

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL**

LUCIANA CAMIZÃO REBELLO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE
Schinus terebinthifolia Raddi**

**SÃO MATEUS, ES
Novembro de 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE
Schinus terebinthifolia Raddi**

LUCIANA CAMIZÃO REBELLO

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barreto da Silva

**SÃO MATEUS, ES
Novembro de 2013**

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolia* Raddi

LUCIANA CAMIZÃO REBELLO

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Aprovada: 29 de novembro de 2013

Prof. Dr. Camilo Amaro de Carvalho

Universidade Federal de Viçosa

Prof.^a Dr.^a Maria da Penha Piccolo
Ramos

Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Marcelo Barreto da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha vida tão agraciada, pela oportunidade de aprendizagem, pela força e persistência a mim concedida. Sozinha não seria possível.

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-graduação Agricultura Tropical (PPGAT) pelo curso oferecido e pela oportunidade de ingresso.

Obrigada ao professor Valdemir Belinelo (*i. m.*) por me acolher nesta pós-graduação.

Agradeço imensamente ao professor Marcelo Barreto da Silva pelo acolhimento, pela orientação, pela disponibilidade e pela amizade.

Agradeço a todos os professores do PPGAT que contribuíram para o cumprimento desta etapa.

Obrigada à professora Cláudia Jamal pelas orientações nos experimentos e pela disponibilidade.

Obrigada a todos do Laboratório de Cultura de Tecidos pelo apoio.

Obrigada à Faculdade Pitágoras de Linhares pela disponibilidade dos laboratórios e equipamentos e ao apoio técnico de Isaías e Késsia.

Obrigada às minhas alunas Lo Ruama e Valdinara pela ajuda e pelo apoio nos momentos que precisei estar em dois lugares no mesmo instante.

Obrigada à minha amiga e colega de profissão Gabriela Esteves (Laboratório Trevisan) pela realização dos testes de antibiograma.

Obrigada a todos os colegas de mestrado pela amizade e pelos conhecimentos, especialmente agradeço a minha companheira de experimento Bruna que sempre se dispôs a ajudar.

Por fim, agradeço ao meu amor, Junior, por me apoiar, por compreender a minha ausência e por me incentivar a seguir não importando as dificuldades. Você é fundamental.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolia* Raddi). 11
- Figura 2:** Concentração de flavonóides equivalente-grama de Rutina em frações dos extratos das folhas e das cascas de caule de *S. terebinthifolia*. Os valores de concentração foram calculados baseados nas absorvâncias do padrão Rutina segundo equação $y = 50,66x - 0,148$. FEC1 = fração etanol casca 1, FDC1 = fração diclorometano casca 1, FDF1 = fração diclorometano folha 1 e FEF1 = fração etanol folha 1.28
- Figura 3:** Esquematização da extração com solventes de polaridades diferentes, mostrando o rendimento dos extratos secos a partir das folhas de *S. terebinthifolia* Raddi.29
- Figura 4:** Esquematização da extração com solventes de polaridades diferentes, mostrando o rendimento dos extratos secos a partir das cascas de caule de *S. terebinthifolia* Raddi.30
- Figura 5:** Esquematização do fracionamento do extrato etanólico com solventes de polaridade crescente, mostrando o rendimento dos extratos secos a partir das cascas de caule de *S. terebinthifolia* Raddi.31
- Figura 6:** Esquematização do fracionamento do extrato etanólico com solventes de polaridade crescente, mostrando o rendimento dos extratos secos a partir das folhas de *S. terebinthifolia* Raddi.32
- Figura 7:** Resultados dos testes de inibição do crescimento micelial do *C. musae* por frações de extratos das folhas e cascas de caule de *S. terebinthifolia*. Cada fração foi preparada na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os testes foram avaliados utilizando Tukey a 5% de probabilidade. CV = 7,68%. FEC1= Fração etanol casca 1; FEC2 = Fração etanol casca 2; FDC2 = Fração diclorometano 2; FEF1 = Fração etanol folha 1; FEF2 = Fração etanol folha 2; FDF2 = Fração diclorometano folha 2.36
- Figura 8:** Resultados dos testes de inibição do crescimento micelial do *C. gloeosporioides*, por frações de extratos das folhas e cascas de caule de *S. terebinthifolia*. Cada fração foi preparada na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os testes foram avaliados utilizando Tukey a 5% de probabilidade. CV = 5,12%. FEC1= Fração etanol casca 1; FEC2 = Fração etanol casca 2; FDC2 = Fração diclorometano 2; FEF1 = Fração etanol folha 1; FEF2 = Fração etanol folha 2; FDF2 = Fração diclorometano folha 2.37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Esquematização para procedimento de teste de concentração inibitória mínima.23
- Tabela 2:** Classes de compostos detectados nos extratos etanólicos de casca de caule e folha de *S. terebinthifolia*.27
- Tabela 3:** Resultado do teste de concentração inibitória mínima para *S. aureus*.33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	3
2.2 ANTRACNOSE	5
2.3 FITOTERAPIA.....	8
2.4 <i>Schinus terebinthifolia</i> RADDI	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	18
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	18
3.2.1 Extratos com solventes de polaridade crescente	18
3.2.2 Frações do extrato etanólico	19
3.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA.....	20
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES.....	20
3.5 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS.....	21
3.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para bactérias.....	21
3.5.2 Controle dos ensaios antibacterianos	23
3.5.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	23
3.5.4 Determinação da atividade fungicida	24
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5 CONCLUSÃO.....	39
6 REFERÊNCIAS.....	40

RESUMO

REBELLO, Luciana Camizão; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Novembro de 2013; **Atividade antimicrobiana dos extratos de *Schinus terebinthifolia* Raddi**; Orientador: Marcelo Barreto da Silva.

A *Schinus terebinthifolia* Raddi, conhecida popularmente como aroeira vermelha, se encontra na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde e possui grande potencial inibitório de crescimento de microrganismo, o que torna esta planta medicinal uma alternativa para atividade antimicrobiana. Este estudo propõe avaliar a atividade antimicrobiana das frações de extratos obtidas a partir de folhas e de casca de caule de *S. terebinthifolia*, contra bactéria causadora de infecção humana (*Staphylococcus aureus*) e contra fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz e *Colletotrichum musae*), identificar os compostos do metabolismo secundário presentes nas folhas e nas cascas de caule e quantificar os flavonóides. As extrações das folhas e das cascas de caule foram preparadas por maceração, utilizando solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano e etanol) e o solvente etanol para o preparo de extrato bruto, submetido ao fracionamento líquido-líquido. Foi realizada a triagem fitoquímica dos extratos brutos etanólicos de ambas as partes e a quantificação de flavonóides. As frações foram utilizadas nos testes de determinação da concentração inibitória mínima, para bactéria, e de inibição do crescimento micelial dos fungos. Os resultados obtidos demonstraram que todos os microrganismos testados apresentaram sensibilidade aos compostos encontrados nos extratos de *S. terebinthifolia*, independente do tipo de extração, e que nas folhas são encontrados flavonóides em maior quantidade ($52,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do que nas cascas de caule ($9,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$), que possivelmente juntamente com os taninos exercem a atividade inibitória dos fungos e bactérias. Portanto, extratos de casca de caule e de folhas de aroeira podem ser uma possibilidade para controlar o crescimento de tais patógenos, como um medicamento fitoterápico com efeito antimicrobiano, bem como um possível agente para controle da antracnose em cultura de mamão e de banana.

Palavras-Chave: *Schinus terebinthifolia*, antracnose, antibiótico.

ABSTRACT

REBELLO, Luciana Camizão; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Novembro de 2013; **Antimicrobial activity of extracts of *Schinus terebinthifolia* Raddi**; Orientador: Marcelo Barreto da Silva.

The *Schinus terebinthifolia* Raddi, popularly known as pepper tree, is in the National Medicinal Plants of the SUS's Interest List and has great potential for growth inhibition of microorganisms, which makes this an alternative to medicinal plant antimicrobial activity. This study aims to evaluate the antimicrobial activity against pathogenic fungi (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz and *Colletotrichum musae*) and against the bacteria which causes human infection (*Staphylococcus aureus*), from the extracts fractions obtained from leaves and stem bark of *S. terebinthifolia*, to identify secondary metabolic compounds in leaves and stem bark and quantify the compounds of the flavonoids group. The extractions of leaves and stem bark were prepared by maceration using increasing polarity solvents (hexane, dichloromethane and ethanol) and ethanol solvent for the preparation of crude extract that underwent liquid-liquid cut. The phytochemical screening of crude ethanol extracts of both parties and the quantification of flavonoids were performed. The fractions were tested for determining the minimum inhibitory concentration for bacteria and for mycelial growth inhibition of the fungus. The results showed that all tested microorganisms demonstrated sensitivity to the compounds found in the extracts of *S. terebinthifolia* regardless the type of extraction, and that the flavonoids are found in greater amounts in the leaves ($52,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$) than in the stem bark ($9,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$), possibly, together with tannins, they do the inhibitory activity of fungi and bacteria. Therefore, extracts of bark stem and leaves of the pepper tree may be a good way for controlling the growth of these pathogen and they can act as an herbal medicine with antibiotic effect as well as being a possible agent to control the diseases in papaya and banana plants.

Key words: *Schinus terebinthifolia*, anthracnose, antibiotic.

1 INTRODUÇÃO

Doenças causadas por microrganismos em espécies vegetais e animais são uma preocupação constante, a qual requer controle e pesquisa de novos compostos ativos para garantir a saúde e o desenvolvimento da espécie hospedeira.

Do ponto de vista da saúde humana, a infecção bacteriana é uma causa frequente de mortes, principalmente pelo aparecimento de microrganismos resistentes aos antibióticos, especialmente, pelo seu uso indiscriminado (ANDRADE et al., 2006).

Na agricultura também existe a necessidade de controle dos microrganismos causadores de doenças em vegetais, que afeta diretamente na produção e qualidade dos alimentos. A antracnose, por exemplo, é uma doença frequente em mamão e banana, causando até 90% de perda de frutos (TATAGIBA et al., 2002). O Estado do Espírito Santo está entre os maiores produtores de mamão e banana e contribui consideravelmente para exportação destas frutas (ESPIRÍTO SANTO, 2010; BRASIL, 2011b).

Uma alternativa para encontrar substâncias que possam inibir os microrganismos resistentes é buscá-las em materiais vegetais que possuem potencial de inibição microbiana, através de estudos etnofarmacológicos, estudos fitoquímicos e estudos farmacológicos.

A grande maioria dos medicamentos, hoje disponíveis no mundo, é ou foi originada de estudos desenvolvidos a partir da cultura popular, o que faz da biodiversidade brasileira um campo de pesquisa científica. Da cultura popular aos cultivares controlados por profissionais conhecedores do assunto, coloca o Brasil na linha de frente no estudo e na aplicação da medicina não convencional e da medicina complementar e alternativa (BRASIL, 2011a).

A *Schinus terebinthifolia* Raddi, conhecida popularmente como aroeira vermelha (FORZZA et al., 2010) faz parte da lista da Relação Nacional de Plantas

Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) e possui grande atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias, bem como outras propriedades farmacológicas, por exemplo, cicatrizante, anti-inflamatória, gastroproterora, antineoplásica e antialérgica (BRASIL, 2012, LIMA et al., 2006, RIBAS et al., 2006; MEDEIROS et al., 2007; CAVALHER-MACHADO et al., 2008; SANTOS et al., 2010; MATSUO et al., 2011).

O interesse pela aroeira se dá pelo seu metabolismo secundário que produz diversos compostos ativos entre outros compostos. Os estudos fitoquímicos de *S. terebinthifolia* detectaram a presença de compostos fenólicos simples, flavonóides e taninos, óleos essenciais, esteróides, triterpenos, antraquinonas e saponinas (LIMA et al., 2006).

Tendo em vista os estudos realizados com extratos de *S. terebinthifolia* Raddi com inibição do crescimento de vários microrganismos e da presença abundante desta espécie no Estado do Espírito Santo foi necessário realizar um estudo de avaliação da inibição do crescimento microbiano, fungos e bactéria, por frações de extratos de folha e de casca caule. Este estudo possibilita encontrar alternativas para controle de fungos causadores da antracnose do mamão e da banana (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz e *Colletotrichum musae*, respectivamente), bem como o controle de infecções bacterianas causadas por *Staphylococcus aureus*.

Este trabalho teve como objetivos avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das frações de extratos obtidos das folhas e das cascas de caule de *S. terebinthifolia* Raddi a partir de solventes de diferentes polaridades e de dois métodos de fracionamento, determinar o perfil fitoquímico dos extratos etanólicos bruto de folhas e de cascas de caule de *S. terebinthifolia* Raddi, quantificar os compostos do grupo dos flavonóides e correlacionar os compostos identificados com a atividade antimicrobiana das frações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência bacteriana a antibióticos é uma preocupação mundial e muitos estudos estão sendo realizados para identificar os microrganismos resistentes e encontrar novos compostos que esses microrganismos sejam sensíveis.

