARACTERÍSTICAS DA VIA VAGINAL.....	34
2.8	VAGINOSES E VAGINITES.....	35
2.9	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.....	36
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
4.1	SOLVENTES, REAGENTES E SOLUÇÕES.....	38
4.2	EQUIPAMENTOS.....	39
4.3	MATÉRIA PRIMA VEGETAL.....	39

4.4	CONTROLE DE QUALIDADE DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL.....	40
4.4.1	<b>Determinação da perda por dessecação.....</b>	40
4.4.2	<b>Determinação do teor de extrativos.....</b>	40
4.4.3	<b>Determinação do resíduo seco.....</b>	44
4.4.4	<b>Determinação do teor de taninos totais.....</b>	41
4.4.5	<b>Análise granulométrica.....</b>	42
4.4.6	<b>Preparação de extrato bruto (APST06).....</b>	43
4.4.7	<b>Preparação de extratos semipurificados.....</b>	43
4.4.8	<b>Determinação do teor de taninos totais do extrato APST06.....</b>	45
4.5	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	45
4.5.1	<b>Avaliação da capacidade antioxidante pelo método com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....</b>	45
4.5.2	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana.....</b>	46
4.5.2.1	Microrganismos empregados e condições de crescimento.....	46
4.5.2.2	Determinação da concentração inibitória mínima.....	46
4.6	DESENVOLVIMENTO DE GEL CONTENDO EXTRATO DE <i>Schinus terebinthifolius</i> PARA APLICAÇÃO VAGINAL.....	47
4.6.1	<b>Extrato seco <i>S. terebinthifolius</i>.....</b>	47
4.6.2	<b>Forma farmacêutica.....</b>	48
4.6.2.1	Preparação da base Gel Carbopol 940 <sup>®</sup> a 1% (BGC1).....	48
4.6.2.2	Incorporação do extrato CFST06 ao gel BGC1.....	48
4.6.3	<b>Técnica de extração de polifenóis do gel GAR2.5.....</b>	49
4.6.4	<b>Técnica modificada para determinação de polifenóis totais de gel</b>	

	<b>GAR2.5</b> .....	49
4.7	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS EM EXTRATO SECO DE <i>Schinus terebinthifolius</i> (CFST06).....	50
4.7.1	<b>Preparo da amostra</b> .....	50
4.7.2	<b>Parâmetros analisados</b> .....	50
4.7.2.1	Linearidade.....	51
4.7.2.2	Intervalo.....	51
4.7.2.3	Precisão.....	51
4.7.2.4	Limite de detecção.....	51
4.7.2.5	Especificidade.....	52
4.7.2.6	Exatidão.....	52
4.7.2.7	Robustez.....	52
4.7.2.7.1	<i>Tempo de Leitura</i> .....	52
4.7.2.7.2	<i>Comprimento de onda</i> .....	53
4.8	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS EM GEL AROEIRA 2,5% (GAR2.5)..	53
4.8.1	<b>Preparo da amostra</b> .....	53
4.8.2	<b>Técnica de extração de polifenóis do gel GAR2.5</b> .....	54
4.8.3	<b>Técnica modificada para determinação de polifenóis totais de gel GAR2.5</b> .....	54
4.8.4	<b>Parâmetros analisados</b> .....	54
4.8.4.1	Linearidade.....	54

4.8.4.2	Limite de quantificação.....	55
4.8.4.3	Precisão.....	55
4.8.4.4	Limite de detecção.....	55
4.8.4.5	Especificidade.....	56
4.8.4.6	Exatidão.....	56
4.8.4.7	Robustez.....	56
4.8.4.7.1	<i>Comprimento de onda</i> .....	56
4.9	ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE.....	57
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	58
5.1	CONTROLE DE QUALIDADE DAS CASCAS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> .....	58
5.2	PREPARAÇÃO DE EXTRATO BRUTO.....	63
5.3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	64
5.3.1	<b>Capacidade antioxidante</b> .....	64
5.3.2	<b>Atividade antimicrobiana</b> .....	65
5.4	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS EM EXTRATO SECO DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (CFST06).....	67
5.4.1	<b>Linearidade</b> .....	67
5.4.2	<b>Intervalo</b> .....	70
5.4.3	<b>Precisão</b> .....	72
5.4.3.1	Repetibilidade.....	72

5.4.4	<b>Limite de detecção</b> .....	73
5.4.5	<b>Especificidade</b> .....	74
5.4.6	<b>Exatidão</b> .....	78
5.4.7	<b>Robustez</b> .....	79
5.4.7.1	Tempo de leitura.....	79
5.4.7.2	Comprimento de onda.....	80
5.5	DESENVOLVIMENTO DO GEL VAGINAL CONTENDO EXTRATO SECO DE <i>S. terebinthifolius</i> (BGC1).....	80
5.6	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS EM GEL AROEIRA 2,5% (GAR2.5)..	82
5.6.1	<b>Linearidade</b> .....	82
5.6.2	<b>Limite de quantificação</b> .....	85
5.6.3	<b>Precisão</b> .....	85
5.6.4	<b>Limite de detecção</b> .....	86
5.6.5	<b>Especificidade</b> .....	86
5.6.6	<b>Exatidão</b> .....	90
5.6.7	<b>Robustez</b> .....	90
5.7	ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE.....	91
6	<b>CONCLUSOES</b> .....	93
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	94

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como medicamento é tão antiga que fica difícil saber exatamente quando a população começou a empregá-las no tratamento das mais diversas patologias. Existem autores que citam o emprego das plantas pelo homem de Neanderthal que as explorava com suas propriedades mágico-simbólicas quando se deparavam com algum mal, valendo-se de suas próprias experiências de acerto e erro e da observação acerca do uso que os animais delas faziam (MARQUES, 1999).

Há provas do uso de plantas medicinais que datam de mais de 60.000 anos. No Peru, foram encontrados utensílios com vestígios de coca com cerca de 50.000 anos. Entretanto, um dos primeiros documentos escritos sobre fitoterapia, é o Papiro de Ebers datado de 1500 a.C., encontrado no Egito. Nele estão descritas 150 plantas curativas e, além de seu valor histórico, contém uma compilação de trabalhos anteriores com um grande número de prescrições e fórmulas. Este entre outros relatos, demonstram que os saberes populares e eruditos foram constituindo a arte de curar através das plantas. Desde Hipócrates e Galeno, que sobressaíram-se na arte de curar através das plantas na Idade Antiga, passando pelos monges e padres, que traduziam trabalhos primitivos para o grego e latim nos mosteiros durante a Idade Média, chegando aos índios sul-americanos, com seus unguentos de plantas na Idade Moderna (BRANDÃO, 2006).

No Brasil, os colonizadores que aqui chegaram, preocupavam-se em descrever o espetáculo natural que vislumbravam, denominando nossas plantas de exóticas. O conhecimento dos indígenas ampliou a utilização das plantas medicinais pelos colonizadores. Anchieta interessou-se pela fauna, flora e terapêutica utilizada pelo índios, fazendo relatos de várias plantas por eles utilizadas. Entre elas a copaíba, a qual descreveu possuir um óleo de cheiro muito forte, porém suavíssimo, ótimo para curar feridas (MARQUES, 1999).

Além da influência dos colonizadores e dos indígenas, pode-se citar a influência africana, não muito conhecida, porém muito importante. Os escravos africanos no Brasil muito contribuíram com a utilização de plantas medicinais trazidas da África (BRANDÃO, 2006).

A evolução da fitoterapia ao longo dos tempos é visível. Muitos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de obter novas opções terapêuticas a partir de extratos vegetais. Isto se deve a redescoberta da população frente aos medicamentos fitoterápicos e, conseqüentemente ao crescente interesse das indústrias farmacêuticas em desenvolver novas formulações a partir de plantas medicinais há muito utilizadas pela população. Entretanto, para isso, são necessários estudos cada vez mais detalhados com cada espécie

vegetal para garantir os três aspectos básicos que devem cumprir os medicamentos: eficácia, segurança e qualidade (YAMADA, 2006).

Nesse sentido, partir de uma preparação simples, utilizada há milhares de anos e chegar a formas farmacêuticas tecnologicamente sofisticadas, demanda muitos estudos, recursos e envolve a interação de áreas distintas.

O emprego de fitomedicamentos tem algumas particularidades que devem ser de conhecimento do profissional da saúde para uma correta prescrição, afim de se evitar confusão com formas populares de uso das plantas medicinais.

Assim, diferenciar o fitomedicamento do uso popular de plantas medicinais é importante, uma vez que no primeiro caso tem-se um produto devidamente testado e aprovado para emprego no tratamento de determinada patologia. No segundo caso, tem-se apenas relatos de utilização, o que não garante sua atividade (YAMADA, 2006).

Nos dias atuais, a fitoterapia tem ganhado destaque em procedimentos clínicos tradicionais, pois apesar da grande evolução da medicina alopática, a partir da segunda metade do século XX, ainda existem obstáculos, tais como o não acesso ao medicamento pelas populações carentes por falta de recursos financeiros. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais (BRASIL, 2006).

Atualmente, existe uma grande quantidade de pesquisas em busca de moléculas ativas nas plantas, organismos marinhos, insetos e microrganismos (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001). Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais. Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas e um número significativo são fármacos obtidas de precursores naturais (RATES, 2001).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial, além de ser detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração (BRASIL, 2006).

Devido a imensa diversidade molecular e a dificuldade em encontrar uma molécula importante, com propriedades de um fármaco em potencial, é crescente a busca por moléculas protótipos nas plantas medicinais e principalmente as que possuem uma informação histórica importante, ou seja, a utilização na medicina popular (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

Assim, sabe-se que, no desenvolvimento de fitomedicamentos são necessários conhecimentos sobre sua eficácia e dos riscos do seu uso, assim como a reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Levantamentos etnofarmacológicos de utilização e

documentações técnico-científicas podem servir para validar sua eficácia e segurança. (BRASIL, 2006).

A partir da resolução RDC nº 48 de 16/03/2004 da ANVISA, a padronização e o controle de qualidade dos fitomedicamentos é exigência legal para fins de registro (BRASIL, 2004).

O mercado de fitomedicamentos cresce anualmente abrangendo todas as especialidades médicas. Na prática ginecológica, os fitomedicamentos têm sido empregados no tratamento de diversas doenças. A descoberta dos fitoesteróis representa um grande avanço na terapia de reposição hormonal. Assim, como exemplo, pode-se citar a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) que tem como princípios ativos primordiais as isoflavonas e os óleos essenciais que encontram indicação clínica no tratamento dos sintomas do climatério. Pode-se também citar o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) que é empregado no alívio de disfunções menstruais, devido a presença de seus constituintes: isoflavonas, flavonóides, glicirrina. A primula (*Oenothera biennis* L.), que tem como princípio ativo o ácido linoleico, um óleo graxo essencial largamente empregado no alívio das síndromes pré-menstruais (BAGNOLI et al., 2006).

Entre as muitas espécies de uso popular, a Aroeira da Praia, *Schinus terebinthifolius* Raddi, também conhecida como Aroeira Vermelha (SOUZA; LORENZI, 2005), é utilizada na clínica ginecológica. Pertencente à família Anacardiaceae, *S. terebinthifolius* tem distribuição predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, ocorrendo também nas regiões temperadas (JOLY, 2002). As cascas, por serem depurativas e febrífugas, têm ação imediata e enérgica sobre as hemoptises e afecções uterinas em geral. As folhas tem ação anti-reumáticas além de valioso remédio na cura de úlceras e feridas, entre outras aplicações medicinais. Os ramos novos servem para os mesmos fins e também são empregados na limpeza e branqueamento dos dentes. Aos frutos atribui-se propriedade diurética (CORRÊA, 1984). É uma planta medicinal amplamente utilizada na região Nordeste do Brasil para tratamento de diversas infecções. O decocto das cascas do caule tem sido tradicionalmente utilizado para tratar cervicites e corrimento genital (SANTOS; AMORIM, 2002).

Dentre as vaginites, a vaginose bacteriana é o tipo mais comum em mulheres na idade reprodutiva (DECENA et al., 2006). Geralmente a ocorrência de vaginite está associada à presença de *Candida* spp. Estima-se que 75% das mulheres já apresentaram uma infecção por *Candida* uma vez durante a vida e 40-50% apresentaram dois ou mais episódios (PITSOUNI et al., 2008).

Dentre a variedade de tratamentos empregados para as vaginites, destaca-se a administração tópica ou oral de antifúngicos. Em casos mais resistentes, é comum a associação destas duas vias de administração. No tratamento alopático, a via oral é

preferida devido a facilidade de administração e redução no tempo de tratamento (PITSOUNI et al., 2008).

No que se refere à medicina popular, uma variedade de plantas medicinais são empregadas, sendo o banho de assento, com o decocto da droga vegetal, é a forma mais comum de tratamento. Porém, em grande número de casos, observa-se que a administração do extrato vegetal provoca uma ação irritante na mucosa vaginal. Estudos foram realizados no intuito de investigar a origem das ações irritantes dos extratos de aroeira e possíveis formas de diminuir tal efeito. Alguns testes foram realizados incorporando-se o extrato a géis e cremes, e concluiu-se que, o extrato incorporado nestas formulações não apresentam efeito tóxico quando empregadas topicamente (LEAL, 1999).

Com base nestas informações e, sendo as vaginites uma das principais patologias ginecológicas, o estudo da atividade farmacológica da *S. terebinthifolius* frente a esta patologia, bem como o desenvolvimento de uma forma farmacêutica segura e eficaz, torna-se importante. Entretanto, para o correto processo de desenvolvimento de novas formulações, a validação de metodologia analítica para a determinação qualitativa e quantitativa de fármacos, matérias-primas, amostras biológicas ou produto acabado tem se tornado fundamental. A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como “o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (KRULL; STWARTZ, 1998).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 SISTEMÁTICA VEGETAL DE *Schinus terebinthifolius* RADDI.

#### 2.1.1 Família Anacardiaceae

A família Anacardiaceae possui distribuição tropical e subtropical, incluindo cerca de 70 gêneros e 700 espécies. No Brasil ocorrem 15 gêneros e cerca de 70 espécies.

Seus gêneros são subdivididos em cinco tribos: Anacardieae, Dobineae, Rhoeeae, Semecarpeae e Spondiadeae. Cerca de 25% dos gêneros desta família são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa. Porém, as espécies venenosas desta família estão restritas às tribos Anacardieae, Rhoeeae e Semecarpeae (CORREIA et al., 2006).

Diversas Anacardiaceae apresentam frutos ou pseudofrutos comestíveis. Este é o caso do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), cujo fruto produz a castanha-de-caju. Outras frutas incluem a manga (*Mangifera indica* L.), os cajás (*Spondias* spp. L.), o umbu (*Spondias tuberosa* Arruda), a seriguela (*Spondias purpúrea* L.). Pertencem ainda a esta família o pistache (*Pistacia vera* L.) e diversas espécies que produzem madeira de boa qualidade, incluindo o goçalo-alves (*Astronium fraxinifolium* Schott ex Spreng.), o guarita (*Astronium graveolens* Jacq.), a aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), a aroeira-branca (*Lithraea molleoides* Engl.) e a braúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). Algumas espécies são utilizadas na ornamentação de ruas e praças, como a aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), o charão (*Rhus succedanea* L.) e a aroeira-salsa (*Schinus molle* L.). O peito-de-pombo (*Tapirira guianensis* Aubl.) é certamente a mais comum espécie nativa de Anacardiaceae, ocorrendo em quase todas as formações florestais do Brasil (SOUZA; LORENZI, 2005).

#### 2.1.2 *Schinus terebinthifolius* Raddi

*Schinus terebinthifolius* Raddi está presente na primeira edição da Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA, 1929), onde estão descritas sua caracterização, aspectos microscópicos e a parte utilizada, suas cascas na forma de tintura e extrato fluido. No Brasil,

já era utilizada pelos nativos antes mesmo da chegada dos colonizadores brancos. É uma árvore de pequeno porte, de espécie perenifólia, proveniente da América do Sul, nativa no Brasil, Paraguai e Argentina. É encontrada desde o Ceará até o Rio Grande do Sul, sendo uma árvore típica das caatingas nordestinas indicada para a recuperação de áreas degradadas e arborização. Destaca-se por ser utilizada na medicina popular, como adstringente, tônica e estimulante, com ação antimicrobiana e regeneradora dos tecidos (SANTOS et al., 2004).

A aroeira tem vários nomes tais como: aroeira-vermelha, aroeira mansa, aroeira branca, aroeira da praia, aroeira do brejo, aroeira rasteira, aroeira do campo, coração de bugre, bálsamo, fruta do sabiá, aroeira de sabiá, aguaraíba, aroeira do sertão, cabuí e cambuí (RIBAS et al., 2006)

É um arbusto de 2-3 m de altura, às vezes arborescentes com até 7-8 metros de altura (figura 1a). Possui folhas imparipinadas, compostas, folíolos oblongo-elípticos ou obovados, bordas em serra, membranáceo (CORRÊA, 1984) (figuras 1b e 1c).

Segundo Duarte et al. (2006), o sistema de revestimento caulinar é representado pela epiderme, que é unisseriada e possui tricomas similares ao da folha. O felogênio se instala superficialmente e o córtex mostra várias camadas de células parenquimáticas. Em meio a estas, encontram-se fibras e células pétreas, isoladas ou em grupamentos, que podem formar uma bainha esclerenquimática incompleta. O floema consiste de um cilindro externo ao xilemático, o qual é totalmente lignificado, apresenta elementos traqueais dispostos em fileiras ou em pequenos grupos, e é percorrido por raios estreitos que se prolongam até o floema. Canais secretores também estão presentes na medula, que se constitui de células parenquimáticas, de paredes levemente espessadas, que exibem pontoações e contêm amiloplastos. Células com conteúdo fenólico e prismas e drusas de oxalato de cálcio são encontradas no córtex, no floema e na medula.

Neste mesmo trabalho, os autores descrevem as folhas como sendo alternas, compostas, imparipinadas, frequentemente com nove ou onze folíolos. Em vista frontal de ambas as faces epidérmicas, ocorrem células de contorno praticamente poligonal com evidentes campos primários de pontoação, revestidas por uma cutícula delgada e estriada. Alguns tricomas tectores e glandulares estão presentes. Estômatos anomocíticos são observados exclusivamente na superfície abaxial, caracterizando a folha como hipostomática. Na região internevural, junto a ambas as faces da epiderme uniestratificada, encontra-se uma camada subepidérmica de células parenquimáticas relativamente maiores. Seguem-se um ou dois estratos de parênquima paliçádico e vários de parênquima esponjoso em disposição dorsiventral. Em meio ao clorênquima, distribuem-se feixes vasculares de pequeno porte, eventualmente acompanhados de canais secretores. A nervura central é biconvexa. Subjacente à epiderme, observa-se colênquima anelar e, percorrendo o

parênquima fundamental, há cerca de três a cinco feixes vasculares colaterais. O floema está associado a canais secretores e o sistema vascular é circundado por uma bainha esclerenquimática incompleta.

Os frutos são do tipo drupa e têm coloração verde no início e depois se tornam vermelhos. Essa casca vermelha seca se transforma em uma espécie de concha de papel que envolve a semente, que é única, marrom escura e mede cerca de 0,3 mm de diâmetro (DEGÁSPARI et al., 2004).

As flores são amarelo-pálidas, pequenas, dispostas em panículas de 5-10 cm de comprimento (figuras 1b e 1c).

Segundo Santos e colaboradores (2007), além de sua aplicação como fitomedicamento, o interesse por *S. terebinthifolius* se dá pelo seu metabolismo secundário que produz entre outras substâncias, flavonóides, taninos e óleos essenciais, com aplicação nas indústrias de alimentos, cosmética e perfumaria.



