

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM PATOLOGIA GERAL

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E DETERMINAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *PSIDIUM GUINEENSE* SWARTZ**

ÉRIKA ROBERTA SILVA DE ARAÚJO

RECIFE, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM PATOLOGIA GERAL

ÉRIKA ROBERTA SILVA DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E DETERMINAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *PSIDIUM GUINEENSE* SWARTZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Professoras Orientadoras:

Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
Karina Perrelli Randau

RECIFE, 2010

Araújo, Érika Roberta Silva de
Avaliação da biocompatibilidade e determinação da
atividade antimicrobiana de *Psidium guineense* Swartz /
Érika Roberta Silva de Araújo. – Recife: O Autor, 2010.
84 folhas: il., fig., tab. e quadro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Patologia, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. *Psidium guineense* Swartz. 2. Composição
química. 3. Atividade antimicrobiana. 4.
Biocompatibilidade. I. Título.

616-078
616.01

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2010-095



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



AUTORA: ÉRIKA ROBERTA SILVA DE ARAÚJO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA GERAL.

NOME DA DISSERTAÇÃO: "AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *PSIDIUM GUINEENSE* SWARTZ"

ORIENTADORA: *PROFA. DRA. EULÁLIA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO XIMENES*

CO-ORIENTADORA: *PROFA. PÓS-DOCTORA. KARINA PERRELLI RANDAU*

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

DATA: 21 DE AGOSTO DE 2009.

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. MARIA BERNADETE SOUSA MAIA

Profª. Dra. LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO

Profª. Dra. TERESINHA GONÇALVES DA SILVA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Hilton Justino da Silva

R E C I F E

2010

Dedicatória

A Deus que sempre esteve ao meu lado, nos momentos de angústia, fraqueza, derrotas, perseverança, dedicação e vitórias. Sei que, principalmente agora, Estais ao meu lado. Obrigado por me guiar e permitir a realização de mais um sonho.

A minha família, pai, Ricardo, mãe, Mirian, e irmã, Rebecca, pelo apoio, incentivo e amor em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, principalmente, ao nosso mestre amado e maior: **Deus**. Aquele que me orienta e me apóia nessa caminhada em busca da evolução espiritual e intelectual.

A minha família que, desde o início de tudo, apoiou-me.

A minha segunda família, meu Tio querido Albérico Rêgo Júnior, a minha irmã e meus irmãos de coração Sandra Katarina Rêgo, Albérico Rêgo Neto e Luiz Gustavo Rêgo pelo amor, carinho, acolhida, nos momentos decisivos para a conclusão desse trabalho.

Aos meus vizinhos e amigos Cid Bezerra e Lindalva Cavalcanti, que me incentivaram e ajudaram a conseguir as amostras da planta para identificação botânica.

As minhas orientadoras Eulália Ximenes e Karina Randau, que me ajudaram com conselhos, ensinamentos, atenção e dedicação em todas as etapas deste trabalho. Vocês foram parcela essencial para a concretização de mais uma etapa da minha vida profissional. Muito obrigada.

A Profª Teresinha Gonçalves, por sua disponibilidade, atenção, carinho e dedicação na etapa de biocompatibilidade. Muito obrigada!

A Profª Kesia Xisto pelo incentivo nas etapas finais do trabalho, pelas palavras de carinho e por ter me recebido no estágio de docência.

A botânica, Olívia Cano e a todos do Herbário Dárdano de Andrade Lima – IPA pela grande ajuda e identificação botânica.

Ao Prof. Diógenes Luiz da Mota, Prof. Carlos Eduardo de Queiroz, Prof. Samuel Daniel de Souza Filho e Prof. Alex Benício da Silveira pela grande contribuição na leitura das lâminas de histologia e pelas fotografias.

Aos professores do Mestrado em Patologia por seus ensinamentos.

A meus amigos de trabalho, Antônio André e René Melo. Minha gratidão a cada um de vocês que me ajudaram, cada um na sua particularidade, com conselhos, advertências e companheirismo, muito obrigada por tudo.

Aos meus companheiros do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos, Nadja Freire, Lucas Leite, Maria Carolina Wanderley, Amanda Mesquita, Rennan Alencar, Carlos Weber e Leila Elid, pelo companheirismo e ensinamentos.

As colegas Roberta Pereira Nazário da Silva, Mariane Freire de Oliveira, Renata Deud Salomão Rameh e Neyla Maria Pereira Alves, pela atenção, dedicação na preparação das lâminas histológicas.

A colega Rosilma de Oliveira Araújo pelos ensinamentos, ajuda, paciência e carinho que me ajudaram a realizar o estágio de docência.

Aos colegas do Mestrado em Patologia: Juliana Carla Serafim da Silva, Karina Carvalho, Gabriela Guedes, Elisângela Soares que ajudaram na realização do Mestrado e na concretização dessa pesquisa.

Aos estagiários do Biotério do Departamento de Antibióticos, Iane Bezerra Vasconcelos, Jaciana dos Santos Aguiar, Thiago Ubiratan Lins, Katariny Calheiros de Castro, Marília Maria Sitônio, a todos que me ajudaram na etapa inicial no cuidado com os ratos do laboratório, tornando possível essa pesquisa.

A CAPES pelo apoio financeiro concedido para a realização desse trabalho.

E a todas as pessoas, que encontrei ao longo desse caminho e, que de alguma forma, me instruíram, e me ajudaram a tornar real essa dissertação.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

“Podemos confiar que Deus provê tudo de que precisamos no momento certo. Essa segurança nos manterá buscando sua vontade e nos ajudará a viver alegremente com aquilo que ele nos der”. Sandy Larsen

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS E QUADROS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1. Considerações Gerais sobre a Fitoterapia	17
2.2. A Fitoterapia no Brasil	19
2.3. Antibacterianos derivados de Plantas	22
2.4. Família <i>Myrtaceae</i>	27
2.5. Gênero <i>Psidium</i>	28
2.6. <i>Psidium guineense</i> Swartz	28
2.7. Plantas Medicinais e Biocompatibilidade	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral	31
3.2. Objetivos Específicos	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Estudo Fitoquímico	32
4.1.1. Coleta e identificação do material vegetal	32
4.1.2. Preparação dos extratos	32
4.1.3. Determinação do perfil fitoquímico de extratos de <i>P. guineense</i> Swartz	33
4.2. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>P. guineense</i> Swartz	35

4.2.1. Microrganismos	35
4.2.2. Método para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	38
4.3. Determinação da biocompatibilidade do extrato aquoso de <i>P. guineense</i> Swartz	40
4.3. 1. Estudo histológico	40
4.3.2. Animais	40
4.3.3. Metodologia	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Análise Fitoquímica das folhas de <i>P. guineense</i> Swartz	43
5.2. Atividade Antimicrobiana de <i>P. guineense</i> Swartz	45
5.3. Biocompatibilidade do extrato aquoso de <i>P. guineense</i> Swartz com tecido subcutâneo de ratos albinos (Wistar)	49
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
8. ANEXOS	67

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AcOH - Ácido Acético

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

°C – Grau Celsius

CBA- Centro de Biotecnologia da Amazônia

CCB – Centro de Ciências Biológicas

CCDA – Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO – Dimetil sulfoxido

EAcEt – Extrato de Acetato de Etila

EAQ – Extrato Aquoso

EEP – Extrato de Éter de Petróleo

EM – Extrato Metanólico

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica

EtOAc – Acetato de Etila

HCOOH - Ácido Fórmico

IC – Isolado Clínico

IPA – Instituto Agrônomo de Pernambuco

MRSA – *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente

n-BuOH- n-Butanol

Me₂CO - Acetona

OMS – Organização Mundial de Saúde

P&D – Pesquisa e Desenvolvimento

pH – potencial hidrogeniônico

RPMI – Instituto Roswell Park Memorial

SUS – Sistema Único de Saúde

TTC – Cloreto de 2,3,5 Trifenil Tetrazólio

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

v/v – volume/volume

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

DAUFPE – Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura química do catecol.	24
Figura 2. Representação da estrutura química da flavona.	25
Figura 3. Representação da estrutura química de taninos: A- Hidrolizável e B- Condensado	26
Figura 4. Representação da estrutura química da artemisina (terpenóide)	26
Figura 5. <i>Psidium guineense</i> Swartz	29
Figura 6. Esquema representando a preparação dos extratos de <i>P. guineense</i> Swartz	33
Figura 7. Esquema para pesquisa de metabólitos secundários dos extratos de <i>P. guineense</i> Swartz por Cromatografia em Camada Delgada Analítica	34
Figura 8. Esquema para determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos de <i>P. guineense</i> Swartz	39
Figura 9. Esquema realizado para o ensaio de biocompatibilidade do extrato aquoso de <i>P. guineense</i> Swartz com o tecido subcutâneo de ratos albinos Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	42
Figura 10. Metabólitos secundários presentes nas folhas de <i>P. guineense</i> Swartz por CCDA.	44
Figura 11. Fotomicrografias do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos albinos. (1) Grupo Controle e (2) Grupo Tratado, após 7(A), 14(B), 28(C) e 32(D) dias da injeção com o extrato aquoso de <i>P. guineense</i> . Observar (F) Fibroblastos e (FC) Fibras Colágenas. Aumento (40x) Coloração (HE).	50
Figura 12. Fotomicrografias do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos albinos. (1) Grupo Controle e (2) Grupo Tratado, após o 7(A), 14(B), 28(C) e 32(D) dias da injeção com o extrato aquoso de <i>P. guineense</i> . Observar (F) Fibroblastos e (FC) Fibras Colágenas. Aumento (200x) Coloração (HE).	51

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1. Plantas com potencial para desenvolvimento de produtos antimicrobianos.	23
Tabela 2. Origem e perfil de susceptibilidade dos microorganismos utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima.	36 e 37
Tabela 3. Pesquisa dos metabólitos secundários nos extratos de <i>P. guineense</i> Swartz	43
Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos diferentes extratos de <i>P. guineense</i> Swartz frente às cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> e <i>Candida albicans</i>	45
Tabela 5. Ocorrência de fibroblastos no tecido subcutâneo de ratos albinos após o estudo da biocompatibilidade do extrato aquoso de <i>P. guineense</i> Swartz	
Quadro1. Sistemas de solventes e reveladores em cromatografia de camada delgada para a caracterização de metabólicos secundários dos extratos de <i>P. guineense</i> Swartz	34