Do ponto de vista epidemiológico, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) de Atlanta, nos Estados Unidos, microrganismos resistentes são aqueles não sensíveis a uma ou mais classes de antimicrobianos. Sob a perspectiva laboratorial, entende-se como o crescimento de uma bactéria *in vitro* na presença de concentrações séricas de antibiótico ou quando se mostram resistentes a duas ou mais classes de drogas que interfeririam em suas funções de crescimento e às quais seriam habitualmente sensíveis (MARTINS et al., 2001; OLIVEIRA, 2005).

A partir de 1940 se iniciou o uso clínico da penicilina (GOODMAN & GILMAN, 2006) e em meados dos anos de 1950, foram encontrados os primeiros registros de surtos por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina em ambiente hospitalar, fato consolidado quando na década de 1960 surgiu o primeiro caso de resistência às recém descobertas penicilinas-lactâmicas, como a meticilina, reconhecendo-se, então, no final da década de 1970, as cepas *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) como uma pandemia. E, colocando-se como uma situação cujo controle ainda está distante, em 2002, nos Estados Unidos, foi descrito o primeiro caso de resistência total do *S. aureus* à vancomicina (ALANIS, 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

Desde a introdução do mais antigo antimicrobiano até o mais recente, vem se registrando uma pressão seletiva dos microrganismos causada, principalmente, pelo uso indiscriminado de antibióticos e quimioterápicos, resultando no desenvolvimento de espécies resistentes (ANDRADE et al., 2006).

A resistência bacteriana a antibióticos é uma característica desenvolvida por microrganismos que pode ser originada por diversos mecanismos, decorrentes do modo de ação desses antibióticos. A resistência à penicilina, por exemplo, pode ocorrer através da: (a) inativação enzimática pelas beta-lactamases biossintetizadas

pelas bactérias; (b) redução da permeabilidade da parede celular bacteriana às penicilinas que, assim, não conseguem alcançar seus locais de ligação, representados por proteínas específicas (PLP); (c) alterações conformacionais nessas proteínas de ligação das penicilinas, bloqueando a atividade antibiótica; e (d) aparecimento de fenômeno de tolerância (SILVA, 2005).

Estudo recente realizado em um hospital universitario brasileiro mostrou que 12,3% dos pacientes internados no Centro de Terapia Intensiva (CTI) eram colonizados por microrganismos resistentes à antibióticos. 61% desse pacientes desenvolveram algum tipo de infecção e 33% dos óbitos ocorridos foram em pacientes com infecção por microrganismos resistentes (OLIVEIRA et al., 2010).

Lichtenfels et al. (2008) estudaram a prevalência de resistência bacteriana nas infecções de ferida operatória em cirurgia arterial periférica e verificaram uma prevalência geral de resistência bacteriana de 72,5% e uma multirresistência em 60% dos casos. Neste estudo o *S. aureus* apresentou uma taxa de resistência de 68,7%.

Nos municípios de Santos, São Vicente, Cubatão, Praia Grande e Guarujá no Estado de São Paulo foram encontrados 18,9% de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes portadores do HIV (ROZMAN et al., 2007).

Com o objetivo de avaliar a ocorrência de bactérias multirresistentes nos pacientes hospitalizados em um Centro de Terapia Intensiva de hospital público e de emergência, Andrade et al. (2006) constataram que no ano de 2004 ocorreram quase 13% de prevalência de bactérias multirresistentes nesses pacientes, dos quais 50% foram a óbito.

Em pacientes ambulatoriais atendidos com Infecção do trato urinário (ITU) foram encontrados 85,9% dos resultados positivos para ITU, microrganismos Gram-negativos, que se mostraram resistentes em maior índice a amoxicilina (74,6%), seguido pelo trimetoprim/sulfametoxazol com 41,8%, ciprofloxacina e norfloxacina com 13,4% de resistência, ceftazidima com 6% e gentamicina com 1,5% de resistência. Das bactérias Gram-positivas encontradas mostraram-se resistentes em

maior índice à ampicilina (72,7%), seguido pela ciprofloxacina com 36,4%, oxacilina com 27,3% e, trimetoprim/sulfametoxazol, vancomicina e linezolida com 18,2% de resistência dos microrganismos a estes antimicrobianos (POLETTO & REIS, 2005).

Durante o período de julho de 2006 e junho de 2008, foram coletados dados pela Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) para traçar indicadores sobre o perfil de sensibilidade dos microrganismos nos hospitais brasileiros e sobre os fatores que contribuem para a resistência aos antibióticos. As notificações relativas às infecções de corrente sanguínea enviadas pelos hospitais, 97 no total, neste período somaram 5.406 microrganismos. Os mais presentes nos hospitais foram os do gênero *Staphylococcus* (47% das notificações), dos quais foram testados para o antibiótico oxacilina. Apenas 20% dos *Staphylococcus* coagulase-negativo e 39% dos *Staphylococcus aureus* apresentaram sensibilidade ao produto. Em relação a essa última, os menores níveis de sensibilidade foram observados nas Regiões Norte (27%) e Centro-Oeste (28%) (BRASIL, 2009).

2.2 ANTRACNOSE

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de mamão e os maiores produtores nacionais são os Estados Bahia, Espírito Santo, Rio Grande do Norte e Ceará. No quesito exportações o Estado do Espírito Santo responde a 70% do total nacional. Em 2010 a produção brasileira foi de 1.871.295 toneladas de mamão e 6.962.792 toneladas de banana. Neste mesmo ano, o Brasil exportou 139.553.134 kg de banana, que corresponde a 18% do total de frutas frescas exportadas. A área plantada com cultura de banana no Estado do Espírito Santo corresponde a 23.094 ha que produziu 220.291 toneladas em 2011. Para o cultivo de mamão a área plantada representa 7.300 ha com a produção de 550.000 toneladas (ESPIRÍTO SANTO, 2010; SERRANO & CAETANO, 2010; BRASIL, 2011b; IBRAF, 2011). Um dos fatores limitantes à exportação do mamão é a antracnose, que causa perdas de até 90% dos frutos (TATAGIBA et al., 2002).

As perdas de mamão recebido para comercialização estão em torno de 11% e destas perdas parte estão relacionadas com microrganismos e a antracnose é uma infecção contribui com 18% do total (COSTA et al., 2011).

A antracnose é uma das doenças mais sérias do mamoeiro e não só incide sobre os frutos como também causa amarelecimento e danos aos pecíolos das folhas. É considerada a principal doença do mamoeiro no Havaí e Brasil, bem como em muitos outros países (GAYET et al., 1995; POLTRONIERI et al., 2001).

O agente causal da antracnose no mamão (*Carica papaya*) e na banana (*Musa spp.*) é atribuída aos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* Penz e *Colletotrichum musae*, respectivamente, pertencentes à classe dos fungos imperfeitos (Anamórficos), ordem Melanconiales, família Melanconiaceae (POLTRONIERI et al., 2001; THANGAMANI et al., 2011).

O sintoma típico da doença é caracterizado por lesões arredondadas, grandes, necróticas e bordos ligeiramente elevados com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada, podendo ocorrer uma podridão-mole nos frutos, prejudicando a sua comercialização (BAILEY et al., 1992, apud LIMA-FILHO, 2003).

O efeito fungitóxico foi avaliado frente ao *C. musae*, que apresentou inibição do seu crescimento em mais de 25% na presença de extrato etanólico de *Xylopiá sericea*, espécie rica em compostos do grupo dos flavonóides. A *X. sericea* foi considerada útil no tratamento de doenças em plantas (MARTINS et al., 2012).

Estudo possibilitou inferir que o óleo essencial extraído do fruto de *S. terebinthifolia* apresentou atividade fungitóxica contra o fungo *C. gloeosporioides in vitro*. O tratamento com óleo essencial *in vivo*, em mamão, se revelou eficiente contra o fungo *C. gloeosporioides* durante o período pós-colheita avaliado. Todavia, o mesmo não é indicado para o comércio em virtude da elevada perda de massa fresca e maior firmeza, e de características visuais que demonstraram sintomas de fitotoxicidade (OLIVEIRA JUNIOR, et al. 2013).

O óleo essencial de várias espécies também foi testado contra o *C. gloeosporioides*. Os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* DC. Stapf (capim limão), *Eucalyptus citriodora* Hook (eucalipto), *Mentha arvensis* L. (menta) e *Artemisia dracuncululus* L. (estragão) inibiram completamente o crescimento do micélio do *C. gloeosporioides*. O tratamento dos frutos de mamão pós-colheita com os mesmos óleos apresentou-se eficiente para o controle da antracnose (CARNELOSSI et al., 2009).

Outro estudo utilizando óleos essenciais verificou que o *C. gloeosporioides* isolado de pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) apresentou seu crescimento *in vitro* inibido pelos óleos de copaíba (*Copaifera sp.*), neem (*Azadirachta indica*), hortelã (*Mentha sp.*), andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), coco (*Cocos nucifera*), eucalipto (*Eucalyptus spp*) e pau rosa (*Aniba rosaeodora*). Esses mesmos óleos obtiveram efeito inibitório do crescimento do fungo *in vivo*, diminuindo o desenvolvimento da lesão de antracnose (SOUZA et al., 2012).

Extratos aquoso e hidroetanólico de folhas de *Myracrodruon urundeuva* e *Lafoensia pacari* apresentaram efeito fungicida para o *C. gloeosporioides* com 90% de inibição do crescimento *in vitro* (NARUZAWA & PARA, 2011).

Extratos de *Syzygium aromaticum* L. (cravo-da-índia), *Allium sativum* L. (alho), *Capsicum frutescens* Mill. (pimenta malagueta) inibiram significativamente o crescimento de *C. gloeosporioides* (SILVA et al., 2012; VENTUROSOSO et al., 2011).

A porcentagem de inibição de crescimento micelial do *C. gloeosporioides* isolados de mamão foi mais acentuada (maior que 50%) na presença de extratos hidroalcoólicos de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.), espirradeira (*Nerium oleander* L.) e eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hooker M.) e uma inibição de mais de 90% na presença de extrato aquoso de melão-de-são-caetano. Além de os extratos aquosos de *Luffa acutangula*, *Eucalyptus citriodora*, *Chenopodium ambrosioides* e *Bauhinia*, e os extratos hidroetanólicos de *Ruta graveolens*, *Eucalyptus citriodora*, *Zingiber officinale* e *Chenopodium ambrosioides* inibirem mais de 90% da germinação de esporos de *C. gloeosporioides* (CELOTO et al., 2008).

O uso intensivo e indiscriminado de defensivos agrícolas tem causado diversos problemas no meio ambiente como a contaminação de águas, solo, animais e alimentos; intoxicação de agricultores; eliminação de microrganismos responsáveis pela degradação de matéria orgânica ou de organismos utilizados em programas de controle biológico; e resistência de fitopatógenos, pragas e plantas daninhas a certos defensivos, entre outros. A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes em extrato ou óleo essencial de plantas pode se constituir uma opção para reduzir com segurança o uso de defensivos (FRANZENER et al., 2003).

Os extratos vegetais mostram-se também eficientes para serem usados como alternativas contra microrganismos fitopatogênicos (NARUZAWA & PARA, 2011; MARTINS et al., 2012; SILVA et al., 2012).

2.3 FITOTERAPIA

O Brasil detém a maior diversidade biológica do mundo, contando com uma rica flora, despertando interesses de comunidades científicas internacionais para o estudo, conservação e utilização racional destes recursos (SOUZA & FELFILI, 2006).

A grande maioria dos medicamentos, hoje disponíveis no mundo, é ou foi originado de estudos desenvolvidos a partir da cultura popular que fazem parte da rica biodiversidade brasileira um vasto campo de pesquisa científica. Da cultura popular aos cultivares controlados por profissionais conhecedores do assunto, coloca o Brasil na linha de frente no estudo e aplicação da medicina não convencional, da complementar e alternativa a partir da medicina e do conhecimento tradicional (BRASIL, 2011a).

Em 1978, a Organização Mundial da Saúde reconheceu oficialmente o uso de fitoterápicos (BRASIL, 2011a). No Brasil, a política de plantas medicinais e fitoterápicos remonta de 1981 por meio da Portaria nº 212, de 11 de setembro, do

Ministério da Saúde que, em seu item 2.4.3, define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica e, 1982, o Ministério da Saúde (PPPM/Ceme) lançou o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos para obter o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico, pelo estabelecimento de medicamentos fitoterápicos, com base no real valor farmacológico de preparações de uso popular, à base de plantas medicinais (BRASIL, 2011a).

No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Por definição, segundo o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (2011a), fitoterápicos é o produto obtido de planta medicinal, ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa.

A regulamentação em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 48/2004, que determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas.

No ano de 2008 foi encontrado um total de 512 medicamentos fitoterápicos registrados, sendo 80 fitoterápicos associados e 432 simples, ou seja, obtidos de derivados de apenas uma espécie vegetal. E foi encontrado um total de 162 espécies vegetais que possuem derivados registrados na ANVISA (CARVALHO et al., 2008).

