

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO – OESTE – UNICENTRO-PR

**AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS E
COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS MEDICINAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GISELI DUCAT

GUARAPUAVA – PR

2009

GISELI DUCAT

**AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS E COMPOSTOS
FENÓLICOS EM PLANTAS MEDICINAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro- Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias Analíticas e Aplicações, para obtenção do título de Mestre.

Prof^ª Dr^ª Sueli Pércio Quináia

Orientadora

Prof^ª Dr^ª Yohandra Reyes Torres

Coorientadora

GUARAPUAVA – PR

2009

GISELI DUCAT

**AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS E COMPOSTOS
FENÓLICOS EM PLANTAS MEDICINAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro- Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias Analíticas e Aplicações, para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 31 de agosto de 2009

Prof. Dr. Membro da Banca: Gilberto Abate

Prof. Dr. Membro da Banca: Ricardo Celeste

Prof^ª Dr^ª Sueli Pércio Quináia

Orientadora

GUARAPUAVA – PR

2009

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter me dado força, coragem, e pelas pessoas maravilhosas que colocou em minha vida.

A minha família pelo incentivo.

A minha orientadora pela dedicação, paciência, carinho e conhecimentos transmitidos para a efetivação deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação da UNICENTRO e seus professores pelos ensinamentos.

A UNICENTRO pelas instalações para realização do trabalho.

Aos amigos pelo apoio, em especial a Sirlene Adriana Kleinübing pelo carinho, ajuda e dedicação.

Aos colegas de laboratório pela ajuda e atenção: Daiane Finger, Daniele Stock, Tais H. Justo, Loyse Tussolini.

À professora Herta Stutz Dalla Santa pelo carinho, atenção, disponibilidade do laboratório de microbiologia do Departamento de Engenharia de Alimentos e auxílio para a realização dos testes antimicrobianos.

Às professoras Yohandra Reys Torres e Ísis K. Caetano pelo apoio e materiais.

À CERCCOPA, pelas amostras doadas.

Ao Sr. Tércio Silveira pelo histórico da CERCCOPA.

SUMÁRIO

Lista de Símbolos e Abreviaturas	i
Resumo	iii
Abstract	iv
1. Introdução	1
2. Objetivos	3
3. Referencial Teórico	4
3.1. Cultivo de plantas medicinais	4
3.1.1. Calêndula (<i>Calendula officinalis</i> L.).....	6
3.1.2. Capim – limão (<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf)	8
3.1.3. Espinheira – santa (<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek).....	9
3.2. Essencialidade dos minerais.....	10
3.2.1. Função dos minerais no organismo humano.....	12
3.2.2. Íons metálicos não essenciais.....	17
3.2.3. Função dos minerais nas plantas.....	21
3.2.3.1. Macronutrientes.....	21
3.2.3.2. Micronutrientes.....	23
3.3. A toxicidade das plantas medicinais.....	26
3.4. Compostos fenólicos em plantas medicinais.....	27
3.5. Atividades biológicas nas plantas.....	30
3.6. Métodos de análise quantitativa de íons metálicos e compostos fenólicos em plantas medicinais.....	32
4. Materiais e Métodos	34
4.1. Instrumental	34
4.2. Amostras e reagentes.....	35
4.3. Testes antimicrobianos	36

4.4. Parte experimental.....	36
4.4.1. Obtenção dos extratos etanólicos	36
4.4.2. Determinação do teor de íons metálicos extraídos nas infusões aquosas	37
4.4.3. Determinação do teor total de íons metálicos nas plantas medicinais	37
4.4.4. Determinação do teor de íons metálicos extraídos nos extratos etanólicos.....	37
4.4.5. Quantificação de fenóis totais pelo método Folin – Ciocalteu	38
4.4.6. Quantificação de flavonóides por complexação com cloreto de alumínio	39
4.4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	40
4.4.7.1. Teste de difusão em ágar.....	40
4.4.7.2. Teste da concentração inibitória mínima– CIM.....	40
4.4.7.3. Teste de concentração bactericida mínima –CBM.....	41
4.4.8. Análises das correlações entre os parâmetros avaliados.....	42
5. Resultados e Discussão..	43
5.1. Determinação de íons metálicos na água de infusão e nas plantas medicinais	43
5.2. Determinação do teor de íons metálicos essenciais e não essenciais nos EEP70% e EEP95%	50
5.3. Determinação de ácidos fenólicos nos EEP70% e EEP95% e nas águas de infusão das plantas medicinais	53
5.4. Determinação quantitativa de flavonóides nos EEP70% e EEP95% e nas águas de infusão.	58
5.5. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e das águas de infusão	59
5.6. Estudo quimiométrico.....	63
6. Conclusões	78
7. Trabalhos Futuros	79
8. Referências Bibliográficas	80

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

OMS – Organização Mundial de Saúde

WHO – World Health Organization

UV – vis – ultravioleta visível

CERCCOPA – Central Regional de Comercialização do Centro Oeste do Paraná

RURECO – Fundação para o desenvolvimento econômico e rural do Centro – Oeste do Paraná.

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

EMA – European Medicines Agency

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

RDA – Recommended Dietary Allowance/Recomendações nutricionais diárias

FAAS – espectrometria de absorção atômica com chama

ICP – OES – espectrometria de emissão óptica com acoplamento de plasma induzido

ICP – MS – espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

ATP – trifosfato de adenosina

AMPc – monofosfato de adenosina cíclico

DNA – ácido desoxirribonucléico

RNA – ácido ribonucléico

ESADDI – estimated safe and adequate daily dietary intake (ingestão dietética diária considerada segura e adequada)

LD – limite de detecção

EEP70 – extrato etanólico de plantas 70%

EEP95 – extrato etanólico de plantas 95%

ATCC – American Type Culture Collection

TSB – tripticase soy broth

TSA – ágar tripticase de soja

NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards

CIM – concentração inibitória mínima

CBM – concentração bactericida mínima

ACP – análise dos componentes principais

CA – calêndula

CL – capim limão

ES – espinheira santa

CL70% - extrato etanólico 70% de capim-limão

CL 95% - extrato etanólico 95% de capim-limão

CA 70% - extrato etanólico 70% de calêndula

CA 95% - extrato etanólico 95% de calêndula

ES 70% - extrato etanólico 70% de espinheira-santa

ES 95% - extrato etanólico 95% de espinheira-santa

ESINF – espinheira santa em infusão aquosa

CLINF – capim limão em infusão aquosa

CAINF – calêndula em infusão aquosa

ESFL – espinheira santa na folha calcinada

CLFL – capim limão na folha calcinada

CAFL – calêndula na folha calcinada

RESUMO

Giseli Ducat. Plantas Medicinais, Metais, Fenólicos, Flavonóides, Atividade Antimicrobiana.

A utilização de plantas para fins medicinais tem se tornado um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população mundial e vem se desenvolvendo juntamente com a comunidade médica, desde que sejam empregadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido comprovadas cientificamente, confirmando sua eficácia e segurança (CECHINEL & YUNES,1998; KINGHORN,2001). Além disso, a importância das plantas deve-se por sua contribuição como fonte natural de fármacos. Esta pesquisa teve como objetivos determinar o teor de metais essenciais e não essenciais ao organismo humano em infusões aquosas, em amostras calcinadas e em extratos etanólicos 70% e 95% v/v obtidos a partir de plantas medicinais, através da técnica de espectrometria de absorção atômica em chama, avaliar o teor de fenóis totais e flavonóides nas infusões aquosas e nos extratos etanólicos, através da espectrofotometria UV-vis nos comprimentos de onda 760 e 425 nm, respectivamente e ainda verificar a ação antimicrobiana dos extratos etanólicos e infusões aquosas, através da técnica de difusão em ágar. As plantas avaliadas foram a calêndula (*Calendula officinalis* L.), o capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) e a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) cultivadas e comercializadas pela população na região de Guarapuava - PR. Os resultados obtidos mostraram que a extração dos metais nas infusões variou entre 6,2 a 68,2% do total encontrado em cada planta; os metais tóxicos foram encontrados apenas nas amostras calcinadas. O extrato etanólico 70% do capim- limão apresentou o maior teor de fenóis e flavonóides. Os extratos de espinheira- santa 70% e 95%, capim limão 70% e 95% e calêndula 95% apresentaram atividade antimicrobiana importante frente à *Klebsiella* sp.

Palavras – chaves: plantas medicinais, metais, fenólicos, flavonóides, ação antimicrobiana.

ABSTRACT

Giseli Ducat. Medicinal Plants, Metals, Phenolics, Flavonoids, Antimicrobial Activity

The use of medicinal plants has become an alternative therapy of great acceptance by the population and the medical community. Physicians prescribe medicinal plants and phytotherapies whose biological activities, effectiveness and safety have been scientifically investigated and proved (CECHINEL & YUNES,1998; KINGHORN,2001). Plants are also resources of active principles used as models in the synthesis of modified compounds with improved activity and lesser toxic effects. This research aimed to determine by flame atomic absorption spectrometry the concentration of essential and non essential metals in aqueous infusions, in roasted plant samples and in 70% and 95% v/v ethanolic extracts. The quantity of total phenols and flavonoids in the aqueous infusions and in the ethanolic extracts were further determined through UV-vis spectrometry at 760 and 425 nm, respectively. Additionally, the antimicrobial activity of the ethanolic extracts and aqueous infusions was assayed by the diffusion technique in agar. The appraised plants were the marigold (*Calendula officinalis* L.), the grass lemon (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) and the “espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek) cultivated and marketed in Guarapuava – PR region. The obtained results showed that metals extraction in the infusions varied among 6,2 to 68,2% of the total amount found in each plant; the poisonous metals were just found in the roasted samples. The 70% ethanolic extract of grass lemon presented the largest amount of total phenols and flavonoids. The 70% and 95% espinheira santa and grass lemon extracts and 95% marigold extracts showed important antimicrobial activity against *Klebsiella* sp.

Keywords: medicinal plants, metals, phenolics, flavonoids, antimicrobial activity

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais de modo geral fazem parte da vida do homem desde quando ele começou a usá-los como fonte de alimentos, de materiais para o vestuário, habitação, utilidades domésticas, na produção dos meios de transporte, e na cura e prevenção de doenças através do uso de plantas medicinais. Sua importância, medida pela intensidade de seu uso transcende os diversos estágios de desenvolvimento da sociedade. Atualmente representam uma das alternativas entre as diversas fontes de insumos necessários à existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de ser uma fonte renovável e, em grande parte, controlável pelo homem (LORENZI & MATOS, 2002).

Em todo o mundo tem sido realizadas pesquisas sobre as virtudes das plantas medicinais, seja para fins alimentícios, cosméticos ou medicinais (VOLPATO *et al*, 2001; LU & FOO, 2001; KUMAR *et al*, 2005; LOZAK *et al*, 2002). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utiliza as plantas medicinais como principal recurso no atendimento básico de saúde. A utilização de plantas medicinais, prática tradicional ainda existente entre os povos de todo o mundo, tem recebido incentivos da própria Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002).

Em consequência do aumento na demanda por produtos a base de plantas medicinais, que ocorreu devido ao aumento significativo do interesse do público brasileiro pelas "terapias naturais", faz-se necessário investigar como esses produtos estão sendo ofertados ao consumidor, de acordo com a legislação específica e critérios estabelecidos cientificamente (MELO *et al* 2007).

Muitos compostos estão presentes nas plantas medicinais, entre eles, compostos fenólicos, originados do metabolismo secundário que possuem propriedades antioxidantes, onde diversos extratos de plantas vêm sendo estudados, como a sálvia (LU & FOO, 2001), coentro (MELO *et al* 2003), alecrim (RAMALHO, 2005), etc. Além das propriedades antioxidantes, muitos óleos essenciais e extratos tem sido estudados pela sua atividade antimicrobiana, como o capim-limão (SCHUCK *et al*, 2001; ONAWUNMI *et al*, 1984), carqueja (AVANCINI *et al*, 2000), calêndula (VOLPATO *et al*, 2001), entre outros (GONÇALVES *et al*, 2006).

Existem também diversas pesquisas sobre o teor de minerais presentes em plantas medicinais, visto que estes são imprescindíveis para a nutrição humana (FERNANDEZ *et al*, 2002; ALMEIDA *et al* 2002; RASHED, 1995).

Na região de Guarapuava-PR, a produção de plantas medicinais cresceu consideravelmente e contou com a criação da cooperativa CERCCOPA que possui estruturas de armazenamento, beneficiamento de mel, cera de abelhas e plantas medicinais, a qual comercializa no atacado e varejo, no Paraná e em diversos estados do Brasil. Comercializa ainda outros produtos como material apícola, própolis, etc. Hoje a CERCCOPA atinge diretamente aproximadamente 350 famílias com a cadeia produtiva de mel e plantas medicinais, com atuação em 09 municípios da região (Pinhão, Turvo, Pitanga, Santa Maria do Oeste, Boa Ventura de São Roque, Nova Tebas, Cantagalo, Virmond e Laranjeiras do Sul). Nos últimos 10 anos, o processo organizativo na região cresceu e foi se especializando por cadeia produtiva. Surgiram as cooperativas de crédito e mais recentemente as cooperativas da cadeia do leite. A produção de plantas medicinais para esta região tem importância sócio-econômica, além do agro-negócio e da agroecologia.

Este trabalho destaca três plantas medicinais cultivadas e utilizadas pela população de Guarapuava – PR: calêndula (*Calendula officinalis* L.), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) e capim – limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). O objetivo principal foi caracterizar parcialmente estas plantas através da quantificação de íons metálicos essenciais e não essenciais para o organismo humano na água de infusão, em amostras calcinadas e em extratos etanólicos, pela técnica de espectrometria de absorção atômica em chama, visto que íons metálicos são imprescindíveis para o organismo humano. Também foi determinado o teor de fenólicos totais e flavonóides por espectrofotometria Uv-vis, pois estas substâncias são consideradas antioxidantes. Como a população tem o hábito de consumir chás para diversas moléstias, neste trabalho também foi avaliada a atividade antimicrobiana da água de infusão e dos extratos etanólicos frente a alguns micro-organismos. Ao término do estudo aplicou-se uma ferramenta estatística aos dados obtidos a fim de avaliar uma possível correlação entre os íons metálicos, os compostos orgânicos e a ação antimicrobiana das infusões e extratos alcoólicos.

2. OBJETIVOS

Geral:

- Caracterizar parcialmente as seguintes plantas medicinais: calêndula (*Calendula officinalis* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) cultivadas na região de Guarapuava-PR pela determinação de compostos orgânicos e inorgânicos presentes nas mesmas.

Específicos:

- Quantificar os íons metálicos essenciais e não essenciais para o organismo humano na água de infusão das plantas calêndula, espinheira-santa e capim-limão;
- Quantificar os íons metálicos totais essenciais e não essenciais nas plantas após o processo de calcinação (digestão via seca);
- Quantificar os íons metálicos essenciais e não essenciais para o organismo humano nos extratos etanólicos;
- Quantificar os ácidos fenólicos e flavonóides presentes nos extratos etanólicos e na água de infusão das plantas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e na água de infusão das plantas.
- Aplicar ferramentas estatísticas aos resultados obtidos a fim de conhecer possíveis correlações entre os íons metálicos e os compostos fenólicos existentes nas plantas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cultivo de plantas medicinais

Desde a antiguidade, os homens buscam na natureza recursos para melhorar suas próprias condições de vida e aumentar suas chances de sobrevivência. O uso de plantas como alimento sempre existiu e a este se incorporou a busca de matéria prima para a confecção de roupas e ferramentas, além de combustível para o fogo (LORENZI & MATOS, 2002).

Atualmente o uso de plantas com propriedades farmacêuticas tem aumentado significativamente. Além disso, as plantas medicinais desempenham um papel importante na saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento.

No Brasil, o uso de extratos vegetais para o tratamento de algumas doenças é um hábito totalmente difundido. Esse hábito pode ser explicado, pelo menos em parte, pela crença que plantas com efeitos terapêuticos não causam efeitos tóxicos no organismo (BOSSOLANI, 2000). A flora brasileira é estimada em aproximadamente entre 40.000 a 60.000 espécies vegetais. O Brasil também é conhecido por possuir uma medicina tradicional muito rica, que pode ser explicado considerando sua população multiracial, ou seja, o resultado de uma miscigenação cultural. (FARNSWORTH & SOEJARTO, 1991; ENGELKE, 2004).

Diversas investigações têm provado que as plantas medicinais contêm diversas classes de compostos como polifenóis, alcalóides, taninos, carotenóides, terpenóides, etc., (ARABBI *et al*, 2004; ARAÚJO 2007; HAMBURGER *et al*, 2003; LEITE *et al*, 2001; NOSSACK *et al*, 2000). Entre essas classes estão os flavonóides e os ácidos fenólicos, que são conhecidos por exibir várias propriedades farmacológicas como vasoprotetoras, anticarcinogênicas, antivirais, anti-inflamatórias, bem como antialérgico, algumas dessas propriedades tem sido relacionadas à ação desses compostos como antioxidantes (CARBAJAL *et al*, 1989; HAMBURGER *et al*, 2003; HOLETZ *et al*, 2002; PUATANACHOKCHAI *et al*, 2002; RUNNIE *et al*, 2004; SARTORI *et al*, 2003).

No início da década de 80, os pequenos agricultores da região Centro Oeste do Paraná, principalmente os que viviam sob o regime de economia familiar, buscaram entre as várias

formas produzir e resistir na terra à formação de associações, de caráter econômico. Com objetivos diversos (produção, compra de equipamentos coletivos, prestação de serviços, assistência técnica e comercialização), de forma articulada, os pequenos produtores foram se organizando em grupos informais, associações comunitárias, municipais, centrais, etc.

Este processo organizativo se constituiu num importante instrumento na busca de alternativas de produção, tendo como base a agroecologia, o desenvolvimento sustentável e a organização de cadeias produtivas, como a do mel, plantas medicinais, leite, criação de fundos de crédito rotativo, etc. Buscaram-se com isso, a melhoria da renda das famílias envolvidas e sua fixação na terra, num período que o modelo de desenvolvimento agrícola, vinha excluindo do campo, milhares de pequenos agricultores todo ano.

Como resultados deste processo foram constituídos neste período, mais de 80 associações comunitárias que deram origem a cinco associações com abrangência municipal. Este trabalho associativo, articulado com o movimento sindical, dos trabalhadores rurais, assessorado pela fundação RURECO, iniciou o debate que deu origem a fundação da Central Regional de Comercialização do Centro Oeste do Paraná – CERCCOPA (Figura1).



Figura 1. Foto externa da CERCCOPA (Guarapuava – PR)

A CERCCOPA nasceu da necessidade dos agricultores familiares que participavam deste processo organizativo, de se ter na região, uma entidade que pudesse articular, orientar, defender e propor políticas de desenvolvimento local, a partir das necessidades e ações

realizadas nas comunidades juntos a estas famílias. As plantas medicinais cultivadas pelos agricultores e comercializadas pela CERCCOPA, incluem: alcachofra (*Cynara scolymus* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), arnica (*Solidago microglossa*), calêndula (*Calendula officinalis* L.), camomila (*Matricaria chamomilla* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.), carqueja (*Baccharis genistelloides*), cavalinha (*Equisetum* sp.), chapéu-de-couro (*Echinodorus macrophyllus*), erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum* L.), espinheira-santa (*Maytenus illicifolia*), funcho (*Foeniculum vulgare*), guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw.), guaco (*Mikania glomerata* Spreng.), ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), hortelã (*Mentha piperita* L.), macela (*Achyrocline satureoides* DC), manjerona (*Origanum majorana*), maracujá (*Passiflora edulis*), melissa (*Melissa officinalis* L.), pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*), poejo (*Mentha pulegium*), sálvia (*Salvia officinalis*), sete-sangrias (*Cuphea carthaginensis*), tanchagem (*Plantago australis*). A seguir encontra-se a descrição de três plantas selecionadas como objeto de estudo deste trabalho.

3.1.1 Calêndula (*Calendula officinalis* L.)

A calêndula pertence à família Asteracea Compositae, a mesma família da margarida, nativa das Ilhas Canárias e região Mediterrânea. É uma planta herbácea anual, ereta, ramificada de 30 – 60 cm de altura, suas folhas são simples, sésseis, de 6 – 12 cm de comprimento, suas flores são amarelas ou alaranjadas (Figura 2), dispostas em capítulos terminais grandes, multiplica-se por semente (LORENZI & MOREIRA, 2001). É cultivada em toda zona temperada do mundo, é muito cultivada no Brasil para fins ornamentais, havendo variedades especialmente desenvolvidas para jardins. Vegeta em vários tipos de solos, desde que ricos em matéria orgânica. A espécie se adapta bem aos solos férteis e úmidos, com iluminação plena (LORENZI & MATOS, 2002).

É amplamente utilizada em todo o mundo na medicina tradicional desde a Idade Média, havendo inclusive hoje variedades mais apropriadas para este fim. Seus principais constituintes são óleos essenciais ricos em carotenóides: caroteno, calendulina e licopina, flavocromo, mutacromo, aurocromo, favoxantina, crisantemazantina e xantofila, além de flavonóides, corantes (TESKE & TRENTINI, 2001, GAZIM *et al* 2007), monoésteres de faradiol (HAMBURGER *et al*, 2003). Seu óleo essencial estimula a granulocitose e fagocitose auxiliando no combate às infecções. Pela sua ação cicatrizante diminui a gastrite e a úlcera

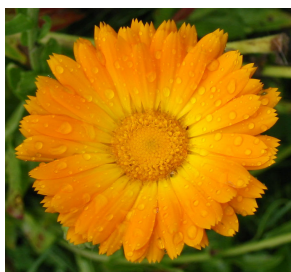
gástrica. Testes clínicos comprovaram sua ação antitumoral. O óleo de calêndula é indicado em casos de fissura de mamilo devido à amamentação, não sendo prejudicial ao lactante (TESKE & TRENTINI, 2001).

A calêndula é uma planta medicinal muito popular na Europa e nos EUA, já foi monografada em várias farmacopéias nacionais, e em 1999 no suplemento *European Pharmacopeia* (EUROPEAN PHARMACOPOEIA SUPPLEMENT, 1999).

A parte da planta usada para propósitos farmacêuticos e cosméticos é a flor seca, que contém saponinas, álcoois triterpenos e ésteres ácidos, carotenóides, flavonóides, cumarinas, taninos, (HAMBURGER *et al*, 2003; GAZIM *et al*, 2007). Foram atribuídas propriedades anti-inflamatórias das flores de calêndula com a ajuda de testes farmacológicos *in vivo* (SARTORI *et al*, 2003) atividade antimicrobiana (HSIEH *et al*, 2001), antiedematosa (HAMBURGER *et al*, 2003).

A calêndula tem sido utilizada normalmente como chás e pomadas. As infusões geralmente são feitas com 1 a 2 g da planta in natura em 150 mL de água fervente e ingeridas três vezes ao dia como antiespasmódico (JELLIN *et al.*, 2003); como pomada é usada como anti-inflamatório, para queimaduras, contusões e erupções cutâneas (LUENG & FOSTER, 1996; BLUMENTHAL *et al*, 2000).

As folhas secas também são usadas como um tempero sendo seu uso considerado seguro, pela FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2007). A calêndula tem sido usada tradicionalmente na medicina pela European Medicines Agency (EMA, 2008, a, b). A calêndula também é usada na perfumaria, na composição de perfumes, o aroma de suas flores está associado à presença dos sesquiterpenos na fração volátil, dentre esses está o d-cadineno que confere notas verdes, refrescantes e doces; e responsável pelas notas amadeiradas está o a-cadinol (REZNICEK & ZITTERL-EGLESEER, 2003).



(a) www.greenspiralherbs.com/Pictures.htm



(b) <http://commons.wikimédia.org/wiki/File:CalendulaOfficinalis.jpg>

Figura 2. Flor da calêndula (a) e plantação de calêndulas (b)

3.1.2 Capim – limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf)

O capim-limão pertence à família Poaceae, é uma erva perene, cespitosa quase acaule, com folhas longas, estreitas e aromáticas (Figura 3) e, quando recentemente amassadas tem forte odor de limão, flores raras e estéreis, de origem asiática, encontrada em cultivo principalmente na América do Sul, África, Índia, Austrália e nos Estados Unidos. É conhecida por diversos nomes populares, tais como capim-limão, capim-cidreira e capim-cidrão no Brasil, belgata e chá-do-gabão em Portugal, citronelle na França, lemon-grass nos países de língua inglesa e surwai na Índia (CORRÊA, 1984; SANGUINETTI, 1989; LORENZI & MATOS, 2002).

É consumido como uma bebida aromática e usado na culinária tradicional pelo seu sabor de limão, mas também é empregado na medicina popular. Infusões ou decocções de folhas secas têm sido utilizadas para dores no estômago, antiespasmódico, calmante, e agente anti-hipertensivo (BORRELLI & IZZO, 2000; GUPTA, 1995). Em muitos países é usado para tratar estados febris e como um relaxante. Ajuda em estados emocionais alterados e é um agente antidepressivo (GUPTA, 1995).

Possui emprego medicinal, para o qual podem ser utilizadas as folhas frescas ou dessecadas e o óleo extraído delas (BENNETT & PRANCE, 2000; SOUZA *et al*, 1991). O principal constituinte do óleo essencial é o citral (47 a 85%), formado por uma mistura dos isômeros geranial e neral (BRUNETON, 1991; EVANS, 1996; PINO & ROSADO, 2002; SIDIBE *et al*, 2001). Em quantidades menores já foram identificados outros componentes, como canfeno, citronelal, citronelol, farnesol, geraniol, limoneno, linalol, mentol, mirceno, nerol, a-pineno, b-pineno e terpineol (TESKE & TRENTINI, 2001; SOUZA *et al*, 1991). Entre os constituintes fixos encontram-se flavonóides (DEMATOUSCHEK & SATHLBISKUP, 1991), saponinas e alcalóides (SOUZA *et al*, 1991; D'MELLO *et al*, 1991).

Estudos com extratos de folhas e óleo essencial do *C. citratus* demonstraram efeito anti-inflamatório, hipotensivo, vasorelaxante, e atividade diurética (CARBAJAL *et al*, 1989; RUNNI *et al*, 2004), atividade antioxidante, (CAPIRO *et al*, 2001; MELO *et al*, 2001), propriedades quimiopreventivas (PUATANACHOKCHAI *et al.*, 2002), atividade antimicrobiana frente a cepas isoladas de infecção urinária (PEREIRA *et al* 2004) e atividade antimicrobiana, (DUKE, 1997; FIORI *et al.*, 2000).



http://shaman-australis.com.au/shop/images/Cymbopogon_citratus.jpg

Figura 3. Arbusto de capim-limão

3.1.3 Espinheira – santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek)

Várias plantas são conhecidas no Brasil com o nome popular “espinheira-santa”, dentre elas a *Maytenus ilicifolia* da família Celastraceae, nativa de muitas partes da América do Sul, incluindo partes do Brasil (HARTWELL, 1968; LIMA *et al*, 1969; LIMA, 1971), é uma árvore de pequeno porte ou arbusto grande, crescendo até o máximo de 5 m de altura, dotada de copa redonda e densa, nativa de regiões de altitude do sul do Brasil. Folhas coriáceas e brilhantes, com margens providas de espinhos pouco rígidos. Flores pequenas de cor amarelada. Os frutos são cápsulas oblongas, deiscentes, de cor vermelha contendo 1 a 2 sementes de cor preta (Figura 4) (LORENZI, 2002).