RESUMO

Psidium guineense Swartz, um arbusto de aproximadamente 2,5 m de altura é popularmente conhecido como araçá. Este vegetal é utilizado como planta medicinal no interior do Brasil, para o tratamento de doenças do trato urinário e do trato gastrointestinal. Entretanto, é pouco estudada quanto a sua composição química, propriedades antimicrobianas e de biocompatibilidade. O presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil fitoquímico, a composição dos extratos éter de petróleo, acetato de etila, metanólico e aquoso, obtidos das folhas de *P. guineense*, determinar a atividade antimicrobiana destes extratos e avaliar *in vivo* a compatibilidade biológica do extrato aquoso de *P. guineense* com o tecido conjuntivo subcutâneo, hepático e renal. A análise fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada para a pesquisa de metabolitos secundários. A atividade antimicrobiana foi avaliada sobre 48 microrganismos incluindo cocos Gram-positivos (n=18), bacilos Gram-negativos (n=20), e levedura do gênero *Candida* (n=10). Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada a técnica de micro-diluição em meio líquido. Nos ensaios de biocompatibilidade, injeções subcutâneas do extrato aquoso de *P. guineense* de concentração 0,4 mg/mL (dose: 1,3mg/kg) foram administradas a 24 ratos (*Rattus norvegicus*, albino Wistar) divididos em quatro grupos. Após 7, 14, 28 e 32 dias desta administração, o tecido subcutâneo circunjacente à injeção foi retirado fixado em formalina tamponada à 10% (pH=7,0) e realizados os procedimentos histológicos para posterior análise microscópica. A análise fitoquímica revelou a presença de mono e sesquiterpenos nos extratos éter de petróleo e acetato de etila; flavonóides nos extratos acetato de etila, metanólico e aquoso; triterpenos e esteróides no extrato éter de petróleo; açúcares nos extratos metanólico e aquoso; proantocianidinas e leucoantocianidinas condensadas nos extratos metanólico e aquoso; e taninos hidrolisáveis no aquoso. Todos os extratos ensaiados apresentam atividade antimicrobiana, sendo esta superior para cocos Gram-positivos. O gênero *Staphylococcus* foi o mais sensível à ação destes extratos cuja média geométrica da concentração inibitória mínima foi de 0,16; 0,21; 0,35 e 0,25 para o extrato aquoso, metanólico, acetato de etila e éter de petróleo respectivamente. As estruturas celulares do tecido analisado apresentaram suas características bem conservadas sem nenhuma alteração morfológica nos grupos experimentais. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram as folhas *P. guineense* Swartz como promissora fonte para o desenvolvimento de medicamentos.

Palavras-chave: *Psidium guineense*, composição química, atividade antimicrobiana, biocompatibilidade.

ABSTRACT

Psidium guineense Swartz, a shrub 2,5 m height approximately is known popularly as araçá. This plant is used as medicinal plant in Brazil for treatment of diarrheic and urinary tract diseases. However, there're not enough studies related to chemical composition, antimicrobial properties and biocompatibility of *P. guineense* extracts. This study was designed to examine the chemical composition of petroleum ether, ethyl acetate, methanol and water extract obtained of *Psidium guineense* leaves; antimicrobial activities of these extracts and evaluation *in vivo* the biological compatibility of water extract with subcutaneous tissue. The chemical composition was realized by TLC (Thin Layer Chromatography) to search secondary metabolites. The antimicrobial activity was investigated about 48 microorganisms including Gram-positive cocci (n=18), Gram-negative bacilli (n=20) and *Candida* yeast (n=10). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by broth microdilution method. *In vivo* biocompatibility assays, *Psidium guineense* water extracts concentration 0,4 mg/mL (dosage: 1,3mg/Kg) were subcutaneously injected in 24 rats (*Rattus norvegicus*, albino Wistar) divided in 4 groups. After 7, 14, 28 and 32 days of that injection, the subcutaneous surrounding tissue slices were taken and fixed in 10% tamponed formaldehyde (pH=7,0) and after blocked in paraffin to realize the histological proceedings to microscopic analysis. The phytochemical screening indicated the presence of mono and sesquiterpenes in petroleum ether extract; flavonoids in ethyl acetate, methanol and water extracts; triterpenes and esteroids in petroleum ether; sugars; proanthocyanidins and leucoanthocyanidins in methanol and water extracts; and hydrolysable tannins in water extract. All of those *P. guineense* extracts showed antimicrobial activity, being better against Gram-positive cocci. *Staphylococcus* genus was the most susceptible with geometric media CIM was 0,16; 0,21; 0,35 e 0,25 for the water, methanol, ethyl acetate and petroleum ether extracts respectively. The subcutaneous tissue and cellular structures showed their characteristics well conserved with any morphological modification in any experimental groups. The results obtained in this research endorse the popular use of *P. guineense* leaves as a promising source to developing medicaments.

Key-words: *Psidium guineense*, chemical composition; antimicrobial activity, biocompatibility.

1. INTRODUÇÃO

O emprego de plantas para uso medicinal representou, durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. Elas são freqüentemente utilizadas como agentes antiinflamatórios e no tratamento de infecções microbianas (APEL *et al.* 2006, CALIXTO *et al.*, 2000, SILVEIRA *et al.*, 2007).

A procura por tratamentos fitoterápicos por parte da população apresenta um notável crescimento, o que torna indispensável uma investigação científica das plantas utilizadas na cura e prevenção de doenças (NEWALL *et al.* 1996).

A família *Myrtaceae* ocorre na Mata Atlântica com mais de 50 espécies, de arbustos e árvores verdes durante todo o ano e cujas folhas opostas, com nervuras marginais são freqüentes nesta família, bem representada na Austrália, no Leste Asiático e nas Américas (PEIXOTO & GENTRY 1990; BARROSO & PERÓN 1994; LANDRUM & KAWASAKI 1997; TABARELLI & MANTOVANI 1999; TYLER, 1999; OLIVEIRA FILHO & FONTES 2000, GUILHERME *et al.* 2004). O gênero *Psidium* possui mais de 150 espécies e aproximadamente 15 espécies são nativas da América Tropical (COSTA 2003).

Araçazeiro é o nome genérico dado a várias espécies de mirtáceas fruteiras do gênero *Psidium* com ampla disseminação no Brasil. De uma maneira geral estão distribuídos em quase todos os estados do país, existindo relatos de várias espécies que ocorrem do Rio Grande do Sul até a Amazônia. *Psidium guineense* é de origem sul-americana e apresenta uma ampla área de dispersão (BRANDÃO *et al.*, 2002).

No Brasil, esta planta encontra-se desde a Região Norte até a Região Sudeste. No Nordeste, ocorre nas regiões do litoral e zona da mata, principalmente nos tabuleiros costeiros. É um arbusto de 2 a 2,5 m de altura, caule de 1,5 cm de comprimento; frutos globosos, apresentam coloração verde clara a amarelo-verdoso com gosto ácido (ANDRADE LIMA, 1957; PIO-CORRÊA, 1978; MATTOS, 1993; DEMATTÊ, 1997).

A espécie *guineense* é utilizada como planta medicinal no interior do Brasil. Na forma de decocto das suas raízes é usado para o tratamento de doenças do trato urinário e gastrointestinal. É utilizada na Costa Rica para o tratamento de varizes e úlceras nas pernas. Chá das folhas é usado para resfriados e bronquites (CHAVARRÍA *et al.*, 1998; AKERELE, 1991; GONZALEZ *et al.*, 2005).

Diante da escassez de estudos científicos que informem o potencial terapêutico de *P. guineense* Swartz, é de fundamental importância a realização de trabalhos que avaliem a

atividade antimicrobiana bem como seus componentes químicos. Além disso, testes de biocompatibilidade são necessários para que futuramente possa ser este extrato veiculado em formulações para uso medicinal humano ou veterinário.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Considerações Gerais Sobre a Fitoterapia

O homem busca na natureza, desde os tempos antigos, recursos que melhorem sua condição de vida para, assim, aumentar suas chances de sobrevivência pela melhoria de sua saúde. Em todas as épocas e culturas, ele aprendeu a tirar proveito dos recursos naturais locais (Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura, 1996).

As propriedades anti-sépticas das plantas são as mais conhecidas, sendo mencionadas na Bíblia e evidenciadas no processo de embalsamento durante a arte de mumificação pelos antigos egípcios (CALIXTO *et al.*, 2001; APEL *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2007).

Com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. À medida que os progressos da química se impunham, suas substâncias ativas puderam ser isoladas e, finalmente usadas como protótipos de moléculas sinteticamente elaboradas, as quais possuíam atividade ainda maior (CALIXTO *et al.*, 2001; APEL *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2007).

Existem ainda hoje, muitas comunidades e grupos étnicos, principalmente aqueles com condições sócio-econômicas menos favorecidas, que utilizam plantas medicinais como principal, e muitas vezes, único recurso para a cura de seus males (CAETANO *et al.*, 2002; MACIEL *et al.*, 2002.)

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 60 a 80 % da população mundial não tem acesso ao atendimento primário de saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura de alívio para muitas doenças. A própria OMS não só reconhece como também estimula o uso de plantas medicinais pela população de países subdesenvolvidos e em via de desenvolvimento (CALIXTO *et al.*, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2007).

O uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico passou a ser oficialmente reconhecido pela OMS em 1978, quando recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para a sua utilização. É sabido que 85% dos 80% da população mundial que recorre a Medicina Tradicional utilizam plantas ou preparações à base de vegetais. Ressalte-se aí que 67% das espécies vegetais medicinais do mundo são originadas dos países em desenvolvimento (ALONSO, 1998; Ministério da Saúde, 2006).

Com a expansão das práticas da medicina tradicional na última década do século passado, essas práticas passaram a ser incentivadas tanto por profissionais que atuam na rede básica de saúde dos países em desenvolvimento, como por aqueles que trabalham onde a medicina convencional é predominante no sistema de saúde local. Neste sentido, a OMS tem elaborado uma série de resoluções com objetivo de considerar o valor potencial da medicina não-convencional em seu conjunto para a expansão dos serviços de saúde regionais (MS, 2006).

De fato, os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todas as novas drogas (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Em algumas áreas, como aquelas que envolvem doenças como o câncer e doenças infecciosas, em torno de 60% das drogas são de origem natural (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

A importância de se estudar plantas medicinais pode ter três implicações distintas: resgatar o patrimônio cultural tradicional, assegurando a sobrevivência e perpetuação do mesmo; otimizar os usos populares correntes, desenvolvendo preparados terapêuticos (remédios caseiros) de baixo custo e organizar os conhecimentos tradicionais de maneira a utilizá-los em processos e desenvolvimento tecnológico (AMOROZO, 1996; ELISABETSKY, 2001).

É de se presumir que com o prosseguimento das pesquisas, centenas de princípios ativos, extraídos de plantas, irão enriquecer o arsenal terapêutico disponível, além de estimular os profissionais da química a sintetizarem protótipos ou análogos bioativos (KOROLKOVAS, 1996).

A busca por medicamentos a partir de espécies vegetais é iniciada pela decisão de qual espécie será pesquisada. Tal decisão pode ser baseada no conhecimento antecipado de efeitos terapêuticos (pesquisa etnobotânica – utiliza o conhecimento pré-existente nas comunidades nativas), por acesso a bancos de moléculas disponíveis ou por pesquisa aleatória (em espécies existentes e disponíveis em local previamente escolhido) (MARINHO 2008).