Em 2009 o Ministério da Saúde divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que contempla 71 espécies nativas do Brasil, que possam ser cultivadas em pelo menos uma das regiões do país e que possam ser utilizadas com segurança e eficácia para o tratamento de determinada

doença, incluindo a *Schinus terebinthifolia*. Atualmente, são oferecidos fitoterápicos com recursos da União, Estados e Municípios derivados de espinheira santa, para gastrites e úlceras; e de guaco, para tosses e gripes (BRASIL, 2012).

Estudos etnobotânicos são realizados para avaliar a interação humana com todos os aspectos do meio ambiente (MARTIN, 1995), através de levantamentos nas comunidades tradicionais sobre a utilização das plantas na farmacopéia caseira e na economia doméstica. Souza & Felfili (2006) investigaram quais plantas são utilizadas pelas populações urbanas e rurais do município de Alto Paraíso de Goiás para o tratamento das enfermidades com fitoterapia e verificou que são utilizadas 103 espécies de plantas e foram citadas em comum por todos os entrevistados sete delas: carrapicho (*Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze), mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.), sendo espécies denominadas exóticas ou ruderais, de porte herbáceo/arbustivo; chapéu de couro (*Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli), arnica (*Lychnophora ericoides* Mart.), plantas nativas de porte herbáceo/arbustivo e por fim, as arbóreas nativas, jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne), tingui (*Magonia pubescens* A. St.-Hil.) e o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville).

Na região centro-norte do Estado do Rio de Janeiro 97,7% da população entrevistada por Veiga Junior (2008) utilizam plantas para fins medicinais regularmente. E no município de João Pessoa (PE), 80% dos entrevistados fazem uso de planta medicinal para uso odontológico (SANTOS et al., 2009).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes (VEIGA JUNIOR et al., 2005), sendo necessários mais estudos para que a utilização dessas plantas seja mais segura.

2.4 *Schinus terebinthifolia* RADDI

A *S. terebinthifolia* Raddi, conhecida popularmente como aroeira vermelha, é uma espécie pioneira, que pertence à família Anacardiaceae (FORZZA et al., 2010)

é nativa da América do Sul, especialmente do Brasil, Paraguai e Argentina (DEGÁSPARI et al., 2005). É encontrada em algumas partes da América Central e algumas regiões da Europa, África, Ásia e, nos Estados Unidos, ocorre no Havaí, nos Estados da Califórnia, do Arizona e da Flórida onde foi introduzida para fins ornamentais. No Brasil, ocorre espontaneamente na costa litorânea, em áreas remanescentes da Mata Atlântica, e em outros tipos de formações vegetais, devido à sua grande plasticidade ecológica (LORENZI & MATOS, 2002; SANTOS et al., 2007; CARVALHER-MACHADO, 2008).

Dependendo do ambiente, apresenta-se como arbusto ou árvore (Figura 1) com altura de até 10 metros (Lenz & Orth, 2004) e as árvores de *S. terebinthifolia* frutificam predominantemente no período de janeiro a julho (LORENZI & MATOS, 2002).

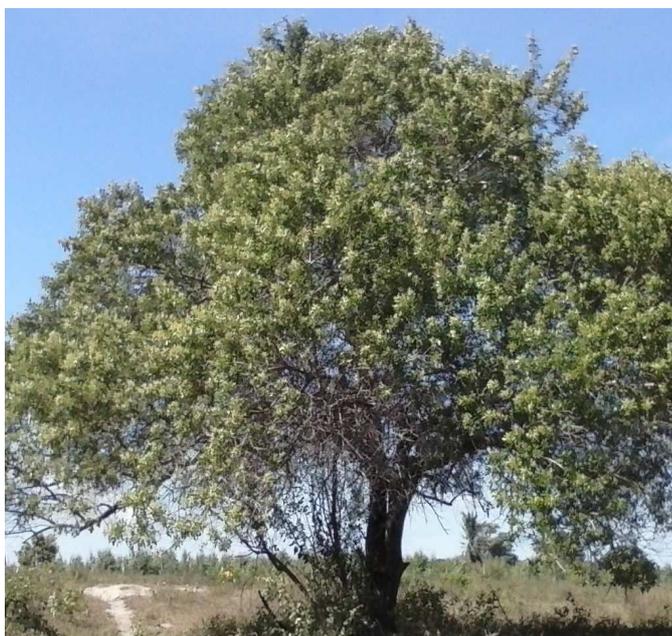


Figura 1: Aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolia* Raddi).

O interesse pela espécie se dá pelo seu metabolismo secundário que produz diversos compostos ativos entre outros compostos. Os estudos fitoquímicos de *S. terebinthifolia* detectaram a presença de compostos fenólicos simples, flavonóides e taninos, óleos essenciais, esteróides, triterpenos, antraquinonas e saponinas (LIMA et al., 2006).

Verificou-se também a presença de compostos fenólicos nos frutos. Os extratos obtidos apresentaram quantidade significativa de flavona apigenina (o qual justifica a coloração amarelada), ácido elágico e também flavanona naringina (DEGÁSPARI et al., 2005).

O seu extrato de casca de caule contém taninos, terpenos, flavonóides e saponinas, destes componentes, as propriedades potenciais e antioxidantes foram atribuídas aos flavonóides (CARVALHO et al., 2003).

El-Massry et al. (2009), estudando a composição química, no extrato etanólico, de folhas de *S. terebinthifolia* identificaram os compostos fenólicos: ácido caféico, ácido siríngico, ácido cumárico, ácido elágico, ácido galico e catequina (traço).

Em estudo fitoquímico dos constituintes fenólicos polares de *S. terebinthifolia*, foi desenvolvido o fracionamento cromatográfico do extrato em etanol das folhas de *S. terebinthifolius*, guiado pelo ensaio para detecção do potencial anti radicalar, que resultou no isolamento de cinco compostos fenólicos ativos, galato de etila, galato de metila, miricetrina, quercitrina e miricetina, cujas estruturas foram identificadas com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN (CERUKS et al., 2007).

Farag (2008), em seu estudo sobre compostos fenólicos de folhas de *S. terebinthifolia* isolou e identificou pela primeira vez dois ésteres de ácido quínico: 5-O-ácido cafeoilquínicos e 5-O-ácido cumaroilquínicos; três glicosídeos miricetina: miricetina-3-O-alfa-L-ramnopiranosil (1" \rightarrow 6") beta-D-galactopiranosídeo, miricetina-3-O-beta-D-glicuronídeo e miricetina 3-O-beta-D-galactopiranosídeo; 1,6-digalloyl-beta-D-glicose e (+)-catequina.

Extrato metanólico de folhas de *S. terebinthifolia* foi fracionado e na fração acetato de etila foram identificados como principais compostos o ácido gálico, o galato de metila e o 1,2,3,4,6-pentagalactoilglicose. Esta fração possui ação anti-alérgica, a qual inibi a liberação de histamina durante a degranulação dos mastócitos, diminuindo a formação de edema e influxo de eosinófilos (CAVALHER-MACHADO et al., 2008).

No óleo essencial extraído de frutos de aroeira contém um total de 73 compostos, incluindo os do grupo dos terpenos, como α -pineno, β -pineno, α -felandreno, β -felandreno, limoneno, α -terpinol e p-cimeno (RICHTER et al., 2010; BENDAOUD et al., 2010). Já no óleo essencial extraído de folhas os principais compostos identificados foram e p-7-cimenol, 9-epi-(E)- cariofileno, carvona e verbenona (SILVA et al., 2010).

Tomando-se como base os estudos de Ceruks et al. (2007), Farag (2008) e El-Massry et al. (2009) e, correlacionando esses dados à triagem fitoquímica preliminar desenvolvida, referente aos grupos de substâncias fenólicas no extrato, pode-se prever a existência dessas substâncias na amostra estudada. Carvalho et al. (2009), em seus estudos, desenvolveram um método de cromatografia líquida (simples, preciso, específico e sensível) para quantificação de ácido gálico, como marcador, a partir de matérias-primas e produtos finais, de *S. terebinthifolia*.

A literatura etnobotânica cita o uso das cascas, com base na tradição popular, na forma de cozimento (decocto), especialmente pelas mulheres, em banhos de assento após o parto e como anti-inflamatório e cicatrizante, ou como medicação caseira contra febre e para o tratamento de doenças do sistema urinário e do aparelho respiratório, bem como nos casos de hemoptise (expectoração sanguínea ou sanguinolenta), afecções e hemorragias uterinas (GRUENWALD et al., 2000; LUCENA et al., 2006). Da casca, extrai-se o óleo empregado contra tumores e doenças da córnea (DEGÁSPARI et al., 2005). Segundo Santos et al. (2009), em um estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais, destacou-se a aroeira dentre as mais vendidas pelos raizeiros, devido aos relatos de uso sobre a atividade cicatrizante e anti-inflamatória em afecções bucais. O hidrolato de um preparado medicamentoso, composto por três plantas, entre elas, o *S. terebinthifolia*, mostrou propriedades antiinflamatórias (MEDEIROS et al., 2007).

Além das cascas, as folhas também são usualmente preparadas na forma de decocto com finalidade expectorante, antisséptica, antidiarréica e cicatrizante (RODRIGUES & CARVALHO, 2001; DI-STASI & HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI & MATOS, 2002).

O efeito cicatrizante de extratos de folhas de *S. terebinthifolia* foi estudado por Ribas et al. (2006), as lesões mostraram fechamento epitelial acelerado, maior proliferação vascular e fibroblástica, comprovando um efeito positivo no processo de cicatrização tecidual. O extrato hidroalcoólico de entrecasca de aroeira também apresentou efeito cicatrizante nas cistotomias de ratos (LUCENA et al., 2006). No entanto, o extrato hidroalcoólico de entrecasca de aroeira não alterou o processo de cicatrização do estômago quanto à avaliação macroscópica, tensiométrica e microscópica (SANTOS et al., 2006). Nunes Junior et al. (2006) também avaliaram a cicatrização da linea alba de ratos após injeção intraperitoneal de extrato hidroalcoólico de entrecasca de aroeira, o extrato não alterou a cicatrização na análise macroscópica e induziu a aumento da carga máxima de ruptura e deformação máxima da linha alba na análise tensiométrica. A análise histológica determinou efeito cicatrizante.

Foi comprovada também, em estudos clínicos a ação terapêutica em cervicites e cérvico-vaginites crônicas, utilizando tampões intravaginais, em contato com a cérvix durante 24 horas (LIMA et al., 2006).

Os efeitos antiproliferativo de polifenóis purificados de folhas de *S. terebenthifolius* Raddi foram investigados com linhagens de células de carcinoma da próstata humana mostraram que fração purificada a partir de extracto de folha contendo polifenóis inibiram a proliferação de células 30 vezes mais em relação ao extrato bruto. A fração com polifenóis também demonstrou induzir a apoptose e a parada de crescimento celular (QUEIRES et al., 2006).

O óleo essencial de *S. terebenthifolius* é rico em terpenos, do qual foi isolado o α -pineno testado em cultura de células de melanoma e foi capaz de induzir a apoptose dessas células, por meio da interrupção precoce do potencial mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio, aumento da atividade da caspase-3, agregação de heterocromatina, fragmentação do DNA genômico e exposição de fosfatidilserina à superfície celular. O α -pineno também apresentou um potente efeito antimetastático (MATSUO et al., 2011).

Em estudo randomizado, 72 pacientes com gastrite confirmada, que fizeram tratamento oral com aroeira, apresentaram melhora percentual da náusea, da azia e da dor epigástrica superior aos tratados com omeprazol e o desaparecimento da lesão gástrica foi semelhante aos pacientes tratados com omeprazol (SANTOS et al., 2010). Compostos obtidos a partir da decocção de casca de caule apresentou ação antiulcerogênica, mostrando ser útil para tratamento de doenças gástricas (CARLINI et al., 2010).

As folhas e frutos podem ser adicionados à água de lavagem de feridas e úlceras, para limpeza de pele e de ação bactericida e fungicida (GRUENWALD et al., 2000; DEGÁSPARI et al., 2005).

Tratamento de vaginose bacteriana com gel de aroeira mostrou-se efetivo e seguro. Além disso, apresentou potenciais efeitos benéficos na flora vaginal (AMORIM & SANTOS, 2003).

Melo Junior et al. (2000) testou a atividade antimicrobiana de dezessete plantas medicinais em osteíte alveolares induzidas em ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar). Dentre as plantas estudadas, o extrato da casca da *S. terebinthifolia* Raddi foi uma das que apresentou maiores halos de inibição. Os testes bacteriológicos mostraram que a *Schinus terebinthifolia* Raddi apresentou atividade em todas as bactérias gram-positivas estudadas (*Enterococcus* do grupo D, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus* não do grupo A.B.D., Bacilo gram-positivo corineforme), porém em nenhuma gram-negativa (*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*). Nos microrganismos em que ele apresentou atividade *in vitro*, os resultados, quando não superiores, foram similares aos da gentamicina, que foi o antibiótico utilizado como controle positivo.