Estudos demonstraram a atividade antiúlcera gástrica em ratos e seres humanos, utilizando os extratos aquosos das folhas (CARLINI, 1988; SOUZA-FORMIGONE *et al*, 1991; GONZALEZ *et al*, 2001; QUEIROGA *et al*, 2000). O estudo fitoquímico indicou a presença de flavonóides (LEITE *et al*, 2001), há também relatos sobre outras substâncias polifenólicas (possivelmente taninos) nos extratos aquosos (CARLINI, 1988). A friedelina e o fridelan-3-ol são os triterpenos majoritários nas folhas de *Maytenus ilicifolia*, sendo proposto um método para sua quantificação (NOSSACK *et al*, 2000), visando o estabelecimento de critérios gerais de qualidade para os medicamentos fitoterápicos contendo espinheira-santa (VILEGAS *et al*, 1994; VILEGAS & LANÇA, 1997).

O Governo brasileiro através da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária); aprovou o uso e a comercialização de fitoterápicos da *Maytenus ilicifolia* pelo seu conteúdo conhecido de taninos, sendo que os mesmos são conhecidos por suas propriedades cicatrizantes (SOUZA *et al*, 2008).



(a) www.infobibos.com/.../2006_3/Espinheira/Fig1.jpg



(b) <http://cerradobrasileiro1ano.blogspot.com.jpg>

Figura 4. Folhas (a) e frutos (b) da espinheira – santa

3.2 Essencialidade dos minerais

Os elementos minerais possuem papéis essenciais, tanto como íons dissolvidos em líquidos orgânicos como constituintes de compostos essenciais, eles estão distribuídos na natureza e exercem papéis fundamentais no organismo humano. O equilíbrio de íons minerais nos líquidos corpóreos regula a atividade de muitas enzimas, mantém o balanço ácido – base e a pressão osmótica facilitando a transferência de compostos essenciais e mantém a irritabilidade nervosa e muscular (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

Os elementos traços, também chamados oligoelementos, juntamente com outros nutrientes essenciais são necessários para o crescimento, funcionamento fisiológico normal e manutenção da vida; eles devem ser consumidos através dos alimentos. A classificação exata de elementos traços e macrominerais não é clara, mas consideram-se elementos traços aqueles que são requeridos em quantidades menores que 100mg/dia, enquanto alguns deles são de vital importância para a vida, outros ainda têm seu papel biológico indefinido e outros podem causar sérios danos à saúde. Recomendações diárias fixas têm sido estabelecidas para alguns

elementos traços, pois sua deficiência pode causar prejuízo à saúde. Para decidir se um elemento é um micronutriente essencial, vários critérios são estabelecidos, como a presença do elemento em um tecido saudável, se aparece no feto ou recém-nascido, se o corpo mantém controle homeostático na sua captação, circulação sanguínea, tecido e excreção (LESNIEWICZ *et al*, 2006,).

Juntos, os minerais representam de 4 a 5% do peso corpóreo, aproximadamente metade deste peso é Ca, e outro quarto é P. Os outros cinco macrominerais (Mg, Na, Cl, K e S) e os 14 microminerais (Fe, Zn, Cu, I, Mn, F, Mo, Co, Se, Cr, Sn, Ni, V e Si) constituem os 25% restantes (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

Elementos traços possuem características preventivas e curativas no combate às doenças, por isso é muito importante conhecer o nível de macro e micronutrientes nas plantas medicinais e em medicamentos fitoterápicos estimando seus teores para fazerem parte da dieta humana, e também para verificar se estão em um nível adequado, pois alguns minerais em níveis elevados podem se tornar tóxicos.

Vários estudos ao longo da última década foram realizados para determinar a quantidade de macro, micronutrientes e íons de íons metálicos pesados em plantas, tanto medicinais quanto aromáticas (AJASA *et al*, 2004; CHIZZOLA *et al*, 2003; GARCIA *et al*, 2000; KUMAR, *et al*, 2005; LOPEZ *et al*, 2000, RAZIC *et al*, 2003).

Yemane *et al* analisaram o teor de íons metálicos (K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Na, Cd e Pb) em cinco amostras de chá de *Camellia assamica*, por espectrometria de absorção atômica em chama, entre os macronutrientes estudados o K foi o elemento mais abundante nos chás (17,7–24,8 mg/g), os íons metálicos tóxicos Pb e Cd estavam abaixo do limite de detecção do método utilizado (YEMANE *et al*, 2008).

Caldas e Machado determinaram o teor total de Cd, Hg e Pb em amostras de ginkgo-biloba (*Ginkgo biloba*), espinheira-santa (*Maytenus illicifolia*), cáscara-sagrada (*Rhamus purshiana*), berinjela (*Solanum melongena*), castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum*), ginseng (*Pffafia glomerata*), centelha-asiática (*Hydrocotyle asiatica*), guaraná (*Paullinia cupana*), alcachofra (*Cynara scolymus*), clorela (*Chlorella pyrenoidosa*), no total foram 130 amostras, utilizando espectrometria de absorção atômica, o Hg foi o elemento que foi determinado no maior número de amostras (38% das amostras), seguido do Pb (23%) e Cd (13%) (CALDAS & MACHADO, 2004).

Basgel & Edermoglu, determinaram 14 elementos nas águas de infusão de sete plantas diferentes consumidas na Turquia, pelas técnicas FAAS e ICP-OES, o conteúdo de Ca variou entre 17,74 e 965 mg/kg; Mg 610 – 2078 mg/kg, Fe 4,90 – 107,4 mg/kg, Al 1,60 – 19,7 mg/kg, Mn 4,30 – 49,1 mg/kg, Zn 3,9 – 18,0 mg/kg, cobre 2,45 – 8,1 mg/kg, não foram detectados os teores de Co, Cr, Pb e Cd nas infusões (BASGEL & EDERMOGLU, 2006).

3.2.1 Função dos minerais no organismo humano

Os minerais essenciais ao organismo humano podem ser classificados como macrominerais, microminerais e elementos traços. Os macrominerais (Ca, P, Mg, S, Na, Cl e K), são os elementos que devem ser consumidos diariamente em concentrações acima de 100 mg, os microminerais (Fe, Zn, Cu e Mn) em torno de 1 a 50 mg/dia e os elementos traços (I, Cr, Sb, Co, Se, Al, Si, Sr e Sn) abaixo de 1 mg/dia. A seguir encontram-se relacionados à importância de alguns elementos na nutrição humana (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

Cálcio

O Ca no organismo é o mineral mais abundante, constituindo de 1,5 a 2% do peso corpóreo e 39% dos minerais corpóreos totais; 99% do Ca encontram-se nos ossos e dentes. O 1% restante está no sangue e líquidos extracelulares e dentro das células dos tecidos moles regulando muitas funções metabólicas importantes (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

A principal função do Ca está na construção e manutenção dos ossos e dentes, além de ter uma série de papéis metabólicos, afeta a função de transporte das membranas celulares, possivelmente agindo como um estabilizador de membrana influencia ainda na transmissão de íons através da membrana de organelas celulares, na liberação de neurotransmissores nas articulações sinápticas, na função dos hormônios protéicos e na liberação ou ativação de enzimas intracelulares e extracelulares, é necessário para a coagulação sanguínea. O Ca é necessário na transmissão nervosa e regulação da batida cardíaca. O equilíbrio apropriado dos íons Ca, Na, K e Mg mantém o tônus muscular e controlam a irritabilidade. O Ca também previne a osteoporose sendo também um tranquilizante natural (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998; COSTA, 2002).

A recomendação nutricional diária (RDA) para adultos está baseada nas estimativas de perda obrigatória (200 a 250 mg/dia) e na taxa de absorção de 30 a 40%, ou seja, de 800 a 1200 mg/dia (FOOD AND NUTRITION BOARD, 1989).

Magnésio

O Mg é o segundo maior em quantidade de cátion dentro dos líquidos celulares. No organismo humano adulto está presente em aproximadamente 20 a 28g, dos quais aproximadamente 60% se encontram nos ossos, 26% nos músculos e o restante nos tecidos moles corpóreos (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

A principal função do Mg pode ser a de estabilizar as membranas das células em todo o organismo regulando o transporte ativo de outros minerais (Na, Ca, K), estabiliza também a estrutura da ATP (trifosfato de adenosina) nas reações enzimáticas dependentes da mesma. O Mg é um cofator para mais de 300 enzimas envolvidas no metabolismo de componentes alimentares e na síntese de muitos produtos. Entre as reações que exigem Mg estão a síntese dos ácidos graxos e proteínas, a fosforilação da glicose e seus derivados na via glicolítica e as reações da transcetolase. O Mg é importante na formação do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), que foi o “segundo mensageiro” a ser identificado. O AMPc recebe a mensagem de fora das células ou por hormônios ou por estímulos. O Mg desempenha também um papel na transmissão e atividade neuromuscular, trabalhando em conjunto ou contra os efeitos do Ca (COSTA, 2002; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

As ingestões médias diárias variaram de 187 mg para mulheres de 60 a 65 anos de idade até 194 mg para mulheres de 14 a 16 anos de idade (PENNINGTON & WILSON, 1990). Para os homens a variação média de ingestão foi de 250 mg para o grupo mais velho e de 297 mg para o grupo mais jovem.

Sódio, cloreto e potássio

Estes três constituintes dietéticos indispensáveis estão intimamente relacionados no organismo. O Na constitui 2%, o K 5% e o Cl⁻ 3% do conteúdo total de minerais no organismo. Estão distribuídos por todos os líquidos e tecidos orgânicos, mas o Na e o Cl são

elementos primariamente extracelulares, enquanto o K é um elemento principalmente intracelular. O Na, o K e o Cl⁻ estão envolvidos na manutenção das seguintes funções fisiológicas importantes do organismo: balanço e distribuição de água e nutrientes nas células, equilíbrio ácido-base e osmótico, contrações musculares normal. O sistema “bomba” Na/K/ATPase é importante na regulação do volume, manutenção do potencial de membrana, transporte de glicose e de alguns aminoácidos incluindo a alanina, prolina, tirosina e triptofano (COSTA, 2002; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

As necessidades mínimas estimadas para estes eletrólitos estão incluídas nas RDAs de 1989, uma vez que os dados ainda não estão disponíveis para sustentar recomendações específicas. A ingestão média de Na por indivíduos com 20 anos de idade e mais velhos variou de 2172 mg para as mulheres a partir de 80 anos até 4126 mg para homens de 20 a 29 anos de idade. A ingestão de K está entre 1800 a 2600mg/dia (COSTA, 2002; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

Ferro

O Fe foi reconhecido pela primeira vez como um nutriente essencial para animais em 1860. No organismo humano existem de 3 a 5g de Fe, aproximadamente 2g como hemoglobina e 8 mg como enzimas, ambas as formas são muito importantes, o restante do ferro está distribuído pelo organismo (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

Este íon desempenha muitas funções que resultam de suas propriedades físicas e químicas, principalmente sua habilidade de participar das reações de oxidação e redução, é essencial para o organismo. Quimicamente, o Fe é um elemento altamente reativo que pode interagir com o oxigênio para formar intermediários capazes de danificar membranas celulares ou degradar o DNA. O Fe precisa estar firmemente ligado às proteínas para prevenir efeitos destrutivos (COSTA, 2002; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998; LOZOFF, 1990).

O Fe tem um papel no transporte respiratório de oxigênio e dióxido de carbono é uma parte ativa das enzimas envolvidas no processo de respiração celular. O Fe também parece estar envolvido na função imunológica e no desempenho cognitivo. Apesar destas relações não estarem claramente identificadas, reforçam o imperativo de prevenir a anemia por deficiência de Fe na população mundial (COSTA, 2002; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

É muito importante para a função cerebral normal em todas as idades (BEARD *et al*, 1993), estando envolvido na função e síntese dos neurotransmissores e possivelmente mielina.

Ocorrem mudanças no metabolismo de Fe em certos estados de doença, tais como o mal de Alzheimer. A distribuição de Fe no cérebro muda durante o envelhecimento normal (JOHNSON *et al* 1994).

O “Food and Nutrition Board” recomenda uma ingestão diária de 10 mg Fe para homens e mulheres na pós-menopausa. Para mulheres e meninas é necessário uma ingestão de 15 mg/dia para repor as perdas ocasionadas pela menstruação e fornecer estoques de Fe suficientes para sustentar uma gravidez. Já para os meninos é uma RDA de 12 mg/dia (OMS, 1998).

Zinco

O Zn encontra-se distribuído por todo o reino vegetal e animal perdendo para o Fe em abundância. Sua concentração pode variar de 2 a 3 g no organismo de um adulto, sendo que as maiores concentrações estão no fígado, pâncreas, rim, ossos e músculos voluntários, está presente em todos os tecidos e líquidos do organismo (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998; OMS, 1998).

Este íon participa da síntese ou da degradação de metabólitos maiores, tais como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, da síntese de conversão por hidrólise do colágeno, da síntese do DNA e de fibroblastos. Mais de 200 enzimas de Zn foram isoladas de várias espécies. O Zn também está envolvido na estabilização de estruturas de proteínas e ácidos nucleicos e na integridade de organelas subcelulares, assim como nos processos de transporte, função imunológica e expressão da informação genética (COSTA, 2002; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998, PRASAD, 1998).

A RDA de 1989 estabeleceu 15 mg/dia como a ingestão apropriada para adolescentes e adultos. Devido ao peso corpóreo menor das adolescentes e mulheres adultas, sua RDA é de 12 mg/dia. A exigência para pré-adolescentes é estimada em 6 mg/dia, mas devido a uma perda dérmica maior e mais variação, a RDA tem sido estabelecida em 10 mg. A RDA para bebês é de 5 mg/dia durante o primeiro ano de vida (OMS, 1998).

Cobre

O Cu é um antioxidante que regenera a citocromo-oxidase é reconhecido também como um constituinte normal do sangue desde 1875. As concentrações de Cu são maiores no fígado, cérebro, coração e rim. O músculo tem uma concentração mais baixa, mas devido a sua grande massa, contém aproximadamente 40% de todo o Cu no organismo. Aproximadamente 90% do Cu no plasma são incorporado na ceruloplasmina, o resto é ligado e à albumina, transcurreína e aminoácidos (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998, OMS, 1998).

O Cu é um componente de muitas enzimas sendo necessário para a produção do ácido ribonucléico (RNA), e tem papéis bem documentados na oxidação do Fe antes dele ser transportado no plasma e na ligação cruzada do colágeno necessária para a sua força de tensão, atua também na produção de energia mitocondrial, é essencial para a formação da mielina nas fibras nervosas (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998; COSTA, 2002).

Apesar de dados suficientes não estarem disponíveis para estabelecer uma RDA, a revisão de 1989 recomenda como “ingestão dietética diária considerada segura e adequada” (ESADDI) para o Cu de 1,5 a 3 mg/dia para adolescentes e adultos. A ESADDI para crianças é de 0,7 a 2 mg/dia (OMS, 1998).

Crômio

Em 1945, os dados sugeriram pela primeira vez um papel biológico para o Cr, mas este não era geralmente aceito como um nutriente essencial até 1977.

Assim como outros minerais, as formas orgânicas e inorgânicas do Cr são absorvidas diferentemente. O Cr orgânico é prontamente absorvido, mas sai rapidamente do sangue. Menos de 2% do Cr trivalente consumido é absorvido, sendo esse o essencial ao organismo humano. A absorção do Cr é aumentada pelo oxalato e é maior em animais com deficiência de Fe do que em animais com estados de Fe adequados. A quantidade de Cr que é absorvida permanece constante com uma ingestão da dieta acima de 40 µg, ponto no qual a excreção urinária aumenta proporcionalmente a ingestão (ANDERSON, 1986). O Cr atua aumentando a efetividade da insulina facilitando a entrada de glicose no interior da célula.

A deficiência de Cr (III) pode causar sérios danos ao organismo. A deficiência afeta o fator de tolerância à glicose, aumenta a concentração de insulina no corpo, eleva a

concentração de colesterol e triglicerídeos no sangue, diminui a fertilidade e a longevidade, aumenta a incidência de placas na aorta e ainda causa desordem cerebral (ANDERSON, 1988).

A ESADDI para o Cr (III) é de 50 a 200 µg/dia para pessoas de 7 anos de idade e mais velhas.

Manganês

Até 1972, quando o primeiro relato de deficiência em humanos apareceu, duvidava-se que tal deficiência pudesse ocorrer em humanos. O Mn tem a função de atuar na diabetes, aumentando a produção da insulina; atua no pâncreas, é necessário na ativação enzimática estando associado à formação dos tecidos conjuntivo e ósseo, crescimento e reprodução e metabolismo de carboidratos e lipídeos (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998; COSTA, 2002).

Em 1989 foi estabelecida uma ESADDI para o Mn para adultos e crianças de 11 anos de idade ou mais na faixa de 2 a 5 mg/dia. Para crianças, de 1 a 3 mg/dia são sugeridas dependendo da idade (OMS, 1998).

3.2.2 Íons metálicos não essenciais

Os íons metálicos se movimentam mais largamente nos sistemas biológicos do que na crosta terrestre de onde são originados. Os mais abundantes na natureza são aqueles que apresentam número atômico menor que 40 e com exceção do Sn e Ba, todos os demais, quando encontrados nos seres vivos, são em quantidade traços (WOOD, 1976).

Dos 92 elementos naturais encontrados na natureza 22 são essenciais para os seres humanos e recebem o nome de micronutrientes (CONCON, 1988).

A maior parte dos íons metálicos encontrados no organismo humano apresentando ou não essencialidade, possuem alta reatividade química e atividade biológica, especialmente na forma de radicais, íons ou complexos orgânicos. Assim, podem ser de alto risco, dependendo da quantidade ingerida e das outras condições associadas à exposição (MIDIO & MARTINS, 2000).

Metal tóxico é considerado como aquele pertencente a um grupo de elementos que não possui propriedades benéficas e muito menos essenciais para o organismo vivo, podendo produzir efeitos maléficos, mesmo em quantidades traços para as funções metabólicas normais (PARMIGIANI & MIDIO, 1995). Entretanto os minerais essenciais tornam-se nocivos ao organismo quando ingeridos através de alimentos em quantidades muito acima das nutricionalmente desejáveis, ou se ocorrer exposição por outro meio que não a oral (MIDIO & MARTINS, 2000).

A maioria dos íons essenciais e não essenciais no organismo humano, provém da dieta, porém nem todo metal ingerido é retido no organismo, podendo ser eliminado pelas fezes, urina, suor, etc.(REILLY, 1980).

Na dieta, quando um íon metálico ou seus compostos estão presentes, as quantidades que serão absorvidas e retidas pelo animal dependem das características físico-químicas da substância, da composição dos alimentos, do estado nutricional e de fatores genéticos do organismo exposto (MIDIO & MARTINS, 2000).

A concentração dos íons metálicos em alimentos, independentemente de sua origem, fica em função das condições ambientais do local ou região onde este alimento foi produzido, e também das técnicas usadas no seu processamento e das condições de armazenamento, sendo que em um mesmo tipo de alimento podem existir variações consideráveis nos níveis de íons metálicos. (MIDIO & MARTINS, 2000; PARMIGIANI & MIDIO, 1995).

Chumbo

Devido suas características físicas como ductilidade, maleabilidade e baixo ponto de fusão, o Pb vem sendo utilizado a milhares de anos. Produtos provenientes de fundição e cosméticos a base de Pb tem sido usados desde a antiguidade. Atualmente, seu principal uso é na produção de baterias e alguns tipos de soldas, formando ligas com outros íons metálicos. Até pouco tempo seus sais eram usados na produção de pigmentos para tintas (KENDLER, 1993).

O Pb, tanto em sua forma elementar, como em compostos inorgânicos ou orgânicos apresentam riscos de intoxicação aos organismos expostos. Compostos como o chumbo tetraetila, por exemplo, ainda são usados em alguns países como aditivo da gasolina sendo centenas de vezes mais tóxicos que os compostos inorgânicos (MIDIO & MARTINS, 2000).

Intoxicações graves por Pb causam efeitos decorrentes da sua ação no sistema nervoso central (SNC) e no sistema renal. Porém, este tipo de intoxicação tornou-se praticamente incomum graças às várias regulamentações impostas para a obtenção do Pb e seus compostos, bem como seu emprego industrial. As possíveis intoxicações provocadas pelo Pb na população humana atualmente, ocorrem pela exposição ocupacional (MIDIO & MARTINS, 2000).

As exposições consideradas não ocupacionais são aquelas que se restringem à dieta e representa a principal fonte de absorção diária de compostos inorgânicos para a população, apesar de serem poucos os casos relatos de intoxicações através desse tipo de exposição, sendo que compostos orgânicos de Pb não estão presentes em alimentos (MIDIO & MARTINS, 2000)

O Pb estando presente no solo, apesar de pouco disponível em função de sua baixa hidrossolubilidade, pode ser transferido para os vegetais, sendo que raízes contêm maiores quantidades do que caules e folhas. Já os frutos e sementes apresentam, via de regra, as menores concentrações. A absorção do Pb pelos vegetais pode ser incrementada com o aumento da acidez do solo e diminuição da quantidade de húmus (PARMIGIANI & MIDIO, 1995).

Na atmosfera, o Pb se apresenta em sua forma particulada, podendo aderir-se firmemente aos vegetais folhosos cultivados em regiões muito próximas a centros urbanos, especialmente rodovias, elevando substancialmente as concentrações nos mesmos. (WHO, 1995; BURGUERA & BURGUERA, 1988).

No organismo humano, a distribuição inicial do Pb dependerá da velocidade de sua liberação do sangue para os vários outros órgãos. Evidências sugerem que essa distribuição é semelhante, independentemente da via de entrada do metal no organismo (MIDIO & MARTINS, 2000).

Quando presente na corrente circulatória, o Pb poderá ser distribuído de muitas maneiras, uma parte poderá ser excretada pela urina e, em menor quantidade, secretado na bile, no suor, ou pode ser armazenado em pelos unhas e dentes, não voltando à circulação. A quantidade que ficará disponível no organismo poderá ser retida em três locais diferentes, no tecido ósseo; nos rins, no sistema nervoso central, no fígado; e no próprio sangue circulante (MIDIO & MARTINS, 2000).

O Pb pode acumular-se nos ossos como fosfato insolúvel ficando 90% ou mais do total disponível no organismo, sendo que sua vida média nesse tecido ultrapassa os 20 anos. O Pb segue o movimento do Ca no organismo, e a exemplo deste, pode ser liberado dos ossos para a corrente sanguínea, podendo, também, ser mobilizado durante a gravidez e amamentação. (WHO, 1995; MIDIO & MARTINS, 2000).

Cádmio

O Cd é um elemento que não possui função fisiológica estabelecida, é encontrado somente no estado de valência 2, foi descoberto em 1817, possui alta resistência a corrosão e tem aplicações na galvanoplastia, em plásticos e pigmentos de tintas (MIDIO & MARTINS, 2000).

É armazenado nos rins, fígado, ossos e dentes, sua meia vida no organismo é de um a três anos, o que o torna tóxico, produzindo diminuição do crescimento e reprodução, hipertensão e disfunção renal e pulmonar. A exposição crônica ao Cd pode causar nefrotoxicidade em seres humanos, principalmente devido a anormalidades tubulares de reabsorção (NORDBERG, 1999). A ingestão diária de Cd em diferentes países europeus e nos Estados Unidos é estimada entre 10 a 40 µg/dia (GOYER, 1996).

Alumínio

O Al é um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, sendo responsável por 8% do total, é um metal muito versátil com uma ampla variedade de usos, como por exemplo, em cosméticos, pigmentos de tintas, abrasivos, aditivos alimentares, antiácidos, materiais de embalagem e construção; para o Al não existe evidência confirmada que possui alguma função essencial em animais ou seres humanos (OMS, 1998).

Com relação à saúde, seu potencial de toxicidade aumenta se a exposição for excessiva, principalmente no uso de água com Al em pacientes com falha renal submetidos à diálise crônica, onde foi evidenciado que o excesso de Al afeta o esqueleto pela formação óssea marcadamente reduzida, resultando em osteomalacia, outra manifestação patológica adicional da toxicidade do Al é uma anemia hipocrômica microcítica não associada à deficiência de Fe, esses problemas tem praticamente desaparecido desde que o uso de água deionizada livre de Al para diálise foi usada (ALFREY *et al*, 1980; OMS, 1998).

Vários trabalhos encontrados em literatura específica sugerem que o Al intervém em diversos processos neurofisiológicos responsáveis pela degeneração característica da doença de Alzheimer (DA). Apesar da polêmica existente, a evidência científica demonstra, ao longo dos últimos anos, que o Al se associa com o desenvolvimento da DA (FERREIRA *et al*, 2008; CAMPBELL, 2002).

Tem sido sugerido uma ingestão semanal tolerável de Al de aproximadamente 7 mg/kg de peso corpóreo. Em geral, não existe risco conhecido para pessoas saudáveis de ingestões de dieta típicas de Al. Os riscos surgem apenas do consumo exagerado de antiácidos por longo períodos de tempo e são aumentados nas pessoas com a função renal prejudicada (OMS, 1998).

3.2.3 Função dos minerais nas plantas

Os nutrientes nas plantas são divididos em dois grupos dependendo da quantidade requerida de cada elemento, os macronutrientes (N, P, S, Ca, Mg, K), que constituem o maior peso da planta e os micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn, Mo, B, Cl, Co, Si, Na) responsáveis por diversas funções nas plantas.