De acordo com Newman (2003) 23% das 1.031 novas moléculas introduzidas no mercado entre 1981-2002 são oriundas de fontes naturais, 10% sintetizados a partir de moléculas naturais identificadas e 5% derivados de fontes naturais sem alterações.

Para que os fitoterápicos venham a ocupar o lugar de destaque na prática médica é necessário realizar estudos cientificamente embasados incluindo a avaliação de sua toxicidade, biocompatibilidade, interações com outras drogas, reações alérgicas e reações idiossincrásicas (BENSOUSSAN; MYERS; CALTON, 2000). Os pacientes precisam

entender que plantas medicinais contêm princípios ativos, os quais não têm apenas tal potencial benéfico, podendo provocar, isoladamente ou interagindo com outras substâncias, reações tóxicas (O'HARA *et al.*, 1998; CALIXTO, 2000).

Metodologicamente os estudos sobre propriedades curativas de plantas medicinais são particularmente complexos, uma vez que algumas plantas com atividades terapêuticas reconhecidas cientificamente, não apresentam a mesma atividade em qualquer das frações de seus extratos. Isto provavelmente ocorre devido à complexa rede de sinergismos entre as diversas substâncias que compõe a planta em si e conferem o determinado poder curativo (VASCONCELOS *et al.*, 2002).

2.2. A Fitoterapia no Brasil

No Brasil, o surgimento de uma medicina popular com uso das plantas, deve-se aos índios, com contribuições dos negros e europeus. Na época em que era colônia de Portugal, os médicos restringiam-se às metrópoles e na zona rural e/ou suburbana a população recorria ao uso das ervas medicinais. A construção desta terapia alternativa surgiu da articulação dos conhecimentos dos indígenas, jesuítas e fazendeiros. Este processo de miscigenação gerou uma diversificada bagagem de usos para as plantas e seus aspectos medicinais, que sobreviveram de modo marginal até a atualidade (ARAÚJO, 1979).

Recentemente, há registros de um acréscimo significativo na utilização de fitoterápicos pela população brasileira. Este crescimento pode ser explicado pelos avanços ocorridos na área científica que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos mais seguros e eficazes, assim como de uma forte tendência de procura, pela população, por terapias supostamente menos agressivas, especialmente quando destinadas ao atendimento primário à saúde (YUNES; PEDROSA; CECHINELLI FILHO, 2001).

Em maio de 2005, a OMS publicou o documento Política Nacional de Medicina Tradicional e Regulamentação de Medicamentos Fitoterápicos, em se que discute a situação mundial a respeito das políticas da Medicina Tradicional e fitoterápicos, inclusive no Brasil. A inclusão brasileira decorre do fato do país ter a maior diversidade genética vegetal do mundo, com cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies e, também, por possuir ampla tradição do uso das plantas medicinais,

vinculada ao conhecimento popular, transmitido oralmente por gerações (Ministério da Saúde, 2006).

O crescente interesse pelos fitoterápicos tem feito com que diversos laboratórios aumentem o número de pesquisas neste segmento e, conseqüentemente, o número de patentes de produtos desenvolvidos no Brasil tem aumentado gradualmente (embora ainda seja pequeno e o potencial do País não esteja sendo plenamente utilizado) (MARINHO, 2008).

De acordo com pesquisas realizadas em universidades e institutos de pesquisa, tanto no País quanto no exterior, muitas das espécies da Amazônia brasileira revelam conter substâncias ativas promissoras para desenvolvimento de agentes terapêuticos oncológicos, antibióticos e antiretrovirais, entre outros (MARINHO, 2004).

Apesar de nossa condição privilegiada de biodiversidade e todo o impulso das universidades e centros de pesquisa, utilizamos, e muito, as plantas medicinais exóticas, com os valores de importação superando amplamente os de exportação para estes produtos (FONTE, 2004).

Segundo a visão das políticas de saúde, verifica-se que, apesar dos progressos alcançados no Brasil, nas últimas décadas, o compromisso de assegurar a acessibilidade universal aos medicamentos ainda está bastante distante uma vez que mais da metade da população não tem acesso aos medicamentos e apenas 23% da população concentre 60% do consumo (MARQUES, 2000).

Uma alternativa viável para solucionar este problema, segundo os especialistas, é o estabelecimento de uma nova política de exploração das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos focada na geração local de renda (BORN, 2000).

A deficiência da divulgação de informações científicas referentes aos fitoterápicos representa outro importante obstáculo, além disso, mesmo quando existe informação científica comprovando os efeitos terapêuticos de determinada planta, ainda esbarra no preconceito de muitos médicos em adotar terapias ditas alternativas (BITTENCOURT; CAPONI; FALKENBERG, 2002). Respondendo a estas demandas, autoridades brasileiras têm atuado, principalmente via Ministério da Saúde, estimulando o uso de fitoterápicos seguros e com base técnico-científica (RIBEIRO; LEITE; DANTAS –BARROS, 2005).

O Ministério da Saúde, em parceria com órgãos governamentais e não-governamentais, propôs várias ações no sentido de aumentar a utilização de plantas medicinais da nossa biodiversidade, dentre elas destacam-se a Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos (2001), o Seminário Nacional de Plantas

Medicinais, Fitoterápicos e Assistência Farmacêutica (2003), a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (2003/05), e em 2005, a criação, por decreto presidencial, do Grupo de Trabalho Interministerial para elaborar a Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Ministério da Saúde, 2006).

As diretrizes contempladas no documento são: estabelecer a Relação Nacional de Medicamentos Fitoterápicos para a Atenção Básica; estimular o desenvolvimento e a produção nacional, conforme critérios científico-tecnológicos; estabelecer uma política de formação, capacitação e qualificação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas e tecnologias inerentes à viabilização do uso racional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos; incentivar a pesquisa e o desenvolvimento de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país; resgatar, valorizar, embasar e validar cientificamente o uso popular de plantas medicinais e implementar a regulamentação sanitária de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos (Ministério da Saúde, 2006).

Em várias regiões do Brasil surgiram iniciativas de realização de estudos etnofarmacológicos integrado a iniciativas para o desenvolvimento sustentável que se traduzem na valorização dos conhecimentos tradicionais e esforços para conservação da biodiversidade, gestão e promoção da saúde ambiental e qualidade de vida da população (AMORIM, 1999; BORN, 2000). Uma iniciativa importante foi a construção, concluída em 2001 do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), com modernas instalações para implantação de laboratórios e incubação de empresas de biotecnologia. Os objetivos essenciais do CBA são promover o conhecimento da biodiversidade amazônica com agregação de valor na região amazônica; incentivar o desenvolvimento regional de produtos, processos e serviços biotecnológicos; incubar, consolidar e projetar empresas de base biotecnológica e estabelecer parques bioindustriais de projeção internacional. (MARINHO, 2008).

O crescente valor econômico dos recursos da biodiversidade está estimulando controvérsias internacionais no plano das relações comerciais e éticas, sobre quem deve lucrar com este negócio e de que maneira. Esta situação torna-se especialmente crítica no Brasil, pois estamos bastante atrasados em relação aos países desenvolvidos nos campos da pesquisa, registro de patentes e divulgação de alternativas fitoterápicas (MARQUES, 2000; PESSINI et al., 2003).

Estudo sobre patentes realizado por Moreira e colaboradores (2006), analisou solicitações de patentes ou patentes concedidas relacionadas às plantas brasileiras, identificando o tipo de invenção envolvida (processo, produto e/ou uso) e quem eram os detentores das patentes. Como resultado foi identificado que 186 de 278 plantas brasileiras (67%) são objeto de patentes (pedidos ou concessões); 94,2% dos 738 documentos analisados eram solicitações feitas por empresas estrangeiras; 89,3% dos pedidos foram para aplicações terapêuticas (principalmente para uso dermatológico) e 57,4% dos pedidos era relacionado ao uso dos extratos ou ingredientes ativos na forma de composições farmacêuticas (enquanto 24,6% eram associados a métodos terapêuticos, 12,5% a processos de extração, 4,3% aos próprios extratos e 1,2% a moléculas) (MARINHO, 2008).

Instituições governamentais (OGAVA *et al.*, 2003), não governamentais (BARBOSA; PINTO, 2003), de ensino, de pesquisa e assistência médica (FERRO 1987/1989; BRANDÃO, 1996; CAETANO, FONTE, BORSATO, 2003; RIBEIRO; LEITE; DANTAS-BARROS, 2005), vêm desenvolvendo estudos sobre fitoterapia. Da mesma forma, as agências de incentivo à pesquisa têm estimulado a produção de conhecimento científico sobre plantas medicinais nos contextos da descoberta, validação e aplicação (RIBEIRO; LEITE; DANTAS-BARROS, 2005).

Salienta-se que, no momento, a questão da proteção e do uso adequado da biodiversidade nacional é extremamente importante. A regulamentação de sua proteção e utilização, associada ao estímulo governamental à P&D em produtos naturais, pode ser um dos mais importantes fatores para geração de inovações tecnológicas.

2.3. Antibacterianos derivados de Plantas

O desenvolvimento de resistência bacteriana é um fenômeno biológico natural, que se seguiu à introdução de antimicrobianos na prática clínica, sendo acentuado pelo uso desmedido e irracional desses agentes. A resistência aos antibacterianos é preocupação mundial e, dentre as medidas que devem ser tomadas para evitá-la ou diminuí-la, está o desenvolvimento de novos medicamentos. A demanda por novos antimicrobianos também é decorrência do alto custo e dos inúmeros efeitos colaterais das drogas disponíveis no mercado (WANNMACHER, 2004).