Das quatro espécies de bactérias ensaiadas por Santos et al. (2007), todas elas foram sensíveis aos extratos hidroalcolóicos de *S. terebinthifolia* Raddi obtidos de casca tratada e não tratada mas concentrações de 27mg/ml. Porém a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato, obtido de cascas tratadas por autoclave a 121°C por 15 min, para *E. coli*, *B. subtilis* foi de 27mg/ml. Os outros extratos de cascas não tratadas e de cascas tratadas por autoclave a 121°C por 20

minutos apresentou uma CIM de 13,5 mg/ml para *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

Por meio de observação de osteíte alveolar induzida em ratos, Melo Junior et al. (2000) constataram que a *S. terebinthifolia* Raddi apresentou atividade antimicrobiana semelhante ao antibiótico gentamicina, neoformação óssea significativa em seis dias, quando comparado ao grupo controle, e melhor regeneração do alvéolo dentário.

Degáspari et al. (2005) estudaram a atividade antimicrobiana de *S. terebinthifolius* Raddi que demonstrou efeito inibitório às cepas de *S. aureus* ATCC 6538 e do *Bacillus cereus* ATCC 11778.

Segundo Santos et al. (2010) o óleo essencial de *S. terebinthifolia* apresenta efeito fungicida contra *Botrytis* spp. e pode-se inibir o crescimento dos fungos utilizando diluições superiores a 10% para *Colletotrichum* spp. e inferiores a 10% para *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. e *Botrytis* spp.. Em um estudo realizado, Schmourlo et al. (2005) relataram a atividade antifúngica dos extratos aquosos de *Schinus terebinthifolius* e *Schinus molle* sobre a espécie de levedura *Candida albicans*.

O tratamento com a tintura da aroeira foi eficaz no tratamento da estomatite protética, promovendo remissão do processo inflamatório e da infecção por *Candida* spp. (SOARES et al., 2010).

Ensaio de toxicidade foram realizados e detectados que a resina produzida por esta planta, em contato com a pele causa dermatite alérgica (MORAES et al., 2004). Testes de toxicidade aguda e dose letal mediana (DL50) de extratos de frutos de Pimenta-do Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolia* Raddi) mostraram segurança quanto à inocuidade para o consumo humano (PIRES et al., 2004). Ingestão oral do produto fitoterápico composto pelas plantas medicinais *S. terebinthifolia* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill até 45 ml ao dia e durante dois meses, foi bem tolerada, não apresentando alterações clínicas, laboratoriais e nem reações adversas significantes (PAULO et al., 2009).

Em estudo com camundongos para avaliação da toxicidade da *S. terebinthifolia*, na forma de decocto de casca de caule, mostrou-se não interferir no ganho de peso e na capacidade de acasalamento e fertilidade, além de não interferir no número de gestações e no tamanho da ninhada. No entanto, a prole apresentou malformações ósseas, quando as fêmeas grávidas receberam o chá. A taxa de lipídeos totais foi reduzida, assim como o número de eritrócitos, a quantidade de hemoglobina e o hematócrito. Portanto, existe um potencial tóxico do chá de casca de caule, principalmente durante a gestação (CARLINI et al., 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas e cascas de caule de *S. terebinthifolia* Raddi foram coletadas no município de São Mateus, ES (18° 47' 0.489" LS 39° 48' 17.640" LW) em março de 2013 e comparadas com o exemplar número 29.461 (coletor Machado Filho, C.) depositado no Herbário VIES Setorial do Centro Universitário Norte do Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A preparação dos extratos foi realizada nos laboratórios de química da Faculdade Pitágoras de Linhares.

Após a colheita as folhas e cascas de caule foram organizadas em camadas de papel e levadas à estufa de circulação de ar a uma temperatura fixa de 45 °C, até a secagem total do material.

Para escolha do método de extração foram realizados métodos de extração preliminares como infusão (solvente água), maceração (solvente etanol), percolação (solvente etanol) e extração com aparelho de Soxhlet (solvente diclorometano).

O método de maceração foi classificado como melhor escolha, por possibilitar a maior extração de compostos do metabolismo secundário dos materiais testados, verificado pelos testes de triagem fitoquímica.

3.2.1 Extratos com solventes de polaridade crescente

As folhas secas trituradas (150g) foram maceradas com hexano (1000 mL), realizada por oito dias em temperatura ambiente. A suspensão resultante foi filtrada em gaze e algodão e posteriormente em papel de filtro. A torta (material vegetal

após filtração) remacerada por mais duas vezes em hexano (1000 mL), com a finalidade de esgotar todos os compostos solúveis neste solvente. Em seguida o mesmo procedimento foi adotado para os solventes diclorometano e etanol (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Para a casca de caule triturada (300g) foram os mesmos procedimentos adotados para folhas.

Os filtrados seguiram para evaporação, utilizando-se evaporador rotatório, com a temperatura do banho-maria mantida em 45 ± 1 °C, sob pressão reduzida. Em seguida, os extratos foram transferidos para recipientes para evaporação até a secura (SIMÕES et al., 2007).

Os extratos secos obtidos foram pesados para obtenção dos rendimentos e nomeados de: fração hexano folha (FHF1), fração diclorometano folha (FDF1), fração etanol folha (FEF1), fração hexano casca (FHC1), fração diclorometano casca (FDC1) e fração etanol casca (FEC1).

3.2.2 Frações do extrato etanólico

O extrato etanólico bruto foi preparado utilizando 150g de folhas secas e trituradas acrescidas de 1000 mL de etanol absoluto. Para casca foi utilizado 300g. A maceração teve duração de oito dias em temperatura ambiente. A suspensão resultante seguiu para filtração em gaze e algodão e posteriormente em papel de filtro. Os filtrados foram evaporados, utilizando-se evaporador rotatório, com a temperatura do banho-maria mantida em 45 ± 1 °C, sob pressão reduzida, até o volume de 100 mL.

Para cada extrato concentrado (extrato etanólico bruto das folhas e extrato etanólico bruto das cascas de caule) adicionou-se 15 ml de água destilada e foram transferidos para um funil de separação. Acrescentou-se 100 mL de hexano e, após agitação, permaneceu em repouso para decantação e separação das fases. As fases foram separadas e em seguida adicionado mais 100 mL de hexano na fase

etanol-água. O processo de partição líquido-líquido foi realizado em triplicata para garantir a maior separação. O mesmo procedimento foi realizado para a fase etanol-água, utilizando o solvente diclorometano. As três fases obtidas (hexano, diclorometano e etanol-água) foram evaporadas até a secura em temperatura ambiente sob exaustão (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Os extratos secos obtidos foram pesados para obtenção dos rendimentos e nomeados de: fração hexano folha (FHF2), fração diclorometano folha (FDF2), fração etanol folha (FEF2), fração hexano casca (FHC2), fração diclorometano casca (FDC2) e fração etanol casca (FEC2).

3.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA

A triagem fitoquímica foi realizada no laboratório de farmacognosia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) campus Maruípe.

A triagem fitoquímica foi feita a partir dos extratos etanólicos brutos obtidos por maceração para folha e casca de aroeira. Os ensaios foram conduzidos para as seguintes classes químicas: cumarinas, terpenos, esteróides, alcalóides, taninos (inclusive taninos pirogálicos, taninos pirocatéquico, taninos gálicos), flavonóides e saponinas. A classificação dos grupos de metabólitos secundários foi realizada por meio de reações químicas que resultaram no desenvolvimento de cor e/ou precipitado (COSTA, 1982; COSTA, 1986; SIMÕES, 2004; WAGNER, 1984).

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES

Esta análise foi realizada no laboratório de farmacognosia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) campus Maruípe.

Para obter a curva de calibração, foi dissolvido 25,0 mg de rutina em metanol, completando-se o volume para 50,0 mL, obtendo-se concentração final de 0,5 mg/mL. Desta solução foram retiradas cinco alíquotas (0,25 mL, 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5

mL e 2,0 mL) e transferidos, separadamente, em balões volumétricos de 25,0 mL. Cada um destes volumes foi completado para 2,0 mL de metanol e, em seguida, foram acrescentados, em cada balão volumétrico, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL de solução aquosa de piridina (20:80), 2,5 mL de solução a 6,5% de cloreto de alumínio em metanol. Completou-se o volume para 25,0 mL com água destilada. Após 30 minutos, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando como solução branco todos os reagentes anteriores (exceto rutina e cloreto de alumínio) para zerar o aparelho.

Os flavonóides das amostras foram quantificados nas amostras das frações FDC1, FEC1, FDF1 e FEF1. Pesou-se 25,0 mg de cada fração separadamente. Na sequência, a amostra foi diluída com 15 mL de metanol, e completou-se o volume para 50 mL com metanol em um balão volumétrico. Desta solução, foi retirada uma alíquota de 3000,0 µL, verteu-se em um balão de 25,0 mL e completou-se seu volume para 2,0 mL com metanol. Em seguida, foram acrescentados 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL de solução aquosa de piridina (20:80), 2,5 mL de solução 6,5% de cloreto de alumínio em metanol. Completou-se o volume para 25,0 mL com água destilada. Após 30 minutos, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando como solução branco todos os reagentes anteriores (exceto o extrato e cloreto de alumínio) para zerar o aparelho (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

3.5 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

3.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para bactérias

Os testes de CIM foram executados no laboratório de microbiologia da Faculdade Pitágoras de Linhares e a identificação da cepa bacteriana, bem como o teste de antibiograma foram realizados no Laboratório Trevisan em Linhares.

A cepa bactéria testada foi isolada de uma amostra de urina humana e identificada como *Staphylococcus aureus* através dos testes de coloração de Gram, catalase e coagulase. O *S. aureus* foi submetido ao teste de antibiograma com os

antibióticos Sulfazotrim, Cefoxitina, Ciprofloxacina, Nitrofurantoina, Cefalexina, Tetraciclina, Gentamicina, Ácido Nalidíxico, Ácido Pipemídico e Amoxicilina.

Os testes foram realizados por microdiluição em caldo Mueller-Hinton, de acordo com metodologia padrão (NCCLS, 2003). A cepa de *S. aureus* foi mantida em caldo Mueller-Hinton por 24 horas em temperatura de 37 ± 1 °C antes do início dos testes. O inóculo foi diluído em solução salina a fim de se obter uma suspensão contendo $1,0 \times 10^8$ a $5,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, comparando, pela turbidez, com tubo de 0,5 na escala de McFarland.

O extrato vegetal foi preparado para a utilização nos testes antimicrobianos, em duas diluições sequenciais. Primeiramente pesou-se $2,0 \times 10^4$ µg dos extratos secos de aroeira (FEF1, FEF2, FDF2, FEC1, FEC2 e FDC2) e adicionou-se 1,0 mL de solução de NaCl 0,9%. Em seguida 100,0 µL desta solução foram transferidos para um tubo Ependorff e então adicionados 900,0 µL de solução de NaCl 0,9% obtendo uma concentração de 2.000 µg.mL⁻¹.

Foram utilizadas microplacas de 96 poços para os testes, dividindo-se os poços em 12 colunas (1 a 12) e oito linhas (A a H), uma placa para cada fração. Em cada poço foram adicionados 100 µL de caldo Müller-Hinton estéril.

Conforme Tabela 1, as linhas de “A” a “E” até as colunas um a nove foram utilizadas para os testes com o extrato em análise, perfazendo-se assim um teste em quintuplicata. Nos poços da coluna um foram transferidos 100,0 µL do extrato vegetal a 2.000 µg.mL⁻¹, para se obter uma concentração de 1.000 µg.mL⁻¹ em cada poço. De cada um destes poços foram pipetados 100,0 µL e transferidos para o poço seguinte (coluna dois), resultando em uma diluição na qual a concentração foi reduzida à metade.

O mesmo procedimento foi repetido até os poços da coluna nove, no qual foi obtida a menor concentração do extrato, 3,9 µg.mL⁻¹. Em seguida foram adicionados 10,0 µL da suspensão bacteriana previamente preparada em cada poço. Cada microplaca foi utilizada para se testar uma fração dos extratos vegetais. As

microplacas então foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas em temperatura de 37 ± 1 °C.

Tabela 1: Esquematização para procedimento de teste de concentração inibitória mínima.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1000,0 µg/mL	500,0 µg/mL	250,0 µg/mL	125,0 µg/mL	62,5 µg/mL	31,25 µg/mL	15,6 µg/mL	7,8 µg/mL	3,9 µg/mL	CB	CM	CE
A	EMB	EMB	EMB	EMB	BEM	EMB	EMB	EMB	EMB	MB	M	ME
B	EMB	EMB	EMB	EMB	BEM	EMB	EMB	EMB	EMB	MB	M	ME
C	EMB	EMB	EMB	EMB	BEM	EMB	EMB	EMB	EMB	MB	M	ME
D	EMB	EMB	EMB	EMB	BEM	EMB	EMB	EMB	EMB	MB	M	ME
E	EMB	EMB	EMB	EMB	BEM	EMB	EMB	EMB	EMB	MB	M	ME

EMB = Extrato + Meio + Bactéria; CB = Controle da Bactéria; MB = Meio + Bactéria; CM = Controle do Meio; M = Meio; CE = Controle do Extrato; ME = Meio + Extrato.