3.2.3.1 Macronutrientes

Nitrogênio

O N estimula a formação e o desenvolvimento das plantas e é componente das proteínas e aminoácidos, além de ser um importante ligante de íons metálicos, dependendo da espécie, do estágio de desenvolvimento e do órgão, a quantidade de N para o crescimento varia de 2 a 5% do peso da planta. A absorção de N ocorre de diferentes formas: $N_{2(g)}$, através das bactérias fixadoras, na forma mineral e como uréia, a forma predominante que as plantas absorvem, em condições naturais é a do nitrato devido o processo de nitrificação no solo. O N é um elemento de alta mobilidade na planta, na forma orgânica (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Fósforo

O P tem o papel de acelerar a formação das raízes, aumentar a frutificação, apressar a maturação dos frutos; ajudar na fixação simbiótica do N e aumentar o teor de carboidratos, óleos, gorduras e proteínas. O P é um elemento móvel na planta, e a forma de fixação depende da faixa de pH do solo, na faixa entre 2 e 7, predomina a forma H_2PO_4^- ; na faixa de 7 a 12 predomina a forma HPO_4^{2-} . A presença de Mg favorece a absorção de P. O P faz parte da molécula ATP (trifosfato de adenosina), produzido nas fosforilações oxidativas e fotossintéticas que participa de reações de sínteses e desdobramento de carboidratos, síntese de proteínas, da absorção salina. O P se redistribui facilmente na planta, principalmente quando está em falta (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Enxofre

O S é responsável pelo aumento na frutificação e vegetação, além de aumentar o teor de óleos, gorduras e proteínas e ajudar na fixação simbiótica do N. O S é absorvido pelas raízes, em condições aeróbicas, predominantemente na forma de sulfato SO_4^{2-} , as folhas além do sulfato absorvem também o gás SO_2 existente no ar, e S orgânico de aminoácidos. O S é constituinte dos aminoácidos cisteína e metionina e conseqüentemente de proteínas (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Cálcio

O Ca nas plantas é um ativador de diversas enzimas além da regulação da permeabilidade da membrana citoplasmática, neutralização de ácidos tóxicos, desenvolvimento e funcionamento das raízes; da germinação, de aumentar a resistência a pragas e doenças; auxiliar na fixação simbiótica do N. No solo, o Ca é absorvido na forma de cátion Ca^{2+} , nas extremidades das radículas; possui baixa mobilidade tanto no solo como na planta, é praticamente imóvel no floema. A presença de cátions como K^+ , Mg^{2+} e NH_4^+ , diminuem a absorção de Ca (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Magnésio

O papel mais conhecido do Mg nas plantas é sua presença na clorofila, sendo o átomo central, e é ativador de quase todas as enzimas fosforilativas, é essencial para a absorção de P. A absorção do Mg da solução do solo é feita na forma de Mg^{2+} , é um cátion bastante móvel; sua absorção é reduzida na presença de altas concentrações de Ca^{2+} , NH_4^+ e K^+ , pois esses cátions concorrem pelo mesmo sítio ativo de absorção (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Potássio

O K possui muitas funções nas plantas, ativa muitas enzimas, regula a abertura e o fechamento dos estômatos, estimula a vegetação, aumenta a utilização de água, aumenta a resistência as secas, geadas, pragas e moléstias, promove o armazenamento de açúcar e amido, ajuda na fixação simbiótica do N, aumenta o teor de carboidratos, óleos, gorduras e proteínas. A absorção do K é altamente seletiva e está interligada a atividade metabólica, aparece na forma K^+ sendo esta a forma mais absorvida pelas raízes dos vegetais, possui baixa afinidade por ligantes orgânicos. Baixas concentrações de Ca contribuem para sua absorção (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

3.2.3.2. Micronutrientes

Ferro

O Fe se apresenta no solo nas formas Fe^{2+} , Fe^{3+} ou complexado, exercendo várias funções importantes nas plantas devido sua alta capacidade redox, como na respiração, fotossíntese, reações de várias enzimas que operam na assimilação e na fixação do N_2 . O Fe possui pouca mobilidade na planta. Concentrações altas de Mn, Cu ou Zn podem inibir competitivamente a absorção de Fe (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Cobre

O Cu se apresenta no solo na forma de Cu^{2+} ligando-se com facilidade aos ácidos húmicos e fúlvicos, e como quelatos solúveis mais de 98% está complexado com compostos orgânicos como aminoácidos e compostos fenólicos. Acumula-se nas raízes e sua mobilidade é restrita, dependendo do teor no tecido. As principais funções do Cu são a participação na síntese de enzimas, participação indireta da fixação simbiótica do N, aumento na resistência a doenças, ativador de enzimas de óxido-redução que oxidam fenóis e que participam do transporte eletrônico terminal e da fotossíntese. O Zn compete com o Cu pelos mesmos sítios do carregador no processo de absorção (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al.*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Manganês

No solo as principais formas do Mn são Mn^{2+} e Mn^{3+} , estando em grande parte 90% complexado a compostos orgânicos. O Mn possui papéis importantes na planta, na fotossíntese, na redução do nitrato, na defesa contra doenças, a dismutase de peróxido depende do Mn e protege a célula do efeito dos radicais livres. O Mn possui baixa mobilidade, e é absorvido pelo sistema radicular na forma divalente Mn^{2+} (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al.*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Zinco

O Zn está presente na forma Zn^{2+} , não fazendo parte das reações de oxiredução. Um pH em torno de 6 favorece a absorção e diminui em um pH próximo de 3, o Fe, o Cu e o P inibem sua absorção. A absorção ocorre pelas raízes. O Zn é um elemento pouco móvel nas plantas, os quelados que forma com ácidos orgânicos são pouco estáveis. O Zn é importante na atividade de várias enzimas, além de possuir função no metabolismo do DNA e RNA, na divisão celular e na síntese de proteínas (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al.*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Molibdênio

É o micronutriente menos abundante no solo, a absorção do Mo se apresenta na forma de molibdato (MoO_4^{2-}) quando o pH é igual ou maior que 5 e como HMoO_4^- em pH menor, é pouco requerido pelas plantas e é um dos micronutrientes menos abundante no solo. A absorção é aumentada em presença de Fe^{2+} e reduzida na presença de Cl^- , Cu^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} . As funções do Mo são fixação do N através da enzima nitrogenase, aumento nas proteínas, ácidos nucleicos e ácido ascórbico (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Boro

O B é absorvido pelas plantas na forma H_3BO_3 (ácido bórico) estando relacionado ao pH e a concentração externa do elemento, sendo um elemento praticamente imóvel no floema, assim como o Ca. O B desempenha muitas funções, síntese e estrutura da parede celular para divisão e aumento no tamanho das células, transporte de carboidratos das folhas para outros órgãos, metabolismo do RNA, respiração, metabolismo fenólico, funcionamento das membranas celulares (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Cloro

O Cl está presente no solo na forma de anion Cl^- , é absorvido via radicular e foliar, é um íon de grande mobilidade, não entra na constituição de nenhum composto orgânico. Com relação às funções, o Cl^- atua como cofator em uma enzima que contém Mn que catalisa a fotólise de água com a liberação de $\text{O}_{2(g)}$, ativação de várias enzimas, mantém o balanço de cargas elétricas, regulação estomática, reduz o efeito de várias doenças (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Cobalto

Nas plantas o Co é absorvido na forma de Co^{2+} , quando absorvido via foliar é praticamente imóvel, a maior concentração se encontra nas raízes depois nas folhas. Quando o

Co está em excesso, diminui a absorção de Fe e Mn. É um elemento essencial para a fixação de N₂ por bactérias de vida livre, faz parte da constituição da vitamina B₁₂, intervém no metabolismo dos carboidratos e proteínas, ajuda no crescimento das raízes (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Silício

Em plantas o Si é absorvido como ácido monossilícico, H₄SiO₄, não dissociado. Como funções, diminui a toxidez do Fe e Mn, aumenta a absorção de P, aumenta a resistência a praga e doenças, sua essencialidade foi demonstrada para um número reduzido de plantas (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

Sódio

Absorvido ativamente na forma de íon Na⁺, dependendo de algumas espécies de planta pode substituir o K em algumas funções não específicas, o Na acumula-se principalmente nas raízes, depois caule e folhas, sua mobilidade é alta (FERRI, 2007; KERBAUY, 2004; MALAVOLTA *et al*; 1997; ROSS & SALISBURY; 1991).

3.3 A toxicidade das plantas medicinais

O uso de plantas medicinais em terapias, ou como suplemento dietético tem se tornado comum ao longo da história, mas nas últimas décadas houve um aumento significativo (WOODS, 1999; KHAN *et al*, 2001; WHO, 2002). Muitas vezes por serem considerados como medicamentos naturais, e, portanto inofensivos, a grande maioria não possui licenciamento e não precisam provar sua eficácia, segurança ou qualidade. Porém a segurança no uso apropriado destas plantas tem sido questionada através de trabalhos sobre doenças e fatalidades envolvendo o uso dessas terapias (STEWART *et al*, 1999; ERNST, 2002). Envenenamentos associados com a presença de íons metálicos tóxicos em plantas medicinais foram reportados na Ásia, Europa e Estados Unidos (CALDAS & MACHADO, 2004;

OLUJOHUNGBE *et al*, 1994; DUNBABIN *et al*, 1992; KAKOSY *et al*, 1996; MARKOWITZ *et al*, 1994)

As plantas podem conter íons metálicos pesados provenientes do solo, água ou ar (MCLAUGHLIN, 1999). Altos níveis de íons metálicos tóxicos podem ocorrer em medicamentos quando as plantas são usadas como princípios ativos, como no caso de Hg e Pb em alguns medicamentos chineses, mexicanos e indianos (LEVITT, 1984; CHAN *et al.*, 1993), ou quando as plantas são cultivadas em áreas poluídas, como perto de estradas, ou locais de mineração e fundição (PIP, 1991). Além disso, os elevados níveis podem ser encontrados quando se usam aditivos agrícolas como adubos orgânicos ou pesticidas contendo Cd, Pb ou Hg e também pela irrigação através da água contaminada (ABOU-ARAB *et al*, 1999). O Pb e o Hg podem causar efeitos adversos sobre os sistemas renal e nervoso e podem atravessar a placenta, com potenciais efeitos tóxicos sobre o feto (TONG *et al.*, 2000; WHO, 2003).

Além dos íons metálicos pesados as plantas podem ser contaminadas com agentes microbianos patogênicos e toxinas químicas, através da adulteração, da colheita, do ambiente em que são cultivadas, conservação e armazenagem desfavoráveis e errados (CHAN, 2003).

3.4 Compostos fenólicos em plantas medicinais

Quimicamente compostos fenólicos são aqueles que pertencem a uma classe na qual são incluídas estruturas simples e complexas, tendo como característica principal possuir pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila (Figura 5). Esses compostos englobam desde moléculas simples até algumas com alto grau de polimerização e contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, além de serem essenciais para o crescimento e reprodução (SIMÕES *et al*, 2007, SOARES, 2002).

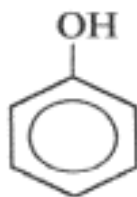


Figura 5. Estrutura básica de um composto fenólico

Entre os compostos fenólicos que pertencem ao metabolismo secundário dos vegetais, não fazendo parte do metabolismo básico, são encontradas estruturas variadas como: ácidos fenólicos, derivados da cumarina, flavonóides, saponinas, taninos, alcalóides, entre outros (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Os ácidos fenólicos são caracterizados por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico, e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, podendo ser divididos como derivados do ácido benzóico, como por exemplo, o ácido gálico e ácido siríngico, e derivados do ácido cinâmico, como por exemplo, ácido *p*-cumárico e o ácido caféico (Figura 6) (SIMÕES, *et al*, 2007, SOARES, 2002).

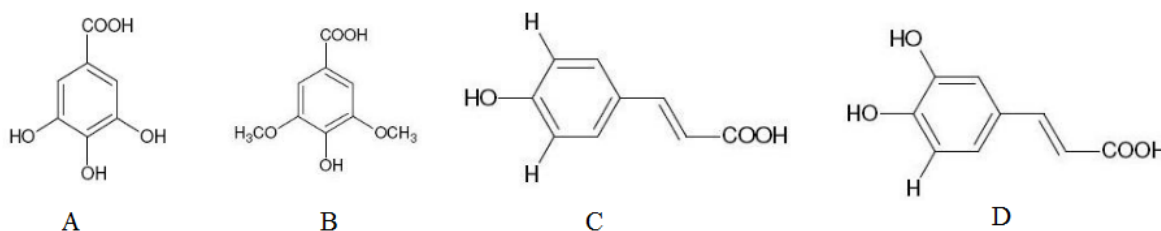


Figura 6. Estruturas moleculares de compostos fenólicos. (A) Ácido Gálico, (B) Ácido Siríngico, (C) Ácido *p* – cumárico, (D) Ácido caféico.

Os flavonóides são um grupo de compostos polifenólicos amplamente distribuído nas plantas medicinais, hortaliças, sucos de frutas e em uma variedade de bebidas (chás, café, vinhos, etc). A estrutura básica é representada por 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental dispostos em uma configuração C₆ – C₃ – C₆, constituída de duas fenilas A e B, ligadas por uma cadeia de 3 carbonos entre elas (Figura 7). Alguns flavonóides encontrados em plantas são: galangina, canferol, miricetina, quercetina, flavona, flavonona, entre outros (Figura 8). Esses compostos apresentam funções importantes nas plantas, entre elas ação antioxidante, inibidores de enzimas, proteção contra a incidência dos raios solares e contra

insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais com a finalidade de polinização (SIMÕES, *et al*, 2007; ANGELO & JORGE, 2007).

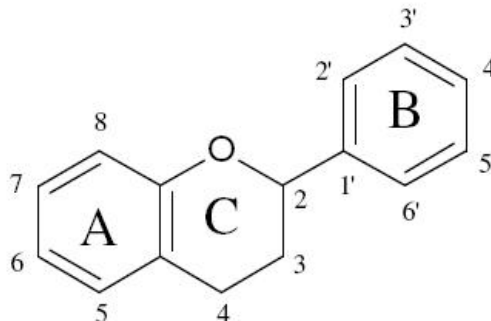


Figura 7. Estrutura genérica das moléculas dos flavonóides

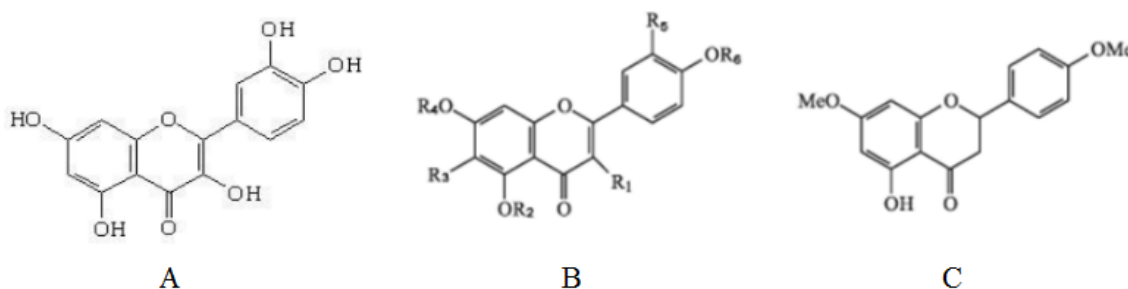


Figura 8. Estruturas moleculares de flavonóides. (A) Quercetina, (B) Flavona, (C) Flavonona

Estudos experimentais recentes demonstram que os flavonóides possuem efeitos benéficos para a saúde humana, incluindo propriedade de proteção cardiovascular, atividade antineoplásica, antiúlcera, antialérgica, antiviral e anti-inflamatória. Esta promoção na saúde parece estar relacionada com a atividade dos flavonóides em serem antioxidantes naturais (SHAGHAGHI *et al*, 2008; HANASAKI *et al*, 1994).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem em sua última camada eletrônica, um número ímpar de elétrons. O não emparelhamento de elétrons nesta última camada confere alta reatividade a estas moléculas ou átomos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Essas espécies de alta reatividade ou espécies reativas de oxigênio (EROs), como O₂⁻, causam danos no DNA ou ainda podem oxidar proteínas e lipídios (SOUSA *et al*, 2007).

Substâncias antioxidantes podem ser definidas como sendo aquelas capazes de inibir ou retardar a oxidação substratos oxidáveis, podendo ser enzimáticos ou não enzimáticos como as vitaminas A e E e os compostos fenólicos como os flavonóides (HALLIWELL, 2001, ASOLINI *et al*, 2006; HANASAKI *et al*, 1994).

O mecanismo de ação dos compostos antioxidantes, ou seja, neutralizadores de radicais livres, presentes nos extratos das plantas, desempenha um papel fundamental na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal e quando incorporado na alimentação humana além de conservar a qualidade do alimento também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (NAMIKI, 1990; RAMARATHNAM *et al*, 1995). A atividade anticarcinogênica dos compostos fenólicos já tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Os compostos fenólicos que possuem este potencial são resveratrol, quercetina, ácido caféico e flavonóis (PIMENTEL *et al*, 2005).

Arabbi *et al* estimaram a ingestão dietética de flavonóides pela população brasileira como sendo de 60 a 106 mg/dia.

3.5 Atividades biológicas nas plantas

A grande maioria das plantas utilizadas com fins medicinais não teve suas potencialidades terapêuticas devidamente comprovadas. Portanto faz-se necessário estudos sobre as plantas devido o grande consumo das mesmas para diversos males da saúde, e também devido ao aumento da resistência dos micro-organismos aos antibióticos alopatóicos.

Devido à presença dos metabólitos secundários os vegetais são capazes de produzir substâncias antibióticas, sendo utilizadas como mecanismo de defesa contra micro-organismos, insetos e até herbívoros (GOTLIEB, 1981).

Muitos são os fatores que interferem na produção dos metabólitos secundários, como variações sazonais, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição, estágio de desenvolvimento e idade, composição do solo. (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Incluem-se nos principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas extraídos de extratos de plantas as flavonas, flavonóis e flavonóides, (GONÇALVES *et al*,

2005; SILVA *et al*, 2005; LEITE *et al*, 2001); substâncias fenólicas e polifenólicas, sendo os fenóis simples, ácidos fenólicos e quinonas (STERN *et al*, 1996), taninos (SCALBERT, 1991; ARAÚJO, 2007; LOGUERCIO *et al*, 2005); entre outros.

A maioria dos estudos sobre as atividades terapêuticas das plantas tem sido realizada com seus extratos etanólicos e óleos essenciais descrevendo numerosas atividades como a antimicrobiana (BETONI *et al*, 2006; INDU *et al*, 2006; HSIEH *et al*, 2001; DUARTE *et al*, 2004), a antioxidante (ANDRADE *et al*, 2007; ASOLINI *et al*, 2006; LU & FOO, 2001; RAMALHO, 2005; MELO *et al*, 2003; SOUSA *et al*, 2007; RAMARATHNAM *et al*, 1995), a anti-inflamatória (HAMBURGER *et al*, 2003; HOLETZ *et al*, 2002; SARTORI *et al*, 2003), a antifúngica (RESENDE & RESENDE, 1999; FIORI *et al*, 2000) e a antiulcerogênica (CARLINI, 1988; GONÇALVES *et al*, 2006; GONZALEZ *et al*, 2001; QUEIROGA *et al*, 2000; SOUZA-FORMIGONE *et al*, 1991).

Dentre as atividades mais estudadas das plantas medicinais, está a antimicrobiana ou antibacteriana, onde as pesquisas focam principalmente em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, onde se utiliza testes de difusão em ágar e em disco (SANTOS *et al*, 2007; SCHUCK *et al*, 2001; LOGUERCIO *et al*, 2005; MICHELIN *et al*, 2005; FALCÃO *et al*, 2006). As bactérias Gram-positivas geralmente estudadas são a *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e as Gram-negativas podem-se citar a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Klebsiella pneumoniae*. Diversos estudos apresentam também a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) de extratos ou óleos essenciais das plantas frente a esses micro-organismos patogênicos (AVANCINI *et al*, 2000; ANTUNES *et al*, 2006; SOUZA *et al*, 2000; MELO *et al*, 2006; DIAS *et al*, 2006; OSTROSKY *et al*, 2008; PEREIRA *et al*, 2005)

O *Staphylococcus aureus*, é uma das bactérias mais comuns na prática médica sendo a causa comum de furunculose, mas quando invadem a corrente sanguínea causam infecções, como osteomielite e pneumonia, essa bactéria é uma das que mais causa mortalidade entre as infecções hospitalares (SILVA *et al*, 2007; BETONI *et al*, 2006, MOREIRA *et al*, 1998; MURRAY *et al*, 2002).

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva amplamente distribuída entre animais e no meio ambiente, e tem sido associada à toxinfecções alimentares (alimentos crus), a infecção pode ser grave (INDU *et al*, 2006).

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa oportunista, pois causa doença em indivíduos imunocomprometidos estando associada a uma variedade de infecções nestes indivíduos sendo um dos principais agentes isolados em casos de infecção hospitalar em uma UTI (unidade de terapia intensiva), particularmente em pneumonia associada à ventilação mecânica, pelo fato desta bactéria ter adquirido resistência múltipla aos antibióticos usuais. Esse micro-organismo pode causar infecções urinárias e respiratórias, pneumonias, meningites, endocardites e diversos outros tipos de infecção (ARRUDA, 1998; FOCA *et al.*, 2000; CUNICO *et al.*, 2004)

A *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa que causa pneumonia, envolvendo a destruição necrótica dos espaços alveolares, a formação de cavidades e a produção de escarro sanguinolento, essa bactéria pode causar ainda infecções de ferimentos e dos tecidos moles (MURRAY *et al.*, 2002).

Além de bactérias há registros do uso de extratos ou óleos essenciais de plantas para fungos, na literatura são encontrados comumente testes envolvendo a levedura *Candida albicans* (ANTUNES *et al.*, 2006; FALCÃO *et al.*, 2006), que afeta mucosas da boca, vagina, esôfago. A candidíase disseminada geralmente se propaga na corrente sanguínea e consequentemente, afeta muitos órgãos (MURRAY *et al.*, 2002).

3.6 Métodos de análise quantitativa de íons metálicos e compostos fenólicos em plantas medicinais

Muitos métodos e técnicas analíticas têm sido propostos e usados na determinação de íons metálicos em uma grande variedade de amostras tais como águas, solos, sedimentos, peixes, vegetais e alimentos, e também em materiais biológicos. A análise de qualquer material encontra a dificuldade de se obter uma amostra representativa sem perdas nem contaminação durante a amostragem, a estocagem ou a preparação no laboratório. Devido à importância dos minerais e elementos traço para a nutrição humana, faz-se necessária a determinação destes. Além da determinação de minerais essenciais, geralmente é realizada também a quantificação de elementos não essenciais ao organismo, pois muitas plantas e/ou suas misturas podem apresentar risco à saúde humana devido à presença de elementos tóxicos como Pb, Cd, Al, Hg, Cr, (GARCIA *et al.*, 2000; CALDAS & MACHADO, 2004; LOPEZ *et*

al, 2000). Para a quantificação de íons metálicos em plantas, utilizam-se diferentes técnicas: espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com acoplamento de plasma induzido (ICP-OES), métodos eletrotérmicos, análise por ativação de neutrônica e a fluorescência de raios X por reflexão total, (VASSILEVA & HOENING, 2001; KRACHLER *et al*, 2002; KHAN *et al*, 2001; FERNADEZ *et al*, 2002, BASGEL & EDERMOGLU, 2006), sendo a mais utilizada para este tipo de amostra a espectrometria de absorção atômica.

Para a determinação de compostos fenólicos em plantas, podem-se utilizar as técnicas: espectrofotometria no UV-Vis e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e apesar da segunda técnica ser mais precisa, a primeira também apresenta bons resultados sendo uma técnica simples e barata (ASOLINI *et al*, 2006; SHAGHAGHI *et al*, 2008, SOUSA *et al*, 2007).

Geralmente quando se utiliza o método espectrofotométrico UV-vis, para quantificação de compostos fenólicos, emprega-se o reagente de Folin-Ciocalteu, o qual é muito presente na literatura, pois se obtém boa reprodutibilidade, (ASOLINI *et al*, 2006; ARAÚJO, 2008; SHAGHAGHI *et al*, 2008, VERZA *et al*, 2007). Este método baseia – se em uma reação de óxido-redução em meio alcalino onde o íon fenolato é oxidado enquanto o reagente Folin (W e Mo) é reduzido deixando a solução azul (NACZK & SHAHIDI, 2004; IKAWA *et al*, 2003; SOUSA *et al*, 2007).

Na quantificação dos flavonóides em plantas utiliza-se o método espectrofotométrico através da complexação do alumínio (SANNOMIYA *et al*, 1998). Na presente técnica, o cátion Al forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol promovendo um desvio batocrômico na absorção, assim determina-se a quantidade de flavonóides presente nos extratos das plantas, evitando a interferência de outros compostos fenólicos, principalmente dos ácidos fenólicos (JURD & GEISSAMAN, 1956; PETRY *et al*, 2001).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumental

As determinações de Cd, Pb, Cr, Fe, Ca, Mg, Mn, Cu, Zn, Al, Na e K foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica em chama - FAAS (Varian modelo AA 220), equipado com lâmpadas de cátodo oco da marca Varian. Os parâmetros instrumentais estão apresentados na Tabela 1. Todas as medidas de absorbância foram realizadas no modo integração de área e as amostras preparadas em triplicatas e descontados os respectivos sinais das provas em branco. Todos os íons metálicos fez-se em modo absorção com exceção do Na e K que utilizou-se emissão, a chama utilizada foi de ar/acetileno, exceto para Ca e Al os quais foram determinados com chama óxido nitroso/acetileno. O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada e pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica. Neste estudo o L.D. dos íons metálicos foi considerado igual a três vezes o desvio padrão do branco dividido pela inclinação da reta. Para efetuar as análises, utilizaram-se curvas analíticas com padrões certificados de metais de pureza elevada, em concentração de 1.000 mg L^{-1} , fizeram-se 5 padrões para cada metal.

As determinações dos fenólicos totais e flavonóides foram realizadas em um espectrofotômetro UV-VIS Varian Cary 50 Bio. O comprimento de onda utilizado foi 760 nm para ácidos fenólicos e 425 nm para flavonóides.

Para as análises antimicrobianas utilizou-se uma autoclave Vertical Phoenix para a esterilização dos materiais e uma câmara em fluxos Logen Scientific para os procedimentos decorrentes da análise. Foram utilizados outros materiais complementares como o *swab*, tubo de Duran, placas de petri e paquímetro.

Para a obtenção dos extratos das plantas, utilizou-se um agitador magnético Fisatom Mod. 752A, e a evaporação do solvente foi realizada em evaporador rotativo com banho de água em temperatura até 60°C e pressão reduzida.

A calcinação das plantas foi realizada utilizando cadinhos de porcelana em mufla a aproximadamente 500°C , por 8 horas.

Tabela 1: Parâmetros instrumentais para determinação de íons metálicos por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS)

Metais	Comprimento de onda (nm)	Limite de detecção (mg/L)	Fenda (nm)	Corrente (mA)	Chama
Cd	228,8	0,03	0,5	4	ar/C ₂ H ₂
Pb	217,0	0,28	1,0	5	ar/C ₂ H ₂
Cr	357,9	0,05	0,2	6	ar/C ₂ H ₂
Fe	248,3	0,06	0,2	5	ar/C ₂ H ₂
Ca	239,9	0,02	0,2	10	C ₂ H ₂ /N ₂ O
Mg	202,6	0,01	1,0	4	ar/C ₂ H ₂
Mn	279,5	0,09	0,2	5	ar/C ₂ H ₂
Cu	324,7	0,14	0,5	4	ar/C ₂ H ₂
Zn	213,9	0,18	1,0	5	ar/C ₂ H ₂
Al	309,3	0,17	0,2	10	C ₂ H ₂ /N ₂ O
Na	330,3	0,01	0,1	-	ar/C ₂ H ₂
K	766,5	0,03	0,1	-	ar/C ₂ H ₂

4.2 Amostras e reagentes

As amostras das plantas calêndula e capim-limão, devidamente secas e embaladas foram cedidas pela CERCCOPA (Central Regional de Comercialização do Centro Oeste do Paraná), e a amostra da planta espinheira-santa foi obtida diretamente de pequenos produtores rurais do município de Turvo-PR.