Foto: PERSC

**Figura 1a** – Exemplar Individual de *Schinus terebinthifolius* Raddi no Câmpus da Universidade Estadual de Maringá



**Figura 1b** - Folhas e flores de *S. terebinthifolius*



Foto: PERSC

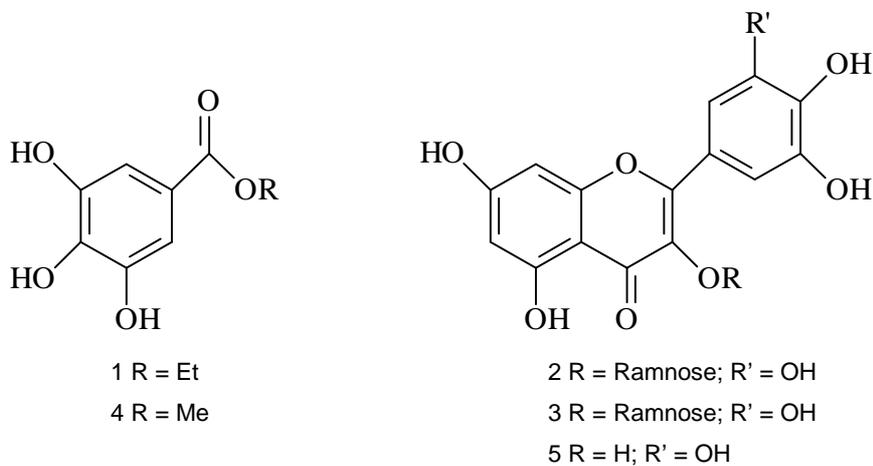
**Figura 1c:** Folhas e flores de *S. terebinthifolius*

## 2.2 CONTEÚDO QUÍMICO DE *Schinus terebinthifolius*

Correia et al., (2006) isolaram além de triterpenos, biflavonóides e lipídios fenólicos, substâncias de maior ocorrência em espécies da família Anacardiaceae, outras classes de substâncias diferentes, tais como os benzenóides.

Os gêneros *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. e *S. terebinthifolius* possuem como constituintes químicos majoritários os taninos, porém, segundo a literatura, também se evidencia a presença de alcalóides, esteróides e substâncias ativas caracterizadas como urundeuvinas A e B (chalconas), às quais são conferidas potentes atividades antiinflamatórias (LIMA et al., 2004).

Em *S. terebinthifolius*, estudos fitoquímicos descrevem a ocorrência de terpenóides e ácidos graxos. Jain et al. (1995) descreveram a inibição de mais de 80% da atividade da fosfolipase A2 por meio do extrato acetato de etila de frutos de *S. terebinthifolius* devido a presença de dois triterpenóides, o ácido masticadiênico e ácido 3 $\beta$ -masticadienólico. Segundo Ceruks et al. (2007), o fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius* resultou no isolamento de cinco substâncias fenólicas ativas: galato de etila (1), miricetrina (2), quercitrina (3), galato de metila (4) e miricitina (5) (figura 2).



**Figura 2** – Substâncias fenólicas isoladas das folhas de *S. terebinthifolius*: galato de etila (1), miricetrina (2), quercitrina (3), galato de metila (4) e miricitina (5).

Degáspari e colaboradores (2004) estudaram o extrato alcoólico dos frutos e verificaram a presença de apigenina e ácido elágico, e nos frutos relataram a presença de componentes tóxicos, entre os quais se destaca o cardanol, além de um alto teor de taninos. As sementes são ricas em óleo essencial constituído de terpenos.

Jorge e Markmann (1996) relataram que as folhas são ricas em taninos e óleos essenciais assim como as cascas, sendo a única diferença entre ambas a composição química, caracterizada pela presença de saponinas.

Em associação com outras duas drogas vegetais, o eucalipto, *Eucalyptus globulus* Labill e a hortelã de folha graúda, *Peltodon radicans* Pohl, compõe uma formulação denominada por Medeiros et al. (2007) como Formulação Poliervas Brasileira que possui ação antiinflamatória. Estes autores destacam ainda, a atividade antibacteriana das cascas de *S. terebinthifolius* além de sua ação terapêutica sobre a inflamação crônica do cólon vaginal.

### 2.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE *Schinus terebinthifolius*

Corrêa (1984) destaca a aroeira-vermelha como adstringente, tônica, estimulante e antinevrálgica, mas com emprego restrito, pois trata-se de uma espécie tóxica e que deve ser utilizada com precaução. As cascas possuem ação depurativa e febrífuga, com ação imediata sobre hemoptises e afecções uterinas.

As partes utilizadas de *S. terebinthifolius* que apresentam propriedades medicinais são: casca, folhas e frutos. É considerada pela medicina popular como adstringente, antidiarreica, antiinflamatória, depurativa, diurética e febrífuga, das cascas se extrai um óleo empregado contra tumores e doenças da córnea (DEGÁSPARI et al., 2004). Devido à composição de seus óleos essenciais é utilizada no tratamento de distúrbios respiratórios.

O decocto da casca do caule tem sido tradicionalmente utilizado para tratar cervicites e corrimento genital (SANTOS; AMORIM, 2002).

Segundo Matos (2000), um estudo clínico realizado com cem mulheres portadoras de cervicite e cervicovaginite comprovou a eficácia do tratamento tópico por meio de tampões assépticos, com a cura de todos os casos no período de tratamento que variou de uma a três semanas.

A presença de substâncias tais como terebintona, o ácido hidroximasticadienóico, o ácido terebintifólico e o ácido ursólico são responsáveis pela ação antimicrobiana de *S. terebinthifolius*.

Lima et al. (2004) avaliaram o potencial de ação antimicrobiana do extrato aquoso de *S. terebinthifolius*, sendo utilizado como substrato de extração o caule e folhas. Este extrato mostrou atividade frente a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* e atividade inibitória do crescimento de *Trycophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Epydermophyton floccosum* e *C. albicans*.

## 2.4 TANINOS

A denominação tanino é largamente utilizada, particularmente em literatura botânica, originalmente derivada do termo “tanante”, implicando que o material vegetal produza couro a partir de peles (MONTEIRO et al., 2005a).

Pela definição clássica, taninos são substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular entre 500 e cerca de 3000 Dalton, as quais apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas. Classicamente, de acordo com a estrutura química, os taninos são divididos em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicolisados. Os taninos condensados, também chamados de proantocianidinas, são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol (MELLO; SANTOS, 2003). Taninos condensados e hidrolisáveis se distribuem no Reino Vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. As proantocianidinas ocorrem amplamente em Gymnospermae e Angiospermae, enquanto os taninos hidrolisáveis estão quase restritos às Choripetale das dicotiledôneas e não foram encontrados nas Simpetalae (MELLO; SANTOS, 2003).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois grupos de taninos, condensados e hidrolisáveis: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres e habilidade de complexar com outras moléculas tais como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996).

Na medicina tradicional, plantas ricas em taninos são utilizadas em diversas patologias, como diarréia, hipertensão arterial, reumatismo, gastrite, feridas, hemorragias, problemas renais, processos inflamatórios em geral entre muitas outras aplicações (MELLO; SANTOS, 2003).

Substâncias fenólicas em vegetais, principalmente taninos, têm reconhecidamente a função de inibir herbívoros, pois em altas concentrações, frutos, folhas, sementes ou demais tecidos jovens tornam-se impalatáveis aos fitófagos e, ainda, combinado a algumas proteínas, estes tecidos resistem fortemente à putrefação (MONTEIRO et al., 2005a).

A habilidade de se ligar a proteínas, confere aos taninos também a propriedade de inibir enzimas. Segundo Hattori et al. (1990) e Ooshima et al. (1993), os taninos são capazes de inibir *in vitro* as glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, encontradas na cavidade oral do homem. Esta inativação da glucosiltransferase pelos taninos bloqueia a formação da placa dental e de inflamações na região da boca e garganta (SCHOLZ, 1994).

Vários efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos aos compostos fenólicos presentes nas frutas, vegetais, chás e vinhos. Atenção especial tem sido dada nas últimas décadas ao resveratrol, um composto fenólico presente nas uvas, devido a estudos epidemiológicos que mostram correlação inversa entre o consumo moderado de vinho e a incidência de doenças cardiovasculares, estes estudos tiveram início a partir de investigações relacionadas à dieta francesa, o fenômeno conhecido como “Paradoxo Francês” (ABE et al., 2007)

Os taninos têm sido utilizados na dermatologia devido a sua forte propriedade adstringente, pois quando aplicados topicamente na pele ou em membranas mucosas, promovem precipitação protéica que torna as camadas superficiais impermeáveis a agentes nocivos, encolhendo as estruturas coloidais, e causando vasoconstrição capilar (SCHULZ et al., 2002), o que é benéfico no tratamento de diversas afecções cutâneas.

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996).

## 2.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Desde a década de 1940, o desenvolvimento de fármacos eficazes e seguros para tratamentos de infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, com consequente redução drástica da morbidade e mortalidade por doenças microbianas. Infelizmente, o desenvolvimento de agentes antimicrobianos potentes que apresentam grande eficácia tem sido acompanhado do aparecimento de microrganismos resistentes a estes agentes.

Isto evidencia a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos. Atualmente, ferramentas analíticas modernas facilitam o estudo fitoquímico detalhado, o que possibilita novos parâmetros ao estudo farmacológico e microbiológico, com possível desenvolvimento de agentes antimicrobianos farmacologicamente seguros.

É crescente a preocupação em fazer uso de produtos menos agressivos de origem vegetal ou o mais próximo possível desta origem. Por tal motivo remete-se à pesquisa de produtos fitoterápicos e produtos naturais. Um dos melhores exemplos são produtos que contenham em seus constituintes, flavonóides, compostos fenólicos naturais largamente distribuídos nos vegetais superiores (PACKER; LUZ, 2007).

Muitas substâncias químicas têm sido isoladas de espécies vegetais brasileiras e de outras partes do mundo com potente atividade antimicrobiana de grande interesse para a indústria farmacêutica e para a medicina.

A atividade antibacteriana e antifúngica do extrato de *S. terebinthifolius*, possivelmente está associada à presença de certas substâncias químicas, em especial taninos, além de substâncias presentes em menor quantidade, como os alcalóides, esteróides, chalconas (urundeuvinas) (LIMA et al., 2004).

Ensaio farmacológico registraram a existência nesta planta de propriedade antimicrobiana para fungos e bactérias incluindo nesta ação *Monilia*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (LORENZI; MATOS, 2002).

## 2.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

O estresse oxidativo é definido em geral como uma formação excessiva e/ou incompleta remoção de moléculas altamente reativas tais como as espécies reativas de oxigênio, que incluem radicais livres como superóxido, radical hidroxila, radical hidroperoxila e também espécies não radicais como peróxido de hidrogênio. *In vivo*, algumas espécies reativas de oxigênio são benéficas e atuam na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e transmissões intracelulares. Por outro lado, também são capazes de danificar uma ampla quantidade de biomoléculas tais como proteínas, DNA e lipídeos. Encontram-se associados não apenas com a peroxidação lipídica que resulta na deteriorização de alimentos, mas também estão envolvidos no desenvolvimento de uma variedade de doenças tais como envelhecimento, carcinogênese, doenças cardíacas, diabetes e neurodegeneração (ARDESTANI; YAZDANPARAST, 2007).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversas substâncias antioxidantes, as quais podem ter origem endógena ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes (SOUSA et al., 2007).

O conhecimento das propriedades antioxidantes das plantas é relativamente novo, observando um enorme crescimento das investigações científicas neste particular, envolvendo desde o efeito de extratos brutos, de frações ou componentes isolados e/ou modificados (WILHELM FILHO et al., 2001).

Segundo Sousa et al. (2007), a atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e a sua estrutura química. Quanto maior a quantidade de hidroxilas fenólicas, maior o seqüestro de radicais livres (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007).

Substâncias fenólicas tais como flavonóides e ácidos fenólicos são considerados antioxidantes mais potentes que a vitamina C e a vitamina E (ALJADI; KAMARUDDIN, 2004). Por isso, há um crescente interesse em antioxidantes fenólicos presentes nas plantas medicinais e nas usadas na dieta alimentar, que podem ajudar atenuando o dano oxidativo. Estes antioxidantes naturais promovem benefícios à saúde associados à prevenção de danos causados por degeneração biológica (ARDESTANI; YAZDANPARAST, 2007).

Estudos têm demonstrado que polifenóis naturais possuem efeitos significativos na redução do câncer, e evidências epidemiológicas demonstraram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e o consumo de alimentos que são fonte de substâncias fenólicas, possivelmente devido às suas propriedades antioxidantes (BROINIZI et al., 2007).

Segundo estudo de Lima e colaboradores (2006), a casca do caule de *S. terebinthifolius* apresentou ação antioxidante e a fração clorofórmica é uma fração rica em substâncias antioxidantes, com ação na mesma ordem de grandeza do padrão epicatequina-galato.

## 2.7 CARACTERÍSTICAS DA VIA VAGINAL

A vagina é um tubo fibromuscular forrado (internamente) por mucosa, mediano, com 7-8 cm de comprimento, que sobe para a pelve inclinando-se para trás cerca de 70° a partir do vestibulo (PIATO, 1993), e liga o colo uterino à vulva. Está a frente do reto e atrás da bexiga. É formada por três camadas: conjuntiva externa, muscular lisa mediana e mucosa interna (GOMPEL; KOSS, 1997).

A mucosa vaginal tem espesso epitélio escamoso estratificado, rico em glicogênio, suportado por lâmina própria conectivo-elástico provida de cerrado plexo venoso. Desprovida de glândulas, apresenta espessamentos longitudinais medianos, às colunas anterior e posterior (PIATO, 1993).

A flora vaginal varia com a idade, pH e secreção hormonal. No primeiro mês de vida, e no período compreendido entre a puberdade e a menopausa, há predomínio de *Lactobacillus* sp. (bacilos de Döderlein). Entre o primeiro mês de vida e a puberdade, e também durante a menopausa, a flora vaginal é constituída de espécies de diferentes gêneros como *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Escherichia*. Estas variações, de modo geral, acompanham variações do pH vaginal, isto é, em pH ácido há predominância de *Lactobacillus* e em pH neutro predominam as outras bactérias. A variação de pH, por sua vez, está relacionada com a quantidade de glicogênio na vagina. A fermentação deste

polímero pelos lactobacilos abaixa o pH, criando um ambiente desfavorável ao crescimento das bactérias que proliferam em pH neutro (TRABULSI, 1991).

## 2.8 VAGINOSES E VAGINITES

A micose vulvovaginal foi descrita pela primeira vez por Wilkinson em 1949, que estabeleceu uma relação entre a existência de fungos na vagina e o aparecimento de vaginite. A partir desse momento, os conhecimentos evoluíram progressivamente (ZIARRUSTA, 2002).

A inflamação da vagina devido à infecção, ou vaginite, é mais comumente causada por um dos três organismos: o fungo *Candida albicans*, o protozoário *Trichomonas vaginalis* ou a bactéria *Gardnerella vaginalis*. A maioria dos casos são atribuídos à presença de *G. vaginalis* e são denominadas vaginose bacterianas, uma vez que não há sinal evidente de inflamação (TORTORA et al., 2006).

A vaginose bacteriana é uma infecção vaginal complexa e polimicrobiana, caracterizada pela redução na quantidade normal de peróxido de hidrogênio produzido pelas espécies de *Lactobacillus* e em uma supercolonização de outras espécies bacterianas, incluindo *G. vaginalis*, espécies Gram-negativas obrigatoriamente anaeróbicas, *Mobiluncus* spp. e *Mycoplasma hominis* (SOBEL et al., 2006).

A vaginose mais frequente, causada por *G. vaginalis* também chamada de vaginite inespecífica, é encontrada em mulheres com flora normal, mas com patogenicidade para a mucosa vaginal. Alguns estudos sugerem que certas vaginites inespecíficas podem ser causadas por microrganismos anaeróbicos. Microrganismos como *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamidia trachomatis* causam vaginite discreta em adultos, entretanto em crianças a primeira pode causar vulvovaginite intensa (TRABULSI, 1991).

A vaginite bacteriana é considerada a infecção mais comum em mulheres na idade reprodutiva, ocorrendo em 15 a 30% das mulheres não grávidas e chegando a 50% em mulheres grávidas. Recentemente, a vaginite bacteriana assintomática vem sendo associada com a transmissão do vírus HIV e aumento da susceptibilidade a infecções sexualmente transmissíveis (SOBEL et al., 2006).

## 2.9 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A utilização cada vez mais difundida da medicina tradicional para o tratamento das necessidades primárias de saúde envolvendo o uso de plantas medicinais, e a consequente maior entrada de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos no mercado brasileiro, tem tornado mais claro, ainda, a necessidade de se buscar parâmetros para o controle de qualidade destes produtos. Um fator limitante para uma maior utilização das plantas é que, a maioria das que estão em uso não possui parâmetros de qualidade definidos, assim o estabelecimento de métodos analíticos validados, que garantam a quantificação de marcadores químicos para o controle da matéria-prima vegetal e dos produtos em transformação, tanto intermediários quanto finais, é fundamental para a produção de fitoterápicos com qualidade (SCHWANZ, 2006).

A implantação da validação de métodos analíticos de controle de qualidade é justificada por razões legais, técnicas e comerciais. A Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA, diz que a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório (BRITO et al., 2003).

Validar um método é um processo demorado, que requer um grande número de experimentos analíticos e cálculos estatísticos. Estabelecer um bom procedimento de validação requer um compromisso entre validar rápido, e com número adequado de análises, sem perder a qualidade das estimativas (RIBEIRO et al., 2008).

Diversos guias contendo diretrizes sobre a validação estão disponíveis atualmente ICH (1996); USP (2005); ANVISA (2003). No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) (RIBEIRO et al., 2008).

A literatura dispõe de vários trabalhos, que abrangem as áreas biológica, farmacêutica e química, que relatam a validação de métodos analíticos e definem critérios que devem ser seguidos durante o seu desenvolvimento. Tais artigos abordam os critérios de validação de acordo com sua área específica, enfatizando a exatidão, a precisão e os limites de detecção e quantificação (BRITO et al., 2003).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi realizar o controle de qualidade, por meio de análises físico-químicas, avaliar a atividade antimicrobiana e a capacidade antioxidante do extrato seco das cascas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), bem como desenvolver uma forma farmacêutica contendo o extrato seco adquirido e validar a metodologia analítica, baseando-se nos teores de polifenóis totais, do extrato e da forma farmacêutica obtida.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a droga vegetal por métodos físico-químicos farmacopeicos e não farmacopeicos.
- Padronizar o extrato adquirido no mercado baseado-se nos teores de polifenóis totais.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos APST06 e CFST06 e frações semipurificadas.
- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato CFST06.
- Desenvolver forma farmacêutica semi-sólida contendo o extrato seco de *Schinus terebinthifolius*.
- Validar a metodologia analítica, por espectrofotometria UV-VIS, baseando-se em teores de polifenóis totais do extrato CFST06.
- Validar a metodologia analítica, por espectrofotometria UV-VIS, baseando-se em teores de polifenóis totais da forma farmacêutica semi-sólida obtida.
- Avaliar preliminarmente a estabilidade da forma farmacêutica semi-sólida.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SOLVENTES, REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes, exceto quando especificado, possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.), e de marca Merck<sup>®</sup>, Sigma<sup>®</sup>, Dinâmica<sup>®</sup>, Carlo Herba<sup>®</sup> ou Mallinckrodt<sup>®</sup>. Foi utilizado álcool etílico de cereais da Cerealcool<sup>®</sup>.