Como as plantas produzem inúmeras substâncias biologicamente ativas, tem-se nos produtos de origem vegetal uma fonte importante de protótipos que poderão ser sintetizados em laboratório. Apesar do desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial e biologia molecular, pequena parte dos fármacos permanece sendo obtida a partir de matérias-primas vegetais. (SCHENKEL, GOSMANN, PETROVICK, 1999). Várias pesquisas envolvendo a busca de novos antimicrobianos a base de plantas vêm sendo realizadas, como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Plantas com potencial para desenvolvimento de produtos antimicrobianos

Espécie Vegetal	Parte da Planta Utilizada	Microrganismos Avaliados	Referência
<i>Plinia glomerata</i>	Folhas	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>Trichophyton mentagrophytes</i> e <i>Trichophyton rubrum</i>	Serafin <i>et al.</i> , 2007
<i>Eugenia brasiliensis</i> Lam.	Folhas e caule	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228; <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29912; <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 35152 e <i>Shigella flexinerii</i> ATCC 12022	Magina <i>et al.</i> , 2008
<i>Eugenia beaurepaireana</i> Kiaersk	Folhas e caule	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228; <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29912; <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 35152 e <i>Shigella flexinerii</i> ATCC 12022	Magina <i>et al.</i> , 2008
<i>Eugenia umbelliflora</i> Berg	Folhas e caule	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228; <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29912; <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 35152 e <i>Shigella flexinerii</i> ATCC 12022	Magina <i>et al.</i> , 2008
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Cascas	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4082; <i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 25975; <i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556, <i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456, <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC33478 e <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 11578	Soares <i>et al.</i> , 2008
<i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Bidens pilosa</i> , <i>Origanum majorana</i> e <i>Salvia officinalis</i>	Folhas	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Escherichia coli</i>	Haida <i>et al.</i> , 2007

<i>Myrciaria tenella</i>	Folhas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228, <i>Enterococcus faecalis</i> (isolado), <i>Micrococcus</i> sp. (isolado); <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29245; <i>Enterobacter</i> sp. (isolado) e <i>Shigella flexnerii</i> (isolado).	Schneider <i>et al.</i> , 2008
<i>Campomanesia adamantium</i>	Cascas, frutos e folhas	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i> e <i>Candida albicans</i>	Kataoka <i>et al.</i> , 2008

Levantamentos realizados no período de 1981 a 2002 pela *Annual Reports of Medical Chemistry* demonstraram que dentre 90 novas drogas com potencial farmacológico, 61 eram derivados semi-sintéticos de plantas (SIXEL e PECINALLI, 2002; NEWMAN *et al.*, 2003).

Os inúmeros compostos bioativos sintetizados pelas plantas são derivados do seu metabolismo secundário, associados a mecanismos de defesa contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros. (COWAN, 1999).

Compostos fenólicos, fenóis ou polifenóis pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande variedade de estruturas simples e complexas, que tem, no mínimo, um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxílico. Como exemplos podem ser citados fenóis simples tal como o catecol (Figura 1) e a epicatecina (COWAN, 1999). Compostos lipofílicos interferem na estrutura da membrana microbiana. Um aumento na hidroxilação destes compostos está relacionado a um aumento de toxicidade. (URS, DUNLEAVY, 1975; SCALBERT, 1991; COWAN, 1999).

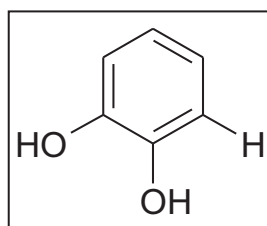


Figura 1 – Representação da estrutura química do catecol.

A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos hidroxilados pode ser explicada por atuarem possivelmente por inibição de enzimas através de reações com grupos sulfidrilas

e por interações inespecíficas com proteínas, embora ainda não tenha sido comprovada uma relação entre o grau de hidroxilação e a atividade tóxica (WILHELM FILHO et al., 2001)

Outros compostos com atividade biológica são os flavonóides; nome dado a polifenóis de baixo peso molecular, encontrados em diversas plantas. Flavonas (Figura 2) são estruturas fenólicas contendo um grupo carbonila. Desde que foram descobertos, os flavonóides foram reconhecidos por serem sintetizados pelas plantas em resposta às infecções microbianas, sendo reconhecida também, *in vitro* sua ação antimicrobiana contra um grande número de microrganismos. (COWAN, 1999; SIMÕES et al., 1999; SARTORI *et al.*, 2003).

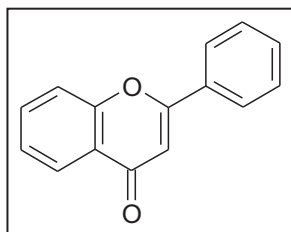


Figura 2 – Representação da estrutura química da flavona.

O mecanismo de ação dos flavonóides ocorre pela habilidade de se complexar com proteínas e com células bacterianas (formar complexos irreversíveis com ácidos aminonucleofílicos em proteínas (STERN *et al.*, 1996), frequentemente levando à inativação da proteína e perda da função.). Muitos flavonóides lipofílicos podem ainda romper a parede bacteriana (TSUCHIYA *et al.*, 1996; COWAN, 1999).

Os taninos (Figura 3) são substâncias não cristalizáveis que na presença de água formam soluções coloidais. Apresentam reação ácida e é adstringente. Quanto a sua atividade antimicrobiana esta, está relacionada à ligação com proteínas e adesinas, inibição de enzimas, privação do substrato microbiano, formação de complexos com a parede celular e com íons metálicos e ruptura da membrana plasmática (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; COWAN, 1999).

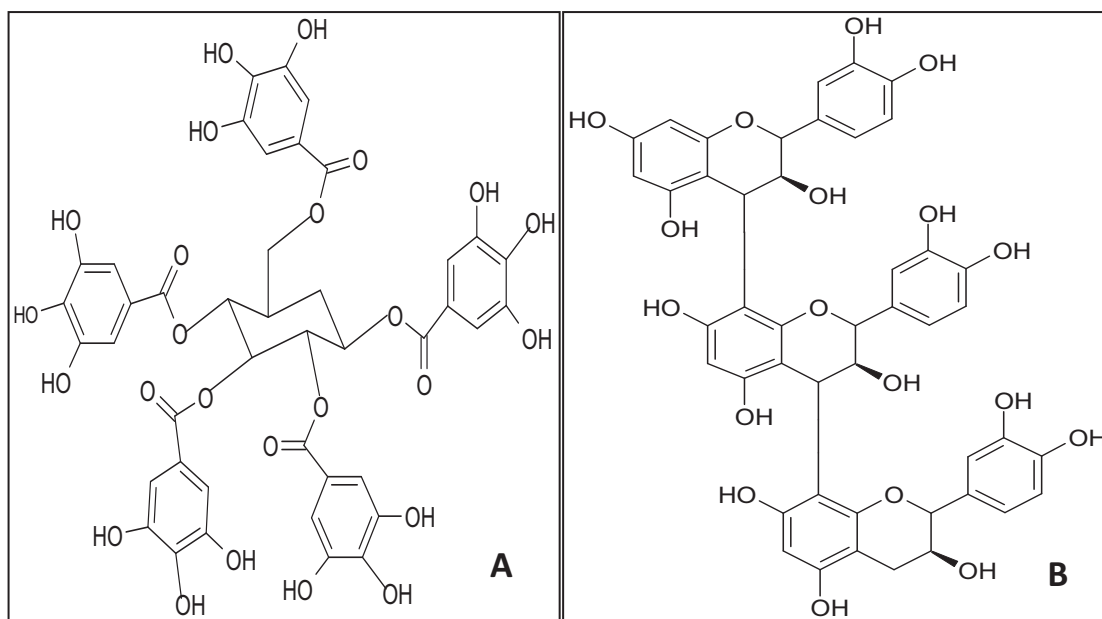


Figura 3 – Representações das estruturas químicas dos taninos: A– Hidrolizável e B – Condensado

Os terpenóides são reconhecidos como substâncias possuidoras de atividade inseticida derivada do metabolismo secundário das plantas (CAVALCANTI et al., 2004). Alguns representantes deste grupo como a capsaicina isolado de *Capsicum*, têm ação antimicrobiana via ruptura da membrana plasmática. O triterpenóide ácido betulínico isolado da *Betula* é uma dos vários terpenóides que tem ação inibitória contra o HIV. Outro exemplo é a artemisina isolada da *Artemisia* (Figura 4) que é derivada do α -arteter, muito utilizada como antimalárico (COWAN, 1999).

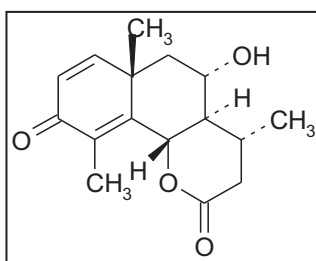


Figura 4 – Representação da estrutura química da artemisina (terpenóide).

2.4. Família Myrtaceae

A família *Myrtaceae* compreende aproximadamente 100 gêneros e 3500 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com poucas espécies ocorrendo nas regiões temperadas (BARROSO *et al.* 1984). Segundo Cronquist (1981) esta família se divide em duas subfamílias: Myrtoideae e Leptospermoideae.

A subfamília Myrtoideae, que reúnem aproximadamente 70 gêneros e 2400 espécies, tem distribuição principalmente nas Américas do Sul e Central (BRIGGS & JOHSON, 1979) e está subordinada apenas pela tribo Myrteae que integra três subtribos: Myrciinae, Eugeniinae e Myrtinae, distintas pela morfologia do embrião.

As espécies de *Myrtaceae* ocorrem em maior densidade nas formações vegetacionais do Brasil. São fontes promissoras para serem exploradas, através de estudos químicos, pelos mais diversos interesses. Apel *et al.* (1998) e Limberger *et al.* (1998), as espécies da família *Myrtaceae* são ricas em sesquiterpenos que apresentam um amplo espectro de efeitos biológicos como atividade antineoplásica, antimalária, antiviral e microbicida. Várias de suas espécies produzem óleos essenciais, incluindo o gênero *Eucalyptus*, a partir dos quais são descritas atividades antifúngica, antibacteriana e antiinflamatória. Algumas espécies de *Myrcia* são utilizadas na medicina popular como: hipoglicemiante, anticancerígenas e antidiabéticas. As folhas de *Psidium guajava* são empregadas popularmente para tratar distúrbios gastrointestinais, prática herdada originariamente da medicina asteca (LOZOYA *et al.*, 2002). Infusos ou decoctos preparados com folhas frescas ou desidratadas são indicados para diarreia, flatulência e cólica abdominal. O efeito espasmolítico e antidiarréico está relacionado com o conteúdo em flavonóides, em particular de derivados da quercetina, que atuam como antagonistas do cálcio nas fibras musculares lisas (MORALES, LOZOYA, 1994). Adicionalmente, comprovaram-se as atividades antimicrobiana, antitussígena (JAIARJ *et al.*, 1999), sedativa (LUTTERODT, MALEQUE, 1988), antioxidante (MARTIN *et al.*, 1998; WANG, 2000; NADERI *et al.*, 2003; ANJANEYULU, 2004; WOODMAN, 2004) e antiproliferativa para células cancerígenas (MANOSROI, 2005).

2.5. Gênero *Psidium*

O gênero *Psidium* é representado por arbustos, raramente árvores com inflorescência em pedúnculos unifloros ou trifloros, poucas vezes sobre ramos áfilos simulando racemos. Compreende aproximadamente 110 a 130 espécies, distribuídas por toda América tropical desde o Paraguai, nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Brasil) até as Antilhas. O maior número de espécies se encontra da Amazônia até o sul do México. (REITZ & KLEIN, 1977).

Este gênero apresenta diversas espécies como *P. myrtoides*, *P. australis*, *P. cattleyanum*, *P. guineense* e *P. guajava*. Dentre essas espécies, *P. guajava* é a espécie mais estudada se destacando por inibir edema, exibir atividade antipirética e antidiarréica (OLAJIDE et al.1999); efeito supressor da atividade locomotora (LUTTERODT & MALEQUE 1988).