Os reagentes e solventes utilizados nas análises espectrofotométricas foram de grau analítico. Todos os padrões utilizados para as análises dos íons metálicos por FAAS foram da marca J.T.Baker Instra-Analysed[®] (1000 µg/mL). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, proveniente do aparelho HUMAN UP 900[®].

Na determinação dos fenóis totais empregou-se uma solução estoque de 0,1 g de ácido gálico em 100 mL de metanol, uma solução saturada de carbonato de sódio (20 g) e tartarato de sódio (1,2 g) em 100 mL de água ultrapura e o reagente Folin- Ciocalteu®.

Para a determinação de flavonóides utilizou-se solução estoque de quercetina 0,01% m/v em metanol e uma solução de cloreto de alumínio 5% m/v em metanol.

4.3 Testes antimicrobianos

Para os testes antimicrobianos foram utilizados os seguintes micro-organismos patogênicos que estão armazenados no laboratório de microbiologia do Departamento de Engenharia de Alimentos da UNICENTRO: bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection) ATCC 25923, *Listeria monocitogenes* ATCC 19111; bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumoniae* isolado clínico; e a levedura *Candida albicans* isolado clínico. Os testes foram feitos em duplicata.

Para o meio de cultura preparou-se um caldo de tripticase de soja (TSB), onde em 1 L de água destilada adicionaram-se 30 g de TSB e 15 g de ágar. A dissolução foi realizada com aquecimento a temperaturas em torno de 60 a 80°C utilizando uma chapa de aquecimento da Fisatom Mod. 752A.

4.4 Parte experimental

4.4.1 Obtenção dos extratos etanólicos

Para a obtenção dos extratos alcoólicos a partir das amostras de plantas medicinais foram preparadas soluções etanólicas nas proporções de 70% e 95% v/v. Transferiu-se 25 g de cada planta para béqueres de 1000 mL e adicionou-se 400 mL de etanol em cada recipiente, respectivamente. Deixou-se em agitação magnética por 24 h, filtrou-se e fez-se a evaporação dos solventes pelo evaporador rotativo com banho de água em temperatura até 60°C e pressão reduzida, para obtenção dos extratos secos. Os extratos obtidos foram denominados de acordo com a concentração da solução etanólica, EEP70 (extrato etanólico de planta 70%) e EEP95 (extrato etanólico de planta 95%).

4.4.2 Determinação do teor de íons metálicos extraídos nas infusões aquosas

Para a determinação do teor de íons metálicos na infusão aquosa de cada planta, pesou-se 2 g de amostra em um béquer de 50 mL, adicionou-se água fervente, até cobrir a planta, abafou-se a infusão por cerca de 10 min., esperou-se esfriar, filtrou-se em uma bomba à vácuo, e transferiu-se para balões de 100 mL (triplicata). A quantificação foi realizada através de espectrometria de absorção atômica em chama utilizando curvas analíticas dos íons metálicos em meio aquoso.

4.4.3 Determinação do teor total de íons metálicos nas plantas medicinais

Para a determinação da concentração total de íons metálicos nas plantas utilizou-se o procedimento de digestão por via seca (calcinação). Pesou-se 1 g de cada amostra, carbonizou-se em bico de Bunsen até completa liberação de fumos, calcinou-se em mufla durante 8 h a 500°C. Após solubilizou-se com aproximadamente 3 mL de uma solução de HCl 1:1 v/v, e transferiu-se para balão de 50 mL (triplicata).

Como o Pb é um metal volátil em temperaturas elevadas procurou-se otimizar o procedimento de calcinação a fim de não perder o Pb por volatilização (este estudo foi um experimento paralelo à determinação dos outros metais). Adicionou-se 100 µg Pb/mL em amostras de calêndula previamente ao processo de calcinação. Após a digestão da amostra efetuou-se o estudo de recuperação do metal através de medidas por espectrometria de absorção atômica.

4.4.4 Determinação do teor de íons metálicos extraídos nos extratos etanólicos

Para a determinação da concentração de íons metálicos nos extratos etanólicos, pesou-se 0,01 g de cada extrato de planta (70 e 95%), dissolveu-se em etanol 95%, avolumou-se

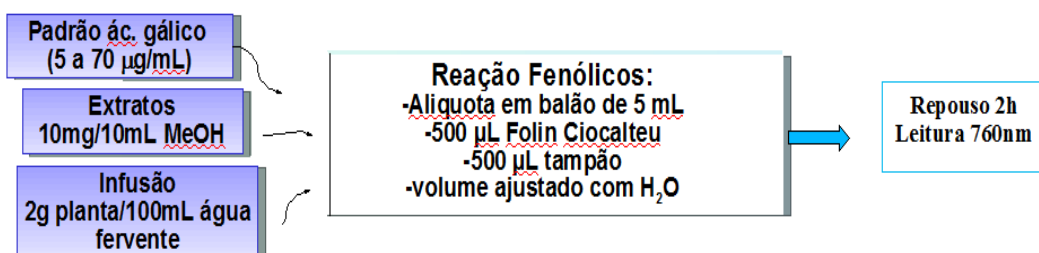
para balões de 10 mL (triplicata). A quantificação foi realizada através de espectrometria de absorção atômica em chama utilizando curvas analíticas dos metais em meio etanólico.

4.4.5 Quantificação de fenóis totais pelo método Folin – Ciocalteu

Para elaboração da curva analítica foram usadas soluções de concentrações conhecidas de ácido gálico em metanol (5 a 70 $\mu\text{g/mL}$) preparadas a partir de uma solução estoque (1000 $\mu\text{g/mL}$). Preparou-se uma solução intermediária do padrão para se chegar as concentrações utilizadas no trabalho. Dessas soluções de referência retiraram-se alíquotas de 1 mL e misturaram-se em balão volumétrico de 5 mL com 500 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 500 μL de solução saturada de carbonato de sódio e tartarato de sódio. Ajustou-se o volume do balão volumétrico com água destilada. Esperou-se 2 horas e fez-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro na região do visível no comprimento de onda de $\lambda = 760$ nm.

Para a determinação do teor de fenóis nos extratos das plantas preparou-se soluções onde 10 mg de cada extrato foram dissolvidos, separadamente, em 5 mL de metanol e transferidos para balões de 10 mL. A partir de cada solução retiraram-se alíquotas de 150 μL e repetiu-se o mesmo procedimento descrito para as curvas de calibração. Para cada extrato as medidas foram realizadas em triplicata.

Para a determinação do teor de fenóis nas águas de infusão, preparou-se uma infusão com 2 g de planta em 100 mL de água, desta solução retirou-se 300 μL e repetiu-se o mesmo procedimento descrito para as soluções padrão. O Fluxograma 1 apresenta o procedimento utilizado na determinação de fenóis por espectrofotometria Uv-vis.



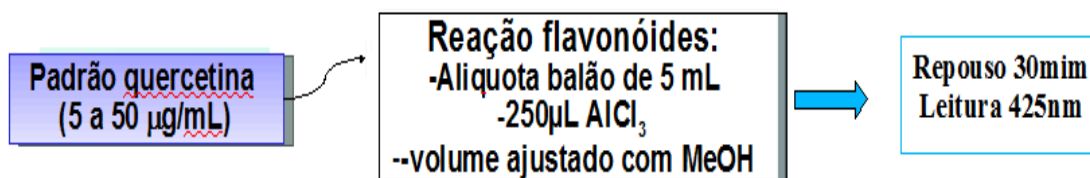
Fluxograma 1: Determinação do teor de fenóis totais nas águas de infusão e nos extratos etanólicos.

4.4.6 Quantificação de flavonóides por complexação com cloreto de alumínio

Para elaboração da curva analítica foram usadas soluções de concentração conhecida de quercetina em metanol (5 a 60 $\mu\text{g/mL}$) preparadas a partir de uma solução estoque (1000 $\mu\text{g/mL}$). Fez-se inicialmente um estudo de diluições até se chegar às concentrações utilizadas no trabalho. Dessas soluções de referência retiraram-se alíquotas de 500 μL e misturaram-se em balão volumétrico (5 mL) com 1 mL de metanol e 250 μL de solução cloreto de alumínio 5% m/v. Esperou-se 30 min. e fez-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro na região do visível no comprimento de onda de $\lambda=425\text{ nm}$.

Para a determinação do teor de flavonóides nos extratos das plantas preparou-se soluções dissolvendo 10 mg de cada extrato em 5 mL de metanol completando-se o volume com metanol em balão volumétrico de 10 mL. A partir de cada amostra retirou-se alíquotas de 300 μL e repetiu-se o mesmo procedimento descrito para as soluções utilizadas na curva analítica. Para cada extrato as análises foram feitas em triplicata.

Para a determinação do teor de flavonóides nas águas de infusão, preparou-se uma infusão com 2 g de planta em 100 mL de Agua, desta solução retirou-se 300 μL e repetiu-se o mesmo procedimento descrito para as soluções padrão (Fluxograma 2).



Fluxograma 2: Determinação do teor de flavonóides nas águas de infusão e nos extratos etanólicos

4.4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.4.7.1 Teste de difusão em Agar

Os micro-organismos foram testados frente à água de infusão e frente aos extratos etanólicos 95% e 70% das plantas. Os extratos obtidos em meio etanólicos 70% e 95% foram preparados na concentração de 10% m/v com etanol 95% como solvente. A água de infusão e os extratos foram esterelizados por filtração em membrana 0,22 µm.

Todo material utilizado para os testes antimicrobianos foi esterilizado em autoclave por 15 min. a 120°C. O procedimento de inoculação dos micro-organismos e de adição dos extratos e infusões foi executado em câmara de fluxo.

Os micro-organismos foram repicados em caldo tripticase de soja (tripticase soy broth– TSB) (Difco) e mantidos por 24 horas a 35°C em estufa bacteriológica. Estas suspensões microbianas foram padronizadas em solução salina estéril (0,9%) para uma concentração de 10⁶ UFC/mL (unidades formadoras de colônias), comparando-se com a escala 0,5 de McFarland, segundo normas NCCLS/CLSI. As suspensões microbianas foram semeadas com o auxílio de *swab* estéril, sobre a superfície de placas de Petri contendo 18 mL de ágar tripticase de soja TSA (Difco).

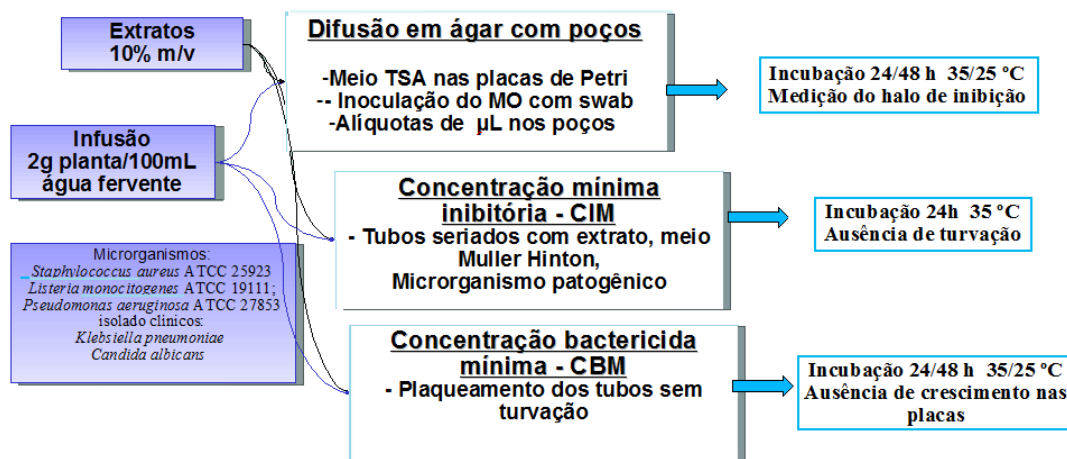
Em seguida foram feitos orifícios de 8 mm com auxílio de tubos de Duran no meio TSA já inoculado com as suspensões microbianas. Com auxílio de micropipeta foram adicionados 100 µL dos extratos concentrados e das infusões. Como controle negativo utilizou-se água e etanol 95% e 70%, conforme o extrato ou infusão testado. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para as bactérias e a 25 °C por 48 h para a levedura. Os resultados da susceptibilidade aos produtos vegetais foram expressos em termos de tamanho de diâmetro do halo de inibição do crescimento microbiano, medido com auxílio de paquímetro.

4.4.7.2 Teste da concentração inibitória mínima– CIM

Os extratos e infusões que apresentaram resultados positivos obtidos no teste de difusão em Agar foram testados para verificação da concentração inibitória mínima (CIM) através do teste de diluição seriada com sistema de tubos múltiplos (RIOS *et al*, 1988). O teste foi feito adicionando-se 1 mL de meio Miller Hinton (Difco) em tubos seriados, com exceção do primeiro tubo (tubo 1), que recebeu 2 ml do meio. Em seguida retirou-se 1 ml do meio do tubo 1 e adicionou-se 1 mL do extrato da planta previamente diluído em água destilada (1:2). A partir do tubo 1 foi feita a diluição 1:10 para os tubos seguintes 2 e 3. O tubo 4 não recebeu adição de extrato e foi utilizado como controle negativo. Desta forma, a concentração final de extratos foi de 25 mg/mL; 2,5 mg/mL e de 0,25 g/mL para os tubos 1, 2 e 3, respectivamente. Em seguida, todos os tubos receberam a adição de 1 mL de suspensão microbiana devidamente diluídos, e foram incubados a 37 °C para as bactérias e a 25 °C para a levedura por 24 h. Foi considerada CIM a menor concentração que inibiu o desenvolvimento microbiano, ou seja, sem turvação do meio no tubo.

4.4.7.3 Teste de concentração bactericida mínima – CBM

A partir dos tubos do teste do CIM em que não foi observada turvação no meio, foi retirada uma alíquota, devidamente diluída e plaqueada em meio TSA. A leitura foi feita após incubação a 37°C para as bactérias e a 25 °C para a levedura por 24 h, sendo considerada CBM a concentração da placa que não apresentou desenvolvimento de nenhuma colônia de micro-organismo (Fluxograma 3).



Fluxograma 3: Determinação da atividade antimicrobiana

4.4.8 Análises das correlações entre os parâmetros avaliados

Com o objetivo de se estudar possíveis relações entre os teores dos íons metálicos e os compostos orgânicos determinados nas plantas, aplicou-se um estudo quimiométrico aos resultados obtidos. Para se identificar grupos de elementos com comportamento similar e o comportamento geral dos dados, foi utilizada a análise de componentes principais (PCA), avaliando o conjunto de dados obtidos e obtendo uma redução da dimensão dos mesmos, conservando a maior parte das informações estatísticas úteis presentes nos dados originais. As operações estatísticas foram realizadas através do programa Statistic versão 6.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação de íons metálicos na água de infusão e nas plantas medicinais

A quantidade de íons metálicos essenciais e não essenciais extraídos nos chás preparados à partir da infusão de plantas com água quente não reflete o conteúdo total de íons metálicos presentes nas plantas medicinais, pois para alguns íons metálicos apenas uma pequena fração, é extraída no processo de infusão. Portanto, um estudo da concentração total de íons metálicos foi realizada através de medidas espectrométricas após a calcinação das plantas em forno mufla. O teor de cinzas obtido após a calcinação de cada planta foi determinado para quantificar a fração mineral presente, pela diferença de massa obtida antes e após a calcinação. A planta capim-limão apresentou o maior teor de cinzas, seguido da calêndula e depois da espinheira-santa. Em produtos vegetais a determinação de cinzas tem relativamente pouco valor, pois o teor de cinzas nesses produtos oferece pouca informação sobre sua composição, uma vez que seus componentes minerais são muito variáveis e tal determinação fornece, em geral, apenas uma indicação da riqueza da amostra nesses elementos (SILVA, 1990). O perfil da cinza pode ser considerado medida geral de qualidade e frequentemente é utilizado como critério na identificação dos alimentos. A cinza contém, em geral, Ca, Mg, Fe, P, Pb, Na e outros componentes minerais (ANGELUCCI *et al*, 1987). A Tabela 2 indica a quantidade de cinzas medidas nas plantas avaliadas.

Tabela 2: Porcentagem de cinzas em plantas medicinais ($T_{\text{calcinação}}=500^{\circ}\text{C}$, 8 h), $n=3$.

Planta (1,0 g)	% de cinzas
Espinheira-santa	$4,3 \pm 0,0005$
Capim-limão	$9,5 \pm 0,002$
Calêndula	$7,4 \pm 0,002$

O Pb é um elemento que facilmente pode ser volatilizado a 550 °C, portanto um estudo de adição e recuperação do analito em plantas foi realizado para verificar se a temperatura de calcinação de 500°C não iria interferir nas medidas deste metal. A Figura 9 apresenta o teor de Pb adicionado e recuperado em uma amostra de calêndula antes e depois da mesma ser calcinada a 500 °C. Conforme pode ser verificado a recuperação do analito foi satisfatória, isto é, o Pb não foi volatilizado durante o processo de calcinação, portanto as medidas realizadas para este metal foram confiáveis.

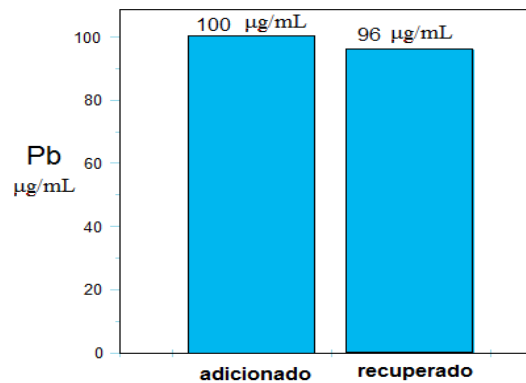


Figura 9: Adição e recuperação de Pb em amostra de calêndula dopada antes da etapa de calcinação.

A Tabela 3 apresenta os resultados dos íons metálicos essenciais (Cu, Zn, Mn, Fe, Na, Mg, Ca, K,Cr) e não essenciais (Al, Pb, Cd) nas amostras das plantas calcinadas e nas águas de infusões. Verificou-se que os íons metálicos Pb e Cd estão presentes na planta, mas não na água de infusão, o que pode ser considerado satisfatório, visto que o indivíduo não irá ingerir esses íons metálicos tóxicos em um chá. Verificou-se também que estas plantas apresentaram quantidades significativas de minerais essenciais como Mg, Ca e K. Dos nove íons metálicos essenciais, a infusão da planta calêndula apresentou a maior quantidade dos minerais: Cu, Zn, Na, Ca, além de grande quantidade de K presente. Para uma melhor visualização da

concentração dos íons metálicos em cada planta, foi realizada uma distribuição espacial dos íons metálicos estudados (Figuras 10, 11 e 12).

Tabela 3: Concentração de íons metálicos na água de infusão e nas amostras calcinadas da espinheira-santa, calêndula e capim-limão por FAAS.

	Espinheira-santa		Calêndula		Capim-limão	
	Infusão (µg/g ± sd)	Total (µg/g ± sd)	Infusão (µg/g ± sd)	Total (µg/g ± sd)	Infusão (µg/g ± sd)	Total (µg/g ± sd)
Cu	2,30 ± 0,01	17,75 ± 0,13	7,20 ± 0,01	12,50 ± 0,11	1,35 ± 0,01	7,02 ± 0,02
Zn	5,08 ± 0,01	23,02 ± 0,12	19,14 ± 0,03	43,91 ± 0,23	5,37 ± 0,01	25,29 ± 0,03
Mn	20,88 ± 0,04	82,08 ± 0,13	12,32 ± 0,02	30,95 ± 0,03	43,87 ± 0,04	109,00 ± 0,17
Fe	6,35 ± 0,05	12,95 ± 0,02	6,23 ± 0,01	89,55 ± 0,29	5,00 ± 0,01	80,35 ± 0,14
Na	47,87 ± 0,01	104,28 ± 0,18	428,37 ± 0,06	700,82 ± 0,16	50,59 ± 0,01	137,46 ± 0,18
Cr	ND	0,77 ± 0,01	ND	0,47 ± 0,01	ND	0,02 ± 0,01
Al	148,67 ± 0,26	372,50 ± 0,1	153,83 ± 0,39	528,67 ± 0,54	139,50 ± 0,12	548,50 ± 0,47
Mg	1.510,75 ± 0,17	5.201,00 ± 0,06	1.170,88 ± 0,05	3.102,50 ± 0,03	711,50 ± 0,02	2.277,25 ± 0,01
Ca	489,00 ± 0,01	6.455,00 ± 0,05	1.797,00 ± 0,40	6.680,00 ± 0,09	1.206,83 ± 0,06	3.851,65 ± 0,02
K	8.766,80 ± 0,62	12.846,15 ± 0,06	17.850,80 ± 0,63	28.465,00 ± 0,02	19.425,88 ± 0,54	34.451,25 ± 0,29
Pb	ND	13,17 ± 0,03	ND	9,84 ± 0,02	ND	9,17 ± 0,02
Cd	ND	ND	ND	ND	ND	ND

* ND = não detectado

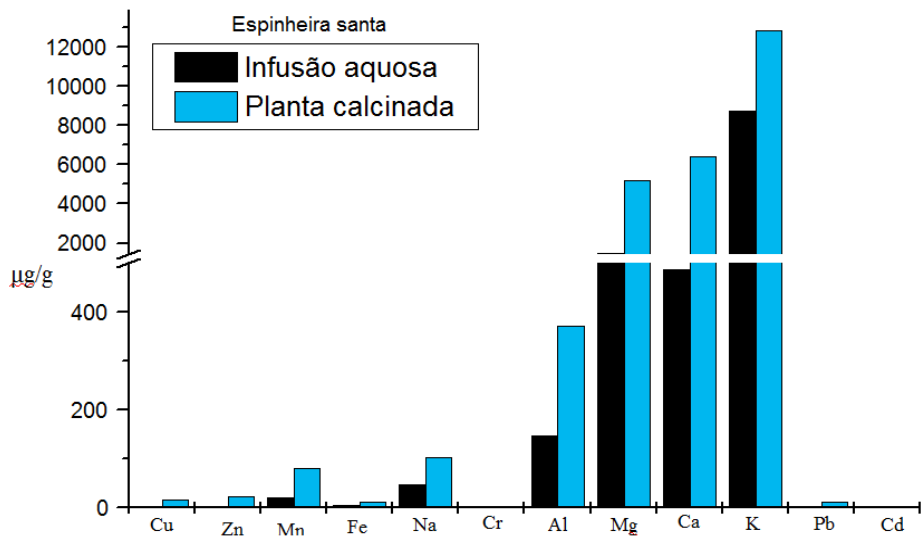


Figura 10: Distribuição espacial dos íons metálicos na infusão aquosa e na espinheira-santa calcinada.

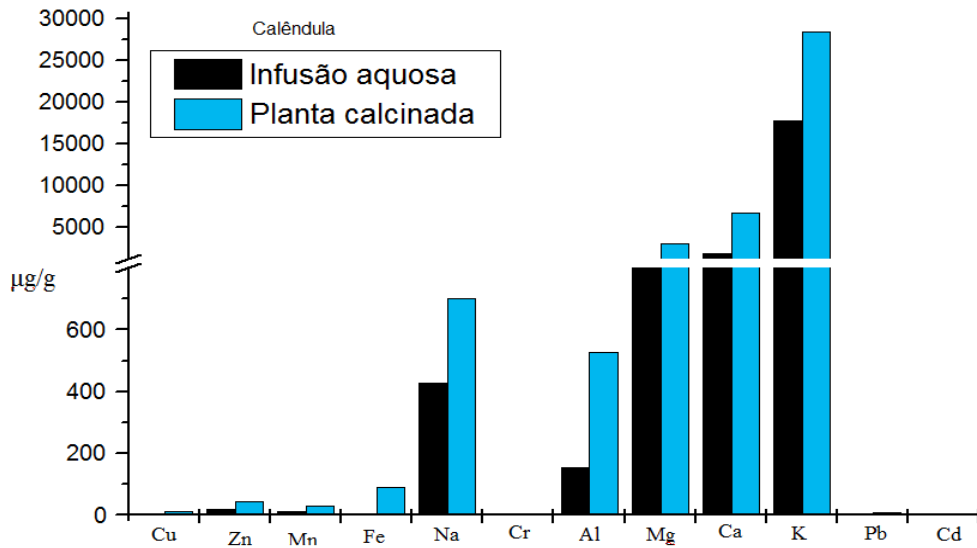


Figura 11: Distribuição espacial dos íons metálicos na infusão aquosa e na calêndula calcinada.

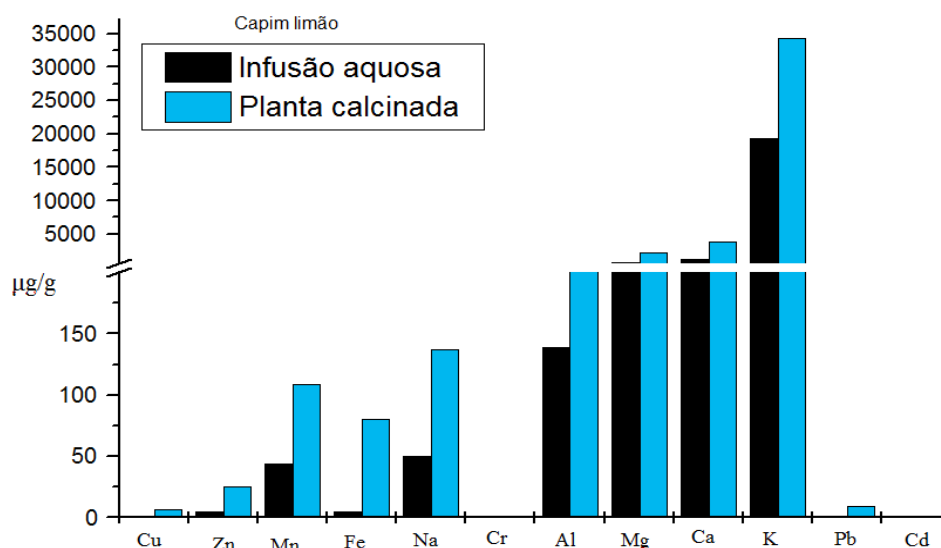


Figura 12: Distribuição espacial dos íons metálicos na infusão aquosa e no capim-limão calcinado.