Os caldos e meios de cultura utilizados para as análises microbiológicas foram da marca Difco<sup>®</sup> e Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

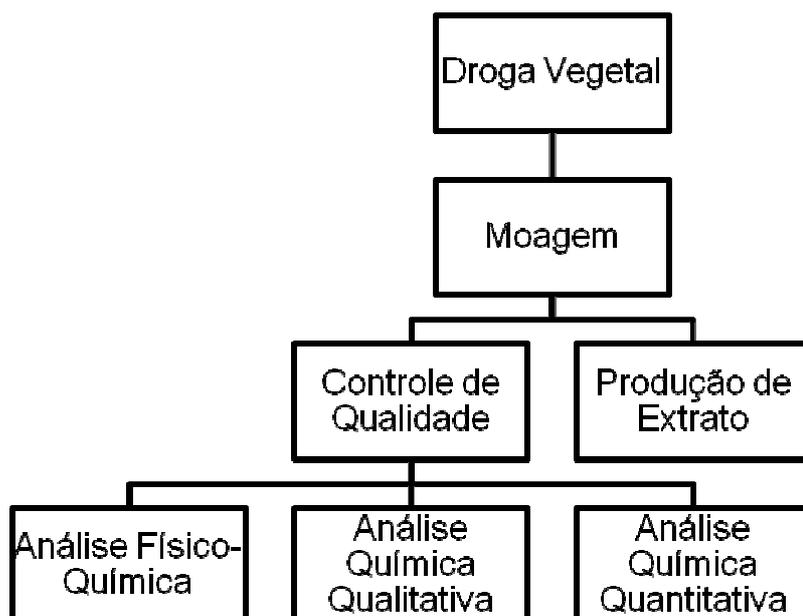
- Acetona
- Ágar Mueller Hinton
- Ágar Saboraud Dextrose
- Álcool etílico de cereais
- BHT
- Caldo Mueller Hinton
- Caldo Saboraud Dextrose
- Carbonato de sódio
- Carbopol 940
- Meio Rosewell Park Memorial Institute
- Metanol
- Metilparabeno
- Nitrogênio líquido
- Pó de Pele levemente Cromado Freiberg
- Reagente Folin–Ciocateau 2 *N*
- Solução de cloreto de alumínio
- Solução metanólica de BHT
- Solução metanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)
- Solução salina 0,9% estéril
- Solução tampão ácido-3-[N-morfolino]propanossulfônico (MPOS)
- Substância referência ácido gálico

#### 4.2. EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético Fisatom
- Balança analítica AND HR-200
- Balança analítica Gehaka 2000
- Balança analítica dessecadora com sistema de infravermelho, Ohaus® MB200
- Banho-maria Fanem mod 120/3
- Bomba a vácuo Vaccubrand Labortechnik tipo MZ 2C
- Centrífuga Refrigerada Eppendorf® 5415R
- Espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS PC-1650
- Estufa de Estabilidade - Binder® - mod. KBF240
- Liofilizador – Christ Alpha I-4
- Mini agitador IKA® MS-1
- Moinho de martelos Tigres ASN5
- pHmetro Digimed mod DM20
- Tamisador vibratório - RETSCH.
- Ultra-som Unique USC 1540, 25 Hz
- Ultra-turrax UTC 115KT

#### 4.3 MATÉRIA - PRIMA VEGETAL

Um lote de cascas, fragmentadas, secas e limpas do vegetal *Schinus terebinthifolius* Raddi foi cedido pela Apsen Farmacêutica (São Paulo). O material recebido foi moído em moinho de martelos, resultando em pó da droga. O esquema de trabalho realizado está apresentado no fluxograma 1.



**Fluxograma 1** – Procedimentos iniciais de trabalho com a droga vegetal *Schinus terebinthifolius*.

#### 4.4 CONTROLE DE QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

##### 4.4.1 Determinação da perda por dessecação (CARDOSO, 2002)

O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico, empregando-se balança analítica dessecadora com sistema de infravermelho. Cerca de 1,0 g da droga vegetal moída foi exatamente pesado em placa de Petri, previamente tarada e dessecada por 20 min à temperatura de 110 °C. O resultado foi calculado em relação a 100 g da droga, pela média de três determinações.

##### 4.4.2 Determinação do teor de extrativos (DEUTSCHES, 1986)

Foram pesados exatamente cerca de 1,0 g da droga vegetal, que foi submetida à decocção com 100,0 ml de água, durante 10 min. Após o resfriamento a solução foi transferida para balão volumétrico de 100 ml e o volume completado. Após filtração em papel filtro, os primeiros 20,0 ml foram desprezados. Foi pesada uma alíquota equivalente a

20,0 g, em pesa-filtro previamente tarado, e levado à evaporação até securo em banho-maria, sob agitação. O pesa-filtro contendo o resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105 °C até peso constante, resfriado em dessecador e pesado. A média foi calculada pela realização de três determinações.

#### 4.4.3 Determinação do resíduo seco

Para a determinação do resíduo seco foram preparadas quatro soluções extrativas com diferentes solventes, sendo todas a 10% (m/v). Os solventes utilizados foram: água, acetona:água (7:3, v/v), etanol:água (1:9, v/v) e metanol:água (1:1, v/v). Cerca de 100 g da droga vegetal moída foram submetidas a agitação com a solução extrativa por 30 min. Após este processo o extrato foi deixada em repouso por 1 h sendo então levada a refluxo por 30 min. O extrato foi filtrado sob pressão reduzida após um período de 12 h em repouso sob refrigeração.

Uma amostra de 20,0 g de cada solução extrativa foi exatamente pesada em pesa-filtro previamente tarado e evaporado até securo em banho-maria. O pesa-filtro foi colocado em estufa por 2 h à temperatura de aproximadamente 105 °C, resfriado em dessecador e pesado a peso constante.

#### 4.4.4 Determinação do teor de taninos totais (GLASL, 1983)

Foram pesados exatamente cerca de 0,750 g da droga vegetal e transferidos para um erlenmeyer com 150 ml de água deixando-se durante 30 min em banho-maria à temperatura de 85 °C. Após resfriamento em água corrente, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 250 ml, completando-se o volume com água. Cerca de 80 ml do extrato foram filtrados, desprezando-se os primeiros 20 ml. O filtrado obtido foi denominado Solução-Mãe (SM).

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5 ml da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 M) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorbância a 691 nm, empregando-se a água como branco.

Para determinações de polifenóis não adsorventes (PNA), 10 ml da SM foram transferidos com 0,100 g de pó-de-pele R para um béquer e agitados durante 60 min. Após, a solução foi filtrada e 5 ml do filtrado foram diluídos com água para 25 ml em balão volumétrico. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 N) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorbância a 691 nm, empregando-se a água como branco. Foram realizadas cinco determinações.

A porcentagem de taninos totais foi calculada segundo as expressões:

$$PT = \frac{15625 \times Abs}{1000 \times m} \qquad PNA = \frac{15625 \times Abs}{1000 \times m}$$

$$TT = PT - PNA$$

Em que:

PT	= Polifenóis Totais (%)
PNA	= Polifenóis não Adsorventes (%)
Abs	= Absorbância
M	= massa da amostra utilizada no ensaio, em gramas, considerando a determinação de água.
TT	= Teor de Taninos Totais (%).

#### 4.4.5 Análise granulométrica (HELMAN, 1982)

Empregou-se a técnica da granulometria por tamisação. Determinou-se com dois tamises, de 2,000 e 0,149 mm e coletor, escolheu-se mais quatro tamises intermediários, com abertura de malha de 0,840; 0,420; 0,250 e 0,177, segundo a DIN 4188, tarando-os individualmente.

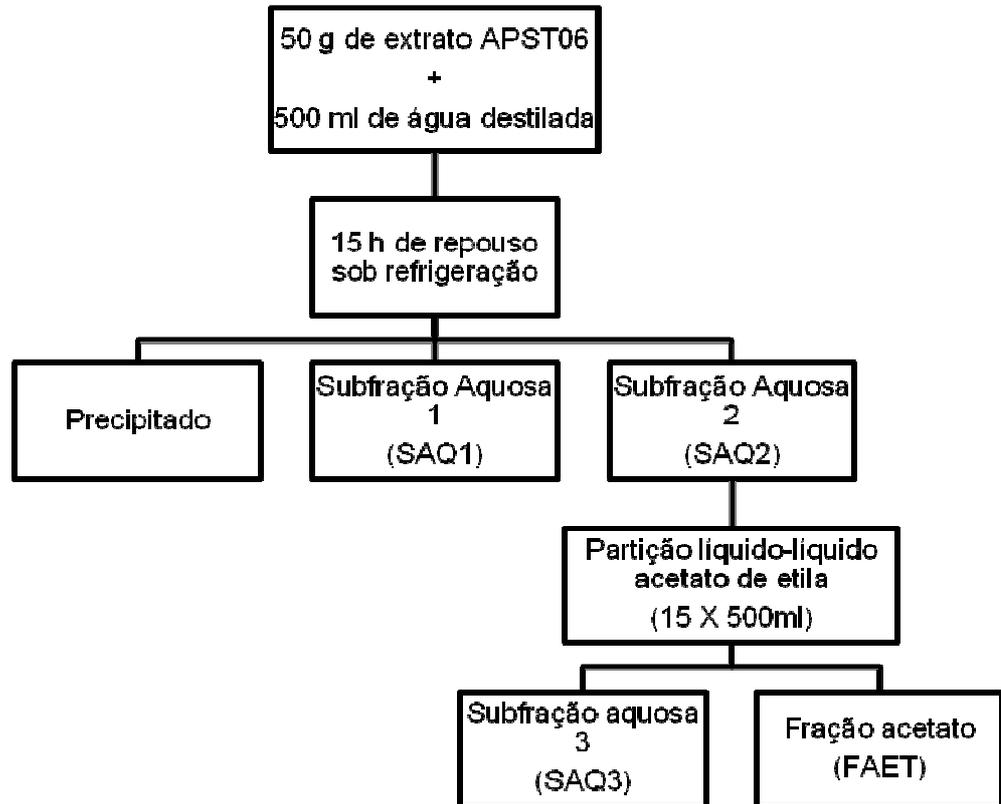
Pesaram-se 50,04 g do vegetal moído. Tamisou-se o conjunto durante 25 min a 70 vibrações por min, utilizando-se tamisador vibratório. Após a tamisação, procedeu-se à pesagem, determinando-se a quantidade de material retido em cada peneira. O resultado é fornecido sob forma tabelar, apresentando-se classe granulométrica (CG; mm); intervalo de abertura de malha ( $\Delta m$ ; mm); dimensão granulométrica média ( $\bar{m}$ ; mm); fração retida percentual (F; %); fração resíduo percentual (R; %) e fração passagem percentual (P; %).

#### 4.4.6 Preparação de extrato bruto (APST06)

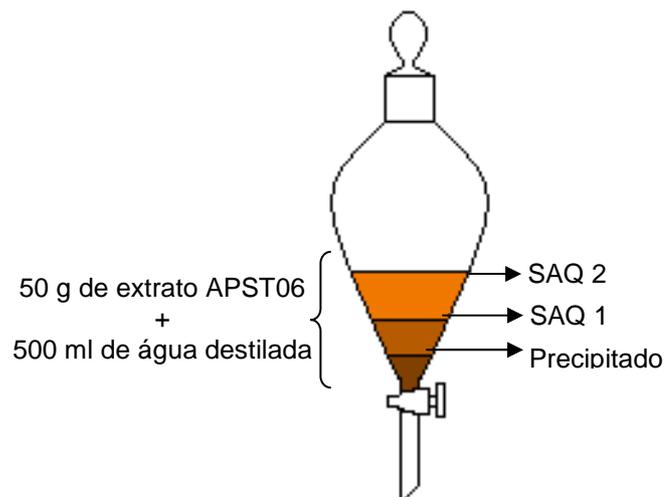
Cerca de 800 g da droga vegetal moída foi deixada em maceração com uma solução hidroetanólica por 14 h. Após esse período, o extrato foi deixado em maceração (com agitação) por 12 h e deixado novamente em repouso por mais 12 h. Após este período, a droga vegetal foi levada à turbólise, em Ultra-turrax, por 20 min. Após a extração, foi filtrado sob pressão reduzida e lavado até esgotamento, sendo então concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida até eliminação completa do solvente orgânico, congelado e liofilizado. O extrato seco obtido foi pesado, homogeneizado, armazenado em potes plásticos e guardados em freezer (-20 °C). O valor do rendimento do extrato foi utilizado para o cálculo da quantidade de extrato a ser utilizado no doseamento de polifenóis e taninos totais.

#### 4.4.7 Preparação de extratos semipurificados

A metodologia para a preparação de extratos semipurificados foi adaptada de Mello et al. (1996). O extrato bruto (50 g) foi disperso em 500 ml de água destilada, colocado em funil de separação e deixado em repouso, sob refrigeração, por 15 h. Após o período de repouso, observou-se a formação de 3 fases, sendo que a inferior foi retirada do funil e denominada precipitado (figura 3). A fase imediatamente superior ao precipitado (denominada fase intermediária) foi separada e denominada subfração aquosa 1 (SAQ1), a qual foi liofilizada. A fase superior à SAQ1 foi considerada a subfração aquosa 2 (SAQ2). Esta, por sua vez, foi submetida a extrações líquido-líquido por 15 vezes com 500 ml de acetato de etila. As frações acetato de etila (FAET) foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, congeladas e liofilizadas. A subfração aquosa restante SAQ3 foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, congelada e liofilizada. Todos os extratos secos das frações foram homogeneizados e armazenados em recipientes apropriados em freezer (-20 °C). Este processo pode ser observado no fluxograma 2.



**Fluxuograma 2** - Preparação de extratos semipurificados a partir do extrato APST06, utilizados na avaliação das atividades biológicas de *S. terebinthifolius*.



**Figura 3:** Representação do extrato obtido após 15 h de repouso sob refrigeração (item 4.4.7).

#### 4.4.8 Determinação do teor de taninos totais do extrato APST06

Cerca de 0,240 g de APST06 foram exatamente pesados e transferidos para um balão volumétrico de 250 ml, completando-se o volume com água. Cerca de 80 ml do extrato foi filtrado, desprezando-se os primeiros 20 ml. O filtrado obtido foi denominado Solução-Mãe (SM).

Seguiu-se a metodologia 4.4.3. Foram realizadas cinco determinações.

### 4.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 4.5.1 Avaliação da capacidade antioxidante pelo método com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (AMAROWICZ et al., 2004)

Foram preparados diluições do extrato CFST06 nas concentrações 0,16-20,0 µg/ml em metanol. Solução metanólica de DPPH (1 mM, 0,5 ml) foi adicionada à amostra (4 ml) nas diferentes concentrações, e a reação ocorreu à temperatura ambiente por 30 min. Solução de 0,5 ml de DPPH em 4 ml de metanol foi usada como controle e outra solução de 2 mg de BHT em 4 ml de metanol com 0,5 ml de solução de DPPH foi utilizada como branco. Os valores da absorvância foram medidos a 517 nm e convertidos em porcentagem de atividade antioxidante ou porcentagem de DPPH consumido (AA%), utilizando-se a seguinte expressão:

$$AA\% = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}\}$$

Em que:

Abs= absorvância

## 4.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

### 4.5.2.1 Microrganismos empregados e condições de crescimento

Os microrganismos utilizados para os ensaios foram leveduras *Candida albicans* ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, cultivadas em caldo Saboraud Dextrose (CSO) (Difco) a 37 °C e mantidas em Ágar Saboraud Dextrose (ASD) (Difco) a 4 °C. A título de comparação também foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cultivados em caldo Mueller Hinton (CMH) (Difco) a 37 °C e mantidas em Ágar Mueller Hinton (AMH) (Difco) a 4 °C. Antes de cada experimento, os microrganismos foram cultivados em meio líquido a 37 °C, durante 48 h para leveduras e 24 h para bactérias. Para os testes de susceptibilidade antimicrobianos, os microrganismos foram padronizados em tubos contendo salina 0,9% estéril, nos quais volumes suficientes de cada cultura foram adicionadas até que a turvação ficasse idêntica aquela comparada à metade do tubo 1 da escala de McFarland (suspensão de BaSO<sub>4</sub> que corresponde a 1-5x10<sup>6</sup> UFC/ml para leveduras e 1x10<sup>8</sup> UFC/ml para bactérias).

### 4.5.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) das amostras, extratos APST06 e CFST06 e frações FAET e SAQ3, foram determinadas segundo procedimentos de referência (CLSI (NCCLS), 2002, 2006), através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando meio Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, pH 7,0, tamponado com 0,165 M de tampão ácido-3-[N-morfolino] propanossulfônico (MPOS) (Sigma-Aldrich) e CMH. Os ensaios com leveduras e bactérias foram realizados em placas de 96 poços, nos quais foram adicionados 100 µl de meio RPMI para leveduras e CMH para bactérias, em cada poço, seguida da adição de 100 µl dos extratos e frações a 2000 µg ml<sup>-1</sup> no primeiro poço, prosseguindo com diluição seriada, homogeneizando e transferindo 100 µl para o poço seguinte e, assim, sucessivamente até o último poço.

As suspensões microbianas padronizadas em solução salina 0,9% de acordo com a turbidez da escala de McFarland foram diluídas nos meios de cultura RPMI e CMH, para leveduras e bactérias, respectivamente, e 5 µl deste foram adicionadas a cada poço,

resultando em inóculo na ordem de 0,5 e  $2,5 \times 10^3$  UFC/ml para leveduras e  $1 \times 10^4$  UFC/ml para as bactérias.

As placas de 96 poços foram incubadas a 37 °C durante 48 h para leveduras e 24 h para bactérias. A CIM é definida como menor concentração de um agente suficiente para inibir o crescimento visível do microrganismo empregado no teste de sensibilidade. As concentrações fungicidas e bactericidas mínimas (CFM e CBM) foram determinadas pelo subcultivo de 10 µl da cultura de cada poço negativo e de um controle positivo.

Foram testados os extratos APST06 e CFST06, as frações acetato de etila (FAET) e aquosa (SAQ3) obtidas da partição líquido-líquido do extrato APST06 (item 4.4.7). Os testes foram realizados no laboratório de microbiologia da UEM, frente aos seguintes microrganismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*.

#### 4.6 DESENVOLVIMENTO DE GEL CONTENDO EXTRATO DE *Schinus terebinthifolius* PARA APLICAÇÃO VAGINAL

##### 4.6.1 Extrato seco *S. terebinthifolius*

O extrato seco de *Schinus terebinthifolius* (CFST06) foi produzido pela Anidro Extrações do Brasil (Botucatu – SP) e cedido pela Apsen Farmacêutica (São Paulo). O material recebido foi analisado quantitativamente em relação ao teor de taninos e polifenóis totais.

Foram pesados exatamente cerca de 0,240 g do extrato seco (CFST06) e transferidos para um balão volumétrico de 250 ml, completando-se o volume com água. Cerca de 80 ml do extrato foram filtrados, desprezando-se os primeiros 20 ml. O filtrado obtido foi denominado Solução-Mãe (SM).

Seguiu-se a metodologia 4.4.4 para determinação de teor de taninos totais. Foram realizadas cinco determinações.

#### 4.6.2 Forma farmacêutica

A incorporação do extrato seco (2,5%) de *Schinus terebinthifolius*, foi feita em gel de Carbopol 940<sup>®</sup>.

##### 4.6.2.1 Preparação da base Gel Carbopol 940<sup>®</sup> a 1% (BGC1)

Cerca de um grama de carbopol 940<sup>®</sup> foi disperso sob leve aquecimento em água destilada e agitação até completa dispersão. Ao gel foi adicionada q.s. de carbonato de sódio para ajuste da consistência e pH.

A formulação final está descrita a seguir:

Carbopol 940 <sup>®</sup>	1,0 %
Metilparabeno	0,2%
Carbonato de sódio	q.s.
Álcool de Cereais	q.s.
Água Destilada q.s.p.	100g

##### 4.6.2.2 Incorporação do extrato CFST06 ao gel BGC1

A incorporação do extrato foi determinada de acordo com o teor de polifenóis totais obtidos através do resultado do doseamento de taninos totais do extrato CFST06 (item 4.6.1), sendo o extrato CFST06 incorporado à base gel Carbopol BGC1 na proporção de 2,5% (p/p).

O extrato CFST06 foi disperso sobre a base gel BGC1 e este agitado vigorosamente até total incorporação. O gel obtido foi denominado gel Aroeira 2,5% (GAR2.5).