2.6. *Psidium guineense* Swartz

Psidium guineense tem origem sul-americana e apresenta uma ampla área de dispersão. No Brasil, ocorre desde a Região Norte até a ilha de São Sebastião, em São Paulo. Nos Estados do Nordeste, é encontrada nas regiões do Litoral e Zona da Mata, principalmente nas áreas dos tabuleiros costeiros, caracterizados por possuírem solos pobres, ácidos e arenosos (ANDRADE LIMA, 1957; PIO-CORRÊA, 1978; MATTOS, 1993; DEMATTÊ, 1997).

P. guineense (Figura 5) é um arbusto ou árvore pequena de 2 a 2,5 m de altura cujas inflorescências durante o crescimento inicial são cobertas com pêlos marrom-avermelhados variando para cinza-amarelados, com cerca de 0,3 a 0,5 mm de comprimento. Os brotos são aveludados, às vezes glabros, a casca mais antiga é geralmente polida e muitas vezes escamosa e resistente. As folhas são coriáceas de cor marrom-amarelada ou marrom-avermelhada de formatos elíptico, elíptico-oblongo ou obovado com 4 a 11,5 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura, normalmente aveludadas na parte inferior; com ápice obusto, arredondado ou agudo. A nervura principal é plana na parte superior e proeminente na parte inferior. As nervuras laterais são em número de 1 a 10. Os frutos são globosos, às vezes ovóides; quando imaturos, apresentam coloração verde clara e gosto ácido, quando

maduros, são amarelo-verdosos. A polpa é de cor de branca e sabor doce, com muitas sementes de aproximadamente 0,3 cm de cor branca, pequena, ovóide, e de casca dura. Suas sementes são em número de 22 a 100 podendo chegar até 250 sementes por fruto, as quais, medem 3 a 4 mm de comprimento (LANDRUM, 1995).

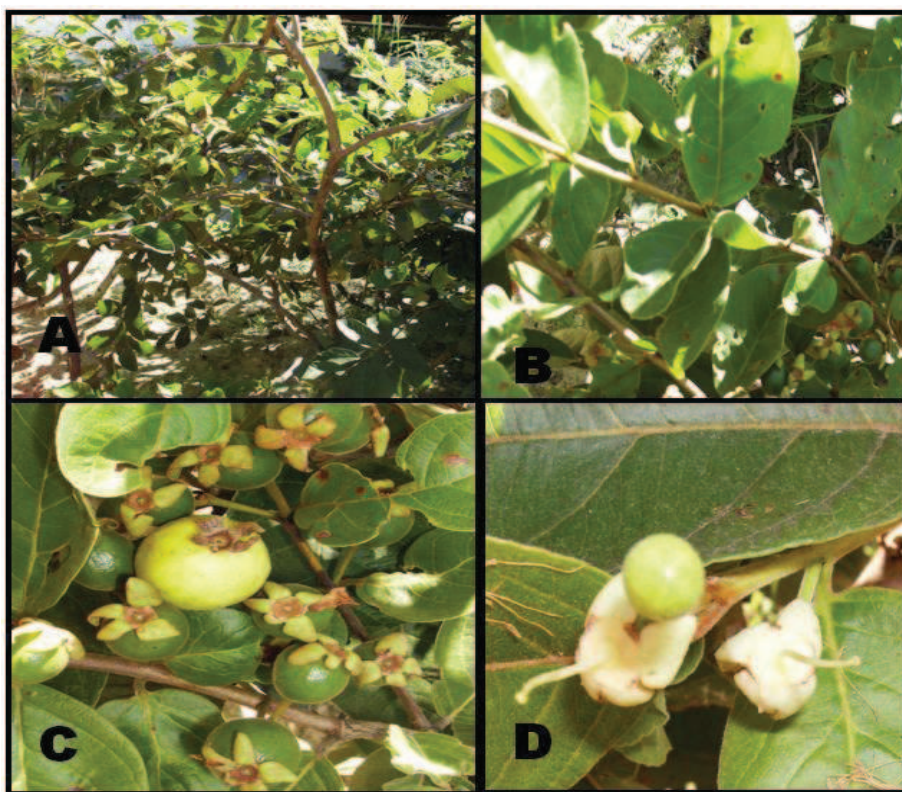


Figura 5. *Psidium guineense* Swartz. **A.** Hábito. **B.** Folhas. **C.** Frutos. **D.** Flores.
Foto: (Erika R. S. Araujo, 2008)

A composição química das cascas e da polpa de *P. guineense* apresenta aldeídos, fenóis, esteróides e triterpenos, flavonóides, cetonas, taninos e açúcares (GONZALÉZ et al., 2005).

Em 1995, Tucker e Maciarelo determinaram a composição química do óleo essencial das folhas de *P. guineense*. Este é composto de α -pineno, canfeno, mirceno, α -felandreno, limoneno, (Z)- β -ocimeno, γ -terpineno, (E)- β -ocimeno, terpinoleno, acetato de fencil, α -ilangeno, benzaldeído, trans- α -bergamotene, acetato de bornil, β -cariofileno, (Z)- β -farneseno, (E)- β -farneseno, zingibereno, β -bisaboleno, cis- γ -bisaboleno, trans- γ -bisaboleno, β -sesquifelandreno, α -curcumeno e óxido de cariofileno.

González e colaboradores (2005), avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos oriundos das folhas, casca e polpa de *Psidium guineense* frente *Streptococcus mutans* ATCC 31089, e a um isolado clínico de *Streptococcus viridans*. Eles concluíram que os extratos dos frutos verdes eram mais ativos que os frutos maduros, e que o extrato de acetato de etila, o mais eficiente em comparação ao extrato etanólico. Também observaram uma correlação entre atividade antimicrobiana e a presença de metabólitos secundários como flavonóides, taninos, terpenos e aldeídos nos frutos verdes.

2.6. Plantas Medicinais e Biocompatibilidade

Depois de comprovada atividade terapêutica da planta, são requeridos estudos complementares que garantam segurança em relação à toxicidade. Estes testes incluem citotoxicidade, hepatotoxicidade e biocompatibilidade. Geralmente, os testes de citotoxicidade e hepatotoxicidade avaliam os efeitos tóxicos *in vitro*, enquanto que os testes de biocompatibilidade avaliam *in vivo*.

Na literatura são conhecidos poucos estudos que correlacionem atividade antimicrobiana das plantas medicinais e biocompatibilidade.

Os estudos *in vivo* permitem uma análise mais detalhada das reações adversas causadas pelas plantas sobre o organismo, uma vez que, as células e os tecidos não existem isoladamente, mas interligados com células e tecidos vizinhos. (SAAD *et al.*, 2006).

Assim sendo, este trabalho, que tem como um dos objetivos testar a biocompatibilidade do extrato aquoso de *P. guineense* Swartz em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, vem adicionar novos conhecimentos a respeito do uso de plantas locais como possíveis agentes terapêuticos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar o estudo fitoquímico de *Psidium guineense* Swartz e determinar sua atividade antimicrobiana e biocompatibilidade com tecido subcutâneo de ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*).

3.2. Objetivos Específicos

- Obter extratos das folhas de *P. guineense* Swartz utilizando éter de petróleo, acetato de etila, metanol e água;
- Determinar o perfil fitoquímico dos extratos;
- Determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* através da determinação da concentração mínima inibitória dos extratos de *P. guineense* Swartz, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (n=8), *Escherichia coli* (n=4), *Enterococcus faecalis* (n=10), *Salmonella enterica* (n=6), *Pseudomonas aeruginosa* (n=10) e *Candida albicans* (n=10);
- Determinar a biocompatibilidade do extrato aquoso das folhas de *P. guineense* Swartz com tecido subcutâneo de ratos (*Rattus norvegicus*, albino Wistar);

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Estudo Fitoquímico

Esta etapa experimental foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da UFPE sob a coordenação da Profa. Dra. Karina Perrelli Randau.

4.1.1. Coleta e identificação do material vegetal

Partes aéreas de *P. guineense* Swartz (araçá) foram coletadas no município de Itamaracá – PE (7°46'05''S; 34°50' 14''W) em novembro de 2007. A identificação do material vegetal foi feita no Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA, pela botânica Olívia Cano. Um espécime deste vegetal encontra-se depositado no Herbário Dárdano de Andrade Lima – IPA sob o número 52.585.

4.1.2. Preparação dos extratos

As folhas de *P. guineense* Swartz foram secas à temperatura ambiente e em seguida trituradas em moinho elétrico. Os extratos das folhas (50 g) de *P. guineense* Swartz foram obtidos por esgotamento com os seguintes solventes em polaridade crescente: éter de petróleo (EEP), acetato de etila (EAcEt), metanol (EM) e água (EA). Cada extrato foi filtrado e os solventes eliminados com o auxílio de evaporador rotatório sob pressão reduzida. Os extratos foram acondicionados em frasco âmbar e mantidos a baixa temperatura, exceto para o extrato aquoso que foi liofilizado (Figura 6). O rendimento para cada extrato foi calculado a partir de 50 g das folhas sendo de 1,3%, 2,3%, 9,8% e 3,7% (p/p) para os extratos éter de petróleo, acetato de etila, metanólico e aquoso respectivamente.

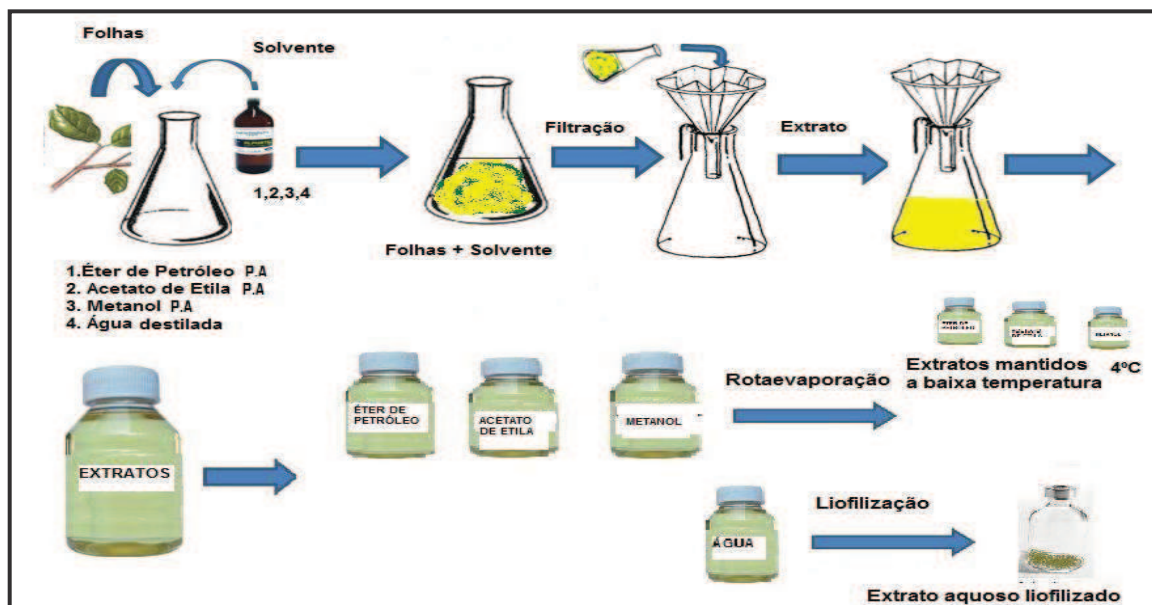


Figura 6. Esquema representando a preparação dos extratos de *P. guineense* Swartz