Sabendo a quantidade total de íons metálicos presentes em cada planta e a quantidade extraída através das infusões aquosas pode-se estimar a porcentagem que é administrada em uma dieta alimentar de cada elemento estudado. A Tabela 4 e Figura 13 apresentam a porcentagem dos íons metálicos em cada infusão aquosa. Pode-se observar pela Figura 13 que alguns íons metálicos são melhores extraídos na infusão proveniente da calêndula (Cu, Zn, Mg e Na). A extração de Fe foi significativa na espinheira-santa. Vale salientar que a parte da planta calêndula utilizada para os chás são as flores e não as folhas, enquanto as outras duas, capim-limão e espinheira-santa utilizam as folhas. O K foi o elemento com maior porcentagem de extração, isso ocorre devido o K ser um elemento de alta concentração e mobilidade nas plantas, pois não se liga a quelatos orgânicos. Quando em uma planta existe muito Mg, este elemento poderá afetar a quantidade de Ca e K, o que ocorreu com a planta espinheira-santa, pois foi a planta que apresenta menores teores de Ca e K e o maior de Mg. O Cu é um elemento com muita afinidade com a matéria orgânica, liga-se aos ácidos húmico e fúlvico no solo e quase 98% estão quelado à compostos orgânicos. Quando em uma planta há mais disponibilidade de Ca e K, esses diminuem a quantidade de Mg na planta, o que pode ser

visto no capim-limão. É importante salientar que uma planta adaptada, extrai do solo muitos nutrientes, mesmo que esses estejam em pequena concentração. O pH influencia na absorção de cátions, pois um pH abaixo de 7 diminui a absorção de cátions, isso ocorre talvez por competição entre estes e íon H^+ por sítios do carregador.

O deslocamento e a solubilidade do Al nas plantas podem ser bastante influenciados pela presença de complexantes orgânicos naturais do solo como ácidos húmicos, ácido cítrico, ácido oxálico (TAN & BINGER, 1986; MIYAZAWA *et al.*, 1992) e, especialmente, pelos ácidos fúlvicos (SCHNITZER, 1969), por apresentarem, em relação aos ácidos húmicos, uma maior quantidade de grupos funcionais (por exemplo, COOH) e valores superiores da constante de estabilidade (STEVENSON, 1982). O Al normalmente está presente em quantidades significativas nas plantas, provenientes do solo de cultivo. Existem na literatura inúmeros trabalhos indicando os efeitos negativos do Al, no entanto outros mostram efeitos benéficos em algumas espécies de plantas, como por exemplo, a necessidade de uma pequena quantidade de Al na solução do solo para estimular o desenvolvimento de algumas plantas. Quando o Al está presente em elevadas concentrações no solo, a planta desenvolve um mecanismo de defesa, capaz de acumular elevadas quantidades de Al em seus tecidos, como meio de desintoxicação. Vários compostos podem complexar o Al e outros íons metálicos como forma de desintoxicação dos mesmos na planta. Os compostos fenólicos apresentam elevada estabilidade de formação de complexação com íons metálicos e apresentam ação antioxidante em condições que podem provocar alterações no crescimento da planta (HARTWIG *et al.*, 2007). Não existe evidência confirmada de que o Al possui alguma função essencial em animais ou seres humanos. A consideração principal com respeito ao Al e saúde é seu potencial de toxicidade quando a exposição for excessiva. Os aspectos toxicológicos de Al consumido oralmente são bem menos definidos. O Al interage com um número de outros elementos, incluindo Ca, F, Fe, Mg, P e Sr e, quando ingerido em excesso, pode reduzir suas absorções. Consideravelmente, a contribuição mais importante para a ingestão de Al vem das medicações antiácidas que podem fornecer vários gramas do metal por dia. Estas quantidades interferem com a absorção de outros elementos; também podem levar a uma acumulação gradual de Al no esqueleto. As concentrações localmente aumentadas de Al ocorrem no cérebro de pacientes com Alzheimer, mas se esse metal possui um papel que pode causar a patogênese desta doença não foi ainda estabelecido (BECARIA *et al.*, 2002; MOLLOY *et al.*, 2007).

Para avaliar os efeitos tóxicos do Al, não é importante considerar apenas a concentração total de Al solúvel em uma amostra, mas é igualmente necessário investigar a distribuição de sua espécie, visto que a disponibilidade biológica e a toxicidade de um elemento dependem da forma em que se encontra no alimento. A espécie livre do Al parece ser a principal responsável pela sua toxicidade (GÜÇER *et al*, 2000). Por outro lado, ligantes naturais como os compostos fenólicos presentes nas plantas contribuem diminuindo a sua toxicidade por meio da formação de complexos estáveis (FLATEN, 2002).

Tabela 4: Teor de íons metálicos extraídos no processo de infusão das plantas medicinais em relação ao teor total de íons metálicos contido em cada planta

Metal	Espinheira-santa %	Calêndula %	Capim-limão %
Cu	12,9	57,6	19,2
Zn	22,0	43,5	21,2
Mn	25,4	39,8	40,2
Fe	49,0	6,9	6,2
Na	45,9	61,1	36,8
Al	39,9	29,1	25,4
Mg	29,0	37,7	31,2
Ca	7,5	26,9	31,3
K	68,2	62,7	56,3

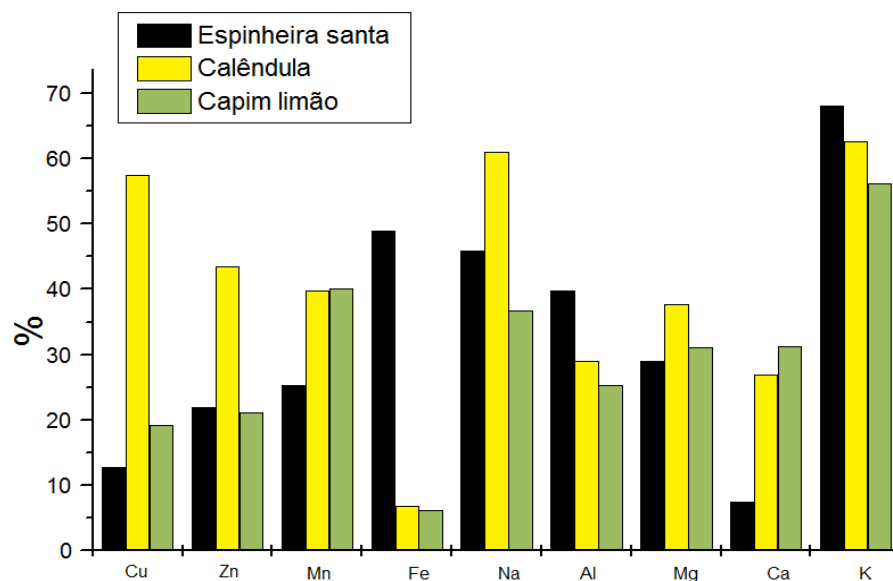


Figura 13: Representação gráfica da porcentagem de íons metálicos extraída nas infusões aquosas de plantas medicinais.

5.2 Determinação do teor de íons metálicos essenciais e não essenciais nos EEP70% e EEP95%

O teor de íons metálicos essenciais e tóxicos também foi avaliado nos extratos etanólicos a fim de verificar o teor de elementos que possivelmente podem estar complexados aos compostos orgânicos e, portanto podem estar presentes nos extratos. Este estudo é importante, pois é a partir dos extratos secos das plantas que são fabricados os fitoterápicos encapsulados. Na Tabela 5, são apresentados os teores determinados de íons metálicos presentes nos extratos etanólicos 70% e 95%. Verificou-se que o solvente 70% extraiu com mais eficiência todos os elementos enquanto os íons metálicos Cd, Pb, Fe e Mn não foram detectados, a eficiência ocorre devido a maior quantidade de água no referido extrato. As Figuras 14, 15 e 16 apresentam as representações gráficas dos teores extraídos em cada extrato etanólico.

Tabela 5: Teor de íons metálicos presentes nos extratos etanólicos * 70% e 95% das plantas medicinais por FAAS

	Espinheira-santa		Calêndula		Capim-limão	
	EEP70 (µg/g ± sd)	EEP95 (µg/g ± sd)	EEP70 (µg/g ± sd)	EEP95 (µg/g ± sd)	EEP70 (µg/g ± sd)	EEP95 (µg/g ± sd)
Cu	2,20±0,00	ND	10,79±0,01	0,177±0,00	6,15±0,02	0,60±0,003
Zn	8,14±0,01	0,876±0,01	10,04±0,01	1,03±0,00	4,39±0,02	0,854±0,00
Mn	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fe	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Na	61,93±0,03	31,89±0,07	153,62±0,12	82,92±0,37	71,22±0,05	24,94±0,09
Cr	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Al	306,18±0,41	122,49±0,15	363,68±0,01	169,89±0,14	420,39±0,20	90,07±0,15
Mg	1.129,15±0,52	46,09±0,06	384,00±0,04	9,62±0,01	24,80±0,01	21,87±0,02
Ca	63,70±0,08	29,61±0,02	167,27±0,13	18,87±0,07	98,90±0,19	7,15±0,06
K	9.274,46±0,12	1.907,52±0,23	9.578,94±0,32	924,35±0,08	2.801,06±0,03	913,85±0,13
Pb	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cd	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*Extratos obtidos a partir de 25 g de plantas

ND = não detectado

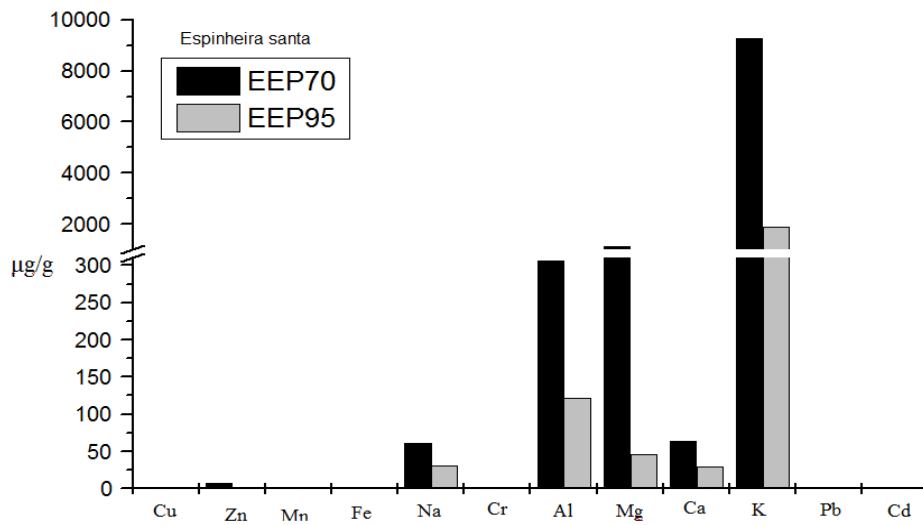


Figura 14: Representação gráfica dos teores de íons metálicos extraídos nos extratos etanólicos da espinheira-santa.

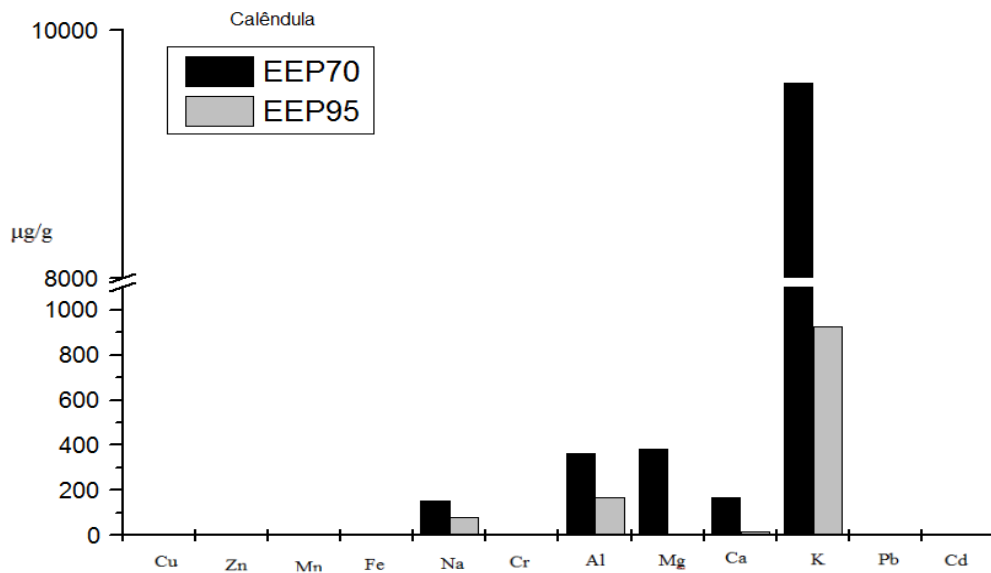


Figura 15: Representação gráfica dos teores de íons metálicos extraídos nos extratos etanólicos da calêndula.

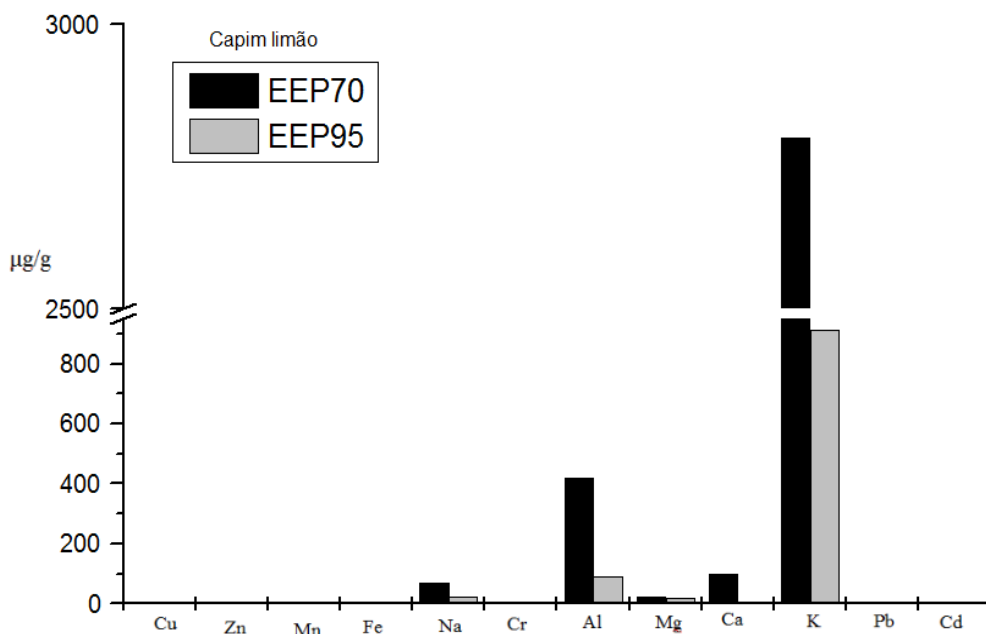


Figura 16: Representação gráfica dos teores de íons metálicos extraídos nos extratos etanólicos do capim-limão.

5.3 Determinação de ácidos fenólicos nos EEP70% e EEP95% e nas águas de infusão das plantas medicinais

Antes de dar início as medidas dos teores de ácidos fenólicos, fez-se um estudo da cinética da reação entre os compostos fenólicos e o reagente Folin-Ciocalteu para a obtenção de um melhor sinal analítico visto que a literatura não apresenta um consenso definido quanto ao tempo de reação necessário para efetuar as medidas espectrofotométricas. O reagente Folin-Ciocalteu é extensivamente utilizado em medidas de compostos fenólicos e consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, no qual o Mo e o W encontram-se no estado de oxidação VI, porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais o estado de oxidação dos íons metálicos está entre 5 e 6 e cuja coloração, permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (NACZK & SHAHIDI, 2004; IKAWA *et al*, 2003, SOUSA *et al*, 2007).

A Figura 17 mostra um estudo da sensibilidade em função do tempo de espera para uma completa reação entre os compostos fenólicos e o meio reacional, mostrando que no tempo de 2h a absorvância foi maior, após este período não houve incremento na sensibilidade analítica.

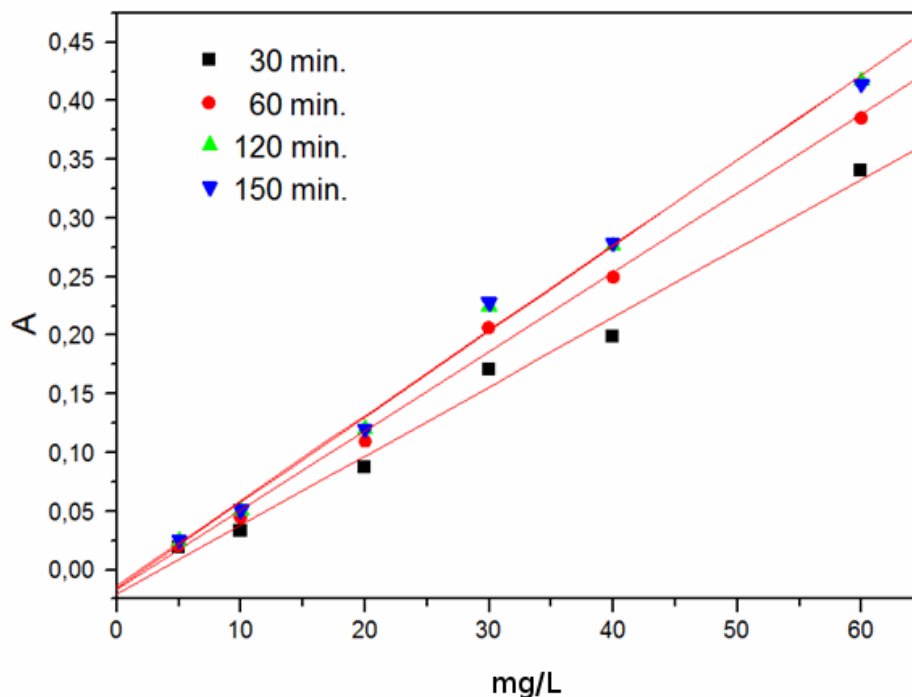


Figura 17: Estudo da sensibilidade em função da velocidade de reação entre os compostos fenólicos e o meio reacional. (760 nm)

Os comprimentos de onda utilizados para a quantificação de fenóis totais e flavonóides foram 760 e 425 nm, respectivamente. A escolha de ambos os comprimentos de onda foi baseada no estudo de artigos científicos que realizaram essas quantificações em extratos de plantas (ANDRADE *et al*, 2007; KUJALA *et al*, 2000).

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK & SHAHIDI, 2004). Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002). A quercetina e a galangina, as quais pertencem ao grupo dos flavonóides, absorvem fortemente no

comprimento de onda de 425 nm em soluções metanólicas de cloreto de alumínio. Já, os complexos derivados de flavonas, como a crisina, não absorvem nesse comprimento de onda, de 425 nm, mas sim em comprimentos inferiores, causando uma subestimativa nas amostras ricas em flavonas. Por isso, o valor medido encontra-se aquém do real, sendo tanto mais próximo do real quanto maior a concentração de flavonóis na amostra. Este comprimento de onda é selecionado devido à quercetina (flavonol) ser o mais comum dos flavonóides encontrados em fontes vegetais. Em 425 nm outras substâncias fenólicas, como ácidos fenólicos, não absorvem em presença de cloreto de alumínio, não havendo interferências para a quantificação de flavonóides.

As Figuras 18, 19 e 20 apresentam as curvas analíticas obtidas a partir de soluções padrão para fenóis totais e flavonóides nos extratos etanólicos e águas de infusão das plantas.

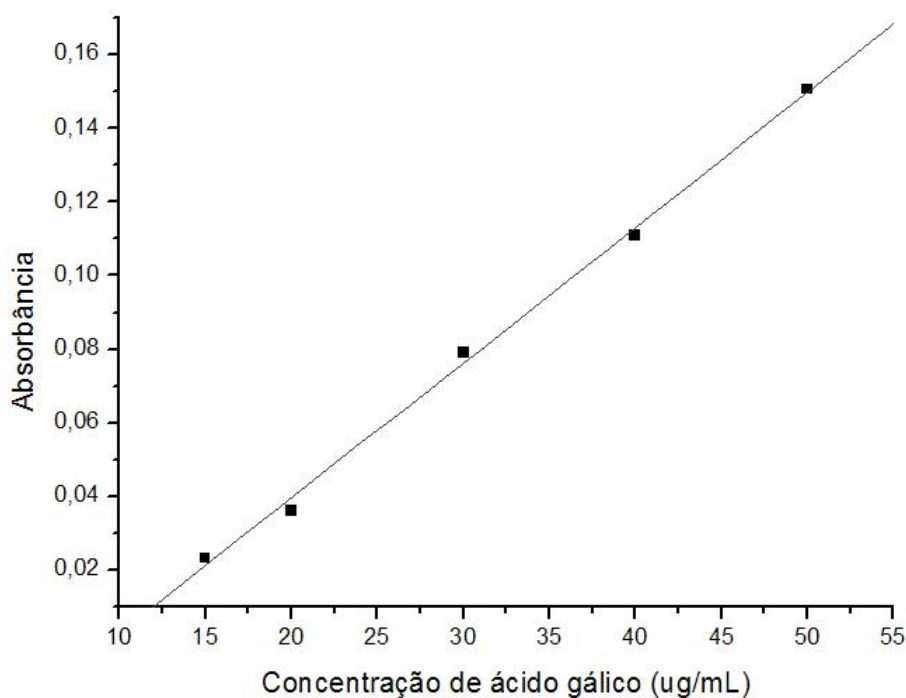


Figura 18: Curva analítica para determinação de fenóis totais em extratos etanólicos ($\lambda=760\text{nm}$). Dados obtidos: $y = (-0,03 \pm 0,003) + (0,0037 \pm 0,0001) x$, $R=0,99865$

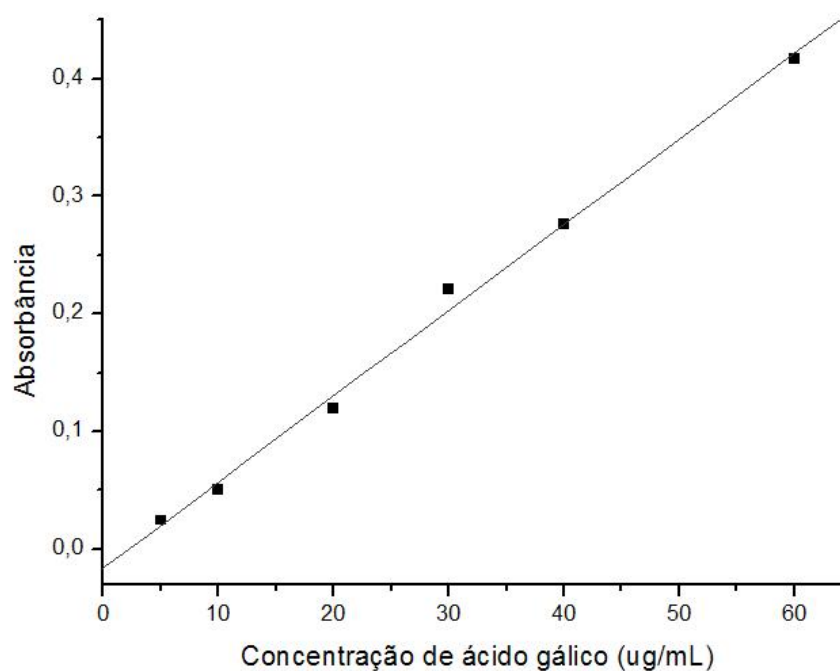


Figura 19: Curva analítica para determinação de fenóis totais em água de infusão ($\lambda=760\text{nm}$).
 Dados obtidos: $y = (-0,016 \pm 0,008) + (0,0073 \pm 0,0002) x$, $R=0,99769$

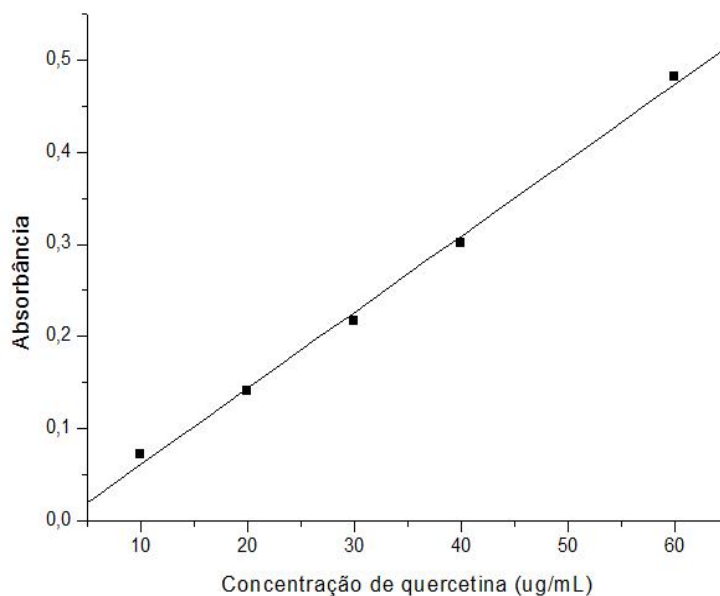


Figura 20: Curva analítica para determinação de flavonóides em extratos etanólicos e na água de infusão. ($\lambda=425\text{nm}$).
 Dados obtidos: $y = (-0,021 \pm 0,001) + (0,0082 \pm 0,0002) x$, $R=0,99833$

A Tabela 6 apresenta o rendimento obtido com os extratos etanólicos. Os extratos 70% sempre apresentaram um rendimento superior em relação aos extratos 95%. Entre as plantas, o capim-limão apresentou o menor rendimento e a calêndula apresentou os maiores valores.

Tabela 6: Rendimento em % dos extratos etanólicos secos

Planta	EEP70 (%)	EEP95 (%)
Calêndula	33,19	28,26
Capim-limão	20,26	6,55
Espinheira-santa	23,21	7,96

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados das quantidades de ácidos fenólicos presentes nos extratos e nas águas de infusões das plantas, cujos valores mostram que o extrato obtido em etanol 95% foi mais eficiente na extração dos compostos para a calêndula e espinheira-santa. Já para o capim-limão, o extrato 70% apresentou-se mais eficiente. Na água de infusão, a calêndula foi a planta que apresentou o maior teor de fenóis totais e flavonóides. É importante saber que vários fatores podem interferir na quantidade dos ácidos fenólicos nas plantas, como a época em que a planta foi colhida, tecidos mais novos geralmente possuem maior quantidade de ácidos fenólicos. Menores quantidade de compostos fenólicos são produzidas quando o solo contem muito nitrogênio (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Tabela 7: Determinação de ácidos fenólicos nos extratos etanólicos e na água de infusão por UV-Vis. Comprimento de onda = 760 nm. (n=3) (mg/g de extrato)

Planta	Água de infusão mg/g	% extraída na infusão*	Extrato 70% mg/g	Extrato 95% mg/g
Calêndula	9,00 ± 0,67	7,4	92,35 ± 0,50	120,26 ± 0,90*
Capim-limão	3,35 ± 0,36	1,2	285,97 ± 0,84*	170,00 ± 0,50
Espinheira-santa	4,36 ± 0,62	0,8	230,44 ± 0,40	518,28 ± 1,30*

* considerado o maior valor como 100%

5.4 Determinação de flavonóides nos EEP70% e EEP95% e nas águas de infusão

Os flavonóides são compostos polifenólicos naturais largamente distribuídos nos vegetais, ocorrem naturalmente em frutas, plantas, flores, legumes e são uma parte integrante da dieta humana (MIDDLETON & KANDASWAMI, 1993; RATTY & DAS, 1988; HACKETT, 1993). Tem-se reportado na literatura muitos efeitos biológicos dos flavonóides como: antibacteriano, antiviral, anti-inflamatório, antialérgico (HANASAKI *et al*, 1994; HOPE *et al*, 1983), ação vasodilatadora (DUARTE *et al*, 1993). Na Tabela 8 são apresentados os resultados das quantidades de flavonóides presentes nos extratos e nas águas de infusões das plantas. Os resultados foram parecidos com os obtidos na determinação dos fenólicos, pois a extração de flavonóides foi mais eficiente com o solvente etanólico a 95% para a calêndula e espinheira-santa, para o capim-limão a eficiência da extração foi igual para os dois extratos etanólicos. Um teor maior de flavonóides é encontrado nos extratos etanólicos obtidos a partir das plantas capim-limão e espinheira-santa, no entanto, quando a extração é realizada com água quente, nota-se a maior presença dos compostos orgânicos proveniente da planta calêndula.