#### 4.6.3 Técnica de extração de polifenóis do gel GAR2.5

Cerca de 0,5 g de GAR2.5 foram exatamente pesados em tubos Eppendorf (capacidade de 2,0 ml) e submetidos a agitação em mini agitador, por 6 vezes durante 5 min e 2200 rpm cada, com 1,3 ml de metanol nas 4 primeiras extrações. Após, foram realizadas duas extrações adicionando-se 0,2 ml de acetato de etila. Após cada extração, as amostras foram levadas em centrífuga, sob refrigeração (15 °C) por 15 min a 1000 rpm. O sobrenadante de cada extração, foi recolhido em frascos previamente tarados e, ao término das 6 extrações levados a resíduo, sendo novamente pesados para obtenção do peso do resíduo.

#### 4.6.4 Técnica modificada para determinação de polifenóis totais de gel GAR2.5

Os resíduos obtidos na extração do GAR2.5 (item 4.6.3) foram diluídos em água destilada e transferidos para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com água destilada. Um mililitro desta solução foi transferido com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (reagente Fenólico de Folin Ciocalteau 2M) e 11 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorbância à 691 nm. Como branco foi empregado o resíduo da base diluída em água em um balão volumétrico de 25 ml, sendo o volume completado com água.

A porcentagem de polifenóis totais foi calculada pela expressão:

$$PT = \frac{625.Abs}{1000.m}$$

Em que:

PT = Polifenóis totais (%)

Abs = Absorbância medida

m = massa do gel

#### 4.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS EM EXTRATO SECO DE *Schinus terebinthifolius* (CFST06).

Conforme a Resolução RE nº. 899, de 29 de maio de 2003/ANVISA: “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (BRASIL, 2003), foi realizada a validação do método analítico por espectrofotometria UV-VIS para a determinação do teor de polifenóis totais em extrato seco CFST06.

O espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS PC-1650 foi utilizado em todas as análises no ultravioleta-visível, empregando-se como substância referência o ácido gálico padrão Sigma.

##### 4.7.1 Preparo da amostra

Foram pesados cinco diferentes massas de CFST06: 0,140; 0,190; 0,240; 0,290 e 0,340 g, cada uma destas massas foram transferidas para balão volumétrico de 250 ml, completando-se o volume com água. Estas soluções foram chamadas de Solução-Mãe (SM). Para cada SM foi realizada a seguinte metodologia: cinco mililitros da SM foram transferidos para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com água. Dois mililitros dessa solução foram transferidos para um balão volumétrico de 25 ml, adicionando-se em seguida 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (reagente Fenólico de Folin-Ciocalteau 2 N) e 10 ml de água e completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução foi medida a absorbância à 691 nm, empregando-se a água como branco. A porcentagem de polifenóis totais foi calculada de acordo com a expressão descrita no item 4.4.4.

##### 4.7.2 Parâmetros analisados

Foram realizados os seguintes ensaios para a validação da amostra extrato seco CFST06 como segue: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequada à análise de acordo com a RE nº. 899/2003-ANVISA.

#### 4.7.2.1 Linearidade

Para esta análise foram utilizadas massas crescentes do extrato CFST06 (item 4.7.1), obtidas as respectivas absorbâncias e realizada a análise da equação da reta.

Segundo a RE nº 899/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser igual a 0,99, para que o método apresente linearidade dentro do intervalo de quantificação.

#### 4.7.2.2 Intervalo

O limite de quantificação foi estipulado a partir do estudo da linearidade, ou seja, pesaram-se massas decrescentes do extrato CFST06 (g): 0,640; 0,590; 0,540; 0,490; 0,440; 0,39; 0,340; 0,290; 0,240; 0,190; 0,140; 0,090; 0,040; 0,015; 0,010; 0,005; 0,002 e 0,001 g; e analisou-se a faixa de massa de CFST06 na qual se obtêm linearidade, exatidão e precisão.

#### 4.7.2.3 Precisão

A repetibilidade (precisão intra-corrída) foi analisada por meio de seis determinações seguidas com um mesmo analista, com a massa de 0,240 g de CFST06. O coeficiente de variação não deve ser superior a 5%.

#### 4.7.2.4 Limite de detecção

Este estudo foi realizado através de sucessivas diluições do extrato CFST06 até a menor concentração detectável, iniciando-se com a massa de 0,290 g. Esta concentração foi escolhida por estar dentro do limite de quantificação.

#### 4.7.2.5 Especificidade

A especificidade do método foi testada através do acréscimo de substância referência a cinco diferentes massas de extrato CFST06. Esta curva foi analisada e comparada com a curva de linearidade. Este mesmo procedimento foi utilizado para a análise de exatidão, portanto, o teste indica se o método é específico e exato.

Foram preparadas cinco soluções mães (SM) segundo item 4.7.1. Em cada SM foram acrescentados 80 mg da substância de referência ácido gálico.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS e obtidas as médias das absorvâncias para cada massa em triplicata.

#### 4.7.2.6 Exatidão

O estudo da exatidão foi realizado analisando-se o teste de recuperação, avaliando-se a curva de calibração obtida a partir do acréscimo de três massas diferentes de CFST06 à massa inicial, 0,240 g de CFST06, sendo:

- concentração baixa = 0,240 g de CFST06 + 5% de massa de CFST06.
- concentração média = 0,240 g de CFST06 + 10% de massa de CFST06.
- concentração alta = 0,240 g de CFST06 + 20% de massa de CFST06.

#### 4.7.2.7 Robustez

Para se determinar a robustez do método analisou-se a influência da alteração do tempo de leitura e do comprimento de onda de leitura das amostras de extrato CFST06 (SM 0,240 g de CFST06).

##### 4.7.2.7.1 *Tempo de Leitura*

A SM com massa de 0,240 g de extrato CFST06, foi submetida à análise em três diferentes tempos de leitura avaliando-se o teor em polifenóis totais da amostra em 691 nm.

Foram realizadas seis leituras no tempo de 15 min, sendo este o tempo normal a contar da pipetagem da solução de carbonato de sódio 14,06% (m/v) até a leitura da amostra. E mais seis leituras nos tempos de 30 e 45 min, ou seja 15 e 30 minutos além do tempo estipulado na técnica, respectivamente.

#### 4.7.2.7.2 Comprimento de onda

A SM com massa de 0,240 g foi submetido à análise em dois comprimentos de ondas diferentes avaliando-se o teor em polifenóis totais da amostra à 691 nm (comprimento de onda conforme a técnica) e 760 nm. Em cada comprimento de onda foram realizadas seis leituras.

### 4.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS EM GEL AROEIRA 2,5% (GAR2.5)

Conforme a Resolução RE nº. 899, de 29 de maio de 2003/ANVISA: “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, foi realizada a validação do método analítico por espectrofotometria UV-VIS para a determinação do teor de polifenóis totais em GAR2.5.

O espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS PC-1650 foi utilizado em todas as análises no ultravioleta-visível, empregando-se a substância referência ácido gálico padrão Sigma.

#### 4.8.1 Preparo da amostra

O gel GAR2.5 foi preparado de acordo com os itens 4.6.2.1 e 4.6.2.2.

#### **4.8.2 Técnica de extração de polifenóis do gel GAR2.5**

Cerca de 0,5 g de GAR2.5 foram exatamente pesadas em Eppendorf e submetidas a extração segundo metodologia descrita no item 4.6.3.

#### **4.8.3 Técnica modificada para determinação de polifenóis totais de gel GAR2.5**

Os resíduos obtidos na extração do GAR2.5 foram pesados e diluídos em água destilada. Seguiu-se o teste conforme metodologia descrita no item 4.6.4.

#### **4.8.4 Parâmetros analisados**

Foram realizados os seguintes ensaios para validação da amostra GAR2.5 como segue: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequada à análise de acordo com a RE nº. 899/2003-ANVISA (BRASIL, 2003).

##### **4.8.4.1 Linearidade**

Para esta análise foram utilizadas concentrações crescentes do extrato CFST06 no gel base Carbopol 940<sup>®</sup> (BGC1), obtidas as respectivas absorbâncias e realizada a análise da equação da reta. As concentrações utilizadas foram (%): 0,75; 1; 1,5; 2,5 e 2,75.

Segundo a RE nº. 899/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99, para que o método apresente linearidade dentro do intervalo de quantificação.

#### 4.8.4.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi calculado teoricamente a partir do estudo da linearidade, através da expressão:

$$LQ = \frac{DP \cdot 10}{IC}$$

Em que:

LQ = limite de quantificação.

DP = desvio padrão do intercepto.

IC = inclinação da curva de calibração.

#### 4.8.4.3 Precisão

A repetibilidade (precisão intra-corrída) foi analisada por meio de 2 determinações em dias alternados com um mesmo analista, em GAR2.5. O coeficiente de variação não deve ser superior a 5%.

#### 4.8.4.4 Limite de detecção

O limite de detecção foi calculado teoricamente a partir do estudo da linearidade, através da expressão:

$$LD = \frac{DP \cdot 3}{IC}$$

Em que:

LD = limite de detecção

DP = desvio padrão do intercepto.

IC = inclinação da curva de calibração

#### 4.8.4.5 Especificidade

A especificidade do método foi testada através do acréscimo de substância referência a cinco diferentes concentrações de extrato CFST06 ao gel BGC1. Esta curva foi analisada e comparada com a curva de linearidade. Este mesmo procedimento foi utilizado para a análise de exatidão, portanto, o teste indica se o método é específico e exato.

Foram adicionados 75 mg de substância referência ácido gálico a cada 100 g de gel BGC1. A esta base gel foi incorporado extrato CFST06 em concentrações crescentes (%): 0,75; 1; 1,5; 2,5 e 2,75. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS e obtidas as médias das absorbâncias para cada concentração em triplicata.

#### 4.8.4.6 Exatidão

O estudo da exatidão foi realizado analisando-se o teste de recuperação, avaliando-se a curva de calibração obtida a partir de concentrações diferentes de extrato CFST06 incorporadas ao gel BGC1, sendo:

- concentração baixa = gel BGC1 + 2,60% extrato CFST06
- concentração média = gel BGC1 + 2,65% extrato CFST06
- concentração alta = gel BGC1 + 2,70% extrato CFST06

#### 4.8.4.7 Robustez

##### 4.8.4.7.1 Comprimento de onda

Para se determinar a robustez do método analisou-se a influência da alteração do comprimento de onda de leitura das amostras de GAR2.5.

O gel foi submetido a análise em dois comprimentos de ondas diferentes avaliando-se o teor em polifenóis totais da amostra em: 691 nm (que é o comprimento de onda utilizado para leitura conforme a técnica) e 695 nm. Em cada comprimento de onda foram realizadas 9 leituras.

#### 4.9 ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE

O estudo de estabilidade preliminar foi realizado segundo Resolução nº1/2005 ANVISA (BRASIL, 2005). Foram analisados o teor de polifenóis totais das amostras de GAR2.5 acondicionadas em estufa Binder. As condições de análise foram 40 °C e 75% de umidade relativa. Os tempos analisados foram: tempo zero, 24 h, 7, 14, 21 e 30 dias. Para o acondicionamento de GAR2.5 e BGC1 foram utilizadas bisnagas revestidas internamente com alumínio. Para cada tempo foram acondicionadas cinco bisnagas, sendo quatro bisnagas de GAR2.5 e uma bisnaga contendo gel BGC1 (branco). A extração do gel e o doseamento do teor de polifenóis totais foi realizado segundo técnica descrita nos itens 4.6.3 e 4.6.4, respectivamente, com três bisnagas de GAR2.5.

Este pré-estudo de estabilidade, com duração de 30 dias, teve as amostras preparadas no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Estadual de Maringá e acondicionadas em estufa no Laboratório de Controle de Qualidade do LEPENC – UEM. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada segundo ANOVA.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foi utilizado o software Statistic 7.1 e os testes empregados foram teste *t* com intervalo de confiança de 95% e ANOVA.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONTROLE DE QUALIDADE DAS CASCAS DE *Schinus terebinthifolius*

Comumente entende-se a fitoterapia como uma medicina alternativa, porém, a fitoterapia trata-se de uma alternativa terapêutica e, assim, necessita de toda padronização necessária para assegurar a produção adequada do fitomedicamento de forma a atingir os resultados terapêuticos esperados. Sem um adequado controle de qualidade e de produção, tornam-se inviáveis tarefas farmacêuticas essenciais como garantia de reprodutibilidade dos lotes, conteúdo e concentração de princípios ativos ou ausência de contaminantes (YAMADA, 2006).

Portanto, para a obtenção de fitomedicamentos com qualidade, eficazes e seguros, além da pesquisa farmacológica, é necessário um longo processo de desenvolvimento com qualidade, que se inicia muito antes da entrega da matéria-prima à indústria. Para isso é necessário um adequado processo de cultivo, estabilização e processamento dessa matéria-prima. Afinal, a eficácia está ligada à sua composição química e, as plantas sofrem influência do meio e estes podem traduzir-se em alterações qualitativas e quantitativas dos seus constituintes químicos (MELLO, 1989).

Alguns parâmetros essenciais para a qualidade das matérias-primas vegetais podem variar, dependendo da procedência do material. As variações, principalmente na composição química e, em alguns casos, na pureza e mesmo nas características fenotípicas ressaltam a importância dos estudos de caracterização farmacognóstica, correlacionadas com a atividade farmacológica (LOPES, 2003).

Para o controle de qualidade de uma matéria-prima vegetal, diversos métodos químicos, físicos e físico-químicos tais como cromatografia em camada delgada, determinação da perda por dessecação e do teor de extrativos, quantificação do teor de substâncias ativas são utilizadas a fim de caracterizar e padronizar o material vegetal ou mesmo seus derivados extrativos.

No desenvolvimento de um fitomedicamento, somente um processo eficaz de produção e de controle de qualidade, aliado aos estudos farmacológicos, podem garantir um adequado emprego terapêutico, pois, apesar dos efeitos adversos dos fitomedicamentos serem relatados com menor frequência, eles existem e vêm sendo confirmados nos estudos clínicos controlados. Com isso, a padronização química e o conhecimento da constituição do fitocomplexo são importantes para diferenciar a ação farmacológica da potencial toxicidade (YAMADA, 2006).

Para realizar o controle de qualidade de *Schinus terebinthifolius*, foram utilizadas amostras de cascas de um lote obtido de fornecedores já denominados anteriormente. Estes testes foram preliminares e essenciais para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica contendo o extrato desta droga vegetal em estudo.

A realização de vários ensaios farmacopeicos e não farmacopeicos foram necessários para atingir os objetivos, como discutido a seguir.

A avaliação do teor de umidade presente nas cascas de *S. terebinthifolius* foi determinada pela perda por dessecação, que determina o teor de água presente na droga vegetal seca, e dependendo da umidade do ar o teor de água na planta pode variar, e dessa forma modificar os resultados de técnicas onde o peso da planta é importante. Além desse fator, esta análise é importante, pois a quantidade de água pode proporcionar a degradação dos constituintes químicos e/ou proliferação de microrganismos.

Assim, limites de água são descritos para drogas vegetais, especialmente para aquelas que facilmente absorvem água ou aquelas nas quais a deterioração é promovida pela presença de água em excesso, visto que este fato impede o armazenamento por tempo prolongado (CARDOSO, 2002).

O teor de umidade estabelecido nas diferentes farmacopeias varia entre 8 e 14% para a droga seca, com poucas exceções especificadas nas monografias (FARIAS, 2003). A Farmacopéia Brasileira 4ª edição determina o teor de umidade de, no máximo, 12% para a droga vegetal seca.

O resultado da perda por dessecação (item 4.4.1) para *S. terebinthifolius* expresso, em porcentagem está demonstrado na tabela 1. Observando-se estes dados pode-se afirmar que o resultado obtido encontra-se dentro dos parâmetros estabelecidos.

**Tabela 1** – Resultados, expressos em porcentagem, dos testes realizados para o controle de qualidade das cascas de *S. terebinthifolius*

Teste	Número de Replicatas	$\bar{x} \pm dp$ (CV%)
Perda por dessecação (%)	3	11,8±0,4 (3,5)
Teor de extrativos (%)	3	17,59±0,52 (2,95)
Teor de taninos totais (%)	3	11,01±0,13 (1,18)

$\bar{x}$  = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

A determinação do teor de extrativos de uma droga vegetal é parâmetro que permite estabelecer a capacidade de um determinado líquido extrator retirar substâncias presentes na mesma, sob condições específicas.

Na avaliação do teor de extrativos das cascas de *S. terebinthifolius* (item 4.4.2), o líquido extrator utilizado foi a água e o resultado obtido está expresso na tabela 1.

Para a determinação do teor de taninos totais (item 4.4.4) foram utilizadas as cascas secas e pulverizadas. O método utilizado foi o de Folin-Ciocalteu, que se baseia na associação dos taninos às proteínas, o que o torna mais específico, pois, trata-se de um método espectrofotométrico que determina a intensidade da coloração azul formada pela redução do ácido fosfotúngstico com compostos fenólicos. Os resultados estão expressos em porcentagem e demonstrados na tabela 1.

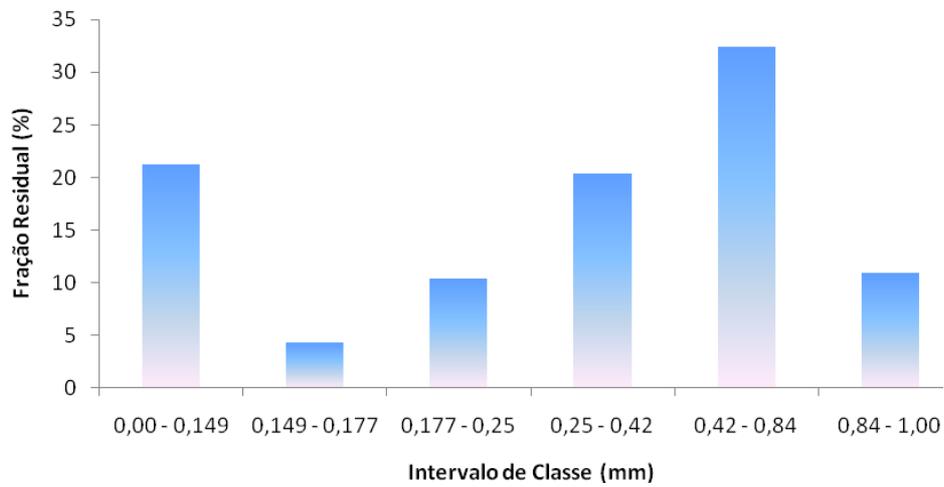
Kommission (1994) determinou um teor de taninos de 3% para o *Crataegus oxyacanta* L. (cratego) e de 10% para a ratânia (*Krameria triandra* Ruiz ET Pavon), uma droga vegetal clássica para taninos. Enquanto que para *Stryphnodendron obovatum* Benth. e *S. polyphyllum* Mart., Lopes et al. (2005) determinaram o teor de taninos em 19 e 12%, respectivamente.

Estudos com *Myracrodruon urundeuva* (aroeira do sertão) espécie da família Anacardiaceae, Monteiro et al. (2005b) reportaram o teor de taninos em 10,38%. Com base nestas informações, pode-se dizer que nas cascas de *S. terebinthifolius* encontra-se boa concentração de taninos. Isto está de acordo com AGUILAR-ORTIGOZA et al. (2003) que diz serem as anacardiáceas reconhecidas pela ampla distribuição de fenóis.

A análise granulométrica (item 4.4.5) é um fator importante no controle de qualidade de uma droga vegetal, sendo essencial na obtenção de um extrato, uma vez que uma maior ou menor extração está intimamente relacionada com a área de superfície e dimensão das partículas em contato com o líquido extrator (CARDOSO, 2002).

A figura 4, gráfico de distribuição granulométrica da droga rasurada, mostra que a maior porcentagem de partículas encontra-se numa faixa granulométrica que varia de 0,840 a 0,420 mm.