3.5.2 Controle dos ensaios antibacterianos

As colunas 10 a 12 da microplaca foram utilizadas como controle da ausência de interferentes que alteram os resultados dos testes. Nos poços da coluna 10 foram inseridos o meio de cultura e 10,0 µL da suspensão bacteriana, o que constituiu o controle do microrganismo. Os poços da coluna 11 foram utilizados como controle do meio de cultura nos quais foi adicionado apenas o caldo Mueller-Hinton estéril. Nos poços da coluna 12 foram adicionados o meio de cultura e 100,0 µL da solução do extrato vegetal a $1.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para verificar a ocorrência de alguma contaminação através do material vegetal.

3.5.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após o teste de microdiluição, foram coletados 10,0 µL de todos os poços que apresentaram inibição bacteriana e transferidos para placa de Petri contendo agar Müller-Hinton, seguindo-se incubação por 24 horas em estufa bacteriológica, em temperatura de 37 ± 1 °C. De acordo com o desenvolvimento bacteriano foi estabelecida a CBM. Os testes que mantiveram a ausência de crescimento em agar Mueller-Hinton foram considerados bactericida e os testes que houve crescimento em agar Mueller-Hinton foram considerados bacteriostáticos.

3.5.4 Determinação da atividade fungicida

Os fungos testados foram *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, isolados a partir dos frutos de mamão e banana, respectivamente. O isolamento direto a partir de frutos coletados na região e a identificação foram executados no Laboratório de Fitopatologia do Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) - UFES pelo fitopatologista Professor Doutor Marcelo Barreto da Silva. O procedimento foi realizado pela raspagem da lesão no fruto e introdução no meio BDA (Batata Dextrose Agar) em placas de Petri, as quais foram incubadas a 25 ± 2 °C até a formação micélio. Os isolados foram identificados, com análise das características do micélio e da microscopia dos esporos e repicados em placas de Petri, utilizando discos de 6 mm de diâmetro do micélio. A incubação das placas foi por sete dias.

Para a determinação da atividade fungicida dos extratos, foram solubilizados 35 mg do extrato em 100 µL de etanol e água destilada estéril suficiente para cinco mL. A solução foi adicionada em 30 mL de BDA fundente estéril para obtenção da concentração de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O meio de cultura foi vertido em três placas de Petri estéreis (triplicata), onde foi transferido para o centro da placa um disco de seis mm de diâmetro de micélio do fungo. As placas foram vedadas com filme PVC e mantidas em BOD a 25 ± 2 °C. Após cinco dias, o crescimento radial do fungo foi avaliado, considerando o diâmetro médio da colônia, com auxílio de uma régua milimetrada, medindo-se o diâmetro da colônia formada em dois sentidos ortogonais.

Para o controle negativo foram preparadas placas de Petri com BDA acrescidos da mistura 100 µL de etanol e quantidade suficiente de água para cinco mL. A estas placas foram transferidos os discos de 6 mm do micélio, e incubadas de acordo com a metodologia anterior.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias dos diâmetros dos micélios dos fungos avaliados foram comparadas utilizando o teste de Tukey com 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de maceração escolhido para obter os extratos foi o que apresentou a maior extração de compostos do metabolismo secundário de plantas. O extrato etanólico obtido por maceração foi submetido aos testes para identificação de cumarinas, terpenos, esteróides, alcalóides, taninos, flavonóides, naftoquinonas e saponinas. Os resultados para cada parte da planta estão apresentados na Tabela 2.

No extrato das cascas de caule foram detectados terpenos, alcalóides, taninos, taninos pirogálicos, taninos gálicos, flavonóis e saponinas. Estes resultados corroboram com os resultados de Lima et al. (2006) que encontraram os compostos fenólicos, triterpenos, antraquinonas e saponinas, porém não detectaram nenhum tipo de flavonóides. Carlini et al. (2010) verificaram a presença de taninos gálicos (43,5%) em extrato aquoso de casca de caule de aroeira.

Para os testes com extrato etanólico de folhas verificou-se a presença de esteróides, alcaloides, taninos, taninos pirocatéquicos, taninos gálicos, isoflavonas e saponinas. Para extrato etanólico de folhas, Lima et al. (2006) detectaram a presença de fenóis, flavononas, flavonóides, leucoantocianidinas e esteróides livres, porém não encontraram saponinas. No entanto, Johann et al. (2007) encontraram saponinas, flavonóides e triterpenos ou esteróides e taninos. Um estudo de Queires et al. (2006) utilizou polifenóis isolados extraídos de folhas de *S. terebinthifolia*.

Portanto, ao observar os grupos de metabólitos secundários percebe-se que folha e casca de caule de aroeira possuem semelhante composição, apresentando nas duas partes alcalóides, taninos, flavonóides e saponinas. Porém, nas folhas encontram-se esteróides enquanto nas cascas de caule encontram-se terpenos.

Dos compostos fenólicos ativos encontrados em folhas de aroeira destacam-se o galato de etila, o galato de metila, a miricetrina, a quercitrina e a miricetina (CERUKS et al., 2007).

Segundo Cowan (1999) as principais classes de metabólitos secundários de plantas com ação antimicrobiana são compostos fenólicos (fenóis simples, fenóis

ácidos, quinonas, flavonóides, flavonas, flavonóis, taninos e cumarinas), terpenóides, alcalóides, lecitinas e polipeptídeos e poliacetilenos.

Tabela 2: Classes de compostos detectados nos extratos etanólicos de casca de caule e folha de *S. terebinthifolia*.

Classes de compostos	Parte da planta (<i>S. terebinthifolia</i>)	
	casca	folha
Cumarinas	-	-
Terpenos	+	-
Esteróides	-	+
Alcalóides	+	+
Taninos	+	+
Taninos pirogálicos	+	-
Taninos pirocatéquicos	-	+
Taninos gálicos	+	+
Flavonóis	+	-
Isoflavonas	-	+
Naftoquinonas	-	-
Saponinas	+	+

Em ambos os extratos etnólicos (folhas e casca de caule) foram identificados flavonóides. Os flavonóides foram então quantificados pelo método de espectrofotometria com luz ultravioleta nas frações FDC1, FEC1, FDF1 e FEF1. As frações FHC1 e FHF1 não foram quantificadas, já que este solvente extrai somente os óleos, as gorduras, os esteróides e os pigmentos. A extração sequenciada com o diclorometano permite recuperar as agliconas livres pouco polares (flavonas, flavonóis, falvononas, di-hidroflavonóis, isoflavonas e outras agliconas com alto grau de metilação), que poderiam ser encontradas na planta. Por fim, a extração com etanol possibilita extrair as agliconas poli-hidroxiladas, flavonas e flavonóis mais polares, auronas e chalconas (SIMOËS et al., 2007).

A Figura 2 exibe os valores de concentração dos flavonóides de cada fração quantificada em função da curva de calibração do padrão Rutina. Nos extratos de folha foi onde se encontrou a maior quantidade de flavonóides, sendo que nas frações FEF1 e FDF1 a concentração foi mais acentuada, representando as duas

frações um total de 3,53% (em massa) de flavonóides. Nas frações casca (FEC1 e FDC1) este valor cai para 0,64% (em massa).

Para os frutos e casca de frutos de aroeira Bernardes et al. (2011) quantificaram os compostos fenólicos totais e encontraram os valores de 125,4 $\mu\text{g/mL}$ para frutos e 122,0 $\mu\text{g/mL}$ para casca de frutos.

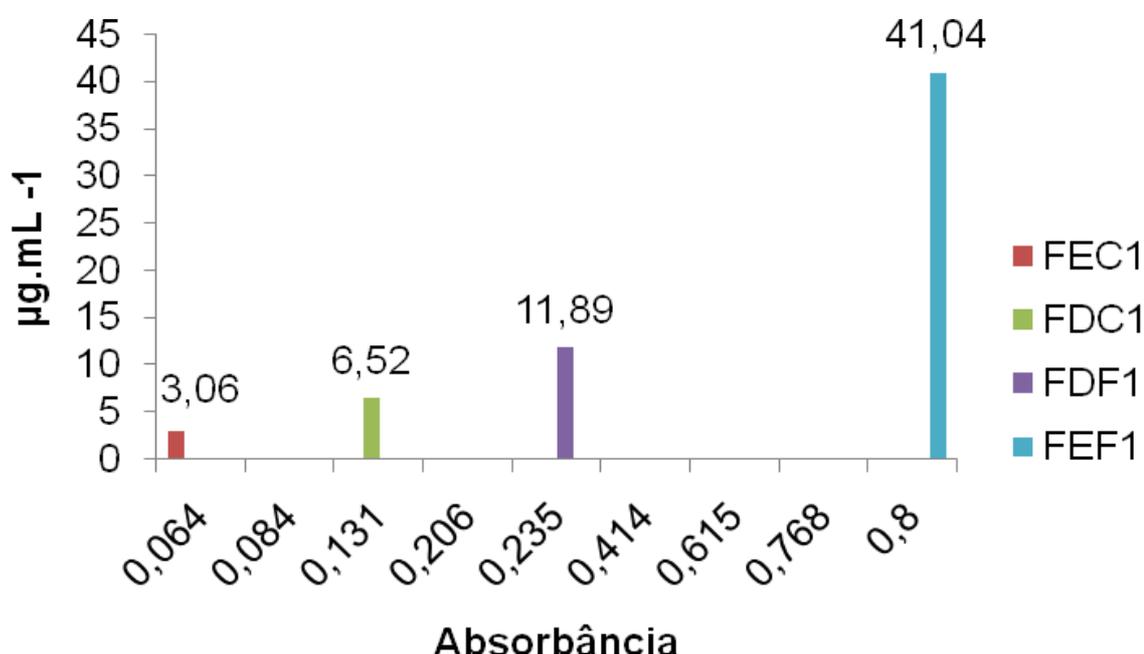


Figura 2: Concentração de flavonóides equivalente-grama de Rutina em frações dos extratos das folhas e das cascas de caule de *S. terebinthifolia*. Os valores de concentração foram calculados baseados nas absorbâncias do padrão Rutina segundo equação $y = 50,66x - 0,148$. FEC1 = fração etanol casca 1, FDC1 = fração diclorometano casca 1, FDF1 = fração diclorometano folha 1 e FEF1 = fração etanol folha 1.

Com relação aos rendimentos dos extratos obtidos com solventes de polaridade crescente e pelo fracionamento do extrato etanólico, os resultados estão representados nas Figuras 3 e 4.

Para os extratos obtidos com solvente de polaridade crescente, a Figura 3 mostra os rendimentos das frações hexano, diclorometano e etanol, obtidos a partir das folhas de aroeira, com as respectivas porcentagens, 7,83%, 2,25% e 3,71%. Na

Figura 4, podem ser observados os rendimentos para as frações extraídas com os mesmos solventes, hexano (5,73%), diclorometano (1,1%) e etanol (1,33%), a partir das cascas de caule de aroeira. Ao avaliar os rendimentos para este tipo de extração verifica-se que tanto nas folhas, quanto nas cascas existe uma maior quantidade em massa de compostos poucos polares, que se dissolveram no hexano, seguido de uma quantidade intermediária de compostos polares, que se dissolveram no etanol e por fim uma menor quantidade de compostos de polaridade intermediária, que se dissolveram no diclorometano.

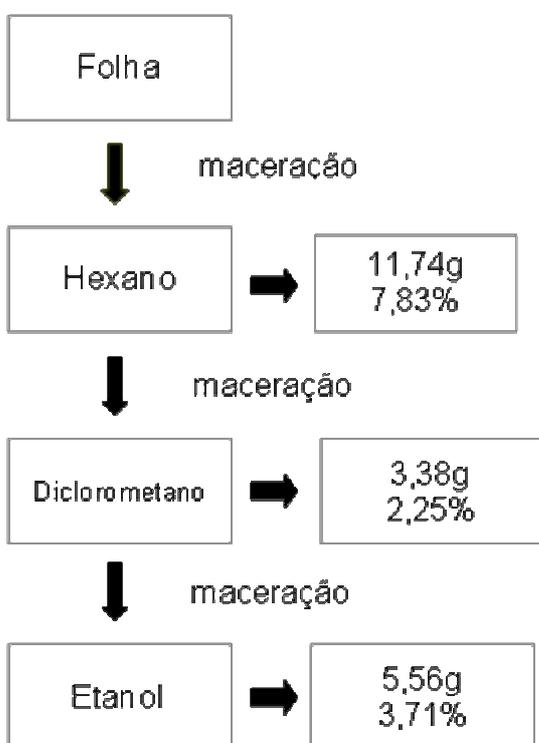


Figura 3: Esquemática da extração com solventes de polaridades diferentes, mostrando o rendimento dos extratos secos a partir das folhas de *S. terebinthifolia* Raddi.

Avaliando as frações obtidas a partir do extrato etanólico bruto pelo método de partição líquido-líquido, são mostrados na Figura 5 os rendimentos das frações hexano (0,55%), diclorometano (0,46%) e etanol (1,5%), para o extrato etanólico a partir de folhas de aroeira. No extrato a partir de folhas, observa-se que a maior quantidade de compostos extraídos pelo etanol é de baixa polaridade, que ficaram contidos na fração hexano, uma pequena porção dos compostos extraídos é de polaridade intermediária, que fazem parte da fração diclorometano e os compostos

mais polares, presentes na fração etanol, apresentaram-se numa percentagem inferior comparada aos compostos de baixa polaridade. Na figura 6, observam-se os rendimentos das frações hexano (4,53%), diclorometano (0,53%) e etanol (3,72%), para o extrato etanólico a partir das cascas de caule de aroeira. Neste extrato, encontram-se maior massa de substâncias de maior polaridade, contida na fração etanol, seguido de substâncias de baixa polaridade e por fim substâncias de polaridade intermediária.