A produção de flavonóides nas plantas pode ser afetada devido a variações sazonais (época de colheita), a idade das plantas, pois em tecidos mais novos há maior concentração de flavonóides, por serem acumulados principalmente em tecidos superficiais, eles são muito sensíveis a intensidade da radiação solar, pela proteção contra foto-destruição, ou seja, ao absorver ou dissipar a energia solar dificultam a danificação dos tecidos internos pela radiação

UV-B, absorvem esta radiação sem alterar a radiação fotossinteticamente ativa; existe ainda para os flavonóides uma correlação com a altitude, pois em maiores altitudes há maior susceptibilidade a radiação UV, (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Tabela 8: Determinação de flavonóides nos extratos etanólicos e na água de infusão por UV-Vis. Comprimento de onda = 425 nm, (n=3). (mg/g de extrato)

Planta	Água de infusão mg/g	% extraída na infusão*	Extrato 70% mg/g	Extrato 95% mg/g
Calêndula	2,23 ± 0,50	11,7	13,55±0,55	18,95 ± 0,45*
Capim-limão	0,66 ± 0,08	1,5	41,54 ± 2,69*	38,20 ± 2,04
Espinheira-santa	0,89 ± 0,73	2,2	20,60 ± 1,25	39,00 ± 1,10*

* considerado o maior valor como 100%

5.5 Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e das águas de infusão

Para as águas de infusão das plantas os resultados foram todos negativos, ou seja, não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados. Segundo Silveira *et al.*, a utilização de plantas no tratamento de doenças é uma prática muito comum, principalmente nos países subdesenvolvidos, devido a dificuldade de acesso imediato ao serviço de saúde pública (SILVEIRA *et al.*, 2007). Desta forma, o uso de chás ou infusões pela população deve ser revisto com cuidado, dependendo do objetivo, pois muitas vezes a infusão de calêndula é utilizada para o tratamento de candidíase. Por outro lado, é preciso salientar que muitas vezes moléculas, como polissacarídeos de cogumelos não têm efeito positivo em testes *in vitro*, entretanto, quando *in vivo*, estimulam o sistema imune e propiciam efeitos benéficos. Portanto, os resultados de ausência da atividade antimicrobiana das infusões devem ser interpretados com cuidado, e apenas indicam a necessidade de novos estudos, a fim de esclarecer se há benefícios reais no organismo após a ingestão destes chás.

Para os extratos etanólicos 95% e 70% das três plantas estudadas, os micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 e

Candida albicans (isolado clínico), apresentaram resultados negativos, ou seja, os extratos não apresentaram atividade frente a esses micro-organismos.

Para os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e *Klebsiella sp.* os resultados foram positivos e podem ser verificados na Tabela 9.

Tabela 9: Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de espinheira-santa (ES), calêndula (CA) e capim-limão (CL) por difusão em ágar. (n=2)

Média dos halos de inibição (mm)		
Extratos	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella sp.</i>
ES 70%	1,45 ± 0,35	2,45 ± 0,64
ES 95%	NO	2,70 ± 0,28
CA 70%	NO	3,48 ± 1,10
CA 95%	0,73 ± 0,11	5,35 ± 2,19
CL 70%	NO	9,00 ± 0,42
CL 95%	NO	6,10 ± 0,57

NO= não observado

Como esperado, nenhuma solução etanólica utilizada como controle negativo apresentou atividade contra os micro-organismos testados.

De acordo com a Tabela 8, verificou-se que os extratos ES70% e CA95% apresentaram atividade antagônica fraca frente à *Staphylococcus aureus*, enquanto os outros extratos não apresentaram atividade. Todos os extratos testados apresentaram atividade frente a *Klebsiella sp.* sendo que o extrato CL70% apresentou a maior atividade, com um halo de 9,00 ± 0,42 mm. Este extrato também apresentou a maior concentração de flavonóides (41,54±2,69), o que sugere que a atividade antimicrobiana está correlacionada a presença deste grupo de moléculas (MIDDLETON & KANDASWAMI, 1993; RATTY & DAS, 1988; HACKETT, 1993).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada também através da determinação da quantidade de substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo teste; cujo valor é conhecido como concentração inibitória mínima - CIM.

Os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana foram utilizados para determinar o CIM (concentração inibitória mínima) e o CBM (concentração bactericida mínima). Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos etanólicos de espinheira-santa (ES), calêndula (CA) e capim-limão (CL) frente à *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella* sp.

Micro-organismos	Extratos etanólicos						
	Concentração (mg/mL)	ES		CA		CL	
		95%	70%	95%	70%	95%	70%
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,0	CIM	-	-	CIM	-	-
		CBM			CBM		
	2,5	CIM	-	-	CIM	-	-
	0,25	CIM	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	2,5	CIM	CIM	CIM	-	CIM	CIM
		CBM	CBM	CBM		CBM	CBM
	0,25	CIM	CIM	CIM	-	CIM	CIM
		CBM	-	-	-	CBM	CBM

- ocorreu turvação pelo desenvolvimento microbiano e, portanto não apresenta atividade antimicrobiana

O extrato de ES 95% apresentou ausência de turvação, ou seja, inibiu o desenvolvimento de *S. aureus* nas concentrações de 25, 2,5 e 0,25 mg/mL, portanto a CIM para este extrato é de 0,25 mg/mL. Entretanto, após o plaqueamento destas alíquotas foi observada ausência de desenvolvimento microbiano apenas na concentração de 25 mg/mL, o que indica que esta concentração é a CBM deste extrato frente ao *S. aureus*. Segundo o

estabelecido por Holetz *et al.*, uma planta ou seu extrato é considerado com potencial antimicrobiano quando apresenta CIM menor que 1,0 mg/mL (HOLETZ, 2002); desta forma o extrato de ES95% pode ser considerado como tendo atividade antimicrobiana importante frente à *S. aureus*.

O extrato de CA70% apresentou atividade inibitória nas concentrações de 25 e 2,5 mg/mL (CIM), entretanto a CBM ocorreu em 25 mg/mL. Este resultado sugere a presença de moléculas inibitórias neste extrato, porém com insignificante potencial antimicrobiano *versus S. aureus*.

A ação antimicrobiana dos extratos foi mais eficiente contra *Klebsiella* sp., pois os resultados indicaram que a CIM é de 0,25 mg/mL para os extratos ES95%, ES70%, CA95%, CL 95% e CL70%. E ainda, a CBM também foi determinada como sendo de 0,25 mg/mL para os extratos de ES95%, CL95% e CL70%. A *Klebsiella* sp. apresentou uma susceptibilidade muito maior do que *S. aureus* aos extratos testados. Estes resultados demonstraram que os extratos de ES 95% e CL95% e CL70% portanto, poderiam ser utilizados para combater a *Klebsiella* sp., pois os resultados dos testes *in vitro* demonstraram ausência de ação antimicrobiana das infusões frente aos micro-organismos testados. Portanto, os extratos ES95%, ES70%, CA95%, CL 95% e CL70% apresentam importante atividade antimicrobiana frente à *Klebsiella* sp.

5.6 Estudo quimiométrico

A análise dos componentes principais foi aplicada aos dados experimentais auto-escalados dos teores de íons metálicos, fenóis, flavonóides, e atividades antimicrobianas obtidos das folhas calcinadas, infusões e extratos de plantas medicinais para verificar as possíveis semelhanças e diferenças entre as amostras e sua correlação entre as variáveis. O auto-escalamento foi feito para assegurar que todas as análises tivessem igual importância para auxiliar na discriminação das amostras (Tabelas 11 e 12). O estudo quimiométrico foi dividido em duas partes, a primeira envolveu a análise de componentes principais dos resultados obtidos com as infusões aquosas e folhas calcinadas e a segunda análise fez-se orientada aos resultados obtidos com os extratos etanólicos das plantas.

A Figura 21 apresenta os gráficos de escores das amostras e os pesos das variáveis da primeira etapa do estudo. A primeira, segunda e terceira componentes principais capturaram juntas 97,7% de variância dos dados experimentais. Em 64,20% de variância capturada pela primeira componente principal, as amostras foram divididas em dois grandes grupos (Figura 21A). O grupo das amostras de infusões aquosas, no eixo negativo de X e o das plantas calcinadas no eixo positivo de X. A separação ocorreu devido a grande diferença entre as quantidades de íons metálicos e compostos orgânicos presentes nas plantas calcinadas em relação às infusões aquosas. A Figura 21B apresenta os pesos das variáveis, podendo ser observado que as variáveis da primeira componente principal estão todas no eixo positivo de X, indicando que ocorre uma correlação direta entre elas.

Analisando a Figura 21B observa-se que os maiores escores da primeira componente principal formam um grupo de amostras de folhas de capim-limão (CL), espinheira-santa (ES) e calêndula (CA). Os pesos da primeira componente principal, que separaram o grupo das plantas calcinadas, são os de teores de Pb, Ca, Al, flavonóides, Cu, Mg, fenóis, Zn, Cr, Fe, Mn, K e Na (nesta ordem) que estão presentes em uma quantidade relativamente maior nas plantas calcinadas do que nas infusões. Um dado relevante é que os íons metálicos pesados não foram encontrados nas infusões, podendo estar fixados pelas constituintes menos solúveis da planta.

De acordo com a segunda componente principal (18.86% de variância capturada - Figura 21B), dentro do grande grupo das plantas calcinadas, ainda pode-se diferenciar a planta ES das demais CL e CA, respectivamente. A ES está localizada no eixo positivo de X e Y,

portanto apresenta os maiores teores relativos das variáveis localizadas nos eixos de maiores pesos em X e Y, isto é, teores de fenóis, Mg, Cr, Cu, flavonóides e Pb (nesta ordem de importância). A CA e CL calcinados contêm maiores teores relativos de Zn e Al. Os maiores teores de Mn nas infusões foram importantes para formar um grupo de amostras de infusão de CL e ES, diferenciando-a da amostra de infusão da CA, esta contém maiores teores de Na, Zn, Al e quantidade intermediária de K e Fe nas infusões.

Tabela 11: Valores auto-escalonados dos teores de íons metálicos nas folhas calcinadas (cinzas) e infusões das plantas medicinais.

Amostras	Calêndula folha	Calêndula infusão aquosa	Espinheira-santa folha	Espinheira-santa infusão aquosa	Capim-limão folha	Capim-limão infusão aquosa
Flavonóides	-0.17561	-0.70928	1.73356	-0.73154	0.61925	-0.73638
Fenóis	0.09075	-0.78216	1.13752	-0.85212	1.27013	-0.86413
Al	1.1007	-0.83277	0.29516	-0.85939	1.20299	-0.90669
Ca	1.21495	-0.60111	1.13127	-1.08757	0.16305	-0.8206
Cu	0.71992	-0.13177	1.56358	-0.91918	-0.1607	-1.07185
K	0.84907	-0.25482	-0.77532	-1.19958	1.47165	-0.09101
Mg	0.47116	-0.70541	1.74938	-0.49839	-0.03151	-0.98523
Na	1.72465	0.69403	-0.53193	-0.74532	-0.40642	-0.73503
Zn	1.63253	-0.08033	0.18797	-1.05259	0.34495	-1.03253
Cr	0.78422	-0.63341	1.68909	-0.63341	-0.57308	-0.63341
Fe	1.3991	-0.67719	-0.50973	-0.6742	1.16984	-0.70784
Mn	-0.49881	-0.9905	0.85062	-0.76458	1.5611	-0.15783
Pb	0.74247	-0.88952	1.29476	-0.88952	0.63135	-0.88952

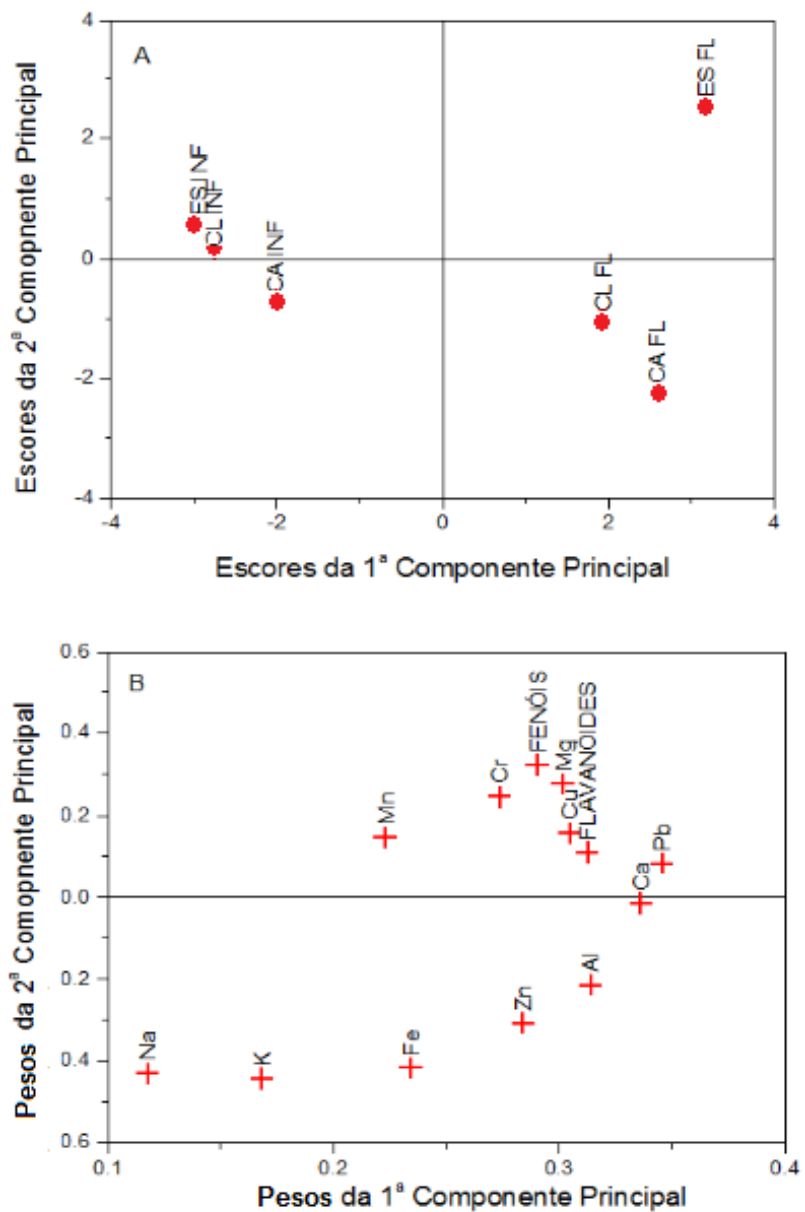


Figura 21: Análise dos componentes principais dos dados de teores de íons metálicos e compostos fenólicos: escores (A) e pesos (B) da primeira e segunda componentes principais para as amostras das folhas calcinadas e infusões aquosas.

ESINF (espinheira-santa em infusão aquosa); CLINF (capim-limão em infusão aquosa); CAINF (calêndula em infusão aquosa); ESFL (espinheira-santa na folha calcinada); CLFL (capim-limão na folha calcinada); CAFL (calêndula na folha calcinada).

A segunda e a terceira componentes principais capturaram 33,5% da variância, dos quais 14,7% foram correspondentes a terceira componente principal. As duas componentes separaram as amostras de acordo com o tipo de planta (Figura 22). O CL calcinado e infusão formaram um grupo devido as maiores quantidades de Mn, flavonóides (maior quantidade extraída da folha calcinada e menor quantidade na infusão), K (maior quantidade na folha calcinada e infusão) e de Al (maior quantidade na folha calcinada e menor quantidade na infusão). O grupo da ES (infusão e folha calcinada) foi isolado de acordo com os teores de fenóis (maior quantidade total extraída e menor quantidade na infusão aquosa), Pb (maior quantidade na folha calcinada e zero na infusão) e Mg (maiores quantidades na folha calcinada e na infusão). A CA infusão e folha foram separadas devido aos teores de Na (maiores quantidades na folha calcinada e na infusão), Zn (maiores quantidades na folha calcinada e na infusão), Ca (maiores quantidades na folha calcinada e na infusão), Cu (quantidade intermediária na folha calcinada e maior na infusão), Cr (quantidade intermediária na folha calcinada e zero na infusão) e Fe (maior na folha calcinada e intermediária na infusão).

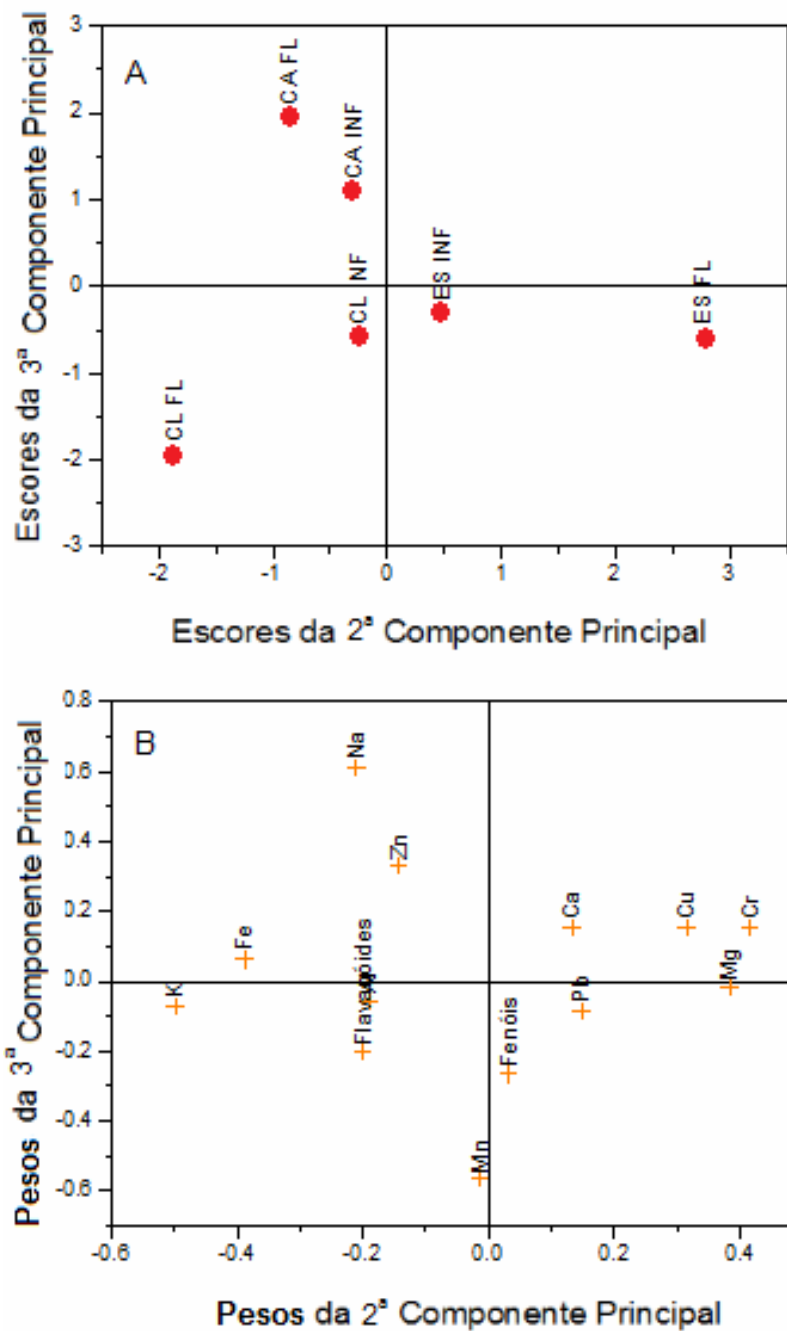


Figura 22: Análise dos componentes principais dos dados de teores de íons metálicos e compostos fenólicos: escores (A) e pesos (B) da segunda e terceira componentes principais para as amostras das folhas calcinadas e infusões aquosas.

ESINF (espinheira-santa em infusão aquosa); CLINF (capim-limão em infusão aquosa); CAINF (calêndula em infusão aquosa); ESFL (espinheira-santa na folha calcinada); CLFL (capim-limão na folha calcinada); CAFL (calêndula na folha calcinada).

Na Figura 23 (A,B,C) foram plotados os pesos correspondentes a cada variável da primeira, segunda e terceira componentes principais mostrando novamente que todas as variáveis estão correlacionadas positivamente de acordo com a primeira componente principal, mas que K e Na foram menos importantes na diferenciação das amostras de folha calcinada e infusão.

Por outro lado, a segunda componente principal mostrou que fenóis, flavanóides, Cr, Mg, Cu, Mn e Pb estão inversamente correlacionados a Al, K, Na, Zn e Fe. Estes dados estão consistentes com o fato de que na solução do solo a presença de Ca e Mg está inversamente correlacionada a do Al, pois é desta solução que a planta extrai minerais, portanto se houver menos Al haverá mais Ca e Mg na folha. O Ca teve peso próximo a zero, portanto não contribuiu para esta segunda componente principal.

Um dos mecanismos de proteção da planta contra íons metálicos nocivos é a complexação dos mesmos com compostos fenólicos, como flavonóides, que tem a habilidade de formar quelatos com cátions metálicos (CUYCKENS & CLAEYS,2004). Uma correlação positiva, entre Al, fenóis e flavonóides pode ocorrer se ele estiver complexado. Essa correlação fica mais evidente na análise quimiométrica dos extratos etanólicos. Nesta primeira etapa do estudo quimiométrico, o Al está inversamente correlacionado a fenóis e flavonóides (Figura 23 B), pois o Al medido foi resultante do processo de calcinação da folha, portanto sendo o Al total presente na folha, complexado e não complexado e esta quantidade pode não estimular a produção de fenóis e flavonóides pela planta.

Estudos adicionais serão necessários para avaliar a relação da presença de maiores teores de Na, K, Fe e Zn (Figura 23B), que estão inversamente correlacionados aos fenóis/flavonóides, na produção destes compostos pela planta. Já a correlação positiva destes compostos com Cu, Pb e Cr, pode significar quais os íons metálicos que, complexados ou não, promovem a produção de fenóis/flavonóides na folha, através do metabolismo, ou seja o aumento da quantidade de determinado metal na folha propicia um aumento de compostos orgânicos. Se na segunda etapa da análise (extração de íons metálicos, flavonóides e fenóis com solventes) um aumento destes compostos orgânicos representa um aumento da extração destes íons metálicos, seria um indicativo da possível complexação dos mesmos por compostos orgânicos. Os teores de maior peso que compuseram a terceira (C) componente principal foram os fenóis, flavonóides e Mn correlacionados diretamente entre si e inversamente aos teores de Na e Zn.

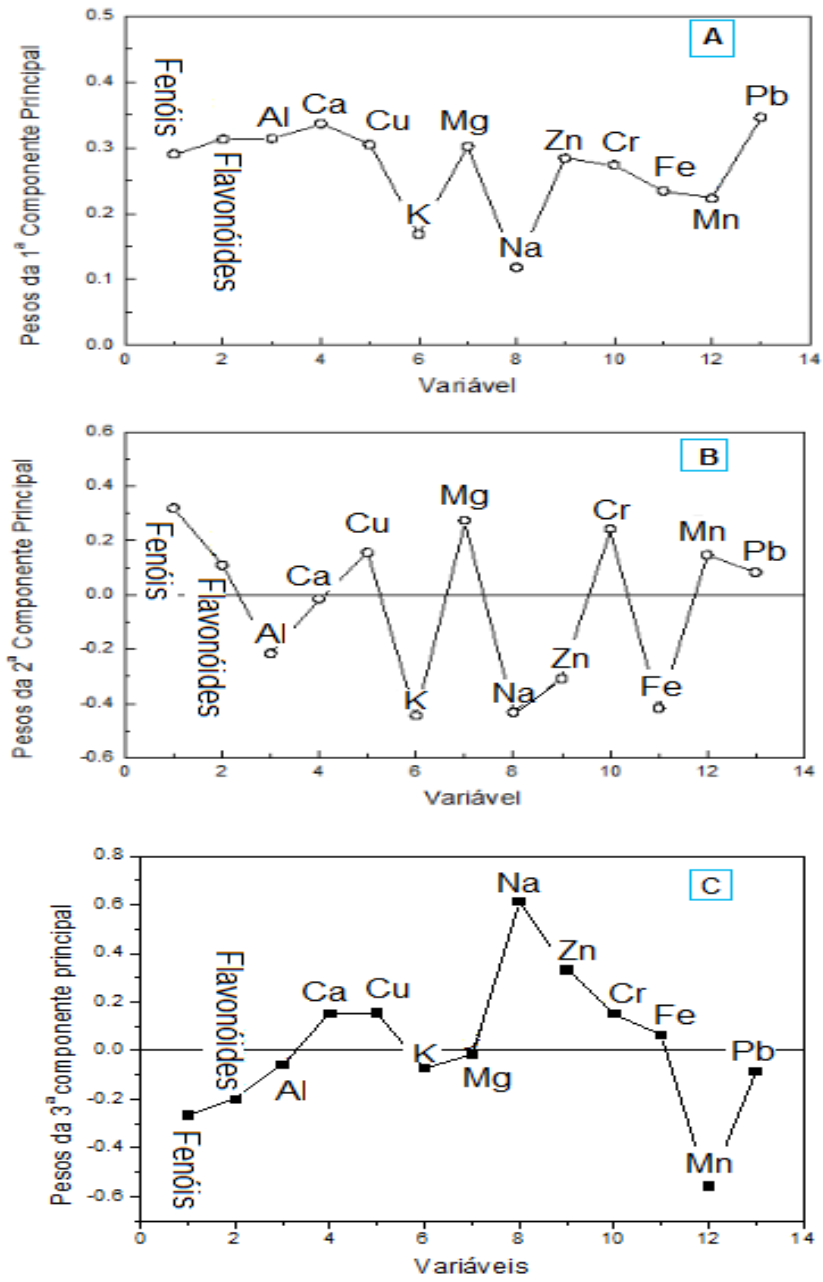


Figura 23: Pesos da primeira (A), segunda (B) e terceira (C) componentes principais nas infusões e plantas calcinadas.