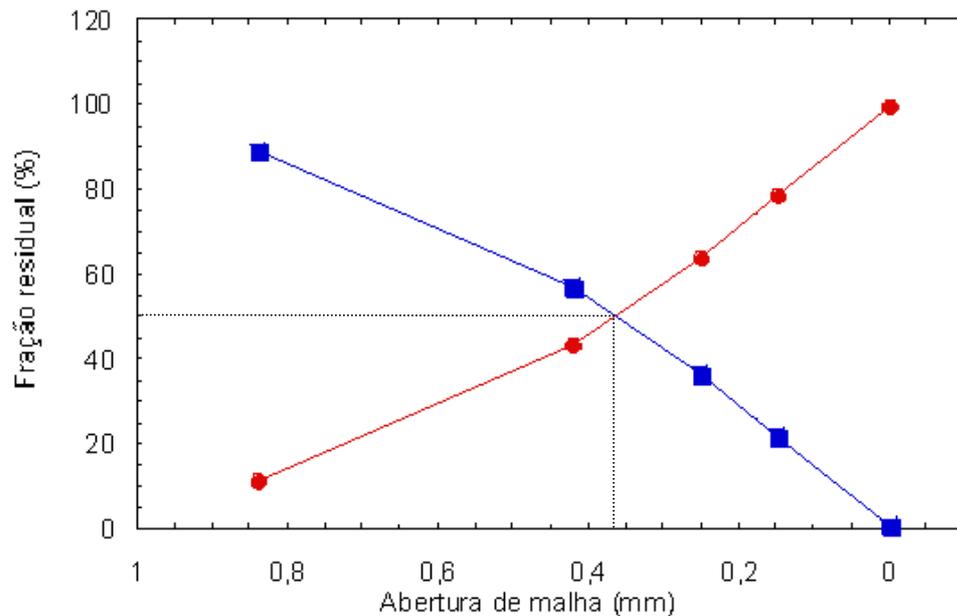
Empregando-se os dados fornecidos pela tabela 2, o diâmetro médio, calculado graficamente (figura 5), a partir do ponto de intersecção das retas foi de 0,36 mm.



**Figura 4** – Gráfico de distribuição granulométrica, sendo fração residual por intervalo de classes, das cascas moídas, em moinho de martelos, de *S. terebinthifolius*.

**Tabela 2** - Análise granulométrica por tamisação das cascas de *S. terebinthifolius*

Abertura de malha (M) (mm)	Classe granulométrica m min – m max (mm)	Abertura média (M) (mm)	Fração retida percentual F (%)	Fração resíduo percentual R (%)	Fração passagem percentual P (%)
0,840	0,84 – 1,00	0,920	10,93	10,93	89,07
0,42	0,42 – 0,84	0,630	32,41	43,34	56,66
0,250	0,25 – 0,42	0,335	20,42	63,76	36,24
0,177	0,177 – 0,25	0,213	10,39	74,15	25,85
0,149	0,149 – 0,177	0,163	4,28	78,43	21,57
Coletor	0,00 – 0,149	0,075	21,22	99,65	0,35



**Figura 5** – Curvas acumulativas de retenção e passagem após tamisação da matéria-prima vegetal *S. terebinthifolius*. (■ fração de passagem/ ● fração retida acumulada)

Na realização da determinação do resíduo seco, empregou-se a metodologia e os solventes descritos no item 4.4.3. Os resultados obtidos estão expressos, em porcentagem, na tabela 3.

**Tabela 3** – Resultados, em porcentagem, do resíduo seco em diferentes soluções extrativas de amostras de cascas de *S. terebinthifolius*.

Solvente (v/v)	n	$\bar{x} \pm dp$ (CV%)
Água	4	14,2±0,28 (1,9)
Acetona:água (7:3)	4	28,9±1,52 (5,2)
Etanol:água (1:9)	4	18,9±0,69 (3,6)
Metanol:água (1:1)	4	23,3±0,80 (3,4)

$\bar{x}$  = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Na determinação do resíduo seco, a mistura acetona:água (7:3, v/v), apresentou melhor rendimento (28,9%). Isto pode ser explicado pelo fato da acetona promover o bloqueio da associação tanino-proteína, tornando a extração quantitativamente maior (MELLO; SANTOS, 2003).

Nota-se uma diferença entre os valores de teor de extrativos e resíduo seco de *S. terebinthifolius*, explicada pelo procedimento no preparo das soluções extrativas em cada teste serem de forma independente.

O resultado deste teste pode ser mais um parâmetro de avaliação da qualidade da droga vegetal, por ser um resultado próprio da *S. terebinthifolius*. Mesmo não sendo possível uma comparação, podemos avaliar este resultado frente a resultados de outras espécies tais como: *Guazuma ulmifolia* Lam. 8,94% em resíduo seco (GALINA, 2002), *Centella asiatica* (L) Urban 3,14% (CONSOLARO et al., 1999) e *Baccharis trimera* (Less.) DC. 29,95% (MELLO; PETROVICK, 2000).

## 5.2 PREPARAÇÃO DE EXTRATO BRUTO

Após extração, a quantidade de extrato liofilizado obtida foi 257,48 g, apresentando um rendimento de 32,18%. Este resultado foi utilizado para cálculo da quantidade de extrato bruto utilizado no doseamento de polifenóis e taninos totais do extrato bruto.

O método extrativo de escolha foi turbo-extração, o qual se baseia na extração com simultânea redução do tamanho de partículas, devido às forças de cisalhamento. O processo favorece rápida dissolução das substâncias ativas tornando o método eficiente (VOIGT, 1993).

### 5.2.1 Determinação do teor de polifenóis e taninos totais do extrato CFST06

Baseando-se nos mesmos princípios utilizados na determinação de taninos totais da droga vegetal *S. terebinthifolius*, foi realizado o doseamento de taninos totais nos extratos secos CFST06 e APST06. A quantidade de extrato a ser utilizado nesta análise foi calculada a partir do rendimento obtido na extração da droga vegetal.

A massa empregada na determinação do teor em taninos totais do extrato seco para todas as amostras foi de 0,2413 g. Foram realizados o doseamento em taninos e polifenóis totais do extrato CFST06. Os resultados obtidos estão expressos, em porcentagem, na tabela 4.

**Tabela 4** – Resultados, em porcentagem, do teor de taninos e polifenóis totais dos extratos CFST06 e APST06.

	n	Taninos totais (%) $\bar{x} \pm dp$ (CV%)	Polifenóis totais (%) $\bar{x} \pm dp$ (CV%)
CFST06	5	32,0±0,26 (0,82)	34,98±0,29 (0,82)
APST06	4	40,37±0,46 (1,15)	44,06±0,55 (1,25)

$\bar{x}$  = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Comparando-se os valores em teor de taninos do extrato de *S. terebinthifolius* com o de extratos de *Stryphnodendron obovatum* Benth e *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., que apresentam teor de taninos de 36,58 e 25,43% (LOPES et al., 2005), respectivamente, o teor de taninos de 32% encontrado pode ser considerado alto. Já para teor de polifenóis totais, o valor de 34,98% de *S. terebinthifolius* está abaixo em relação ao teor de polifenóis totais de *S. obovatum* e *S. polyphyllum*, 76,95 e 51,62% (LOPES et al., 2005), respectivamente, porém pode ser considerado um bom resultado.

### 5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 5.3.1 Capacidade antioxidante

O estudo foi realizado de acordo com o ensaio do radical livre DPPH, que tem por base sua redução. Ao fixar um radical livre (H), removido do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorvância, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do radical livre DPPH (BROINIZI et al., 2007).

O restante do radical livre DPPH (que não foi reduzido; e que foi medido após determinado tempo) corresponde inversamente à atividade seqüestradora do radical exercida pelo antioxidante testado (KULISIC et al., 2004).

Os resultados médios obtidos de IC<sub>50</sub> ( $\bar{x} \pm dp$ ) ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) para a vitamina C foi de 7,48±1,24 (CV%=16,6) e do extrato CFST06 foi de 9,50±0,43 (CV%=4,55).

Segundo a análise estatística realizada, conclui-se que a diferença não é significativa. Isto representa que o extrato CFST06 possui capacidade antioxidante comparativamente à vitamina C.

O método é realizado à temperatura ambiente para que se elimine o risco de degradação térmica das moléculas testadas (BONDET et al., 1997).

De acordo com estudos realizados, a atividade de seqüestro de radicais livres de compostos fenólicos é amplamente influenciada pelo número de hidroxilas presentes nos anéis aromáticos (PELLATI et al., 2004).

### 5.3.2 Atividade antimicrobiana

Foram realizadas análises microbiológicas dos extratos seco 1 (APST06) e extrato seco 2 (CFST06) e também das frações acetato de etila (FAET) e aquosa (SAQ3), frente aos seguintes microrganismos: *Candida albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e os resultados podem ser observados na tabela 5.

Para a análise dos resultados, segundo Holetz et al. (2002), a atividade antimicrobiana é considerada boa para CIM < 100 µg ml<sup>-1</sup>; moderada para CIM entre 100 e 500 µg ml<sup>-1</sup>; fraca para CIM entre 500 e 1000 µg ml<sup>-1</sup> e inativo se CIM > 1000 µg ml<sup>-1</sup>. Porém, tratando-se de uma droga vegetal, alguns trabalhos consideram com boa atividade, extratos brutos com um MIC < 1000 µg ml<sup>-1</sup>, para frações o MIC < 100 µg ml<sup>-1</sup> e para substâncias puras o MIC < 25 µg ml<sup>-1</sup>. Considerando estes dados, pode-se dizer que os extratos e as frações de *S. terebinthifolius* são inativos frente às bactérias testadas: *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*. Porém, frente à *S. aureus*, os extratos e a fração aquosa apresentaram uma discreta atividade antimicrobiana, já a fração acetato de etila, frente ao mesmo microrganismo é considerável.

**Tabela 5** - Resultados da análise microbiológica dos extratos e frações de *S. terebinthifolius*.

	Extrato APST06		Extrato CFST06		FAET		SAQ3	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E.coli</i>	>	>	>	>	>	>	>	>
<i>P. aeruginosa</i>	>	>	>	>	>	>	>	>
<i>B. subtilis</i>	>	>	>	>	>	>	>	>
<i>S.aureus</i>	500	>	500	>	125	500	500	>
<i>C. albicans</i>	31,2	>	31,2	>	31,2	>	31,2	>
<i>C. parapsilosis</i>	31,2	>	31,2	>	15,6	>	31,2	>

> concentração maior que 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Estes resultados estão de acordo com Lima et al. (2006), que demonstraram uma alta atividade antibacteriana das frações acetato de etila e clorofórmica das cascas de *S. terebinthifolius* contra cepas resistentes de *S. aureus*, sendo este estudo analisado de acordo com o tempo de crescimento bacteriano que, neste caso não foi detectado após 24 h de incubação.

Os resultados obtidos para o extrato bruto e as frações acetato de etila e aquosa de *S. terebinthifolius* frente a *E. coli* e *P. aeruginosa*, são comparáveis aos resultados obtidos por Lopes (2003) com *Stryphnodendron polyphyllum* que não demonstrou atividade antimicrobiana. Frente ao *B. subtilis*, *S. terebinthifolius* não apresentou atividade, enquanto a *S. polyphyllum* apresentou uma atividade considerada moderada.

Em se tratando de *S. aureus*, a fração acetato de etila de *S. terebinthifolius* apresentou atividade assim como a mesma fração de *S. polyphyllum* (LOPES, 2003).

Frente às leveduras *C. albicans* e *C. parapsilosis*, todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que a fração acetato de etila foi a que apresentou melhor resultado (MIC 15,6  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

Diante destes resultados, pode-se dizer que extratos das cascas de *S. terebinthifolius* possuem uma boa atividade antifúngica, o que explica o seu uso popular nas infecções vaginais.

Outras partes de *S. terebinthifolius* têm sido estudadas no que se refere à atividade antimicrobiana, Johann et al. (2008), relataram que a fração acetato de etila das folhas possui uma potente atividade (MIC 7,8  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) contra *C. albicans* isoladas da cavidade oral de pacientes.

#### 5.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS EM EXTRATO SECO DE *Schinus terebinthifolius* Raddi (CFST06).

##### 5.4.1 Linearidade

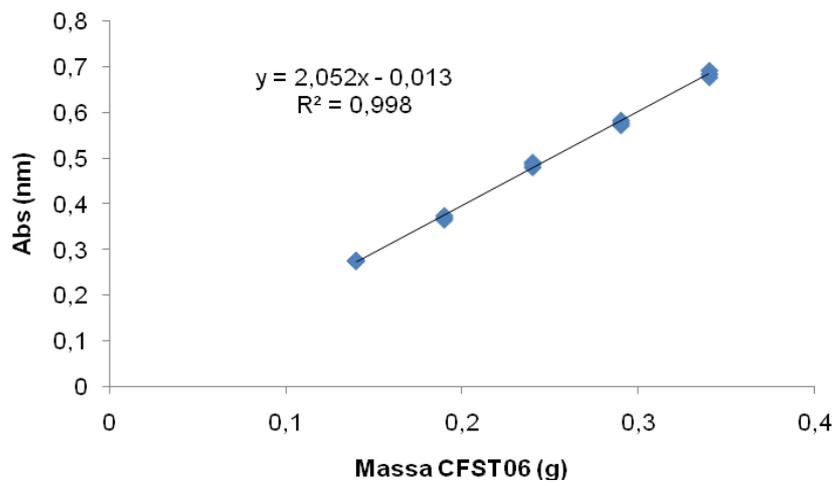
É a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (RE nº. 899, 2003).

Para esta análise foi realizada a metodologia descrita no item 4.7.2.1. As massas do extrato CFST06 utilizadas, suas respectivas absorbâncias e teores em polifenóis totais estão descritos na tabela 6 e figura 6.

**Tabela 6** – Teores de polifenóis calculados, em porcentagem, através da média da absorbância medida de diferentes massas do extrato CFST06 utilizadas para obtenção da curva de calibração.

	<b>Massa (g) CFST06</b>	<b>n</b>	<b>Absorbância (nm) (<math>\bar{x}</math>)</b>	<b>Polifenóis totais (%) <math>\bar{x} \pm dp</math> (CV%)</b>
1	0,140	3	0,276	30,84 $\pm$ 0,13 (0,42)
2	0,190	3	0,370	30,45 $\pm$ 0,37 (1,21)
3	0,240	3	0,486	31,29 $\pm$ 0,41 (1,33)
4	0,290	3	0,578	31,16 $\pm$ 0,29 (0,95)
5	0,340	3	0,685	31,49 $\pm$ 0,34 (1,09)

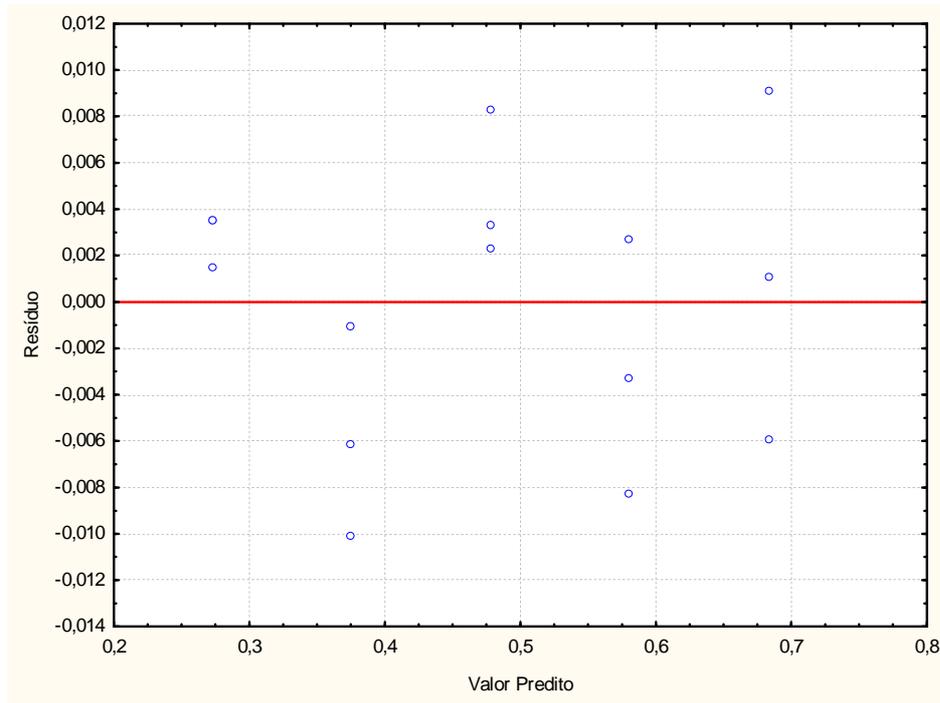
$\bar{x}$  = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação



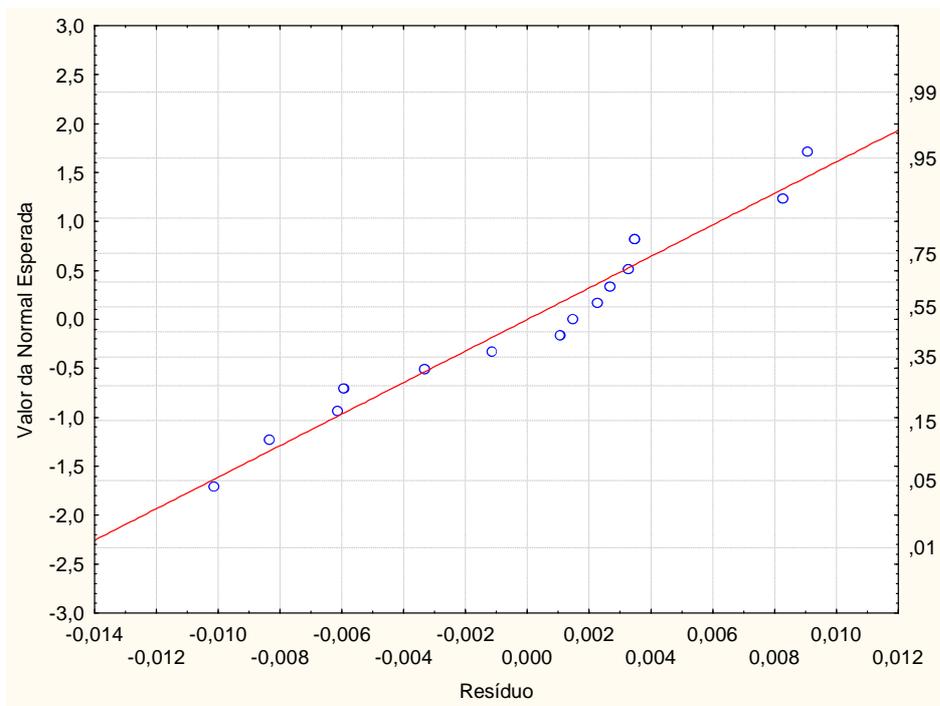
**Figura 6** – Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,998, obtida pela relação de cinco diferentes massas de CFST06 e a média de suas absorvâncias.

Segundo a RE nº. 889/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r^2$ ) deve ser igual a 0,99. No entanto, apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração. Modelos de calibração com altos resíduos no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependente e independente. Para evitar problemas de falta de ajuste durante a modelagem, faz-se necessária a análise cuidadosa do gráfico dos resíduos do sinal analítico e a aplicação de testes para determinar a faixa na qual a curva de calibração apresenta um comportamento linear (RIBEIRO et al., 2008).

Na determinação da melhor faixa de aplicação, foram utilizadas análises estatísticas, item 4.10. Baseando-se nas análises dos resultados obtidos, onde se observa que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno da média zero (figuras 7) e que os pontos caem próximos da reta, o que mostra a amostra seguindo uma distribuição normal (figura 8), pode-se dizer que há linearidade do método.