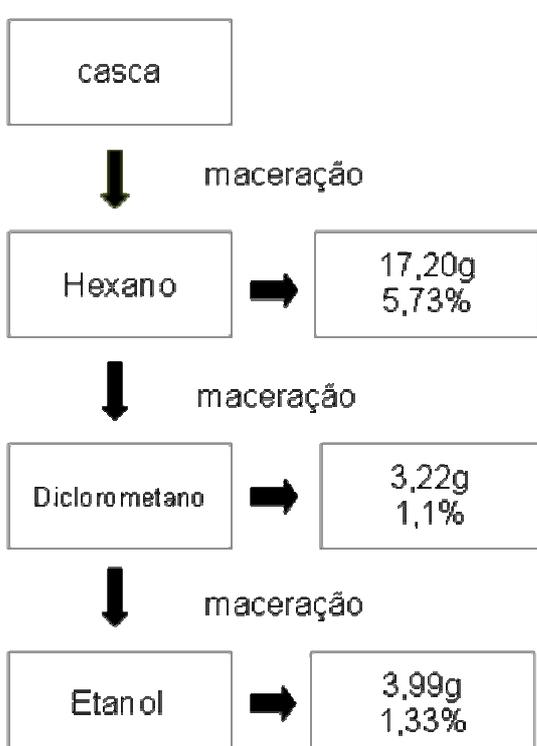


Figura 4: Esquematisação da extração com solventes de polaridades diferentes, mostrando o rendimento dos extratos secos a partir das cascas de caule de *S. terebinthifolia* Raddi.

Os extratos secos FEC1, FEC2, FDC2, FEF1, FEF2 e FDF2 foram solubilizados para preparar soluções de concentrações de 2 mg.mL⁻¹. Somente estas frações foram possíveis solubilizar, já que o solvente utilizado foi DMSO e salina. As outras frações por serem pouco polares necessitariam de um veículo pouco polar ou a utilização de um tensoativo, para obtenção de uma emulsão (ANSEL, 2000). Seria necessário um estudo para encontrar a melhor maneira de solubilizar estas frações pouco polares, possibilitando executar testes

microbiológicos que utilizam meios de cultura de veículo aquoso, como nas preparações com óleo essencial de *S. terebinthifolia* Raddi que utilizaram o tensoativo Tween 80 a 8% (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013; GRIPPA et al., 2010).

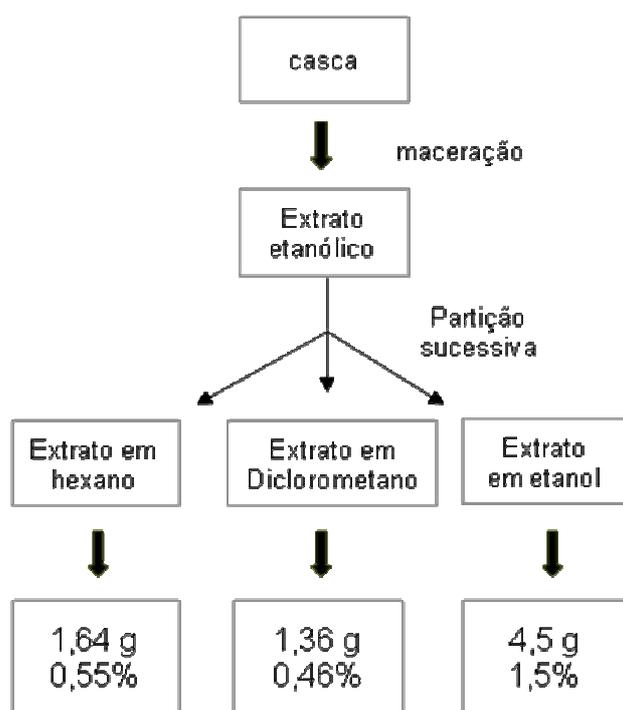


Figura 5: Esquemática do fracionamento do extrato etanólico com solventes de polaridade crescente, mostrando o rendimento dos extratos secos a partir das cascas de caule de *S. terebinthifolia* Raddi.

A cepa de *S. aureus*, utilizada no teste de concentração inibitória mínima (Tabela 3) foi identificada pelos resultados de classificação como Gram-positiva, teste da catalase positivo e teste da coagulase positivo. Esta cepa também foi submetida ao teste de sensibilidade aos antibióticos, mostrando-se sensível a todos os antibióticos testados (Sulfazotrim, Cefoxitina, Ciprofloxacina, Nitrofurantoina, Cefalexina, Tetraciclina, Gentamicina, Ácido Nalidíxico, Ácido Pipemídico, Amoxicilina).

Os resultados de CIM foram apresentados como bacteriostático e bactericida. Os resultados considerados bacteriostáticos foram aqueles testes em que não houve crescimento nas microplacas, porém cresceram ao serem transferidos para as placas de Petri com meio sólido sem adição de extrato e bactericida aqueles testes

em que não houve nenhum crescimento. Observa-se na Tabela 3 que na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ todas as frações apresentaram efeito bactericida, com exceção da FDC2 e da FDF2. É possível perceber também que o método de preparação das frações com solventes de polaridades crescentes ou pelo método de partição líquido-líquido do extrato etanólico não influenciou no efeito sobre a bactéria, cujo resultado foi semelhante quando se comparam as FEF1 e FEF2.

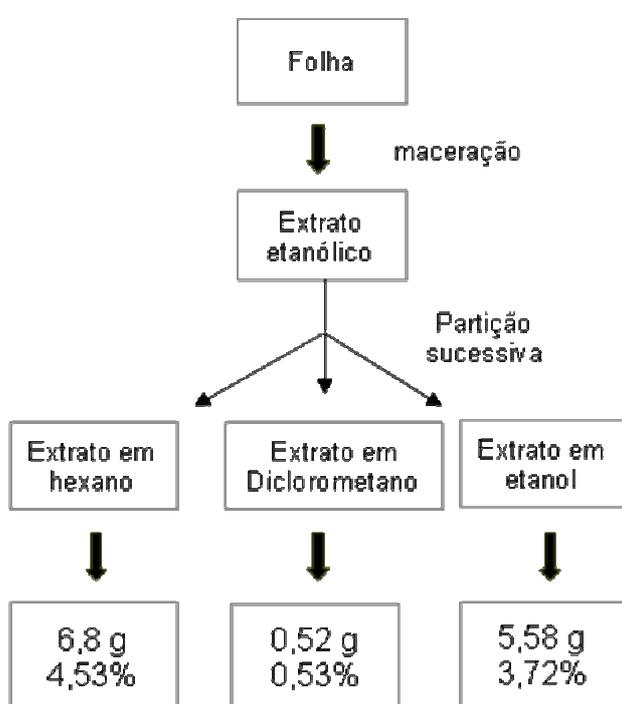


Figura 6: Esquematização do fracionamento do extrato etanólico com solventes de polaridade crescente, mostrando o rendimento dos extratos secos a partir das folhas de *S. terebinthifolia* Raddi.

Os flavonóides também presentes nos extratos de casca de caule e de folha de *S. terebinthifolia* possivelmente contribuíram para o efeito bactericida e bacteriostático do *S. aureus*. Estudos já demonstram os prováveis mecanismos de ação antibiótica dos flavonóides, atuando através da inibição da função da membrana plasmática, da inibição da DNA girase e da atividade da proteína carreadora de β -hidroxiacil-acil (CUSHNIE & LAMB et al., 2005).

O extrato aquoso de casca de caule de aroeira produz danos ao DNA e mutações nas bactérias e outros danos oxidativos que podem ser responsáveis pela genotoxicidade. Tanto o potencial mutagênico quanto as propriedades antioxidantes tem sido atribuídos à presença dos flavonóides neste extrato (CARVALHO et al. 2003). Ensaio com cultura de células e bactérias indicam que as frações enriquecidas com flavonóides e os flavonóides da casca do caule de *S. terebinthifolia* Raddi têm propriedades genotóxica (VARELA-BARCA et al., 2007).

Verifica-se, portanto, que tanto as cascas quanto as folhas possuem compostos capazes de inibir o crescimento bacteriano. A sensibilidade da bactéria às frações das duas partes da planta também pode estar relacionada à presença de taninos, que são compostos fenólicos que precipitam proteínas, propiciando um efeito antimicrobiano (SIMÕES, 2007).

Tabela 3: Resultado do teste de concentração inibitória mínima para *S. aureus*.

	<i>S. terebinthifolius</i>					<i>S. aureus</i>					CB	CM	CE
	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62,5 µg/mL	31,25 µg/mL	15,5 µg/mL	7,8 µg/mL	3,9 µg/mL				
FEC1	bc	bt	bt	bt	bt	+	+	+	+	+	-	-	
FEC2	bc	bt	bt	bt	+	+	+	+	+	+	-	-	
FDC2	bt	bt	bt	bt	bt	bt	bt	bt	+	+	-	-	
FEF1	bc	bt	bt	bt	bt	bt	+	+	+	+	-	-	
FEF2	bc	bt	bt	bt	bt	bt	+	+	+	+	-	-	
FDF2	bt	bt	bt	bt	+	+	+	+	+	+	-	-	

bc: bactericida; bt: bacteriostático; CB = Controle da Bactéria; CM = Controle do Meio; CE = Controle do Extrato, (+): crescimento positivo; (-): crescimento negativo. FEC1= Fração etanol casca 1; FEC2 = Fração etanol casca 2; FDC2 = Fração diclorometano 2; FEF1 = Fração etanol folha 1; FEF2 = Fração etanol folha 2; FDF2 = Fração diclorometano folha 2.

Estudos têm demonstrado que *S. aureus* também apresentou sensibilidade ao extrato etanólico e aquoso de folhas de *S. terebinthifolia* Raddi (MARTINEZ et al., 1996; GUERRA et al., 2000). Cepas resistentes de *S. aureus* do tipo NorA (resistentes a quinolonas) e do tipo MrsA (resistentes a Meticilina) foram sensíveis aos extratos de casca de caule de *S. terebinthifolia* Raddi, incluindo extrato etanólico, fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila e fração hidrometanólico (LIMA et al., 2006). Do mesmo modo, extrato etanólico de frutos de *S. terebinthifolia* Raddi contendo compostos fenólicos apresentou efeito inibitório no

crescimento do *S. aureus* (DEGÁSPARI et al. 2005). O óleo essencial extraído de folhas de aroeira apresentou efeito inibitório em *S. aureus* isolados de cães (SILVA et al., 2010).

S. aureus apresentou-se como sensível a extratos de várias plantas contendo os seguintes compostos do metabolismo secundário: 3,5,7-trihydroxyflavone (galangin), benzoquinona, benzopirano, helihumulone, carnosol, 7-O-methyl-epirosmanol, anolignan B, sesquiterpenoides, flavonoides, terpenóides, vernolide, vernodalol, diterpenos, ácidos cumáricos, naftoquinonas e glicosinolatos (PAIVA et al., 2010).

A tintura de aroeira a 20% foi testada contra o *Streptococcus mutans* e verificou-se atividade antibacteriana da tintura até a diluição de 1:8 (SOARES et al., 2007).

Ao avaliar o crescimento do *C. musae* em meio BDA na presença das frações dos mesmos extratos de aroeira, na Figura 7 é possível perceber que a aroeira tem um grande potencial inibitório deste fungo, pois, com exceção da fração FEC1, todos os tratamentos apresentaram diferença significativa em comparação aos controles (controle e álcool 100 µL). Observa-se também que nas folhas de aroeira se encontram mais compostos que possuem ação antifúngica, já que as frações que melhor inibiu o crescimento do *C. musae* foram FDF2 e FEF2, nestes tratamentos, observa-se que existe uma diferença significativa da inibição quando comparado aos outros tratamentos. Estes compostos que possivelmente estão exercendo o efeito fungicida podem fazer parte do grupo dos flavonóides que foram quantificados em maior concentração nas frações de folha (Figura 2).

Extrato de *Xylopiá sericea* também apresentou ação inibitória do crescimento do *C. musae*, apresentando mais de 25% de inibição no crescimento micelial. A *X. sericea* contém alta concentração de flavonóides, possibilitando inferir que a ação fungitóxica desta espécie está relacionada com a presença destes compostos (MARTINS et al., 2012).

Em 2010, Johann et al., isolaram flavonóides de folhas e cascas de *S. terebinthifolia*, além de um novo composto identificado como schinol e verificaram a ação antifúngica contra o *Paracoccidioides brasiliensis*. Quando comparadas as ações dos isolados com a fração inicial, os compostos isolados apresentaram maior efeito inibitório para com o fungo e o schinol apresentou um efeito sinérgico quando combinado com o itraconazol.