Para avaliar o que foi questionado acima e outras correlações entre determinados constituintes realizou-se a análise dos componentes principais para os seis extratos etanólicos das folhas. Na Tabela 12 estão os dados auto-escalados processados, da mesma forma que na primeira análise quimiométrica. A primeira, a segunda e a terceira componentes principais capturaram 38,0%, 26,5% e 19,4% da variância dos dados experimentais respectivamente, juntas totalizando 83,9% da variância capturada.

A primeira e a segunda componentes principais (Figura 24A) separaram os extratos etanólicos 95% obtidos a partir do CL, CA e ES dos demais. O extrato CL 70% diferenciou-se por maiores teores de Al, flavonóides e atividade frente a *Klebsiella* sp., o extrato CA 70% por maiores teores de Cu, Ca, Zn e quantidade intermediária (próxima ao máximo) de K, o da ES maiores teores de Mg e melhor atividade contra *S. aureus*. Os extratos 95% separam devido a teores similares de Na.

Os dados de escores e pesos da terceira componente principal são apresentados na Figura 25. A terceira componente principal separou os extratos de acordo com o tipo de planta formando vários grupos: grupo com escores negativos (extratos de ES); grupo próximo de zero (CL) e grupo positivo (CA). As variáveis flavonóides (próximo do máximo ES 95%), fenóis (máximo ES 95%) e Mg (máximo na ES 70%), separaram a ES; Al (máximo CL 70%), Ca (próximo do máximo), atividade contra *S. aureus* (zero) e Zn (quantidade intermediária) o CL; Na (quantidade intermediária), Cu (quantidade máxima) e atividade anti-*Klebsiella* sp. (intermediária) a CA. Isto sugere o uso do extrato de ES como fonte de fenóis, flavonóides e Mg, e o CL adicional de Ca e Zn. Os cuidados com o solo para diminuir a absorção de Al pela planta devem ser maiores durante o cultivo de CL considerando os extratos etanólicos.

Tabela 12: Valores auto-escalonados dos teores de íons metálicos, fenóis e flavonóides nos extratos etanólicos 70% e 95%.

Amostras	Calêndula Extrato 70%	Capim-limão Extrato 70%	Esp. santa Extrato 70%	Calêndula Extrato 95%	Capim-limão Extrato 95%	Esp. santa Extrato 95%
Flavonóides	-1.23096	1.05231	-0.65586	-0.79046	0.77985	0.84511
Fenóis	-0.92636	0.32036	-0.0372	-0.74664	-0.42637	1.81620
Al	-0.50998	1988	-0.51319	-0.13111	-0.69941	-0.13432
Ca	1.33811	0.89926	-0.32919	-0.89449	-1.20632	0.19263
Cu	1.45421	1.03961	-0.34239	-0.82402	-0.41149	-0.91592
K	0.96083	-0.59772	01/01/35	-1.12629	-0.75386	0.15354
Mg	0.09027	-0.59444	1.97071	-0.62043	-0.50029	-0.34581
Na	0.37816	-0.45331	-0.89517	1.85204	-0.56616	-0.31556
Zn	1.239	0.16121	1.12846	-0.99028	-0.74156	-0.79683
<i>S. aureus</i>	-0.59839	-0.59839	1.7897	0.60389	-0.59839	-0.59839
<i>Klebsiella</i> sp	-0.54628	1.66016	-0.95799	0.20119	0.50098	-0.85806

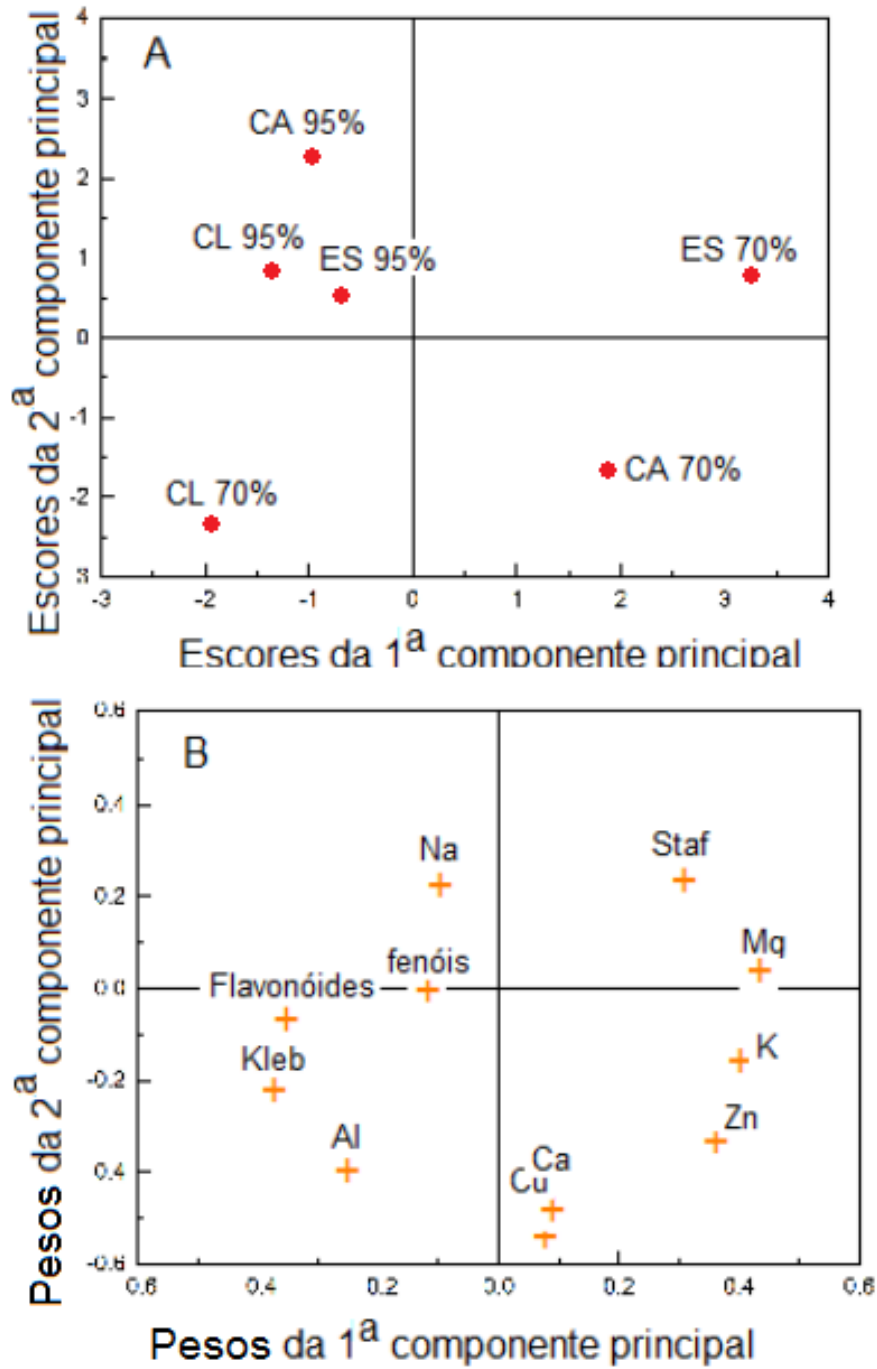


Figura 24: Análise dos componentes principais dos dados de teores de íons metálicos: escores (A) e pesos (B) da primeira e segunda componentes principais nos extratos alcoólicos. Kleb. – *Klebsiella* sp ; Staf. – *S. aureus*.

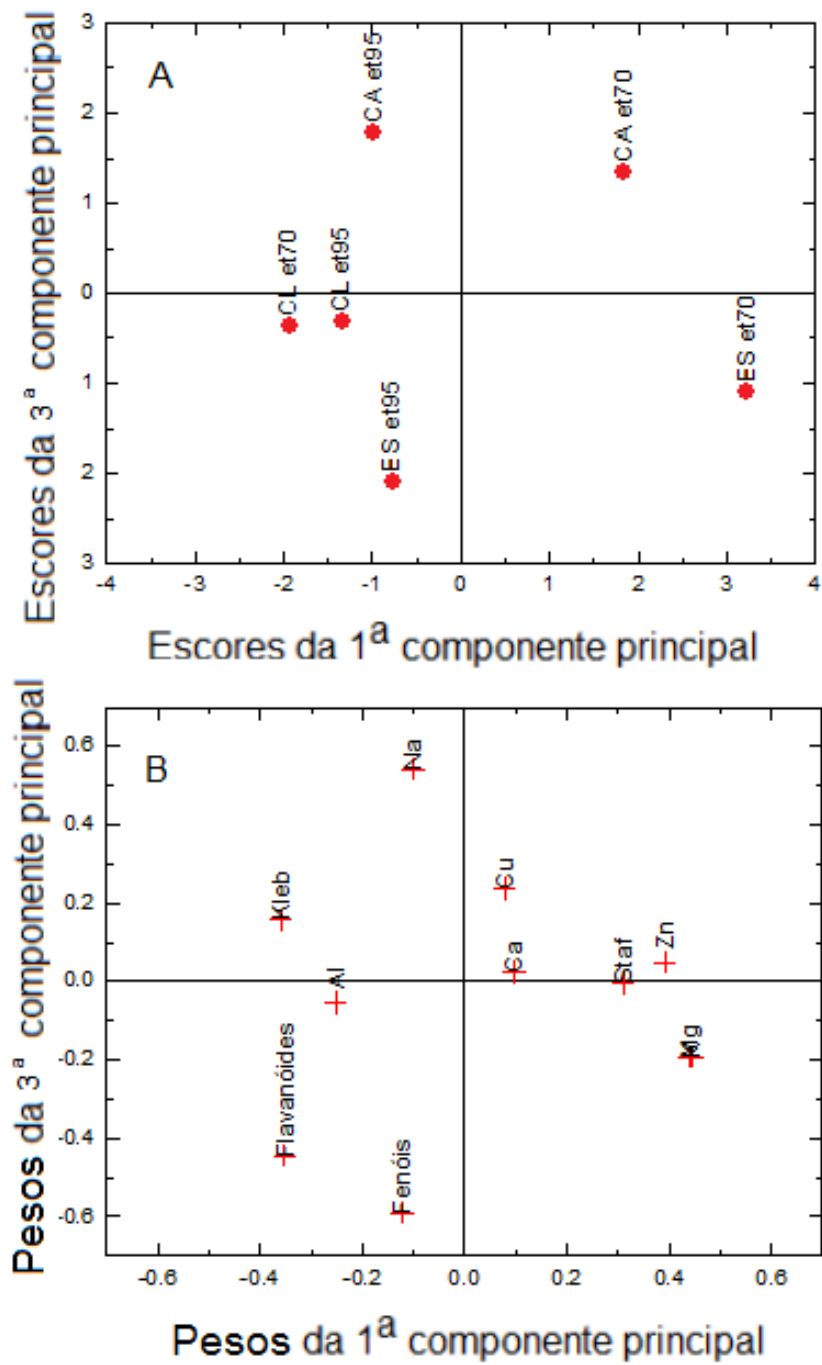


Figura 25: Análise dos componentes principais dos dados de teores de íons metálicos: escores das amostras (A) e pesos das variáveis (B) nos extratos alcoólicos da primeira e terceira componentes principais.

Kleb. – *Klebsiella* sp; Staf. – *S. aureus*.

A Figura 26 apresenta os pesos das variáveis avaliadas nas PCAs. Na primeira componente principal estão diretamente correlacionados, o teor de flavonóides, atividade anti-*Klebsiela* e teor de Al indicando que o mesmo pode estar complexado com os flavonóides. Estão inversamente correlacionados aos teores de flavonóides e a atividade anti-*Klebsiela* todos os demais íons metálicos e a atividade anti - *S.aureus*. Os pesos da segunda componente principal indicam os teores de Al, Ca, Cu, Zn, flavonóides e atividade anti-*Klebsiela* diretamente correlacionados entre si, tornando possível novamente a hipótese de formação de complexos fenóis/flavonóides com Al e Cu e estão inversamente correlacionados aos teores de Na e anti *S.aureus*.

As correlações positivas entre teores de fenóis/flavonóides nos extratos etanólicos com determinados íons metálicos permitem outras hipóteses, além da possível complexação entre estes íons metálicos e flavanóides/fenóis tais como: a extração dos flavonóides/fenóis em etanol é favorecida pela presença do metal, como a de flavonóides é favorecida por Ca, K, Cu e Zn; as correlações entre a solubilidade de determinados fenóis/flavonóides com a solubilidade de íons metálicos, como Ca, K Cu e Zn e flavonóides; alguns íons metálicos ou compostos organometálicos que se formam podem favorecer a atividade antimicrobiana de fenóis/flavonóides, neste caso, Al, Cu, Ca, K Cu e Zn podem favorecer a atividade anti-*Klebsiela* sp. , mas com maior intensidade os íons metálicos o Al, Ca e Cu (maiores pesos – Fig. 26).

A Figura 26C apresenta os pesos das variáveis correlacionadas pela terceira componente principal, mostrando que para diferenciar os extratos das plantas são importantes os teores de flavonóides, fenóis, Mg (diretamente correlacionados) que estão inversamente correlacionados aos teores de Na, Cu e atividade anti-*Klebsiela* sp.. Novamente o Al foi correlacionado positivamente a fenóis e flavonóides para valores intermediários, mas o Mg e K foram mais importantes para favorecer a extração destes compostos de acordo com a planta.

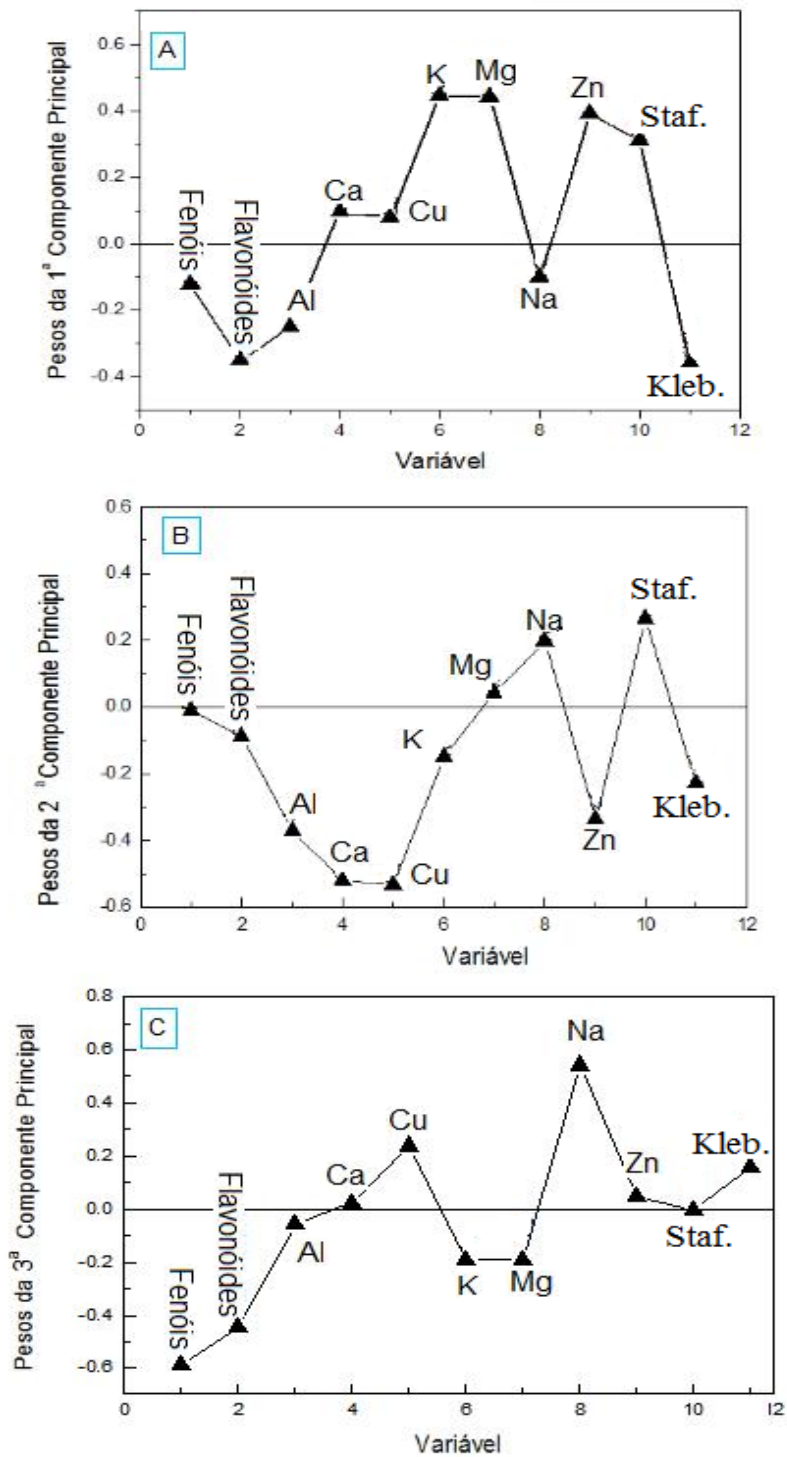


Figura 26: Pesos da primeira (A), segunda (B) e terceira (C) componentes principais nos extratos etanólicos.

Kleb. – *Klebsiella* sp; Staf. – *S. aureus*.

O reconhecimento de padrões feito através da análise de componentes principais pode estabelecer uma assinatura química das plantas medicinais e extratos de plantas de um determinado local e, para atingir este objetivo, devem ser pesquisados vários locais com diferentes tipos de plantas, de solos e clima. Como o número de plantas analisadas é pequeno, este trabalho somente sugere direcionamentos para futuras pesquisas, dando indícios de que existe um padrão entre os diferentes tipos de plantas medicinais em relação entre seu conteúdo em substâncias minerais e compostos fenólicos.

6. CONCLUSÕES

Através deste estudo pode-se concluir que os chás (águas de infusão) das plantas medicinais, são fontes importantes de minerais essenciais como Mg, K e Ca; percebe-se também que os íons metálicos não essenciais, Pb e Cd, são fracamente extraídos nas infusões, não causando danos ao ser humano. O Al está presente nas infusões em quantidades significativas, mas será tóxico apenas se a pessoa sofrer de problemas renais, as quantidades pequenas absorvidas nas dietas normais são excretadas pelos rins saudáveis, de modo que nenhuma acumulação ocorre de forma considerável. Como foi verificada uma forte correlação deste metal com os compostos orgânicos sugere-se que uma porcentagem significativa esteja complexado com os ácidos fenólicos deixando o mesmo menos disponível para o organismo.

Com relação aos compostos orgânicos, a calêndula foi a planta que mais apresentou ácidos fenólicos e flavonóides na água de infusão. Os extratos etanólicos 95% v/v da calêndula e da espinheira-santa apresentaram maiores valores de ácidos fenólicos com relação aos extratos 70%, já no caso do capim-limão, ocorreu o contrário. Para os flavonóides, os extratos de capim-limão 70% e 95% e de espinheira-santa 95% foram os que apresentaram maiores teores.

O extrato de espinheira-santa 95% v/v pode ser considerado como tendo atividade antimicrobiana importante frente a *S.aureus*, como mostrou o estudo de CIM. E os extratos de espinheira-santa 70% e 95%, capim-limão 70% e 95% e calêndula 95% apresentaram atividade antimicrobiana importante frente a *Klebsiella* sp. As infusões aquosas, nas concentrações avaliadas, não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos estudados.

Nos extratos etanólicos, não verificou-se a presença dos íons metálicos, Mn, Fe, Cr, Pb e Cd. Os demais íons metálicos foram melhor extraídos em etanol 70%.

Através da análise das componentes principais foi possível determinar algumas correlações entre íons metálicos e o teor de fenólicos e flavonóides, entre agentes antimicrobianos e compostos fenólicos. Sugere-se também que o Ca e o Al competem entre si pelo mesmo sítio ativo na planta, por isso aparecem inversamente nas PCA's.

7. TRABALHOS FUTUROS

A partir deste trabalho é possível sugerir a realização de novas pesquisas que poderão ser desenvolvidos:

- Estudo de íons metálicos e compostos fenólicos em amostras coletadas em outras regiões (estudo de correlações);
- Estudo de íons metálicos e compostos fenólicos em amostras coletadas em diferentes estações do ano, com maior e menor incidência de sol;
- Avaliar a ação antimicrobiana dos extratos etanólicos frente a outros micro-organismos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ARAB, A.A.K., KAWTHER, M.S., EL TANTAWY, M.E., BADEAA, R.I., KHAYRIA, N., Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. *Food Chemistry* 67, 357-363, 1999.

AJASA, A. M. O., BELLO, M. O., IBRAHIM, A. O., OGUNWANDE, I. A., & OLAWORE, N. O.; Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigeria. *Food Chemistry*, 85, 67–71, 2004

ALFREY A.C., HEGG A., CRASWELL P., Metabolism and toxicity of aluminum in renal failure. *Am J Clin Nutr.* 33:1509-16, 1980.

ALMEIDA, M.M.B., LOPES, M.F.G., NOGUEIRA, C.M.D.,MAGALHÃES, C.E.C., MORAIS, N.M.T., Determinação de Nutrientes Minerais em Cinco Plantas Medicinais, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 22(1): 94-97, jan.-abr. 2002.

ANDERSON, R.A., Chromium metabolism and its role in disease processes in man. *Clin.Physiol. Biochem* 4, 31-41, 1986.

ANDERSON, R. A. In *Trace minerals in Foods*. New York, ed. K. T. Smith. Marcel Dekker, 1988.

ANDRADE, A.A.; COSTA.C K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae-mimosoide. *Rev.Brasileira de Farmacognosia*, p. 231-235, 2007

ANGELO, P.M.; JORGE, N.; Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66(1): 232-240, 2007.

ANGELUCCI, E.; CARVALHO, L.R.; CARVALHO, N.R.P.; FIGUEIREDO, B.I.; MANTOVANI, B.M.D.;MORAES, M.R. *Análise química de alimento: manual Técnico*. Campinas, SP., 123p. 1987.

ANTUNES, R.M.P., LIMA, E.O., PEREIRA, M.S.V., CAMARA, C.A., ARRUDA, T.A., CATÃO, R.M.R., BARBOSA, T.P., NUNES, X.P., DIAS, C.S., SILVA, T.M.S., Atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. Rev. Bras. de Farmacognosia 16 (4), 517-524, 2006.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução RE nº 1068, de 12 de julho de 2001.

ARABBI, P.R., GENOVESE, M.I., LAJOLO, F.M., Flavonoids in vegetables foods commonly consumed in Brazil and estimates ingestion by the Brazilian population. Journal of Agricultural Food Chemistry, v.52, p.1124-31, 2004

ARAÚJO, T.A.S.; Taninos e flavonóides em plantas medicinais da caatinga: um estudo de etnobotânica quantitativa, 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2007.

ARRUDA, E. A. G. Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.31, n.5, p.503-504, 1998.

ASOLINI, F.C., TEDESCO, A.M., CARPES, S.T., FERAZ, C., ALENCAR, S.M., Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. Braz. J. Food Technol., v.9, n.3, p. 209-215, jul./set. 2006

AVANCINI, C.A.M., WIEST, J.M., MUNDSTOCK, E., Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Vol.52 n.3 Belo Horizonte, Junho 2000.

BASGEL, S., ERDEMOGLU, S.B., Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. Science of the Total Environment 359, 82-89, 2006.

BEARD, J.L.; CONNOR, J.R., JONES, B.C.; Iron in the brain. Nutr. Rev. 51, 157; 1993.

BECARIA, A.; CAMPBELL, A.; BONDY, S. C. Aluminium as a toxicant. *Toxicol. Ind. Health* 18, 309-320, 2002.

BENNETT, B. C.; PRANCE, G. T. Introduced plants in the indigenous pharmacopoeia of northern South America. *Econ.Bot.*, Bronx, v. 54, p. 90-102, 2000.

BETONI, J.E.C.; MANTOVANI, R.P.P.; BARBOSA, L.N.; DI STASI, L.C.; FERNANDES JUNIOR, A.; Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 101: 387-390, 2006.

BORRELLI, F., IZZO, A. A.; The plant kingdom as a source of antiulcer remedies. *Phytotherapy Research*, 14(8), 581–591, 2000.

BOSSOLANI, M.P., Mecanismo molecular da ação anti-secretora ácida gástrica de extratos e frações isoladas de *Maytenus ilicifolia* Mart e *Maytenus aquifolium* Mart, Tese de mestrado, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, p. 108, 2000.

BLUMENTHAL, M., GOLDBERG, A., BRINCKMANN, J., Calendula flower. In: *Herbal Medicine Expanded Commission E Monographs*. American Botanical Council, Austin, pp. 4–45, 2000

BRUNETON, J. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Zaragoza, Acribia, p. 266, 1991.

BURGUERA, J.L., BURGUERA, A.M., Lead in roadside soils of Merida City, Venezuela. *Sci. Total Environ.* 77, 45-49; 1988.

CALDAS, E.D., MACHADO, L.L., Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil *Food and Chemical Toxicology* 42, 599–603, 2004

CAMPBELL, A., The potential role of aluminium in Alzheimer's disease. *Nephrol Dial Transplant.*;17(suppl 2):17-20, 2002.

CAPIRO, N., SANCHEZ-LAMAR, A., FONSECA, G., BALUJA, L., & BORGES, E.; Capacidad protectora de *Cymbopogon critratus* (DC.) Stapf. ante el dano genetico inducido por estres oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biome´dicas*, 20(1), 33–38, 2001.

CARBAJAL, D., CASACO, A., ARRUZAZABALA, L., Gonzalez, R., & TOLON, Z.; Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* leaves. Journal of Ethnopharmacology, 25(1), 103–107, 1989

CARLINI, E.L.A., Estudo da ação anti úlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa e outras). Brasília: CEME/AFIP.1988

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. Quim. Nova v. 21,p. 99, 1998.

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

CHAN, T.Y.K., TOMLINSON, B., CRITCHLEY, A.J.H., Chinese herbal medicines revisited: a Hong Kong perspective. The Lancet 342, 1532-1534, 1993.

CHIZZOLA, R., MICHITSCH, H., & FRANZ, C.H., Monitoring of metallic micronutrients and heavy metals in herbs, species and medicinal plants from Austria. European Journal of Food Research and Technology, 216, 407–411, 2003.

CONCON, J.M., Food toxicology. New York: Marcel Dekker, 1988.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Nacional, v.1, p. 577., 1984.

COSTA, E.A., Manual de nutrientes: Prevenção das doenças através dos alimentos. Petrópolis, RJ: Vozes, 2002.

CUNICO, M.M., CARVALHO, J.L.S., KERBER, V.A., HIGASKINO, C.E.K., CRUZ ALMEIDA, S.C., MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G., Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperacea). Rev.Bras. de Farmacognosia 14 (2), 97-103; 2004.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. Journal of Mass Spectrometry, v. 39, pp. 1-15, 2004.