**Figura 7** – Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de linearidade das amostras de CFST06.



**Figura 8** – Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de linearidade das amostras de CFST06.

### 5.4.2 Intervalo

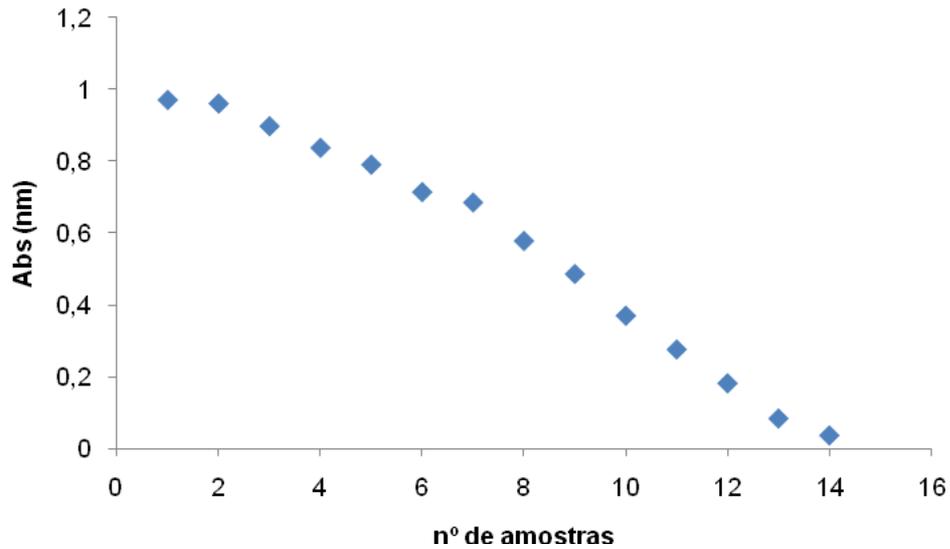
O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico (RE nº. 889/2003).

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas (RE nº. 889/2003).

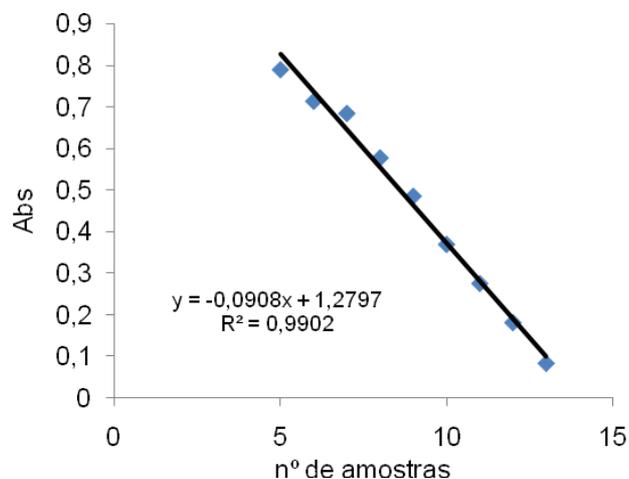
O limite de quantificação foi estipulado a partir do estudo da linearidade, ou seja, pesaram-se massas decrescentes da amostra CFST06 (tabela 7) e analisou-se a faixa de concentração na qual se obtêm linearidade, exatidão e precisão. Os resultados estão apresentados na figura 9.

**Tabela 7** - Teores de polifenóis calculados, em porcentagem, através da absorbância medida de diferentes massas do extrato CFST06 utilizadas na determinação do intervalo de quantificação.

	<b>Massas de CFST06 (g)</b>	<b>n</b>	<b>Abs (nm) (<math>\bar{x}</math>)</b>	<b>Polifenóis totais (%)</b>
1	0,640	3	0,970	23,69
2	0,590	3	0,960	25,42
3	0,540	3	0,897	25,96
4	0,490	3	0,837	26,71
5	0,440	3	0,790	28,05
6	0,390	3	0,714	28,60
7	0,340	3	0,685	31,49
8	0,290	3	0,578	31,16
9	0,240	3	0,486	31,68
10	0,190	3	0,370	30,45
11	0,140	3	0,276	30,84
12	0,090	3	0,182	31,65
13	0,040	3	0,084	33,07
14	0,015	3	0,037	38,88



**Figura 9** – Representação gráfica, em escala decrescente, da média das absorvâncias de diferentes massas de CFST06 utilizadas na determinação do intervalo de quantificação.



**Figura 10** – Representação da curva de calibração, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,9902, dos pontos que formam o intervalo do limite de quantificação.

De acordo com as figuras 9 e 10, pode-se dizer que o intervalo de quantificação para CFST06, que apresenta linearidade, exatidão e precisão, encontra-se entre 0,040 e 0,440 g de massa de CFST06. Acima deste limite o método se mantém exato, porém, de acordo com a lei de Lambert-Beer, a partir de certa concentração deixa de haver proporcionalidade entre a concentração e a absorvância.

Assim, o limite de quantificação estipulado foi 0,040 g, ou seja, este valor é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão.

### 5.4.3 Precisão

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostragens múltipla de uma mesma amostra (RE nº. 899, 2003). Usualmente, é expressa como o desvio padrão, variância ou coeficiente de variação de diversas medidas.

#### 5.4.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade expressa a precisão nas mesmas condições de operação. É a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (RE nº. 899, 2003).

O teste foi realizado segundo metodologia descrito no item 4.7.2.3. foram utilizadas 6 soluções mães com concentração  $0,240 \text{ g ml}^{-1}$  de CFST06. As absorvâncias (nm) e os teores em polifenóis (%) estão apresentados na tabela 8. A média obtida foi de 29,80% em polifenóis totais, com um coeficiente de variação (CV) igual a 1,78% e desvio padrão de 0,532.

**Tabela 8** – Teores de polifenóis totais calculados a partir das absorvâncias de 6 soluções mães  $0,240 \text{ g ml}^{-1}$  de CFST06.

	<b>Absorbância (nm)</b>	<b>Polifenóis Totais (%)</b>
1	0,448	29,058
2	0,453	29,517
3	0,467	30,518
4	0,464	30,095
5	0,464	30,120
6	0,465	29,515

De acordo com a RE nº. 899, de 23 de maio de 2003, os valores encontrados para o coeficiente de variação não devem ser superiores a 5%. Portanto, pode-se afirmar que o método apresenta repetibilidade.

A análise estatística comprovou que não há diferença entre os dias.

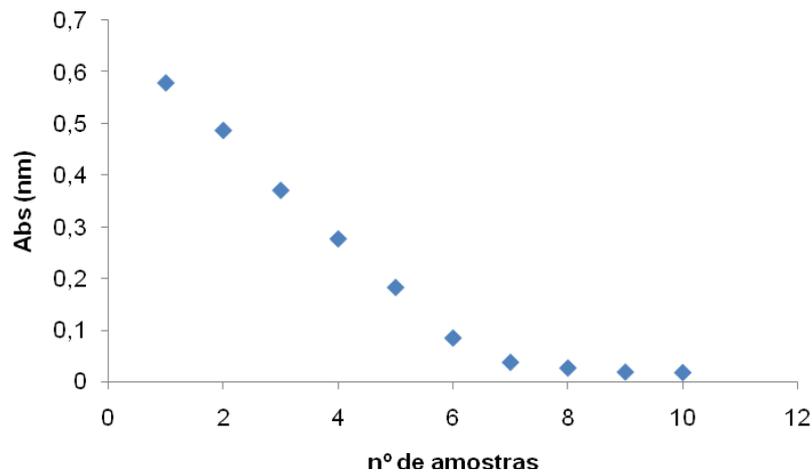
#### 5.4.4 Limite de detecção

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob condições experimentais estabelecidas (RE nº. 899, 2003).

Este estudo foi realizado segundo metodologia descrita no item 4.7.2.4. Os dados estão apresentados na tabela 9 e representados na figura 11.

**Tabela 9** – Teores de polifenóis calculados, em porcentagem, através da absorbância medida de diferentes massas do extrato CFST06 utilizadas na determinação do limite de detecção.

	<b>Massa de CFST06 (g)</b>	<b>n</b>	<b>Abs (nm) (<math>\bar{x}</math>)</b>	<b>Polifenóis totais (%)</b>
1	0,290	3	0,578	31,16
2	0,240	3	0,486	30,59
3	0,190	3	0,370	30,45
4	0,140	3	0,276	30,84
5	0,090	3	0,182	31,65
6	0,040	3	0,084	33,07
7	0,015	3	0,037	38,88
8	0,010	3	0,026	40,625
9	0,005	3	0,018	58,33
10	0,002	3	0,017	106,25



**Figura 11** – Representação gráfica, em escala decrescente, da média das absorvâncias de diferentes massas de CFST06 utilizadas para a determinação do limite de detecção.

De acordo com a figura 11, pode-se determinar que o limite de detecção do método é atingido quando se utiliza 0,015 g (ponto 7; tabela 10) de massa inicial de CFST06. Abaixo desta concentração obteve-se uma leitura de absorvância muito baixa que pode ser apenas oscilação do equipamento.

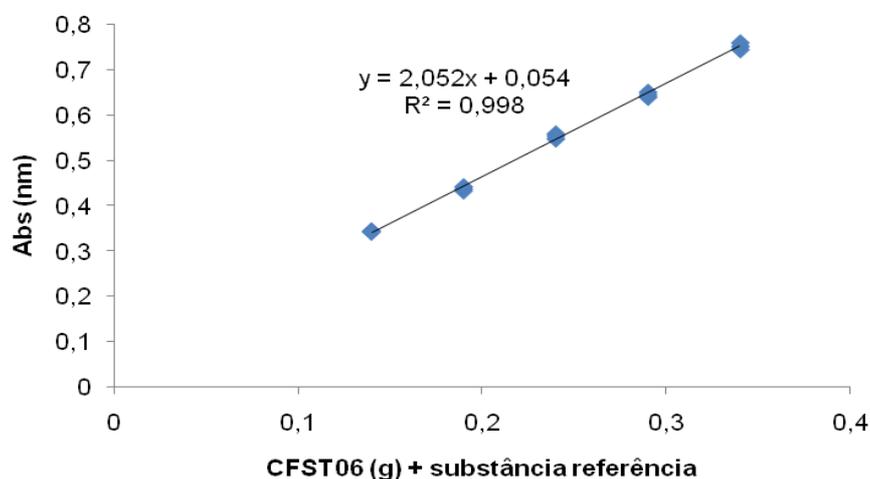
#### 5.4.5 Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (RE nº. 899/ 2003).

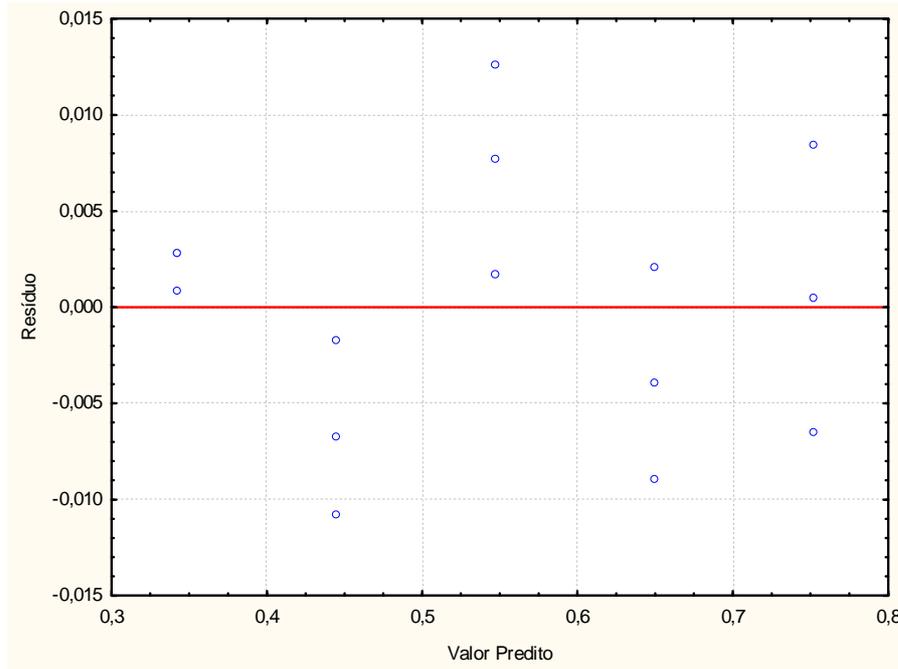
Foi realizada a leitura de cada solução-mãe (item 4.7.2.5) em triplicata e as médias das absorvâncias estão apresentadas na tabela 10 e representadas na figura 12.

**Tabela 10** – Teores de polifenóis calculados, em porcentagem, através da média da absorbância medida de diferentes massas do extrato CFST06 acrescidas de substância referência, ácido gálico (80 mg), utilizadas para obtenção da curva de calibração.

	<b>Massa (g) CFST06 + 80 mg de substância referência</b>	<b>n</b>	<b>Absorbância (nm) (<math>\bar{x}</math>)</b>	<b>Polifenóis totais (%) <math>\bar{x} \pm dp</math> (CV%)</b>
1	0,140	3	0,344	38,43±0,13 (0,33)
2	0,190	3	0,438	36,04±0,37 (1,03)
3	0,240	3	0,554	36,11±0,35 (0,99)
4	0,290	3	0,646	34,82±0,29 (0,85)
5	0,340	3	0,753	34,62±0,35 (0,99)

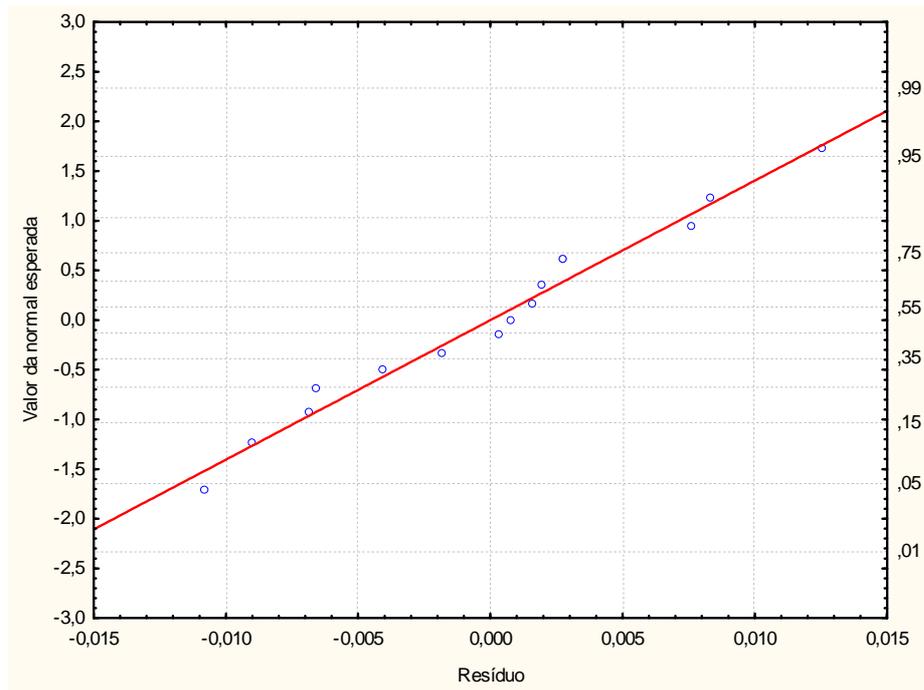


**Figura 12** – Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,998, obtida pela relação de cinco diferentes massas (g) de CFST06 + 80 mg de substância referência pela média de suas absorbâncias.



**Figura 13** – Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de linearidade das amostras de CFST06 + substância referência.

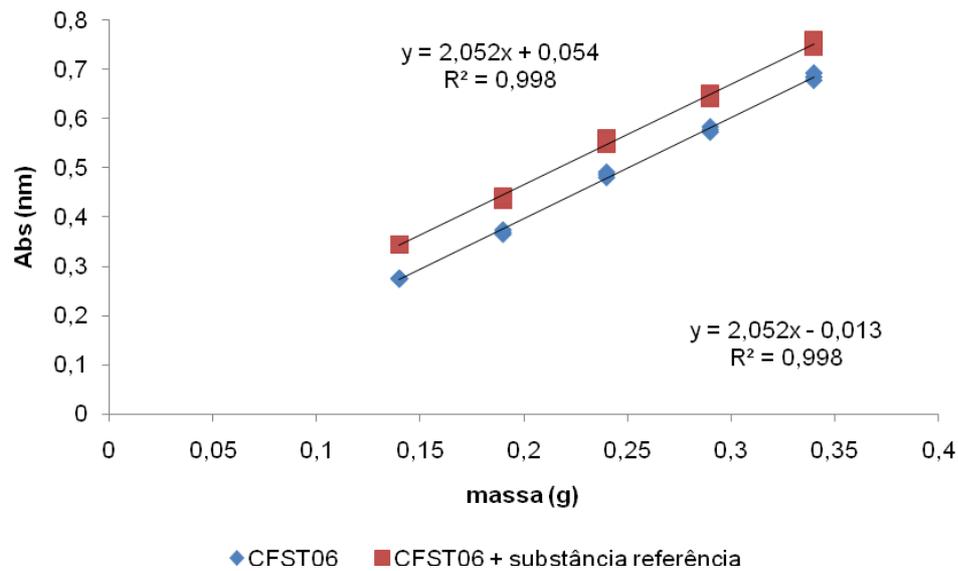
Para a comprovação da especificidade do método, é necessário que a curva analítica de CFST06 + substância referência, apresente linearidade. No entanto, conforme discutido no item 5.4.1, além do valor do coeficiente de correlação, são necessários testes estatísticos para a análise dos resíduos. A observação dos resultados obtidos nestes testes (figuras 13 e 14) confirma a linearidade da curva analítica. Na comparação com a curva de calibração entre CFST06 e CFST06 + substância referência (figura 15), pode-se observar que há especificidade do método.



**Figura 14** – Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de linearidade das amostras de CFST06 + substância referência.

**Tabela 11** – Comparação entre as absorvâncias de CFST06 e CFST06 + substância referência ácido gálico.

	<b>Massa (g) CFST06</b>	<b>Abs (nm)</b>	<b>Massa (g) CFST06 + 80 mg de substância referência</b>	<b>Abs (nm)</b>
1	0,140	0,276	0,140	0,344
2	0,190	0,370	0,190	0,438
3	0,240	0,484	0,240	0,554
4	0,290	0,578	0,290	0,646
5	0,340	0,685	0,340	0,753



**Figura 15** – Representação da comparação das curvas de linearidade, das massas de CFST06 e das massas de CFST06 + substância referência (80 mg) pela média de suas respectivas absorbâncias.

#### 5.4.6 Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (RE nº. 899/2003).

O estudo foi realizado segundo metodologia descrita no item 4.7.2.6. Sendo:

- 1 = concentração baixa.
- 2 = concentração média.
- 3 = concentração alta.

**Tabela 12** – Massas de CFST06 utilizadas na preparação das soluções-mãe para o teste de exatidão, suas respectivas absorbâncias e total de recuperação obtido.

	Massa (g) CFST06	Absorbância (nm)	Recuperação (%)
1	0,250	0,510	105,37
2	0,265	0,529	109,29
3	0,290	0,552	114,04

O índice de recuperação aceitável para matriz complexa pode variar entre 85 e 115% (BRASIL, 2003). Os resultados apresentados na tabela 12 demonstram que a recuperação obtida nas três concentrações utilizadas foi aceitável, assim pode-se dizer que há exatidão no método.

#### 5.4.7 Robustez

##### 5.4.7.1 Tempo de leitura

A tabela 13 apresenta os resultados obtidos pelo estudo realizado segundo metodologia descrita no item 4.7.2.7.1.

**Tabela 13** – Resultados do teor de polifenóis totais, em porcentagem, da solução-mãe, 0,240 g de CFST06, em três diferentes tempos de leitura.

	15 min	30 min	45 min
n	6	6	6
$\bar{x}$ (%)	31,15	31,48	31,61
dp	0,54	0,46	0,50
CV (%)	1,73	1,49	1,58

n = número de amostras;  $\bar{x}$  = média do teor de polifenóis totais; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Pela análise estatística dos resultados, observou-se que as médias são iguais, sendo assim, pode-se dizer que não há influência do tempo de leitura após adição da solução carbonato de sódio 14,06% no teor de polifenóis totais.

#### 5.4.7.2 Comprimento de onda

De acordo com a metodologia descrita no item 4.7.2.7.2, foram realizadas leituras em dois comprimentos de ondas diferentes: 760 e 691, este último referenciado na técnica. Em cada comprimento de onda foram realizadas seis leituras. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 14.