Os compostos fenólicos possuem comprovada ação antifúngica e esta pode ocorrer, entre outros mecanismos, pela inativação de sistemas enzimáticos do microrganismo envolvidos na produção de energia e na síntese de componentes estruturais (OLIVEIRA et al., 2007).

O crescimento micelial do *C. musae* foi inibido por extrato etanólico de *Achillea millefolium*, onde foram encontrados compostos fenólicos, taninos, flavonóides e cumarinas, indicando a potencialidade fungicida destes compostos contra o *C. musae* (PERES et al., 2009).

Outro fator que pode ter interferido no crescimento do *C. musae* com a adição das frações de extrato de aroeira é o pH do meio. Thangamani et al. (2011) verificaram que o pH igual a 7,0 é o ideal para crescimento máximo de *C. musae* e que o pH abaixo de 6,0 e acima de 7,0 foi prejudicial ao crescimento do patógeno.

Com relação ao teste de inibição do crescimento do *C. gloeosporioides* frente às frações dos extratos de aroeira, apresenta-se os resultados na Figura 8. Neste teste verifica-se que o álcool na quantidade de 100 µL, utilizado para facilitar a dissolução das frações secas, apresentou diferença significativa em comparação ao controle, portanto a comparação entre os tratamentos deve ser feita considerando o tratamento álcool 100 µL como o grupo controle, descartando assim a influência deste solvente nos tratamentos.

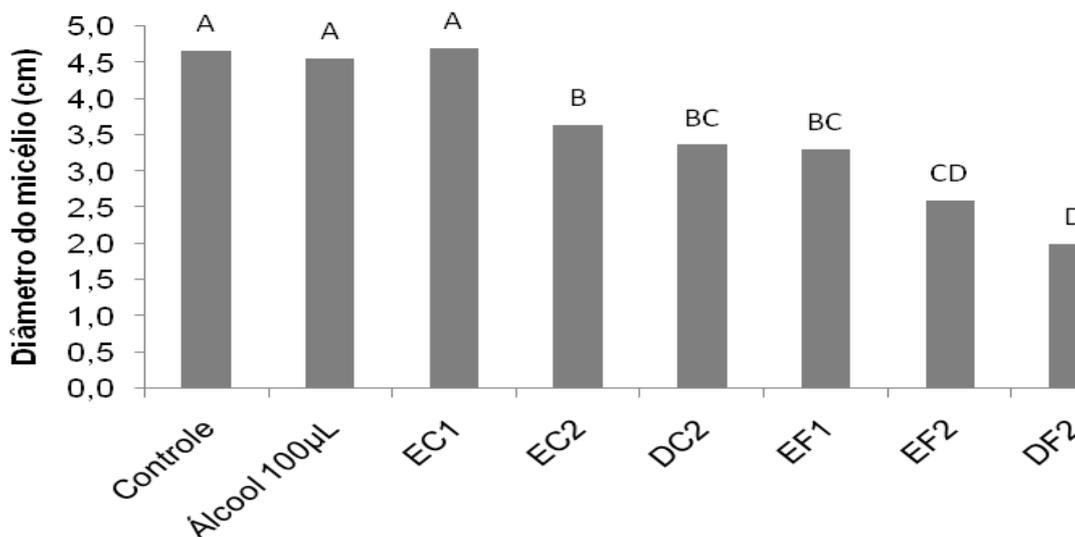


Figura 7: Resultados dos testes de inibição do crescimento micelial do *C. musae* por frações de extratos das folhas e cascas de caule de *S. terebinthifolia*. Cada fração foi preparada na concentração de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os testes foram avaliados utilizando Tukey a 5% de probabilidade. CV = 7,68%. FEC1= Fração etanol casca 1; FEC2 = Fração etanol casca 2; FDC2 = Fração diclorometano 2; FEF1 = Fração etanol folha 1; FEF2 = Fração etanol folha 2; FDF2 = Fração diclorometano folha 2.

A espécie *C. gloeosporioides* apresentou sensibilidade na presença das frações FEF2, FEC1 e FDF2, nestes tratamentos houve diferença significativa em comparação ao álcool 100 µL. Estes resultados corroboram com o estudo apresentado por Johann et al. (2007) que verificaram a menor concentração inibitória mínima – MIC (30 µg/mL) para fração diclorometano de folhas de aroeira frente à *Candida glabrata* e uma concentração ainda menor (15 µg/mL) para a fração etanol frente à *Candida schenckii*. Para o extrato etanólico de casca o resultado de menor MIC (30 µg/mL) foi para o *Cryptococcus neoformans*.

A presença de taninos nas duas partes estudadas (casca e folha) pode estar diretamente relacionada à inibição do crescimento do *C. gloeosporioides*. Liu et al. (2010) verificaram que os taninos adicionados em meio de cultura para crescimento de *C. gloeosporioides* diminuíram o diâmetro do micélio, bem como a taxa de germinação de esporos.

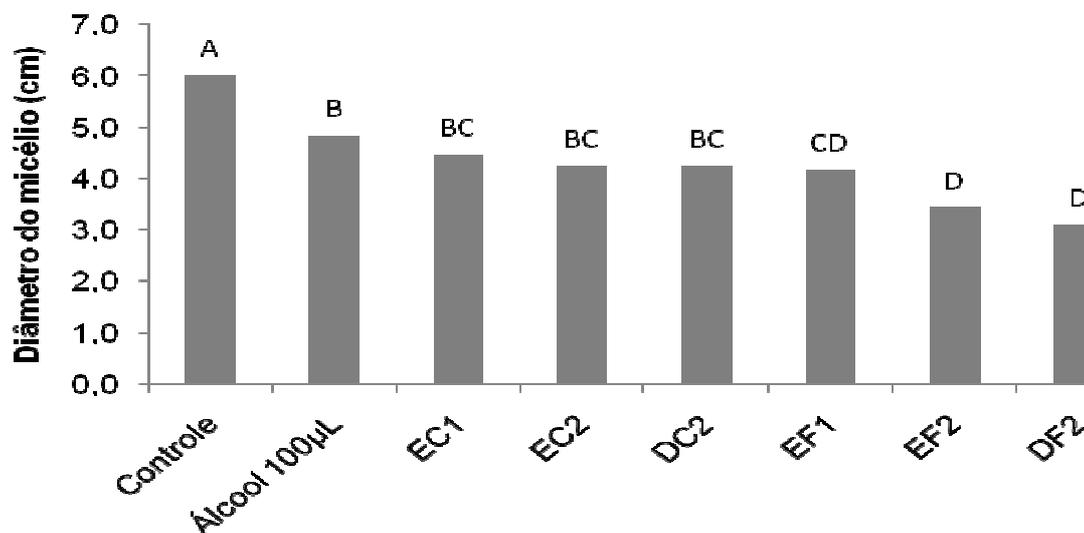


Figura 8: Resultados dos testes de inibição do crescimento micelial do *C. gloeosporioides*, por frações de extratos das folhas e cascas de caule de *S. terebinthifolia*. Cada fração foi preparada na concentração de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os testes foram avaliados utilizando Tukey a 5% de probabilidade. CV = 5,12%. FEC1= Fração etanol casca 1; FEC2 = Fração etanol casca 2; FDC2 = Fração diclorometano 2; FEF1 = Fração etanol folha 1; FEF2 = Fração etanol folha 2; FDF2 = Fração diclorometano folha 2.

Em 2013, Duque, verificou a inibição do crescimento micelial *C. gloeosporioides* na presença de frações extraídas de mil-folhas (*Achillea millefolium*) as quais a qualificação e quantificação dos compostos presentes evidenciou compostos dos grupos fenólicos simples (ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico) e flavonóides (flavona, rutina). Estes resultados corroboram com os resultados encontrados neste estudo, inferindo a possibilidade da ação fungitóxica das frações dos extratos de aroeira esteja relacionada à presença dos compostos fenólicos identificados (taninos e flavonóides).

O *Colletotrichum sp.* foi inibido por óleo essencial de frutos de *S. terebinthifolia* (SANTOS et al., 2010). Em estudo de Oliveira Junior et al. (2013) o *C. gloeosporioides* também se mostrou sensível a diferentes concentrações de óleo essencial extraído de frutos de *S. terebinthifolia*, sendo que a concentração de 50% do óleo inibiu aproximadamente 79% do crescimento *in vitro* do fungo. Em testes *in vivo*, o óleo essencial de aroeira apresentou efeito semelhante ao fungicida

Benomil[®], evidenciando que o óleo essencial poder ser utilizado como alternativa ao controle de antracnose. Comparando com a composição de outros óleos essenciais o constituinte que possivelmente possui o efeito fungitóxico seria o limoneno.

No entanto, Bigaton (2013) verificou que o extrato metanólico e o óleo essencial de frutos de *S. terebinthifolia* não controlaram a antracnose do feijoeiro, mas favoreceram a doença nas plantas.

Estudos utilizando extratos de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e seu óleo essencial observaram a inibição do crescimento do *C. gloeosporioides* (SILVA et al., 2012; VENTUROSOSO et al., 2011). O extrato aquoso de cravo-da-índia na concentração de 10% e o óleo essencial apresentaram efeito fungitóxico, inibindo 100% o crescimento micelial do *C. gloeosporioides* extraídos de frutos de goiaba (ROZWALKA et al., 2008). O óleo essencial cravo-da-índia é rico em monoterpenos oxigenados, destacando o eugenol como principal constituinte (OLEVEIRA et al., 2009). O eugenol é considerado o responsável pelo efeito fungitóxico do óleo essencial (ASCENÇÃO & MOUCHREK FILHO, 2013).

Comparando os efeitos inibitórios das frações de folha e casca de caule de aroeira nos dois fungos testados, verifica-se que existe atividade das frações obtidas pelo método de extração com solventes de polaridades crescentes e das frações obtidas com a partição líquido-líquido do extrato etanólico. Portanto, os métodos diferentes de extração não influenciaram no efeito inibitório do crescimento destes microrganismos.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a *S. terebinthifolia* apresenta atividades antimicrobianas tanto para os fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, quanto para a bactéria *Staphylococcus aureus*. Este efeito foi verificado em frações de extratos de folhas e de casca de caule.

A atividade antimicrobiana não foi influenciada pelos métodos de extração utilizados no trabalho.

Os compostos do metabolismo secundário encontrados em folhas e casca de caule, alcalóides, taninos, flavonóides e saponinas, estão diretamente relacionados com os efeitos biológicos encontrados, principalmente os compostos fenólicos, como flavonóides e taninos.

A parte da planta utilizada teve papel importante quanto à inibição dos fungos que responderam mais às frações obtidas de folha, que possui maior concentração de flavonóides.

Extratos de casca de caule e de folhas de aroeira apresentam potencial no controle dos patógenos estudados.

6 REFERÊNCIAS

ALANIS, A.J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Arch Med Res.** v. 36, n. 6, p. 697–705, 2005.

AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da Vaginose Bacteriana com Gel Vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. **RBGO**, v. 25, n. 2, P. 95-102, 2003.

ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V.C.; HAAS, V.J. Ocorrência de Bactérias Multiresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v.18, n.1, 2006.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** Tradução de Terezinha Oppido; tradução de Edi Goncalves de Oliveira; tradução de Ivone Castilho Benedetti. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

ASCENÇÃO, V. L.; MOUCHREK FILHO, V. E. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Cadernos de Pesquisa.** v. 20, n. especial, 2013.

BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. L.; NUNES, C. R.; PESSANHA, F. F.; MUZITANO, M. F.; OLIVEIRA, D. B. Quantificação dos Teores de Taninos e Fenóis Totais e Avaliação da Atividade Antioxidante dos Frutos de Aroeira. **VÉRTICES, Campos dos Goytacazes.** v. 13, n. 3, p. 117-128, 2011.

BRASIL, RENISUS. Relação **Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.** Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS_2010.pdf. Acesso em 04 ago. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011a.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Anuário estatístico do Brasil.** v. 71, 2011b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM.** Ano III - Edição nº 1, de 10 de julho de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004.** Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, 2010.

BIGATON, D.; BACCHI, L. M. A., FORMAGIO, A. S. N.; GAVASSONI, W. L.; ZANELLA, C. S. Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 44, n. 4, p. 757-763, 2013.

CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.** v. 20, n. 2, 2010.

CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; TABACH, R. Assessment of the toxicity of the brazilian pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira- da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão). **Phytotherapy Research**. 2012.

CARNELOSSI, P. R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; ITAKO, A.T.; MESQUINI, R.M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.4, p.399-406, 2009.

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

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Braz J. Pharmacogn.** 18(2), 2008.

CARVALHO, M.C.; BARCA, F.N.; AGNEZ-LIMA, L.F.; MEDEIROS, S.R. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Shinus terebinthifolius* Raddi). **Environ Mol Mutagen** 42: 185-191, 2003.

CARVALHO, M.G.; FREIRE, F.D.; RAFFIN, F.N.; ARAGAÃO, C.F.S.; MOURA, T.F.A.L. LC determination of gallic acid in preparations derived from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Chromatographia**, v. 69, p. 249-253, 2009.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, 1998.

CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Sci. Agron.** v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008.