4.1.3. Determinação do perfil fitoquímico de extratos de *P. guineense* Swartz

Dos extratos foram retirados 15µL e submetidos à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) em placas de gel de sílica (MERK-Germany, 15553), (Figura 7) empregando-se diversos sistemas de solventes: **A-** [EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11: 11: 27 v/v)]; **B-** [Benzeno-EtOAc (97 : 3 v/v)]; **C-** [EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 0,5 : 0,5 : 0,5 v/v)]; **D-** [n-BuOH-Me₂CO-tampão fosfato pH = 5,0 (40 : 50 : 10 v/v)], **E-** [Éter-tolueno-AcOH 10% (50 : 50 : 50 v/v)] (Quadro 1), bem como reveladores específicos para a pesquisa de metabólitos secundários dos extratos das folhas de *P. guineense* Swartz a saber: Alcalóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos, cumarinas, flavonóides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas, taninos hidrolisáveis, mono e sequiterpenóides, triterpenóides e esteróides, iridóides, saponinas, açúcares redutores (RANDAU et al, 2004). A determinação de antraquinonas foi realizada pela metodologia de Bornträger em tubos de ensaio (COSTA, 2002).

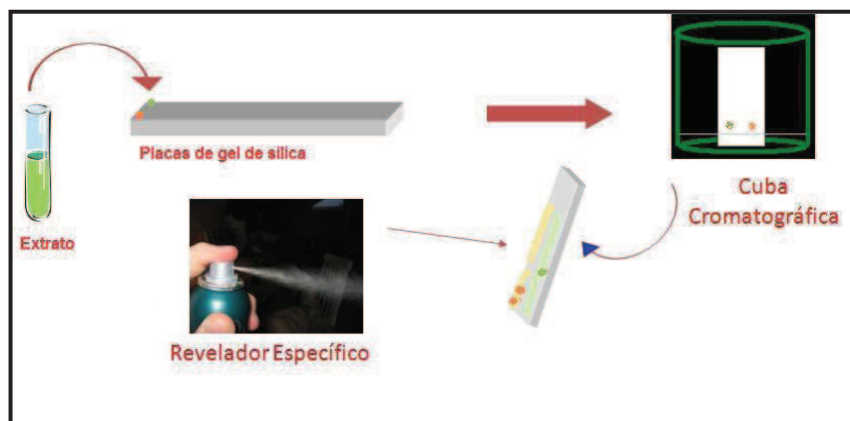


Figura 7. Esquema para pesquisa de metabólitos secundários dos extratos de *P. guineense* Swartz por Cromatografia em Camada Delgada Analítica

Quadro 1 – Sistemas de solventes e reveladores em cromatografia de camada delgada para a caracterização de metabólitos secundários dos extratos de *P. guineense* Swartz

Metabólitos secundários	Fase móvel	Revelador	Referência
Alcalóides	A	Dragendorff	Wagner & Bladt, 1996
Derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	A	2-amino etildifenil borinato	Wagner & Bladt, 1996
Cumarinas	E	2-amino etildifenil borinato	Wagner & Bladt, 1996
Flavonóides	A	2-amino etildifenil borinato	Wagner & Bladt, 1996
Proantocianidinas condensadas e leucoantocinidinas	A	Vanilina clorídrica	Roberts, 1956
Taninos hidrolisáveis	D	2-amino etildifenil borinato Alúmem de ferro	Stiasny, 1912; Xavier, 2002
Triterpenóides e esteróides	C	Liebermann/Burchard	Hashimoto, 1970; Harbone, 1998
Mono e sequeiterpenóides	B	Vanilina sulfúrica ácida	Wagner & Bladt, 1996
Iridóides	A	Vanilina sulfúrica ácida	Wagner & Bladt, 1996
Saponinas	A	Anisalaldeído	Wagner & Bladt, 1996
Acúcares redutores	D	2,3,5 cloreto trifeniltetrazolium	Metz, 1961

4.2. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de *P. guineense* Swartz

Esta etapa experimental foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE sob a coordenação da Prof^a. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

4.2.1. Microrganismos

Neste experimento foram utilizados 48 microrganismos alguns deles obtidos a partir de espécimes de pacientes acometidos por infecções e com um fenótipo de resistência para diversos agentes antimicrobianos: *Staphylococcus aureus* IC 14, IC 15, IC 27, IC 138; IC 247, IC 311, IC 404; *Pseudomonas aeruginosa* IC 01, IC 02, IC 03, IC 05, IC 06, IC 10, IC 12, IC 13, IC 16; *Enterococcus faecalis* IC 068, IC 144, IC 245, IC 259, IC 288, IC 354, IC 671, IC 915, IC 995; *Escherichia coli* IC 18. Outros de diversos sítios e origens como *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* 1 QC, *Salmonella enterica* Rubislaw 3373, Saintpaul 391, Anatum P-58, Anatum 873; *Candida albicans* IC 01, IC 07, IC 09, IC 11, IC 12, IC 16, IC 17, IC 19, IC 25, IC 26 e 6 microrganismos pertencentes à coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e do American Type Culture Collection *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 27212, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028; *Salmonella enterica* UFPEDA 415, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Tabela 2).

Tabela 2 – Origem e perfil de susceptibilidade dos microrganismos utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima

Microrganismos	Origem	Resistência	Sensibilidade
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 068	Urina	CLO; ERI; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 144	Urina	CLO; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 245	Urina	ND	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 295	Urina	ND	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 288	Urina	CLO; GEN; TET; ATM; AMP	TEIC; VAN
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 354	Urina	CLO; ERI; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 671	Urina	CLO; GEN; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 915	Urina	ND	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 995	Urina	CLO; ERI; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 27212	ATCC	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	ATCC	ND	CLO; AMP; CFL; CTX; MER; SZT; AMI; GEN; CIP; TET; IMP; CPM; TOB; NIT; ATM
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 INCQS 71	FIOCRUZ – RJ	ND	CLO; AMP; CFL; CTX; MER; SZT; AMI; GEN; CIP; TET; IMP; CPM; TOB; NIT; ATM
<i>Escherichia coli</i> 1 QC	Queijo Coalho	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> IC 18	Urina	AMP; CFO	CTX
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 404	Secreção da orofaringe	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; ERI; TET	CIP
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	ATCC	ND	NIT; VAN; NET; RIF; AZI; SUT; OFX
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 14	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 15	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 27	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 138	Secreção Vaginal	AMI; GEN	CTX; ERI; CLO
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 247	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 311	Ferida do dedo	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; SZT; ERI; TET; PEN	CIP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 01	Hemocultura	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER	IMP; SZT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 02	Secreção Hepática	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER; SZT	ATM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 03	Secreção traqueal	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER	ATM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 05	Hemocultura	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; ATM; MER; SZT; AMP+SUB	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 06	Secreção traqueal	CIP; GAT; GEN; CFL; CFO; CTX; COM; CLO;	ND

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 10	Secreção abdominal	ATM; MER; SZT; AMP+SUB MAI; CFL; CFO; CTX; CPM; CIP; GEN; TOB; ATM; IMP; MER; SZT	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 12	Urina	AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CIP; GENT; TOB; ATM; IMP; MER; SZT; NIT; NAL; CLO; TET	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 13	Urina	CFL; CFO; CTX; CIP; GEN; TOB; SZT; NIT; NAL; CLO; TET; NOR	MER
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 16	Hemocultura	GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER; SZT; AMP+SUB; ATM	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	ATCC	ND	ND
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	ATCC	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> UFPEDA 415	Coleção de microrganismos	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> Rubislaw 3373	IC	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> Saintpaul 391	IC	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> P-58	IC	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> 873	Isolado do molusco <i>Biomphalaria glabrata</i>	ND	ND
<i>Candida albicans</i> IC 01	Cavidade Oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 07	Cavidade Oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 09	Cavidade Oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 11	Cavidade Oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 12	Cavidade Oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 16	Cavidade Oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 17	Cavidade Oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 19	Cavidade Oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 25	Cavidade Oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 26	Cavidade Oral	ND	Miconazol

AMI: Amicacina 30 µg; AMOX: Amoxicilina 10 µg; AMP: Ampicilina 10 µg; AMP+SUB: Ampicilina/Sulbactam 10 µg/10 µg; ATM: Aztreonam 30 µg; AZI: Azitromicina 15 µg; CFL: Cefalotina 30 µg; CFO: Cefoxitina 30 µg; CIP: Ciprofloxacina 5 µg; CLO: Clorafenicol 30 µg; CPM: Cefepime 30 µg; CTX: Cefotaxima 30 µg; ERI: Eritromicina 15 µg; GAT: Gatifloxacina 10 µg; GEN: Gentamicina 10 µg; NAL: Ácido nalidixico 30 µg; NIT: Nitrofurantoina 30 µg; NOR: Norfloxacina 10 µg; IPM: Imipenem 10 µg; MER: Meropenem 10 µg; TEIC: Teicoplanina 30 µg; TET: Tetraciclina 30 µg; TOB: Tobramicina 10 µg; SZT: Sulfazotrim 25 µg; VAN: Vancomicina 30 µg. ATCC: American Type Culture Collection IC: Isolado Clínico ND: Não determinado

4.2.2 Método para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Numa etapa anterior à determinação da CIM propriamente dita, os extratos secos obtidos com éter de petróleo, acetato de etila e metanol foram solubilizados num sistema composto por dimetilsulfóxido/Tween 80/H₂O (1,5:1,0:17,5) de modo a obter uma concentração final de 2,0 mg/mL. O pó liofilizado do extrato aquoso de *P. guineense* Swartz foi pesado e solubilizado em água destilada e esterilizada de forma a obter uma solução de igual concentração. Todos os extratos foram esterilizados por filtração com filtros de porosidade 0,45µm.