**Tabela 14** – Comparação do teor de polifenóis totais, em porcentagem, da solução-mãe, 0,240 g de CFST06, em dois comprimentos de onda diferentes.

	<b>691 nm</b>	<b>760 nm</b>
n	6	6
$\bar{x}$ (%)	31,15	34,72
dp	0,54	0,51
CV (%)	1,74	1,49

n = número de amostras;  $\bar{x}$  = média do teor de polifenóis totais; s = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Pela análise estatística dos resultados, observou-se que as médias são estatisticamente diferentes. Assim, pode-se dizer que há influência do tempo de leitura após adição da solução carbonato de sódio 14,06% no teor de polifenóis totais.

#### 5.5 DESENVOLVIMENTO DO GEL VAGINAL CONTENDO EXTRATO SECO DE *S. terebinthifolius* (BGC1)

Para a escolha da base na qual seria incorporado o extrato de *S. terebinthifolius* procedeu-se a um estudo preliminar empregando-se inicialmente um gel base de natrosol, por ser uma base não iônica e, teoricamente, com menor possibilidade de apresentar reações de incompatibilidade. Porém, observou-se, macroscopicamente, que havia nítida interação do extrato com a base, pois era evidente a presença de pequenos precipitados insolúveis. Na sequência, empregou-se uma base composta pelo gel de natrosol associado à uma base autoemulsiva, na tentativa de obtenção de uma base com aspecto sensorial mais atrativo e adequado à aplicação a que se destina esta formulação. O emprego da base

emulsiva teria, ainda, o papel de impedir a ocorrência dos precipitados formados na base de natrosol. Em relação ao aspecto macroscópico da formulação, observou-se que este se apresentava homogêneo, com sensorial agradável, porém com problemas na microextração necessária ao doseamento de polifenóis totais, o que poderia sugerir uma reação de incompatibilidade fármaco-excipiente. Em seguida, procedeu-se aos testes com Carbopol 940<sup>®</sup>. Com esta base, observou-se fácil incorporação do extrato, formulações com aspecto homogêneo e com sensorial agradável, o que pode ser explicado pelo caráter aniônico do carbopol. No que diz respeito à microextração, não foram encontrados problemas, evidenciando que não houve incompatibilidades dentro do tempo avaliado e sugerindo que não houve retenção do fármaco pela base. Assim, concluiu-se que o carbopol poderia ser a base de escolha para incorporação do extrato de *S. terebinthifolius*.

Os polímeros de carbopol são muito empregados no desenvolvimento de formulações de caráter hidrofílico para aplicação tópica como géis e emulgéis devido as características de bioadesividade destes carbômeros que pode contribuir para a melhoria na efetividade terapêutica do fármaco com redução na dose diária do medicamento ou redução do número de aplicações. Em se tratando de formulações de uso tópico a toxicidade da base dermatológica é menos preocupante, porém sendo a região vaginal extremamente vascularizada faz-se necessário considerar alguns parâmetros. Em relação aos polímeros de carbopol vários estudos têm demonstrado que assim como ocorre com outros polímeros de alta massa molecular, o grau de toxicidade e irritação cutânea são baixos devido às suas características físico-químicas. O carbopol 940, empregado no desenvolvimento deste trabalho, apresenta baixa toxicidade em formulações de uso oral e zero ou moderada quando aplicada em formulações oculares, e esse grau de irritação é ainda menor em se tratando de formulações tópicas. No intuito de diminuir ainda mais o grau de irritação destes polímeros já se encontra disponível no mercado o carbopol 934 P, com maior grau de pureza (HOSMANI, 2008).

Definida a base, gel de Carbopol (BGC1), foi adicionado o extrato CFST06 à 2,5% (p/p) denominado de GAR2.5. Após a adição de CFST06, determinou-se o teor em polifenóis totais (itens 4.6.3 e 4.6.4) cujos valores estão expressos, em porcentagem e demonstrados na tabela 15.

**Tabela 15** – Resultado, em porcentagem, de polifenóis totais de 5 amostras de GAR2.5.

Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	$\bar{x} \pm dp$ (CV%)
0,78	0,77	0,78	0,77	0,79	0,78±0,008 (1,07)

$\bar{x}$  = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Por estes resultados pode-se confirmar que o processo de micro-extração foi efetivo e, sugere-se que não há complexação dos compostos polifenólicos com a base, conforme discutido anteriormente.

Em formulações de uso vaginal é de grande importância a manutenção da flora vaginal, que depende diretamente dos valores de pH nesta região. Em relação ao gel vaginal contendo extrato de *S. terebinthifolius*, não houve necessidade de inclusão de acidificante pois o pH final do gel, após incorporação do extrato, manteve-se em valor igual a 5,0, o que está dentro do preconizado para formulações vaginais e compatível com o valor de pH de estabilidade para o Carbopol.

## 5.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS EM GEL AROEIRA 2,5% (GAR2.5)

### 5.6.1 Linearidade

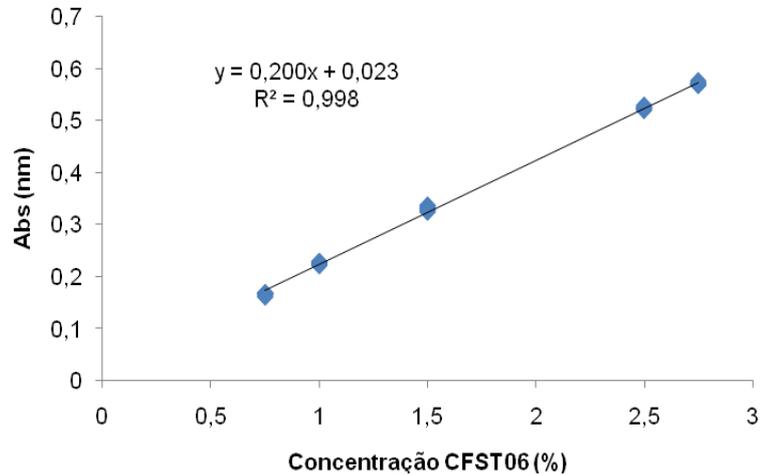
Esta análise foi realizada segundo metodologia descrita no item 4.8.4.1, as médias das concentrações de extrato CFST06 em gel BGC1 utilizadas e suas respectivas absorbâncias e teor em polifenóis totais estão descritos na tabela 16.

**Tabela 16** – Concentrações (p/p) do extrato CFST06 incorporadas à BGC1 e seus respectivos teores de polifenóis totais descritos em porcentagem.

	% CFST06 incorporada à BGC1	Absorbância (nm) ( $\bar{x}$ )	Polifenóis totais (%) $\bar{x} \pm dp$ (CV%)
1	0,75	0,167	0,207±0,003 (1,67)
2	1	0,226	0,280±0,003 (1,27)
3	1,5	0,331	0,411±0,006 (1,56)
4	2,5	0,524	0,650±0,003 (0,49)
5	2,75	0,571	0,709±0,003 (0,51)

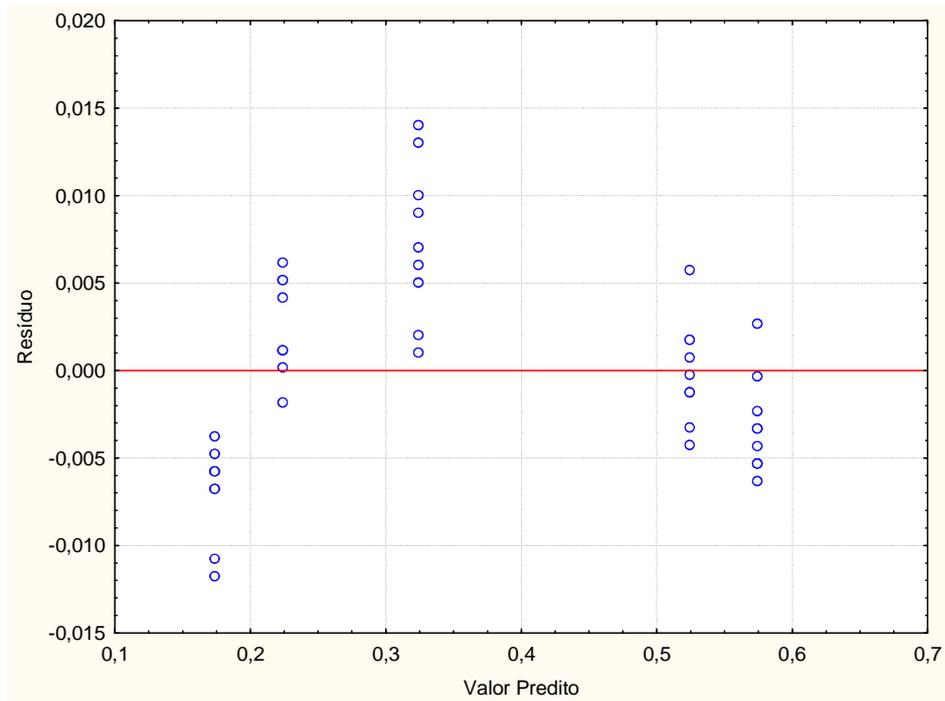
$\bar{x}$  = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

De acordo com estes resultados foi realizada a análise da equação da reta (figura 16).

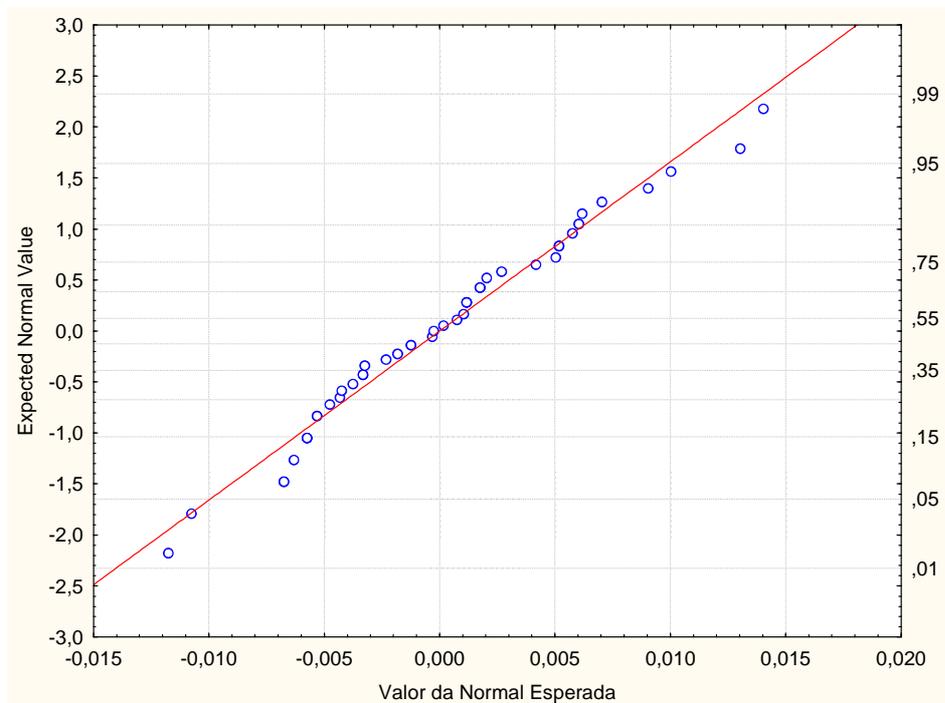


**Figura 16** – Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,998, obtida pela relação de cinco diferentes concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1 pela média de suas absorvâncias.

Segundo a RE nº 889/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser igual a 0,99. Assim, como no item 5.5.1, foram realizadas análises estatísticas dos resíduos para comprovação da linearidade do método. Os resultados destas análises estão expressos nas figuras 17 e 18.



**Figura 17** – Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos das amostras de diferentes concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1.



**Figura 18** – Gráfico da distribuição normal dos resíduos das amostras de diferentes concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1.

### 5.6.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi calculado de acordo com a expressão descrita no item 4.8.4.2.

O resultado obtido foi 0,15, ou seja, este valor é a menor concentração do analito incorporado ao gel que pode ser determinada com precisão e exatidão.

### 5.6.3 Precisão

Esta análise foi realizada segundo metodologia descrita no item 4.8.4.3.

**Tabela 17** – Resultados das absorvâncias obtidas de 6 amostras de GAR2.5, em dois dias diferentes de teste, e os respectivos teores de polifenóis totais calculados.

	Dia 1		Dia 2	
	Absorbância (nm)	Polifenóis totais (%)	Absorbância (nm)	Polifenóis totais (%)
1	0,530	0,6598	0,526	0,6561
2	0,521	0,6448	0,53	0,6611
3	0,522	0,6493	0,531	0,6636
4	0,525	0,6541	0,526	0,6575
5	0,527	0,6553	0,527	0,6587
6	0,522	0,6501	0,527	0,6579

As absorvâncias (nm) e os teores em polifenóis (%) estão apresentados na tabela 17. As médias obtidas foram de 0,6522% e 0,6591% em polifenóis totais, com coeficientes de variação (CV) iguais a 0,8 e 0,41% e desvios padrão de 0,0052 e 0,0027 para os dias 1 e 2 respectivamente.

De acordo com a RE nº. 899, de 29 de maio de 2003, os valores encontrados para o coeficiente de variação não devem ser superiores a 5%. Portanto, pode-se afirmar que o método apresenta repetibilidade.

A análise estatística comprovou que não há diferença significativa entre os dias.

#### 5.6.4 Limite de detecção

O limite de detecção foi calculado de acordo com a expressão descrita no item 4.8.4.4.

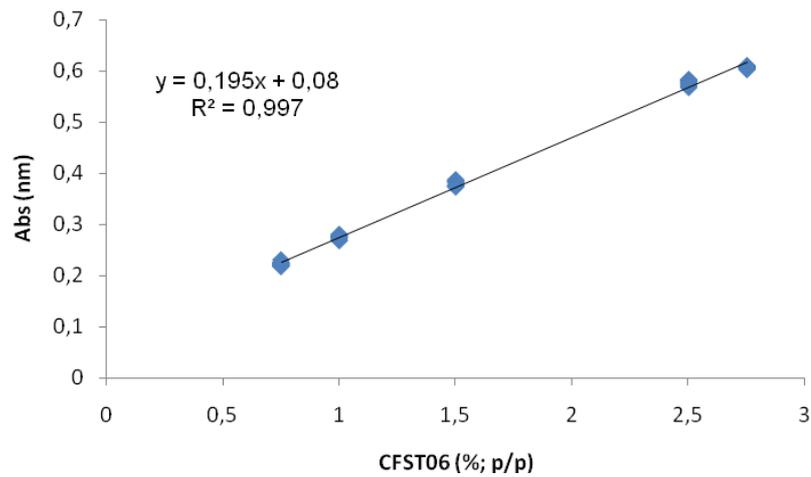
O resultado obtido foi 0,044, ou seja, o limite de detecção do método é atingido quando se obtém a absorbância de 0,044 nm. Abaixo desta absorbância o método não apresenta linearidade.

#### 5.6.5 Especificidade

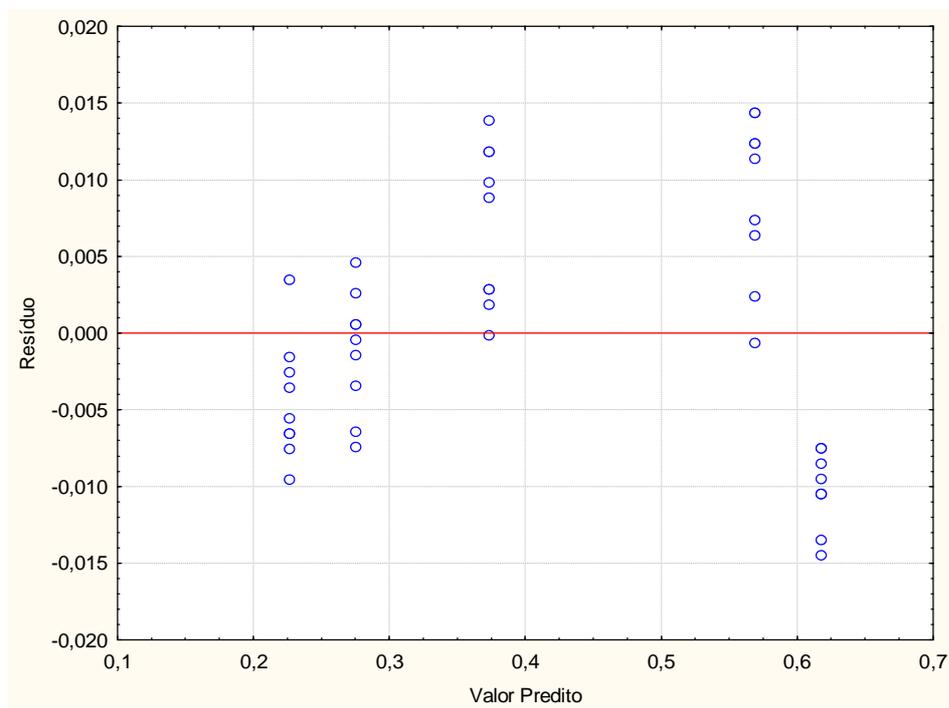
Esta análise foi realizada segundo metodologia descrita no item 4.8.4.5. As médias das absorbâncias estão apresentadas na tabela 18 e representadas na figura 19.

**Tabela 18** – Teores de polifenóis totais calculados, em porcentagem, através da média das absorbâncias medidas (n=9) de diferentes concentrações (p/p) iniciais de CFST06 incorporadas à BGC1 acrescida da substância referência (75 mg/100 g).

	% CFST06 incorporada à BGC1 acrescida de substância referência	n	Abs (nm) ( $\bar{x}$ )	Polifenóis totais (%) $\bar{x} \pm dp$ (CV%)
1	0,75	9	0,222	0,277±0,005 (1,75)
2	1	9	0,274	0,341±0,005 (1,61)
3	1,5	9	0,380	0,474±0,006 (1,38)
4	2,5	9	0,577	0,726±0,001 (1,96)
5	2,75	9	0,607	0,758±0,003 (0,41)

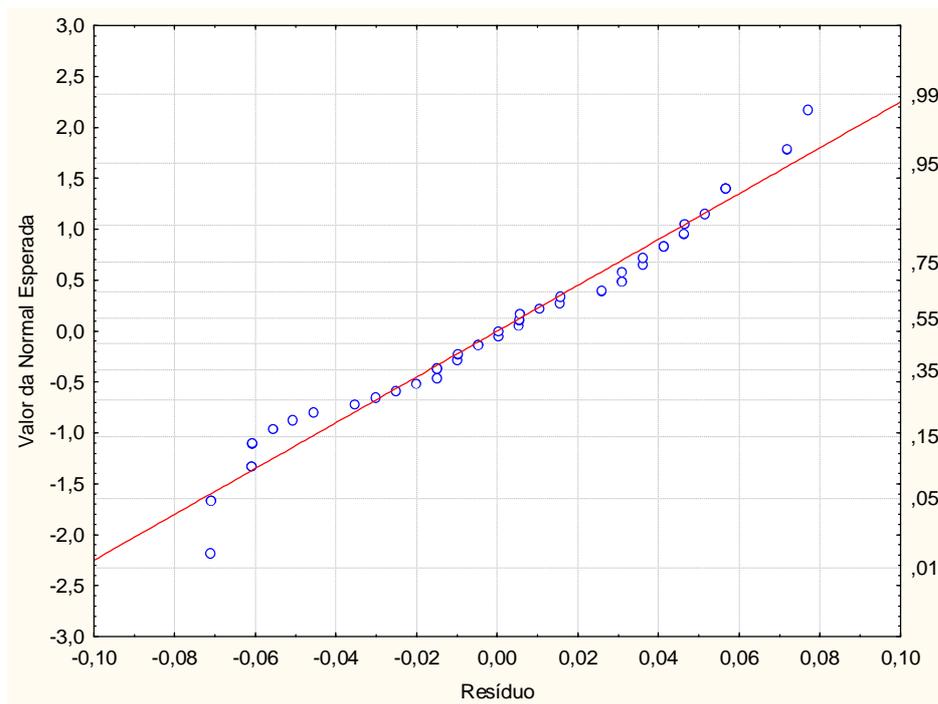


**Figura 19** – Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,997, obtida pela relação de cinco diferentes concentrações de CFST06 incorporadas à BCG1 acrescida de substância referência (75 mg/100 g) pela média de suas absorbâncias.