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

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

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Editora Lisboa: Fundação Calouste Grilbenkian, 1986.

COSTA, L. C.; RIBEIRO, W. S.; ALMEIDA, E. I. B.; GURJÃO, G. C.; BARBOSA, J. A. Procedência, qualidade e perdas pós-colheita de mamão 'havaí' no mercado atacadista da Empasa de Campina Grande-PB. **Revista Agropecuária Técnica**. v. 32, n. 1, 2011.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 26, p. 343-356, 2005.

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

DI-STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, p. 340-350, 2002.

DUQUE, F. F. **Atividade de frações do extrato etanólico de *Achillea millefolium* sobre *Colletotrichum gloeosporioides***. 2013. 42f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2013.

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

ESPÍRITO SANTO. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER). **Incaper em Revista**. Ano 1, n. 1, 2010.

Farmacopéia Brasileira, 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARAG, S.F. Polyphenolic compounds from the leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **J Pharm Sci**, v. 31, p. 319-329, pt. 2, 2008.

FORZZA, R. C., et al. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. **Andrea Jakobsson Estúdio : Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. v. 01, 2010.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.,; CRUZ, M. E. S. Fungitoxic activity and resistance induction in wheat plants against *Bipolaris*

sorokiniana by *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum-Agronomy**. v. 25, n. 2, p. 503-507, 2003.

GAYET, J.P., BLEINROTH, E.W., MATALLO, M., GARCIA, E.E.C., GARCIA, A. E., ARDITO, E.F.G. & BORDIN, M.R. Mamão para exportação: Procedimentos de colheita e pós-colheita. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria de Desenvolvimento Rural, Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças e Plantas Ornamentais. **EMBRAPA-SPI**. 1995.

GOODMAN & GILMAN – **As bases Farmacológicas da Terapêutica**, Editora MAC GRAW HILL, 11. ed, 2006.

GRIPPA, G. A.; REIS, F. O.; OLIVEIRA JUNIOR, L. F. G.; SANTOS, R. B.; MACHADO, L. P.; BISPO, W. M.; NASCIMENTO, V. L.; MATSUMOTO, S. T. Evaluation of the essential oil of *Schinus terebinthifolius* for the control of *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro and in vivo. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.35, n.1, 2010.

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKKE, C. Physicians desk references (PDR) for herbal medicines. **Med Econ Co**, New Jersey, p. 858, 2000.

GUERRA, M.J.M., BARREIRO, M.L., RODRÍGUEZ, Z.M., RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80 % de *Schinus terebinthifolius* RADDI (copal). **Rev Cubana Plant Med**, v.5, 2000.

IBRAF. Instituto brasileiro de frutas. **Comparativo das exportações de frutas frescas**. 2009/2010.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNICI, C. L.; REZENDE, M. A. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 632-637, 2007.

JOHANN, S.; SÁ, N. P.; LIMA, L. A. R. S.; CISALPINO, P. S.; COSTA, B. B.; ALVES, T. M. A.; SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 9, n. 30, p. 1-6, 2010.

LENZI, M.; ORTH, A. I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi.), em Florianópolis-SC, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.2, p.198-201, 2004.

LICHTENFELS E.; FRANKINI A.D.; PALUDO J.; D'AZEVEDO P.A. Prevalência de resistência bacteriana nas infecções de ferida operatória em cirurgia arterial periférica. **J Vasc Bras**, v. 7, n. 3, 2008.

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

LIMA-FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum spp.* associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, p. 620-625, 2003.

LIU, L. I.; ZHAO, K. H.; LIU, C. Y.; LIANG, C. H.; GUAN, T. S.; WANG, H. WANG, Q. Effect of Sugar and Acid in Grape on Growth and Development of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Shenyang Agricultural University**. v. 1, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Nova Odessa: Plantarum**, p. 49-59, 2002.

LUCENA, P, L, H.; RIBAS FILHO, J. M.; MASSA, M.; CZECZOKO, N. G.; DIETZ, U. A.; CORREIA NETO, M. A.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J.; CESCHIN, A. P.; THIELE, E. S. Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexigas de ratos. **Acta cirúrgica Brasileira**, v.12, n. 2, p. 46-51, 2006.

MARTIN, G. J. **Etnobotânica: manual de métodos**. Nordan, 1995.

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

MARTINS M.A.; AZEVEDO F.M.; ROCHA L.C.M.; ROSÁRIO P.W.S. Drogas antibacterianas: antibióticos. Manual de infecção hospitalar: epidemiologia, prevenção e controle. 2. ed. Belo Horizonte: **Medsa**, p. 451-72, 2001.

MARTINS, F. M. M., SILVA, M. B., SILVEIRA, D., COSTA, A. S. V., JAMAL, C. M. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial citotóxico e Antifúngico de *Xylopiá sericea* ST. Hlll frente à *Colletotrichum musae*. **Rev. Biología e Farmácia**. v. 7, n. 2, p. 60-65, 2012.

MATSUO A.L.; FIGUEIREDO, C. R.; ARRUDA, D. C.; PEREIRA, F.V.; SCUTTI, J. A. B.; MASSAOKA, M. H.; TRAVASSOS, L. R.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. G. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.411, p. 449–454, 2011.

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

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* Radd in infl ammatory models. **Rev Bras Farmacogn** v. 17, p. 23-28, 2007.

MELO JUNIOR, E.J.M. et al. Estudo de Plantas medicinais com atividade antimicrobiana sobre microrganismos presentes na alveolite. **Rev ABO Nac**, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p.220-226, 2000.

NARUZAWA, E.S.; PAPA, M.F.S. Antifungal activity of extracts from Brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassiicola*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.4, 2011.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. v.23, n. 2, p. 1-48, 2003

NUNES JR, J. A. T.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; CZECZKO, N. G.; INÁCIO, C. M.; NEGRÃO, A. W.; LECUNA, P. L. H.; MOREIRA, H.; WAGENFUHR, J. R. J.; CRUZ, J. J. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) no processo de cicatrização da *linea alba* de ratos. **Acta Cir Bras.** v. 21, n. 3, p. 8-15, 2006.

OLIVEIRA A.C. **Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 341-47, 2005.

OLIVEIRA, A.C., EVANGELISTA, S., LUCAS, T.C., MOURÃO, P.H.O., CLEMENTE, W.T. A percepção da equipe multiprofissional sobre a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar. **Online Braz J Nurs.** 2006.

OLIVEIRA, M.S., DORS, G. C., SOUZA-SOARES, L. A., BADIALE-FURLONG, E. Antioxidant activity of phenolic compounds from plant extracts. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.18, n. 2, p. 267-275, 2007.

OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

OLIVEIRA A.C.; SILVA R.S.; DÍAZ M.E.P.; IQUIAPAZA R.A. Resistência bacteriana e mortalidade em um centro de terapia intensiva. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v. 18, n.6, 2010.

OLIVEIRA JUNIOR, L.F.G.; SANTOS, R.B.; REIS, F.O.; MATSUMOTO, S.T.; BISPO, W.M.S.; MACHADO, L.P.; OLIVEIRA, L.F.M. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.15, n.1, 2013.

PAULO, P. T. C.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; MORAIS, L. C. L.; ANDRADE, F. B.; SANTOS, H. B. Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). **Braz J. Pharmacogn.** v. 19, n. 1A, p. 68-76, 2009.

PAIVA, P. M. G.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p.396-406, 2010.

PERES, R. L.; MORAES, S. C. S.; CARVALHO, C. A.; NASCIMENTO, P.C.; CARVALHO, L. M.; SILVA, M. B.; RAMPELOTTO, P. H.; ROSA, M. B. *Achillea millefolium* – Asteraceae: estudo fitoquímico, espectrofotométrico e da atividade antifúngica (*Colletotrichum musae*). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 3, p. 81-93, 2009.

PIRES, O. C.; TAQUEMASA, A. V. C.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; ARAUJO, C. E. P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL50) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum* L.). **Acta farmacéutica bonaerense**, v. 23, n. 2, 2004.

POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.C.; TRINDADE, D.R.; DUARTE, M. de L.R.; POLTRONIERI, M.C.; OLIVEIRA, A.F.F. de. Doenças do mamoeiro no Estado do Pará. **Belém: Embrapa Amazônia Oriental**. 2001.

POLETTI, K. Q.; REIS, C. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na Cidade de Goiânia, GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.38, n. 5, p.416-420, 2005.

QUEIRES, L.C.S.; FAUVEL-LAFÈVE, F.; TERRY, S.; DE LA TAILLE, A.; KOUYOUMDJIAN, J.C.; CHOPIN, D.K.; VACHEROT, F.; RODRIGUES, L.E.A.; CRÉPIN, M. Polyphenols Purified from the Brazilian Aroeira Plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) Induce Apoptotic and Autophagic Cell Death of DU145 Cells. **Anticancer Research**, v.26, 2006.

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 Odontológica – Fac. Odont/PUCRS**, v. 21, n. 53, p. 245-252, 2006.

RICHTER, R.; VON REUß, S.H.; KÖNIG, W.A. Spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1371–1374, 2010.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 42 p, 2001.

ROZMAN L.M.; SANTO A.H.; ROZMAN M.A. Resistência do Mycobacterium tuberculosis às drogas em pacientes HIV+ em cinco municípios da Baixada Santista, São Paulo, Brasil, **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 5, p.1051-1059, 2007.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.301-307, 2008.

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

SANTOS, E.B.; DANTAS, G.S.; SANTOS, H.B.; DINIZ, M.F.F.M.; SAMPAIO, F.C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Braz J. Pharmacogn.** v. 19, n. 1B, 2009.

SANTOS, O.J.; RIBAS FILHO, J.M.; CZECZKO, N.G.; CASTELO BRANCO NETO, M.L.; NAUFEL JÚNIOR, C.; FERREIRA, L.M.; CAMPOS, R.P.; MOREIRA, H.; PORCIDES, R.D.; DOBROWOLSKI, S. Avaliação do extrato de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 21, Suppl 2: 39-45, 2006.

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Braz. J. Pharmacogn.** v. 20, n. 2, 2010.

SANTOS, S. B.; LIMA, A. C. A.; MELO, A. R. S.; FRAZÃO, C. S.; CHERPAK, G. L. Comparação da eficácia da aroeira oral (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com omeprazol em pacientes com gastrite e sintomas dispépticos: estudo randomizado e duplo-cego. **GED gastroenterol. endosc.dig.** v. 29, n. 4, p.118-125, 2010.

SERRANO, L.A.L.; CATTANEO, L.F.O cultivo do mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruti-cultura, Jaboticabal**, v.32, n.3, 2010. Texto de capa.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C. S.; COSTA, S. S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 563-568, 2005.

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V.; SANTOS, D. I. P.; PESSOA, J.O. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento *in vitro* de fitopatógenos. **Revista Verde**, v.7, n.1, p. 80 – 86, 2012.

SILVA, A. B.; SILVA, T.; FRANCO, E. S.; RABELO, S. A.; LIMA, E. R.; MOTA, R.A.; CÂMARA, C. A. G.; PONTES-FILHO, N. T.; LIMA-FILHO, J.V. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from brazilian pepper tree (*Schinus Serebinthifolius*, RADDI). **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 158-163, 2010.

SILVA, PENILDON. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. e ampl Florianópolis: editora. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 1102 p., 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC, 1104 p., 2007.

SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B.; PAULO, M. Q.; CARVALHO, M. F. F. P.; PADILHA, W. W. N. Avaliação Clínica e Microbiológica do Tratamento da Estomatite Protética com Tintura de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v. 10, n. 3, p.365-370, 2010.

SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B.; LEAL, C.; DRUMOND, M. R. S.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana in vitro da tintura de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na descontaminação de escovas dentais contaminadas pelo *S. mutans*. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v. 7, n.3, p. 253-257, 2007.

SOUZA, C.D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta bot. Bras.** v. 20, n. 1, 135-142. 2006.

SOUZA, R. M. S.; SERRA, I. M. R. S.; MELO, T. A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.1, p.42-47, 2012.

THANGAMANI, P.R.; KUPPUSAMY, P.; PEERAN, M.F.; GANDHI, K.; RAGUCHANDER, T. Morphological and Physiological Characterization of *Colletotrichum musae* the Causal Organism of Banana Anthracnose. **World J. Agric. Sci.** v. 7, n. 6, 2011.

TATAGIBA, J. S.; LIBERATO, J. R.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; COSTA, H. Controle e condições climáticas favoráveis à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 27, p. 186-192, 2002.

VARELA-BARCA, F.N.; AGNEZ-LIMA, L.F.; MEDEIROS, S.R. Base excision repair pathway is involved in the repair of lesions generated by flavonoid-enriched fractions of pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) stem bark. **Environ Mol Mutagen**. v. 48, p. 672-681, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Braz J. Pharmacogn**. v. 18, n. 2, 2008.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: Cura Segura? **Quim. Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L.; CONUS, L.A.; PONTIM, B.C.A.; SOUZA, F.R. Inibição do crescimento *in vitro* de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.78, n.1, p.89-95, 2011.

WAGNER, H. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer. 320p, 1984.