DEMATOUSCHEK, B. V.; SATHLBISKUP, E. Phytochemical analysis of non volatile compounds from *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae). Pharm.Acta Helv., Amsterdam, v. 66, p. 242-5, 1991.

DIAS, J.F.G., VIRTUOSO, S., DAVET, A., CUNICO, M.M., MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G., AUER, C.G., GRIGOLETTI-JR, A., OLIVEIRA, A.B., FERRONATO, M.L., Atividade antibacteriana e antifúngica de extratos etanólicos de *Aster lanceolatus* Willd., Asteracea. Rev.Bras. de Farmacognosia 16 (1), 83-87, 2006.

D'MELLO, J. P. F.; DUFFUS, C. M.; DUFFUS, J. H. Toxic substances in crop plants, Cambridge, Royal Society of Chemistry, p. 323, 1991.

DUARTE, J., VIZCAINO, F.P., UTRILLA, P., JIMENEZ, J., TAMARGO, J., ZARZUELO, A.; Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure activity relationships. Biochem. Pharmacol.24, 857-862, 1993.

DUARTE, M.C.T, FIGUEIRA, G.M., PEREIRA, B., MAGALHÃES, P.M., DELARMELINA, C., Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. Rev. Bras. de Farmacognosia 14 (1), 6-8; 2004.

DUKE, J. A. The green pharmacy. Emmaus, Rodale Press, p. 204, 1997.

DUNBABIN, D.W., TALLIS, G.A., POPPLEWELL, P.Y., Lead poisoning from Indian herbal medicine. Medical Journal of Australia 157, 835-836, 1992.

EMEA. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Assessment Report for the Development of Community Monographs and for Inclusion of Herbal Substance(s), Preparation(s) or Combinations Thereof in the Community List. EMEA/HMPC/179282/2007, London 6 March 2008. <www.emea.europa.eu/pdfs/human/hmpc/calendula_officinalis_flos/17928207en.pdf>. 2008a

EMEA. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Community Herbal Monograph on *Calendula Officinalis* L., Flos. EMEA/HMPC/179281/2007Coor, London, 2 May 2008. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/hmpc/calendula_officinalis_flos/17928107enfin.pdf>, 2008b.

ENGELKE, F. Fitoterápicos e Legislação. *Jornal Brasileiro de Fitomedicina* 1(1):10 – 15, 2004.

EVANS, W. C. Trease and Evans' *Pharmacognosy*. 14th ed. London, WB Saunders, p. 52, 495, 1996.

ERNST, E., Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. *Pharmacological Sciences* 23, 136-139, 2002.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA SUPPLEMENT, German Edition. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, p. 1015, 1999.

FALCÃO, D.Q., COSTA, E.R., ALVIANO, D.S., ALVIANO, C.S., KUSTER, R.M., MENEZES, F.S., Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. *Rev. Bras. De Farmacognosia* 16 (1), 73-76, 2006.

FARNSWORTH, N.R., SOEJARTO, D.D., Global importance of medicinal plants. In: (Akerle, O., Heywood, V., Synge, H.), *Conservation of Medicinal Plants*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 25–51, 1991.

FERNANDEZ, P.L., PABLOS, F., MARTÍN, M.J., GONZALEZ, A.G., Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Food Chemistry* 76, 483–489, 2002.

FERREIRA, A.L.A, MATSUBARA, L.S.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*; 43(1): 61-8, 1997.

FERREIRA P.C., PIAI K.A., TAKAYANAGUI A.M.M., SEGURA-MUÑOZ S.I.; Alumínio como fator de risco para a doença de Alzheimer. *Rev Latino-am Enfermagem*, janeiro-fevereiro; 16(1), 2008.

FERRI, M.G.; Fisiologia Vegetal 1. 2ªed.; São Paulo: EPU, 2007.

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae* J. Phytopathol., Berlin, v. 148, p. 483-7, 2000.

FLATEN, T. P. Aluminium in tea – concentrations, speciation and bioavailability. Coord. Chem. Rev. 228, 385-395, 2002.

FOCA, M.; JAKOB, K.; WHITTIER, S. Infecção endêmica por *Pseudomonas aeruginosa* em Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal. New England Journal of Medicine, n.343, p.695-700, 2000.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food and Drug Administration Department of Health and Human Services. Food for Human Consumption; Substances Generally Recognized as Safe 21 CFR Part 182.10, 2007.

FOOD AND NUTRITION BOARD. National Research Council, National Academy of Sciences: Recommended Dietary Allowances, 10thed. Washington, DC, National Academy Press, 1989.

GAZIM, Z.C., FERREIRA, G.A., REZENDE, C.M., NAKAMURA, C.V., DIAS FILHO, B.P., CORTEZ, D.G.A., Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis* produzida no Paraná. Hortic. Bras. 25 (1), 2007.

GARCIA, E., CABRERA, C., LORENZO, M. L., & LOPEZ, M. C., Chromium levels in species and aromatic herbs. The Science of the Total Environment, 257, 51–56, 2000.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H., Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arq. Inst. Biol. 72, 3, 353-358, 2005.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H., Atividade antimicrobiana de algumas plantas medicinais nativas contra bactérias encontradas em úlceras de decúbito, O Biológico, v. 68, p. 133, 2006.

GONZALEZ, F.G., DI STASI, L.C., Antiulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. *Phytomedicine* 9: 125-134, 2002.

GONZALEZ , F.G., PORTELA T.Y., STIPP, E.J., DI STASI, L.C.; Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *J Ethnopharmacol* 77: 41-47, 2001.

GORBO-NETO, L., LOPES, N.P., Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, vol.30,2, 374-381, 2007.

GOTLIEB, O. New and underutilized plants in the Americas: solutions to problems of inventory through systematics. *Interciencia* 6, n.1, 22-29, 1999.

GOYER, R.A., Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C.D., ed. *Cassarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons*. 5ed., New York: MacGraw Hill, 691-736, 1996.

GÜÇER, S.; ERDEMOGLU, S. B.; PYRZYNISKA, K. Speciation of aluminum in tea infusion by ion-exchange resins and flame AAS detection. *Anal. Chim. Acta* 411, 81-89, 2000.

GUPTA, M. P.; 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Colombia: Programa Iberoamericano de Ciencia Y Tecnología para el Desarrollo, CYTED (pp. 308–310), 1995.

HACKETT, A.M.; The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical Pharmacological, and Structural-Activity Relationships*, p. 177-194, Alan R. Liss, New York, NY USA, 1986.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, p. 1-7, 2001.

HAMBURGER, M.; ADLER S.; BAUMANN, D.; FÖRG A.; WEINREICH, B.; Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia*, 74: 328-338, 2003.

HANASAKI, Y., OGAWA, S., FNKUI, S.; The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 16, 845-850, 1994.

HARTWELL, J.L., Plants used against cancer: a survey, *Lloydia* 31,114, 1968.

HARTWIG, et al , Mecanismos associados a tolerância ao Al em plantas, *Semina*, 28, p.219-228, 2007.

HASLAM, E.; J. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action *Nat. Prod.* 59, 205, 1996.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R. et al. Screening of plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7):1027-1031, 2002.

HOPE, W.C., WELTON, A.F., FIELDER-NAGY, C., BATULA-BERNARDO, C., AND COFFEY, J.W.; In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substances of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity of quercetin. *Biochem. Pharmacol.* 32, 367-371, 1983.

HSIEH, P.C.; MAU, J.L.; HUANG, S.H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology* 18, p.35-43, 2001.

INDU, M.N.; HATHA, A.A.M.; ABIROSH, C.; HARSHA, U.; VIVEKANANDAN, G., Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Braz. J. Microbiol.*, 37: 153-158, 2006.

IKAWA, M., SCHAPER, T.D., DOLLARD, C.A., SASNER, J.J., Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (7), pp 1811–1815, 2003.

JELLIN, J.M., GREGORY, P.J., BATZ, F., HITCHENS, K., et al. Pharmacist's Letter/Prescriber's Letter Natural Medicines Comprehensive Database, 5th ed, Stockton, CA, pp. 265–66, 2003.

JOHNSON, M.A., FISCHER, J.G., BOWMAN, B.A., GUNTER, E.W.; Iron nutriture in elderly individuals. *The FASEB Journal* 8, 609-621, 1994.

JURD, L.; GEISSMAN, T.A. Absorption Spectra of Metal Complexes of Flavonoid Compounds. *Journal of Organic Chemistry*, v.21, n.12, p.1395-1401, 1956.

KAKOSY, T., HUDAK, A., NARAY, M., Lead intoxication epidemic caused by ingestion of contaminated ground paprika. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology* 34, 507-511, 1996.

KENDLER, B.S., Lead: an element of danger. *Carolina Tips*, 56, 1-3; 1993.

KERBAUY, G.B., *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2004.

KHAN, I.A., ALLGOOD, J. WALKER, L.A., ABOURASHED, E.A., SCHELENK, D., BENSON, W.H.; Determination of heavy metals and pesticides in ginseng products. *Journal of AOAC International* 84, 936-939; 2001.

KINGHORN, A. D.; *J. Pharm. Pharmacol.* v.53, p.135, 2001.

KRACHLER, M., MOHL, C., EMONS, H., SHOTYK, W., Analytical procedures for the determination of selected trace elements in peat and plant samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 57 (8); 1277-1289, 2002.

KUJALA, T.S, LOPONEN, J.M; KLICA, K. D.; PIHLAJA, K. Phenolics and betaeyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *J. Agric. Food Chemistry* 48: 5338-4342, 2000.

KUMAR, A., NAIR, A. G. C., REDDY, A. V. R., & GARG, A. N.; Availability of essential elements in Indian and US tea brands. *Food Chemistry*, 89, 441-448, 2005.

LEITE J.P.V., RASTRELLI L., ROMUSSI G., OLIVEIRA A.B., VILEGAS J.H.Y., VILEGAS W., PIZZA C., Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). *J Agric Food Chem* 49: 3796-3801, 2001.

LESNIEWICZ, A., JAWORSKA, K., ZYRNICKI, W.; Macro and micro-nutrients and their bioavailability in polish herbal medicaments. *Food Chemistry* 99, 670-679; 2006.

LEVITT, C.M.D., Sources of lead poisoning. *Journal of the American Medicinal Association* 252, 3127-3128, 1984.

LIMA, O.G., Antimicrobial substances from higher plants. XXXVI. On the presence of maytenin and pristimerine in the cortical part of the roots of *Maytenus ilicifolia* from the south of Brazil, Ver. Inst. Antibiot. Recife, 1971

LIMA, O.G., *et al*; Substâncias Antimicrobianas de plantas superiores, Comunicação XXXI. Maitenina. Novo antimicrobiano com ação antineoplástica, isolada da Celastracea de Pernambuco, Revista do Instituto de Antibióticos Recife, 17–25, 1969.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A., VARGAS, A.C., HENZEL, A., WITT, N.M., Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). Ciência Rural 35 (2), 371-376, 2005.

LOPEZ, F. F., CABRERA, C., LORENZO, M. L., & LOPEZ, M. C., Aluminium levels in species and aromatic herbs. The Science of the Total Environment, 257, 191–197, 2000.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil - Vol 02 - 2. edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 384 p. 2002.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A, Plantas medicinais no Brasil, nativas e exóticas, Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H., MOREIRA H., 2001. Plantas ornamentais no Brasil, 3ªEd. Instituto Plantarum. Nova Odessa. 1120p, 2001.

LOZAK, A., SOLTYK, K., OSTAPCZUK, P., & FIJALEK, Z.; Determination of selected trace elements in herbs and their infusions. The Science of the Total Environment, 289, 33–40, 2002.

LOZOFF, B.; Has iron deficiency been show the cause altered behavior in infants? In Dobbins (ed): Brain, behavior and iron in the infant diet. Springer-Verlag, 1990.

LUENG, A.Y., FOSTER, S., Calendula. In: Encyclopedia of Common Natural Ingredients used in Food Drugs and Cosmetics. John Wiley & Sons, New York, pp. 113–114, 1996.

LU, Y., FOO, L.Y., Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). Food Chem 2001; 75 (2): 197-202, 2001.

MAHAN, L.K., ESCOTT-STUMP, S.; Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia, trad. Andrea Favano, 9 ed., São Paulo:Roca, 1998.

MALAVOLTA, E., VITTI, G.C., OLIVEIRA, S.A., Avaliação do estado nutricional das plantas, princípios e aplicações, 2ªEd. Piracicaba:Potafos, 1997.

MARKOWITZ, S.B., NENEZ, C.M., KLITZMAN, S., Lead poisoning due to hai ge fen: the porphyrin content of individual erythrocytes. Journal of the American Medical Association 271, 932-934, 1994.

MCLAUGHLIN, M.J., PARKER, D.R., CLARK, J.M., Metals and micronutrients – food safety issues. Field Crops Research 60, 143-163, 1999.

MELLO, F.A.F. [et al]. Fertilidade do solo. São Paulo:Nobel, 1993.

MELO, A.F.M., SANTOS, E.J.V., SOUZA, L.F.C., CARVALHO, A.A.T., PEREIRA, M.S., HIGINO, J.S., Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. Rev. Bras. de Farmacognosia 16 (2), 202-205, 2006.

MELO, E.A, MANCINI-Filho J., GUERRA, N.B., MACIEL, G.R. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). Ci. Tecnol. Aliment.; 23 (suppl): 195-9, 2003

MELO, J.G., MARTINS, J.D.R., AMORIM, E.L.C., ALBUQUERQUE, U.P.; Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). Acta bot. bras. 21(1): 27-36. 2007.

MELO, S. F., SOARES, S. F., COSTA, R. F., SILVA, C. R., OLIVEIRA, M. B. N., BEZERRA, R. J. A. C., CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A., & BERNARDO-FILHO, M.; Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 496(1–2), 33–38, 2001.

MICHELIN, D.C., MORESHI, P.E., LIMA, A.C., NASCIMENTO, G.G.F., PAGANELLI, M.O., CHAUD, M.V., Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Rev. Bras de Farmacognosia 15 (4), 316-320, 2005.

MIDDLETON, E., JR.; KANDASWAMI, C.; The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. (J.B. Harborne, ed.), p. 619--652, Chapman and Hall, London, UK, 1993.

MIDIO, A.F., MARTINS, D.I., *Toxicologia de Alimentos*, São Paulo: Varela, 2000.

MIYAZAWA, M.; CHIERICE, G.O.; PAVAN, M.A. Amenização da toxicidade de alumínio as raízes do trigo pela complexação com Ácidos orgânicos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.16, n.2, p.209-215, maio/ago. 1992.

MOLLOY, D. W.; STANDISH, T. I.; NIEBOER, E.; TURNBULL, J. D.; SMITH, S. D.; DUBOIS, S. Effects of acute exposure to aluminum on cognition in humans. *J. Toxicol. Environ. Health A – Current Issues* 70, 2011-2019, 2007

MOREIRA, M., MEDEIROS, E.A.S., PIGNATARI, A.C.C., WEY, S.B., CARDO, D.M., Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina sobre a letalidade e o tempo de hospitalização. *Rev. Ass. Med. Brasil* 44 (4), 263-268, 1998.

MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., KOBAYASHI, G.S., PFALLER, M.A., *Microbiologia médica*, 4ªed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

NACZK, M., SHAHIDI, F.; Extractions and analysis of phenolics in food; *J. Chromatography A*, 1054, 95-111, 2004.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 29 (4): 273-300, 1990.

NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Information supplement 15th M100-S15. Wayne. PA: NCCLS/CLSI, 2005/CLSI, 2005.

NORDBERG, G., Excursions of intake above ADI: case study on cadmium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 30, S57-S62, 1999.

NOSSACK A.C., VASCONCELOS E.C., VILEGAS J.H.Y., LANÇAS F.M., ROQUE N.F., Quantitative analysis of triterpenes friedelin and friedelan-3-ol in *Maytenus aquifolium* by HRGC and HT-CGC. *Phytochem Anal* 11: 243-246,2000.

OLUJOHUNGBE, A., FIELDS, P.A., SANDFORD, A.F., Heavy metals intoxication from homeopathic and herbals remedies. *Postgraduate Medical Journal* 70, 764-769, 1994.

ONAWUNMI, G. O., WOLDE-AB, Y., OGUNLANA, E.O., Antibacterial Constituents in the Essential Oil of *Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf. *Journal of Ethnopharmacology*, 12, 274-286 Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd, 1984.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Elementos traço na nutrição e saúde humanas, tradução: Andrea Favano, São Paulo: Roca, 1998.

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

PARMIGIANI, M.P.C.V.D., MIDIO,A.F. Chumbo na alimentação da população infantil. *Cadernos de nutrição*,v.9, p.25-34, 1995.

PENNINGTON, J.A.T. & WILSON, D. B., Daily intakes of nine nutritional elements: Analyzed vs. calculated values. *J. Am.Diet. Assoc.* 90: 375-381, 1990

PEREIRA, J.V., PEREIRA, M.S.V., HIGINO, J.S., SAMPAIO, F.C., ALVES, P.M., ARAÚJO, C.R.F., Estudos com o extrato da *Punica granatum* Linn. (romã): efeito antimicrobiano *in vitro* e avaliação clínica de um dentifrício sobre micro-organismos do biofilme dental. *Rev. Odonto Ciência* 20 (49), 262-269, 2005.

PEREIRA,R.S., SUMITA, T.,C., FURLAN, M.R., JORGE, A. O.C. & UENO, M., Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Revista de Saúde Pública*, 38(2): 326-328, 2004.

PETRY, R.D.; ORTEGA, G.G.; SILVA, W.B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride-flavonoid complex. *Pharmazie*, v.56, n.6, p.456-479, 2001.

PINO, J. A.; ROSADO, A. Chemical composition of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, from Cuba. *J. Essent. Oil Res.*, Carol Stream, v. 12, p. 301-2, 2000.

PIMENTEL, C.V.M.B., FRANCKI V.M., GOLLÜCKE A.P.B.; Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela; 2005.

PIP, E., Cadmium, copper and lead in soils and garden produce near a metal smelter at Flin Flon, Manitoba. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 46, 790-796, 1991.

PRASAD, A.S., Zinc and immunity. *Molecular and Cellular Biochemistry* 188, 63-69, 1998.

PUATANACHOKCHAI, R., KISHIDA, H., DENDA, A., MURATA, N., KONISHI, Y., VINITKETHUMNUEN, U., & NAKAE, D.; Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf.) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male 344 rats. *Cancer Letters*, 183(1), 9–15, 2002.

QUEIROGA, C.L., SILVA, G.F., DIAS, P.C., POSSENTI, A., CARVALHO, J.E., Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *J Ethnopharmacol* 72: 465-468, 2000.

RAMALHO, V.C. Ação antioxidante de α -tocoferol e extrato de alecrim em óleo de soja submetido a termoxidação [Dissertação de Mestrado]. São José do Rio Preto, São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2005. 154 pp.

RAMARATHNAM, N., OSAWA T., OCHI H., KAWAKISHI, S.; The contribution of plant food antioxidants to humans health. *Trends Food Sci Nutr*; 6 (3): 75-82, 1995.

RASHED, M.N., Trace elements in some wild plants from the shores of the high dam lake and the adjacent desert, as determined by atomic absorption spectroscopy, *Journal of Arid Environments* 29:185-197, 1995

RATTY, A.K., DAS, N.P.; Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: Structure activity relationship. *Biochem. Med. Metabol. Biol* 39, 69-79, 1988.

RAZIC, S., ONJIA, A., & POTKONJAK, B., Trace elements analysis of *Echinacea purpurea* – herbal medicinal. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33, 845–850, 2003.

REILLY, C. Metal contamination of food. London: Appl. Science, 1980.

- RESENDE, J.C.P.; RESENDE, M.A.; In vitro antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* spp. from hospitalized patients. *Mycoses*, 42: 641-644, 1999.
- REZNICEK, G., ZITTERL-EGLSEER, K. Quantitative determination of the faradiol esters in marigold flowers and extracts. *Scientia Pharmaceutica* 71, 121-128, 2003.
- RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v.23, p.127-49, 1988.
- ROSS, S., SALISBURY, F.B., *Plant Physiology*, 4th ed., Belmont, California: Wadsworth, 1991.
- RUNNIE, I., SALLEH, M. N., MOHAMED, S., HEAD, R., & ABEYWARDENA, M.; Vasorelaxation induced by common edible tropical plant extracts in isolated rat aorta and mesenteric vascular bed. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2-3), 311-316, 2004.
- SANGUINETTI, E. E. *Plantas que curam*. Porto Alegre, Rígel, p. 76.1989.
- SANNOMIYA, M. et al., A Flavonoid Glycoside from *Maytenus aquifolium*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 1, p.237-239, 1998.
- SANTOS, S.C., FERREIRA, F.S., ROSSI-ALVA, J.C., FERNANDEZ, L.G., Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes, *Rev. Bras. De Farmacognosia* 17 (2), 215-219, 2007.
- SARTORI, L.R.; FERREIRA, M.S.; PERAZZO, F.F.; MANDALHO LIMA, L., CARVALHO, J.C.T.; Atividade anti-inflamatória do granulado de *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L.; *Revista Brasileira de Farmacognosia*; v. 13, supl., p. 17-19, 2003.
- SCALBERT, A., Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883, 1991.
- SCHNITZER, M. Reactions between fulvic acid, a soil humic compound and inorganic soil constituents. *Soil Science Society of America Proceedings*, Madison, v.33, n.1, p.75-81, Jan./Feb. 1969.

SCHUCK, V.J.A., FRATINI, M. , RAUBER, C.S., HENRIQUES, A., SCHAPOVAL, E.E.S., Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Vol 37, n.1, jan/abr., 2001.

SHAGHAGHI, M.; MANZOORI, J.L.; JOUYBAN, A., Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method. Food Chemistry 108, 695–701, 2008.

SIDIBE, L.; CHALCAT, J. C.; GARRY, R. P.; LACOMBE, L.; HARAMA, M. Aromatic plants of Mali (IV): Chemical composition of essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and *C. giganteus* (Hochst.) Chiov. J.Essent.Oil Res., Carol Stream,v. 13, p. 110-2, 2001.

SILVA, D.J. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). 2ª ed. Viçosa, MG: UFV, 949p., p.165-170, 1990.

SILVA, J.G., SOUZA, I.A., HIGINO, J.S., SIQUEIRA-JR, J.P., PEREIRA, J.V., PEREIRA, M.S.V., Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras de Farmacognosia 17, 4, 572-577, 2007.

SILVA, J.L., SILVA, R.P., JORGE, R.M., SILVA, G.D.F, VIEIRA-FILHO, S.A., FONSECA, A.P.N.D., TAGLIATI, C.A., Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae). Rev.Bras. de Farmacognosia 15 (1), 30-35, 2005.

SILVEIRA, L. M. S., ROSAS, L.S., OLEA, R. S. G.,GONÇALVES, E.C., & FONSECA-JR, D.C., Antibacterial activity of gervão extract against *Staphylococcus aureus* oxacillin-sensible and oxacillin-resistant strains isolated from biological samples. RBAC, vol. 39(4): 299-301, 2007.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.P., MENTZ, L.A., PETROVIK, P.R.; Farmacognosia da planta ao medicamento, 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2007.

SOARES, S. E.; Ácidos Fenólicos como Antioxidantes. Rev. Nutr. 15, 71-81, 2002.

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

SOUZA, C.A.S., AVANCINI, C.A.M., WIEST, J.M., Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37 (6), 2000.

SOUZA-FORMIGONE, M.L.O., OLIVEIRA M.G.M., MONTEIRO M.G., SILVEIRA FILHO N.G., BRAZ S, CARLINI E.A., Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J Ethnopharmacol* 34: 21-27, 1991.

SOUZA, L.M., CIPRIANI, T.R., IACOMINI, M., GORIN, P.A.J., SASSAKI, G.L., HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47,59–67, 2008.

SOUZA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza, UFC/ Lab. Produtos Naturais, p. 207-13, 1991.

STERN, J.L., HAGERMAN, A.E., STEINBERG, P.D., MASON, P.K., Phlorotannin-protein interactions. *Journal of Chemical Ecology* 22, 1887-1899, 1996.

STEVENSON, F.J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. New York : J. Wiley, 443p., 1982.

STEWART, M.J., MOAR, J.J., STEENKAMP, P., KOKOT, M., Finding in fatal cases of poisoning attributed to traditional remedies in South Africa. *Forensic Science International* 101, 177-183, 1999.

SCHUCK, V.J.A., FRATINI, M., RAUBER, C.S., HENRIQUES, A., SCHAPOVAL, E.E.S., Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cytopogon citratus*. *Rev.Bras. de Ciências Farmacêuticas* 37, 1, 44-49, 2001.

TAN, K.H.; BINGER, A. Effect of humic acid on aluminum toxicity in corn plants. *Soil Science*, Baltimore, v.141, n.1, p.20-25, Jan. 1986.

- TESKE, M., TRENTINI, A.M. Herbarium. Compêndio de fitoterapia, 4a edição, 317p., 2001.
- TONG, S. Von SCHIRNDING, Y.E., PRAPAMONTOL, T., Environmental lead exposure: a public problem of global dimension. Bulletin of the World Health Organization 78, 1068-1077, 2000.
- VASSILEVA, E., HOENING, M., Determination of arsenic in plant samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with ultrasonic nebulization: a complex problem. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy Volume 56, Issue 2, 223-232, 2001.
- VERZA, S.M., KREINECKER, V.R., REIS, V., HENRIQUES, A.T., ORTEGA, G.G.; Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor tanínicos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. Quim. Nova, Vol. 30, No. 4, 815-820, 2007.
- VILEGAS J.H.Y., LANÇAS F.M., Detecção de adulterações em amostras comerciais de “espíneira-santa” por cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC). Rev. Ciênc Farm 18: 241-248, 1997.
- VILEGAS J.H.Y., LANÇAS F.M., CERVI A.C., High resolution gas chromatography analysis of “espíneira-santa” (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*): analysis of crude drug adulterations. Phytother Res 8: 241-244, 1994.
- VOLPATO, A. M. M.; RIOS, E. M.; MIGUEL, M. D.; SANDER, P. C.; MIGUEL, O. G. Investigação da atividade antibacteriana de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). Revista Visão Acadêmica, v.2, n.1, p.7-10, 2001.
- WHO, 1995, Inorganic lead. [Environmental Health Criteria 165]. World Health Organization.
- WHO, 2002, Drug Information Herbal Medicines, v. 16. World Health Organization, Geneva.
- WHO, 2002. Report on infectious diseases. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

WHO, 2003. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. Concise International Chemical Assessment Document 50. World Health Organization, Geneva.

WOOD, J.M., Les métaux toxiques dans l'environnement. La Recherche, v.70,p. 711-9, 1976.

WOODS, P.W., Herbal healing. Essence 30, 42-46, 1999.

YEMANE, M.,CHANDRAVANSI, B.S.,WONDIMU, T., Levels of essential and non-essential metals in leaves of the tea plant (*Camellia sinensis L.*) and soil of Wushwush farms, Ethiopia. Food Chemistry 107, Issue 3, p. 1236-1243, 2008.