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”. Um volume de 200 µL dos diversos extratos vegetais, foram depositados nas colunas de 1 a 9 da linha A. Os demais orifícios foram preenchidos com 100 µL e caldo Mueller-Hinton para as bactérias e o meio RPMI 1640 para leveduras, ambos duas vezes mais concentrados. Em seguida, uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício da linha A foi transferido para os orifícios da linha B, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para linha C, repetindo-se este procedimento até a linha H. Assim foram obtidas concentrações decrescentes dos extratos (1 mg/mL- linha B; 0,5 mg/mL- linha C; 0,25 mg/mL- linha D, e assim por diante). Os inóculos microbianos padronizados em 10⁸ UFC/mL foram diluídos 1/10 em solução salina esterilizada (0,9%) e desta diluição um volume de 5 µL (10⁴ UFC/mL) foram depositadas em todos os orifícios das linhas A-H. Os orifícios da coluna 11 foi destinado para os testes de controle de experimento, nessa coluna recebeu apenas caldo Mueller-Hinton ou RPMI 1640 para a verificação da esterilidade da placa.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 18 horas para bactérias e 28°C por 24 horas para as leveduras. Decorrido este intervalo de tempo foi adicionado a cada um dos orifícios 20µL de uma solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio a 0,5% e as microplacas foram novamente incubadas por mais três horas. Após esta última incubação a presença de uma coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do extrato, enquanto a ausência da coloração vermelha foi considerada prova positiva da ação inibitória do extrato.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do extrato em mg/mL capaz de impedir o crescimento microbiano, ou seja, o aparecimento da coloração vermelha (Figura 8).

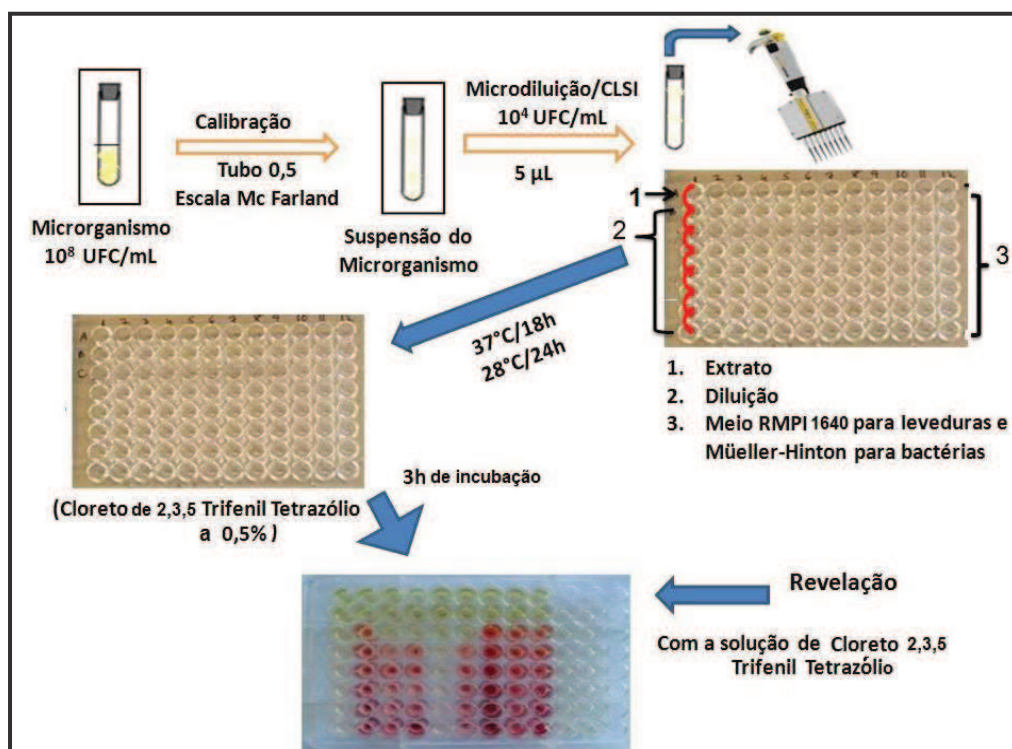


Figura 8 – Esquema para determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos de *P. guineense* Swartz. (Érika R. S. Araújo, 2008)

4.3 Determinação da biocompatibilidade do extrato aquoso de *P. guineense* Swartz

A etapa experimental foi realizada no Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos sob supervisão da Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva.

4.3.1 Estudo Histológico

4.3.2 Animais

O extrato aquoso de *P. guineense* foi o escolhido para dar o prosseguimento à pesquisa sobre biocompatibilidade com o tecido conjuntivo de ratos albinos. Esta escolha deve-se ao fato deste extrato apresentar atividade antimicrobiana principalmente sobre *S. aureus*. Esta atividade não foi significativamente diferente dos outros extratos, direcionando nossa escolha para um extrato cujo veículo é inócuo aos tecidos.

Para realização do teste de biocompatibilidade do extrato aquoso de *P. guineense* com tecido conjuntivo subcutâneo, foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus*, albino Wistar) machos, com 60 dias de vida, pesando em média de 300g, procedentes do biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, em número de 6 por gaiola, à temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob condições padrão de iluminação (ciclo claro-escuro de 12/12 horas), alimentados com dieta sólida (ração Labina da AgribRANDS Purina do Brasil Ltda.) e água *ad libitum*. Os procedimentos adotados no manejo dos animais foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo “National Institute Guide for Care and Use of Laboratory Animals” e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE, nº 23076.00669/2008-89.

4.3.3 Metodologia

Os animais foram divididos em quatro grupos, cada grupo com seis animais (n=24): grupo I (grupo eutanasiado após sete dias da injeção do extrato), grupo II (grupo eutanasiado

após quatorze dias da injeção do extrato), grupo III (grupo eutanasiado após vinte e oito dias da injeção do extrato) e grupo IV (grupo eutanasiado após trinta e dois dias da injeção do extrato).

A partir da linha média, equidistante da inserção da cauda e da cabeça do animal, foram administradas duas injeções de 1 mL no tecido subcutâneo do animal. A primeira no lado direito (o extrato aquoso de *P. guineense* Swartz na concentração inibitória mínima - 0,4 mg/mL, equivalente a dose de 1,3 mg/kg) e a segunda no lado esquerdo (solução fisiológica) (Figura 9).

Após 7, 14, 28 e 32 dias desta administração, cada grupo de animais foi eutanasiado por dose excessiva de anestésicos cloridrato de quetamina à 5% (Vetanarcol, König) e cloridrato de xilazina à 2% (Kensol, König).

Os animais foram tricotomizados e o tecido conjuntivo juntamente com a área circunjacente à injeção do extrato foram obtidos. O material recolhido foi imediatamente imerso em solução fisiológica e cortes transversais foram realizados de modo a facilitar a penetração da substância fixadora de Boiun (750 mL de solução saturada de ácido pícrico, 250 mL de formol a 40%, ácido acético glacial 50 mL). Em seguida foram realizados vários procedimentos histológicos para observação em microscopia óptica (XAVIER *et al*, 1973; COUTO *et al*, 2000).

Cortes laterais foram obtidos com micrótomo ERMA (Tokyo-Japan), utilizando navalha ajustada para 6µm cada. Os cortes foram estirados em banho-maria histológico, dispostos em lâminas untadas com albumina de Mayer, colocadas em estufas por aproximadamente 30 min a 37°C para secagem do material. Os espécimes receberam o tratamento de coloração pela hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram montadas em Entellan e finalizadas para observação e fotomicrografadas em Microscópio Óptico Olympus Modelo BX50, Video Câmera Samsung Modelo SHC 410NAD, Software: TV Tuner Application.

Para análise quantitativa de células fibroblásticas, utilizou-se o sistema Mesurim Pro. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão da média. As diferenças entre os grupos foram analisadas através da Análise de Variância (ANOVA).

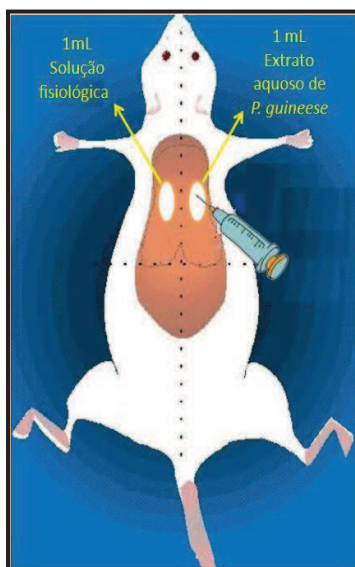


Figura 9. Esquema realizado para o ensaio de biocompatibilidade do extrato aquoso de *P. guineense* Swartz com o tecido subcutâneo de ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*). (Érika R. S. Araújo, 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise Fitoquímica das folhas de *P. guineense* Swartz

Após solubilização num sistema composto por DMSO/Tween80/H₂O (1,5:1,0:17,5), os extratos das folhas de *P. guineense* Swartz apresentaram diversas colorações: o extrato éter de petróleo coloração amarelada, acetato de etila, verde escuro; metanol; verde claro e o extrato aquoso submetido à liofilização resultando em um pó fino de coloração marrom.

A análise fitoquímica dos extratos de *P. guineense* Swartz mostrou a presença de mono e sesquiterpenos nos extratos éter de petróleo e acetato de etila; flavonóides nos extratos acetato, metanol e água; triterpenos e esteróides no extrato éter de petróleo; açúcares nos extratos metanólico e aquoso; proantocianidinas e leucoantocianidinas condensadas no metanólico e aquoso; e taninos hidrolisáveis no extrato aquoso. Não foi observada a presença de alcalóides, saponinas, iridóides, cumarinas, derivados cinâmicos, fenilpropanoglicosídeos e antraquinonas (Tabela 3; Figura 10).

Tabela 3. Pesquisa dos metabólitos secundários nos extratos de *P. guineense* Swartz

Metabólitos secundários	Éter de Petróleo	Acetato de Etila	Metanólico	Aquoso
Alcalóides	(-)	(-)	(-)	(-)
Antraquinonas	(-)	(-)	(-)	(-)
Derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	(-)	(-)	(-)	(-)
Cumarinas	(-)	(-)	(-)	(-)
Flavonóides	(-)	(++)	(+++)	(+++)
Proantocianidinas condensadas e leucoantocinidinas	(-)	(-)	(++)	(+)
Taninos hidrolisáveis	(-)	(-)	(-)	(+)
Triterpenóides e esteróides	(+)	(-)	(-)	(-)
Mono e sequiterpenóides	(+++)	(++)	(-)	(-)
Iridóides	(-)	(-)	(-)	(-)
Saponinas	(-)	(-)	(-)	(-)
Acúcares redutores	(-)	(-)	(+)	(+)

(-) Ausência de bandas do metabólito no extrato de *P. guineense* Swartz; (+) Presença de uma banda do metabólito no extrato de *P. guineense* Swartz; (++) Presença de duas a cinco bandas do metabólito no extrato de *P. guineense* Swartz; (+++) Presença de mais de cinco bandas do metabólito no extrato de *P. guineense* Swartz.