**Figura 20** – Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos das amostras de diferentes concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1 acrescida de substância referência.

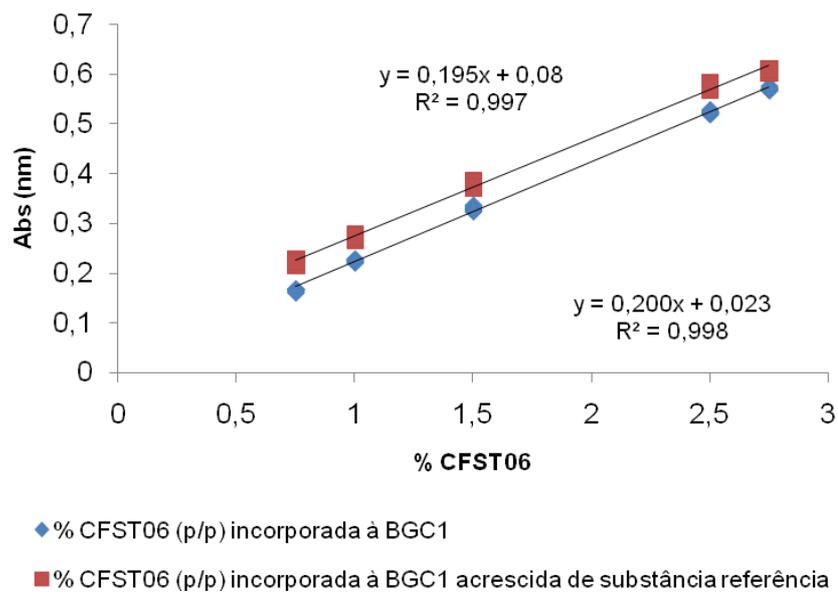
A análise da curva analítica de CFST06 (%; p/p) incorporada à BGC1 acrescida da substância referência ácido gálico, comprovada também pela análise quadrática dos resíduos (figuras 20 e 21), indica a linearidade e, conseqüentemente, a especificidade do método. No entanto, para confirmação da especificidade do método, é necessário a comparação entre as curvas analíticas de CFST06 (%; p/p) incorporada à BGC1 e CFST06 (%; p/p) incorporada à BGC1 acrescida da substância referência ácido gálico (figura 22).



**Figura 21** - Gráfico da distribuição normal dos resíduos das amostras de diferentes concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1 acrescida de substância referência.

**Tabela 19** - Comparação entre as absorvâncias de diferentes concentrações (p/p) de CFST06 incorporadas à BGC1 e à BGC1 acrescida de substância referência.

	% CFST06 incorporada à BGC1	Abs (nm)	% CFST06 incorporada à BGC1 acrescida de substância referência	Abs (nm)
1	0,75	0,167	0,75	0,222
2	1	0,226	1	0,274
3	1,5	0,331	1,5	0,380
4	2,5	0,524	2,5	0,577
5	2,75	0,571	2,75	0,607



**Figura 22** – Representação da comparação das curvas de linearidade, das concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1 e das concentrações de CFST06 incorporadas à BGC1 acrescida de substância referência pela média de suas respectivas absorvâncias.

### 5.6.6 Exatidão

Este teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 4.8.4.6. Os resultados estão expressos na tabela 20.

Sendo:

1 = concentração baixa.

2 = concentração média.

3 = concentração alta.

**Tabela 20** – Concentrações (p/p) de CFST06 incorporadas à BGC1 para a realização do teste de exatidão, suas respectivas absorbâncias e total de recuperação obtido.

	<b>Concentração (%)</b>	<b>Absorbância (nm)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
1	2,60	0,522	99,61
2	2,65	0,529	100,95
3	2,70	0,534	101,9

O índice de recuperação aceitável para matriz complexa pode variar entre 85 e 115% (BRASIL, 2003). De acordo com os resultados apresentados na tabela 23, pode-se dizer que houve recuperação aceitável nas três concentrações utilizadas, sendo assim, há exatidão no método.

### 5.6.7 Robustez

Para a realização deste teste seguiu-se a metodologia descrita no item 4.8.4.7.1. Os resultados estão expressos na tabela 21.

**Tabela 21** – Comparação do teor de polifenóis totais em GAR2.5 em dois comprimentos de onda diferentes.

	<b>691 nm</b>	<b>695 nm</b>
N	9	9
$\bar{x}$ (%)	0,654	0,655
dp	0,0039	0,0038
CV (%)	0,60	0,59

n = número de amostras;  $\bar{x}$  = média do teor de polifenóis totais;

dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

## 5.7 ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE

O estudo da estabilidade acelerado é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudança física de um produto em condições forçadas de armazenamento (BRASIL, 2005). O teste de estabilidade é necessário para assegurar que a formulação irá manter sua integridade, ou seja, sua qualidade (MARQUELE-OLIVEIRA, 2007).

No estudo de estabilidade são empregadas condições de armazenamento que têm como objetivo acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características de cada produto (MARQUELE-OLIVEIRA, 2007).

Para a realização do estudo foi utilizada a metodologia descrita no item 4.9 e os resultados estão expressos em teor de polifenóis totais e se encontram descritos, em porcentagem, na tabela 22.

**Tabela 22** – Resultados dos teores de polifenóis totais obtidos nos diferentes dias do teste de estabilidade de GAR2.5 (n=3), seus respectivos desvios padrões e coeficientes de variação.

	<b>0 hora</b>	<b>24 horas</b>	<b>7 dias</b>	<b>14 dias</b>	<b>21 dias</b>	<b>30 dias</b>
PT (%)	0,6414	0,6355	0,6134	0,6041	0,5929	0,5709
dp	0,0042	0,0036	0,0032	0,0042	0,0052	0,0020
CV (%)	0,66	0,56	0,52	0,69	0,88	0,36

PT = polifenóis totais; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Os resultados mostram um decréscimo no teor de polifenóis totais com o tempo. A provável explicação baseia-se na possível decomposição dos compostos fenólicos provocadas por fatores extrínsecos e intrínsecos em função do tempo, o que já era esperado por se conhecer as características destas substâncias.

Para a análise estatística dos resultados foi realizada a análise estatística segundo ANOVA ( $p < 0,05$ ).

## 6 CONCLUSÕES

As análises físico-químicas qualitativas e quantitativas realizadas com as cascas de *Schinus terebinthifolius* permitiram determinar as características da droga, servindo como parâmetro para avaliação do controle de qualidade da mesma.

O teor em polifenóis totais determinado no extrato seco de *Schinus terebinthifolius* adquirido do mercado possibilitaram a padronização do mesmo.

Não foi possível identificar até o momento a estrutura química.

A atividade antimicrobiana dos extratos secos e das frações aquosa e acetato de etila frente à *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* não foi significativa, porém contra *Staphylococcus aureus* a fração acetato de etila mostrou uma boa atividade, comprovando o já relatado na literatura. Frente às cepas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* os resultados obtidos foram positivos para os extratos secos e as frações aquosa e acetato de etila.

A capacidade antioxidante obtida para o extrato CFST06 foi, estatisticamente, comparativa à vitamina C.

O desenvolvimento da forma farmacêutica semi-sólida contendo CFST06, foi possível empregando-se como base gel Carbopol 940®.

Considera-se possível de ser utilizada, através da validação da metodologia, a técnica de micro-extração de polifenóis totais e a adaptação da técnica de doseamento de polifenóis totais. A validação do método de análise do extrato seco de *S. terebinthifolius*, foi realizada por espectrofotometria UV-VIS, obtendo-se bons resultados. Confrontando com os resultados obtidos com a análise quadrática dos resíduos, através de análises estatísticas, pode-se dizer que o método é analiticamente possível.

A validação da metodologia analítica para o doseamento de polifenóis totais da forma farmacêutica semi-sólida (gel vaginal), também foi realizada por espectrofotometria UV-VIS. Os resultados em polifenóis totais obtidos foram confrontados com os resultados obtidos na análise quadrática dos resíduos, através de análises estatísticas, demonstrando que o método é analiticamente possível.

O estudo preliminar da estabilidade da forma farmacêutica semi-sólida (gel vaginal) mostrou que, nas condições empregadas houve decréscimo no teor de polifenóis totais entre o tempo 0 e o tempo final, 30 dias. A análise estatística (ANOVA) demonstrou haver diferenças significativas entre os teores de polifenóis totais em todos os tempos analisados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L.T.; DA MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciências Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.

AGUILAR-ORTIGOZA, C.J.; SOSA, V.; AGUILAR-ORTIGOZA, M. Toxic phenols in various Anacardiaceae species. **Economic Botany**, v. 57, n.3, p. 354-364, 2003.

ALJADI, A.M.; KAMARUDDIN, M.Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, p. 513 -518, 2004.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the *Canadian prairies*. **Food Chemistry**, v. 84, p. 551-562, 2004.

ARDESTANI, A.; YAZDANPARAST, R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. **Food Chemistry**, v. 107, p. 21-29, 2007.

BAGNOLI, V. R.; FONSECA, A. M.; ARIE, W. M. Y.; JUNQUEIRA, P. A. A. Fitomedicamentos Utilizados em Ginecologia e Obstetrícia. In: Lima, S.M.R.R. **Fitomedicamentos na Prática Ginecológica e Obstétrica**. Ed. Atheneu. São Paulo, 2006.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 30, 1997.

BRANDÃO, D. C. A História da Fitoterapia. In: Lima, S.M.R.R. **Fitomedicamentos na Prática Ginecológica e Obstétrica**. Ed. Atheneu. São Paulo, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE nº 01 de 29.07.2005, Guia para realização de estudos de estabilidade, Diário Oficial da União de 01.08.2005.

BRASIL, Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília:, 2006.

BRASIL, RDC n. 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 10 de janeiro de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Leis, decretos, etc. Resolução (RE) n. 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRITO, N.M.; AMARANTE JÚNIOR, O.P. de; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos estratégia e discussão. **Pesticidas Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p. 129-146, 2003.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WHARTA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale L.*). **Ciências Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

CARDOSO, M.L.C. **Desenvolvimento de técnica analítica e tecnológica na obtenção de extratos secos nebulizados de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach., Malpighiaceae, (nó-de-cachorro)**. 2002. 128 f. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2002.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. *Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos*. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. p. 17-45. Editora Argos, 2001.

CERUKS, M.; ROMOLF, P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anarcadiaceae). **Química Nova**, vol. 30, nº 3, 597-599, 2007.

CONSOLARO, M.E.L.; MARQUES, L.C.; MELLO, J.C.P. de. Análisis Farmacognóstico de *Centella asiática* (L.) Urban: aspectos botânicos, físico-químicos y enfoque químico preliminar. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v .18, n. 2, p. 115-120, 1999.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1984. p. 170-171.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de Anarcadiaceae. **Química Nova**, vol. 29 n. 6. São Paulo, 2006.

DECENA, D.C.D.; CO, J.T.; MANALASTAS Jr., R.M.; PALAYPAYON, E.P.; PADOLINA, C.S.; SISON, J.M.; DANCEL, L.A.; LELIS, M.A. Metronidazole with lactacyd vaginal gel in bacterial vaginosis. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**. v. 32, n. 2, p. 243-251, 2006.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R.J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Visão Acadêmica**, v.5, n.2, p. 85-90, 2004.

DEUTSCHES Arzneibuch. 9. Ausg. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1986.

DUARTE, M. R.; TOLEDO, M. G.; OLIVEIRA, R. La B. de . Diagnose morfoanatômica de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). **Visão Acadêmica**, v. 7, p. 05-13, 2006.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, M.O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003.

FARMACOPÉIA Brasileira. 1 ed. São Paulo. Companhia Editora Nacional, 1929.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte Geral.

GALINA, K.J. ***Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae: estudo botânico, químico e microbiológico**. 105 f, 2002. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus Araraquara, 2002.

GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 123, p. 1979-1983, 1983.

GOMPEL, C.; KOSS, L.G. **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas**. Ed. Manole. São Paulo, 1997.

HARBORNE, J. **Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2. ed. London: Chapman and Hall, 1984.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug possible models of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HATTORI, M.; KUSUMOTO, L.T.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.38, p. 717-720, 1990.

HELMAN, J. **Farmacotecnica teorica y practica**. 3 ed. Mexico: Continental, 1982.

HOLETZ, F.B.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P.; MORGADO-DIAZ, J. A.; TOLEDO, C. E. M.; NAKAMURA, C. V. Biological effects of extracts obtained from

*Stryphnodendrom adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n.4, 2005.

HOSMANI, A.H. *Carbopol and its pharmaceutical significance a review*. **Pharmainfo.net**, v. 4, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.pharmainfo.net/reviews/carbopol-and-its-pharmaceutical-significance-review>>. Acesso em: 20 dez. 2008.

ISHIDA, K.; MELLO, J.C.P. de; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 942-949, 2006.

JAIN, M.K.; YU, B.Z.; ROGERS, J.M.; SMITH, A.E.; BOGER, E.T.A.; OSTRANDER, R.L.; RHEINGOLD, A.L. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A<sub>2</sub> from berries of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, vol. 39, n. 3, p. 537-547, 1995.

JOHANN, S.; SILVA, D.L.; MARTINS, C.V.B.; ZANI, C.L.; PIZZOLATTI, M.C.G.; RESENDE, M.A. Inhibitory effect of extracts from Brazilian medicinal plants on the adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells. **World Journal of Microbiology and Biothecnology**, v. 24, n. 11, p.2459-2464, 2008.

JOLY, A.B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 2002. v. 4, p. 595.

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

KOMMISSION, E. Bundesanzeiger n. 133 de 19.07.1994. Liste der Monographien. Bundesgesundheitsamt: Institut für Arzneimittel, 1994.

KRULL, I.S.; STWARTZ, M.E. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, p 12-20, 1998.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, 2004.

LEAL; L.B. **Preparação e avaliação biofarmacêutica de formas semi-sólidas da aroeira da praia *Schinus terebinthifolius* Raddi**. 132 f, 1999. Dissertação (Mestrado). Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 1999.

LIMA, E.O.; PEREIRA, F.O.; LIMA, I.O.; TRAJANO, V.N.; SOUZA, E.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiano de seu extrato aquoso. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, 2004.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; CARVALHO, C. M.; SANT'ANA, A. E. G.; ARGOLO, A. C. C. M.; ABREU, F. C.; ARGÔLO, A.C.C.M.; SANT'ANA, A.E.G. Ação antioxidante e moluscicida da espécie *Schinus terebinthifolius*. In: **Anais da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia, 2006.

LOPES, G.C. **Estudos botânicos, químicos e biológicos de cascas e extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., Leguminosae** . 197 f, 2003. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá, 2003.

LOPES, G.C.; SANCHES, A. C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. de. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 265-272, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, 2002. p. 56.

MARQUELE-OLIVEIRA, F. **Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo***. 155 f, 2007. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 2007.

MARQUES, V.R.B. **Natureza em Boiões**: medicinas e boticários no Brasil setecentista. Editora da Unicamp/Centro de Memória. Campinas – São Paulo, 1999.

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

MEDEIROS, K.C.P.; MONTEIRO, J.C.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A.; SILVA, B.A.; PIUVEZAM, M.R. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Raddi in inflammatory models. **Revista Brasileira de Farmacognosia** . v. 17, n.1, p. 23-28, 2007.

MELLO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.19, p. 211-215, 2000.

MELLO, J.C.P.de ; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p.857-862, 1996.

MELLO, J.P.C. de. **Desenvolvimento galênico de macerados de *Baccharis trimera* (Less.) DC. – Compositae – (Carqueja)**. 135 f, 1989. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1989.

MELLO, J.P.C. de; SANTOS, S.C. Taninos. In: SIMÕES, M.O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, P.; ARAÚJO, E.L.; AMORIN, E.L.C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, 892-896, 2005a.

MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.L.; AMORIN, E.L.C.; STRATTMANN, R.R.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpáticas da caatinga. **Revista Árvore**, v.29, n.6, p. 999-1005, 2005b.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference Method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. National committee for clinical laboratory standards, Villanova, Pa. 2002.

OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATAMI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, v.27, p.124-129, 1993.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17 n.1, p. 102-107, 2007.

PELLATI, F.; STEFANIA, B.; MAGRO, L.; MELEGARI, M.; SORAGNI, F. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of Echinaceae spp. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 2, p. 289-301, 2004.

PIATO, S. **Diagnóstico e terapêutica das patologias obstétricas**. 2 ed., Ed. Atheneu, São Paulo:Rio de Janeiro, 1993.

PITSOUNI, E.; IAVAZZO, C.; FALAGAS, M.E. Itraconazole vs fluconazole for the treatment of uncomplicated acute vaginal and vulvovaginal candidiasis in nonpregnant women: a metanalysis of randomized controlled trials. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 198, n. 2, p. 153-160, 2008.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p.603-13, 2001.

RIBAS, M.O.; SOUSA, M.H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T.A.; NORONHA, L.; ACRA, L.A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciências**, v.21, n.53, p. 245-252, 2006.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.

SANTOS L.C.; AMORIM, M.M.R. Uso da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para tratamento de infecções vaginais. **Femina**; v. 30, p. 339-342, 2002.

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

SANTOS, P.L.; SANTOS, A.C.A.; SERAFINI, L.A.; ROSSATO, M.; PAULETTI G. F. Determinação da composição química e do rendimento do óleo essencial de folhas e talos de *Schinus terebinthifolius* RADDI. 2004. Disponível em: <[http://www.ucs.br/ucs/tplJovensPesquisadores2004/pesquisa/jovenspesquisadores2004/programacao/trabalhos\\_pdf/vida/paulalucianadossantos.pdf](http://www.ucs.br/ucs/tplJovensPesquisadores2004/pesquisa/jovenspesquisadores2004/programacao/trabalhos_pdf/vida/paulalucianadossantos.pdf)>. Acesso em: 22 de julho de 2006.

SCHOLZ, E. Pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxikologie. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v.134, n.34, p.3167-3179, 1994.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R; TYLER, V.E. **Fitoterapia Racional**. Editora Manole, 2002.

SCHWANZ, M. **Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da boldina em *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae) e avaliação preliminar de sua estabilidade**. 81 f, 2006. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

SOBEL, J.D.; FERRIS, D.; SCHWEBKE, J.; NYIRJESY, P.; WIESENFELD, H.C.; P., J.; SOPER, D.; OHMIT, S.E.; HILLIER, S.L. Suppressive antibacterial therapy with 0.75% metronidazole vaginal gel to prevent recurrent bacterial vaginosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, p. 1283-1289, 2006.

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

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, 2005.

THOMPSON, R.S.; JACQUES, D.; HASLAM, E.; TANNER, R.J.N. Plant proanthocyanidins. Part 1. Introduction; the isolation, structure and distribution in nature of plant procyanidins. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction I**, p. 1387-1399, 1972.

TORTORA, J.G.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L **Microbiologia**, 8. Ed.. Artmed Editora S.A., 2006.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 2 ed. Livraria Atheneu Editora, 1991.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 7 ed., Berlin: Ullstein Mosby, 1993.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Org.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1ª Ed. Chapecó: Ed. Argos, Ed. da UNOESC, p. 317-334, 2001.

YAMADA, C. S. B. Fitomedicamentos: a importância do controle de qualidade na produção. In: Lima, S.M.R.R. **Fitomedicamentos na Prática Ginecológica e Obstétrica**. Ed. Atheneu. São Paulo, 2006.

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L.A.; CANTELI, V.C.D.; USHIROBIRA, T.M.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; MELLO, J.C.P. de. Antioxidant capacity and *in vitro* prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, p. 1950-1963, 2007.

ZIARRUSTA, GB. Vulvovaginal candidiásica. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 19, p. 22-24, 2002.