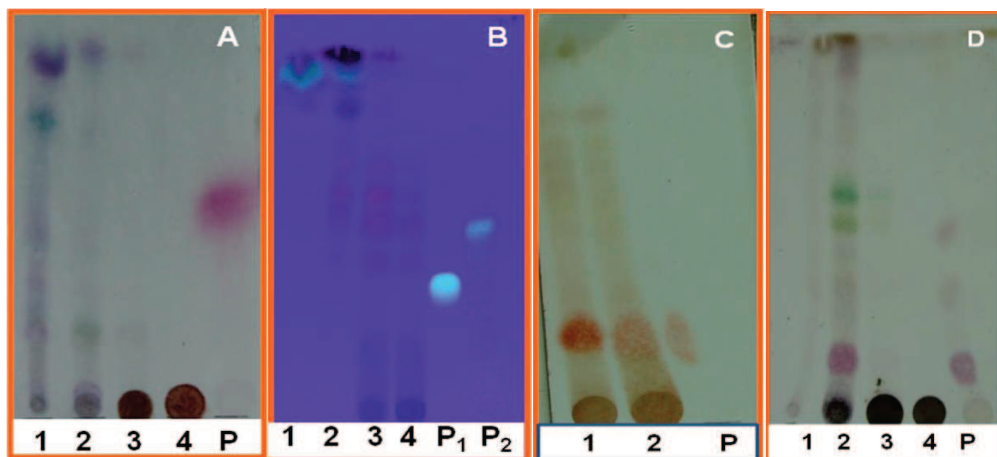


Figura 10. Metabólitos secundários presentes nas folhas de *P. guineense* Swartz por CCDA. **A. Monoterpenos e sesquiterpenos.** (1) Extrato éter de petróleo; (2) Extrato acetato de etila; (3) Extrato metanólico; (4) Extrato aquoso; (P) Padrão Timol. **B. Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas.** (1) Extrato éter de petróleo; (2) Extrato acetato de etila; (3) Extrato metanólico; Extrato aquoso. (P₁) Padrão Verbacosídeo; (P₂) Padrão Ácido Clorogênico. **C. Açúcares Redutores.** (1) Extrato metanólico; (2) Extrato aquoso; (P) Padrão Glicose. **D. Triterpenos e Esteróides.** (1) Extrato acetato de etila; (2) Extrato éter de petróleo; (3) Extrato metanólico; (4) Extrato aquoso; (P) Padrão β -sitosterol. **Fotos:** (Karina P. Randau, 2008; Érika R. S. de Araújo, 2008).

5.2. Atividade Antimicrobiana de *P. guineense* Swartz

A análise da atividade antimicrobiana dos extratos éter de petróleo (EEP), acetato de etila (EAcEt), metanólico (EM) e aquoso (EAQ) frente aos 48 microrganismos testados estão apresentados na tabela 4. Todos os extratos de *P. guineense* Swartz mostraram-se ativos frente aos microrganismos ensaiados, cujas concentrações inibitórias mínimas variaram de 0,015 a 2,00 mg/mL.

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos diferentes extratos de *P. guineense* Swartz frente às cepas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Candida albicans*

Microrganismo	Extrato	CIM	CIM ₁₀₀ (mg/mL)	CIMMG _(mg/mL)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Aquoso	1	1	1
	Metanólico	0,5-1,0	0,5	0,92
	Acetato de Etila	0,0-1,0	0,5	0,92
	Éter de Petróleo	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aquoso	0,015-0,5	0,015	0,16
	Metanólico	0,015-1	0,015	0,21
	Acetato de Etila	0,5-1,0	0,5	0,35
	Éter de Petróleo	0,015-0,5	0,25	0,25
<i>Escherichia coli</i>	Aquoso	2	2	2
	Metanólico	2	2	2
	Acetato de Etila	2	2	2
	Éter de Petróleo	1-2	1	1,41
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aquoso	2	2	2
	Metanólico	1	1	1
	Acetato de Etila	0,5-1	0,5	0,93
	Éter de Petróleo	1	1	1
<i>Salmonella enterica</i>	Aquoso	2	2	2
	Metanólico	2	2	2
	Acetato de Etila	2	2	2
	Éter de Petróleo	1-2	1	1,12
<i>Candida albicans</i>	Aquoso	1-2	1	1,83
	Metanólico	2	2	2
	Acetato de Etila	2	2	2
	Éter de Petróleo	2	2	2

(CIM) Concentrações Inibitórias Mínimas, (CIM₁₀₀) Concentração Mínima capaz de inibir 100% do crescimento microbiano, (CIMMG) Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima de todas as amostras de cada espécie.

Todos os extratos de *P. guineense* Swartz mostraram sobre bacilos Gram-negativos valores de CIM igual ou superior a 1mg/mL.

O extrato metanólico, acetato de etila e éter de petróleo mostraram-se mais ativos frente às cepas de *Pseudomonas aeruginosa* quando comparados ao extrato aquoso. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Não houve diferença significativa entre os valores obtidos para os diferentes extratos quando avaliados contra 10 amostras de *Candida albicans*. A CIM foi em média 2mg/mL para estas leveduras.

Após analisar os resultados obtidos dos extratos de *P. guineense* Swartz frente à enterobactérias do gênero *Samonela*, foi observado que o extrato éter de petróleo foi o mais eficaz na inibição desses microorganismos. Estes resultados quando comparados aos obtidos para os extratos de maior polaridade mostrou ser significativamente diferente ($p < 0,01$). Entretanto, não houve diferença significativa da atividade desses extratos frente a amostras de *Escherichia coli*.

De todos os microrganismos, as cepas de *Staphylococcus aureus* revelaram ser as mais sensíveis cuja média geométrica da concentração inibitória mínima foi de 0,16; 0,21; 0,35 e 0,25 para o extrato aquoso, metanólico, acetato de etila e éter de petróleo respectivamente. Quando estes extratos foram comparados entre si foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

Estes resultados são importantes, uma vez que infecções estafilocócicas têm uma alta morbidade/mortalidade. Além disso, os microrganismos estudados apresentam resistência a diversos agentes antimicrobianos, como reportados na tabela 2.

Oliveira et al., (2001) em um estudo sobre o perfil de cepas de *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados em 4 hospitais públicos de São Paulo, apontam a crescente resistência das cepas desse microrganismo aos antimicrobianos com atividade antiestafilocócica atualmente disponíveis, como aminoglicosídeos, cloranfenicol, lincosamídeos, macrolídeos, quinolonas e tetraciclina.

A presença de taninos e flavonóides nos extratos metanólico e aquoso de *P. guineense* pode estar relacionada a sua atividade antimicrobiana verificada principalmente sobre as cepas de *S. aureus*.

González et. al. (2005), avaliaram microbiologicamente as frações obtidas com éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e metanol oriundos do extrato etanólico da casca, folhas e polpa dos frutos de *P. guineense* Swartz. Estas frações mostraram-se ativas frente às cepas *Streptococcus mutans* ATCC3108 e de uma amostra de *Streptococcus viridans* isolados

da clínica médica. Este autor associa a atividade antimicrobiana à presença de taninos e flavonóides encontrados no extrato etanólico das folhas de *P. guineense* Swartz.

Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico (BRUNETON, 1991; MELLO & SANTOS, 2002). Os flavonóides agem formando complexos com as células bacterianas (STERN *et al.*, 1996).

O mecanismo de ação dos taninos pode ser explicado por três hipóteses. A primeira implica que os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou complexam com os substratos dessas enzimas; a segunda relaciona a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo; e a terceira fundamenta-se na formação de um complexo dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991; MELLO & SANTOS, 2002).

Muitos flavonóides isolados de diferentes plantas apresentam *in vitro* atividade antimicrobiana (HARBORNE *et al.*, 1976; JENSEN *et al.*, 1998; ALCERITO *et al.*, 2001; PENNA *et al.*, 2001; PANIZZI *et al.*, 2002). A atividade antimicrobiana dos flavonóides está provavelmente relacionada à capacidade deste composto de se complexar com proteínas das células bacterianas formando complexos irreversíveis com ácidos aminonucleofílicos, o que, freqüentemente, leva à inativação da proteína e perda da função (STERN *et al.*, 1996). Muitos flavonóides lipofílicos podem ainda romper a parede bacteriana (TSUCHIYA *et al.*, 1996).

A discreta atividade inibitória dos extratos brutos de *P. guineense* Swartz, sobre as bactérias Gram-negativas e leveduras *Candida albicans* obtidos no presente estudo está provavelmente relacionada às diferenças estruturais que estes microrganismos apresentam em relação às bactérias Gram-positivas, como por exemplo, a presença de uma membrana externa sobre o peptidoglicano, de uma cápsula, de porinas, e na própria constituição da parede celular (KONEMAN *et al.*, 1999).

As bactérias Gram-negativas contêm uma maior porcentagem de lipídeos (11-22%) que as bactérias Gram-positivas (1-4%). Essa diferença está relacionada com a permeabilidade dos cocos, que com menos lipídeos são conseqüentemente mais permeáveis, permitindo a passagem de vários tipos de moléculas para seu interior (SHANAB, 2004).

Os resultados encontrados estão de acordo com o trabalho de Abu-Shanab *et al.* (2004), que relatam a resistência das bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa* a diversos compostos de origem natural. A resistência dos bacilos Gram-negativos a estes

compostos pode está ligada a concentrações muito baixas de substâncias ativas presentes nos extratos ou bloqueio na passagem destas para o interior da célula bacteriana.

5.3. Biocompatibilidade do extrato aquoso de *P. guineense* Swartz com tecido subcutâneo de ratos albinos (Wistar)

O tecido subcutâneo foi analisado microscopicamente com o objetivo de detectar possíveis alterações morfológicas das células e dos seus elementos estruturais, bem como do tecido como um todo. Também foi realizado o acompanhamento clínico dos animais ao longo dos dias após a injeção dos extratos.

Não foram evidenciadas quaisquer alterações morfológicas em nenhum dos grupos experimentais quando estes foram comparados ao controle. Foram observadas fibras colágenas coradas pela eosina, dispostas em diversos sentidos e numerosos fibroblastos de limites citoplasmáticos imprecisos, cujos núcleos se destacam (Figuras 11 e 12). Os animais não apresentaram nenhuma reação alérgica ou inflamatória do local da injeção do extrato.

Após a análise ao microscópio de luz, foi realizada a contagem de fibroblastos, cujos resultados estão descritos na tabela 5. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e controle em todos os tempos estudados.

Tabela 5. Ocorrência de fibroblastos no tecido subcutâneo de ratos albinos após o estudo da biocompatibilidade do extrato aquoso de *P. guineense* Swartz

Grupos	T 07 Dias	T 14 Dias	T 28 Dias	T 32 Dias
Controle- soro fisiológico	23,50 ±4,80	23,66±4,45	26±3,10	27,66±5,90
Tratado- extrato aquoso de <i>P. guineense</i> (dose 1,3mg/mL)	23,66±5,80	24,83±4,44	27,66±3,72	27,33±4,32

Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais

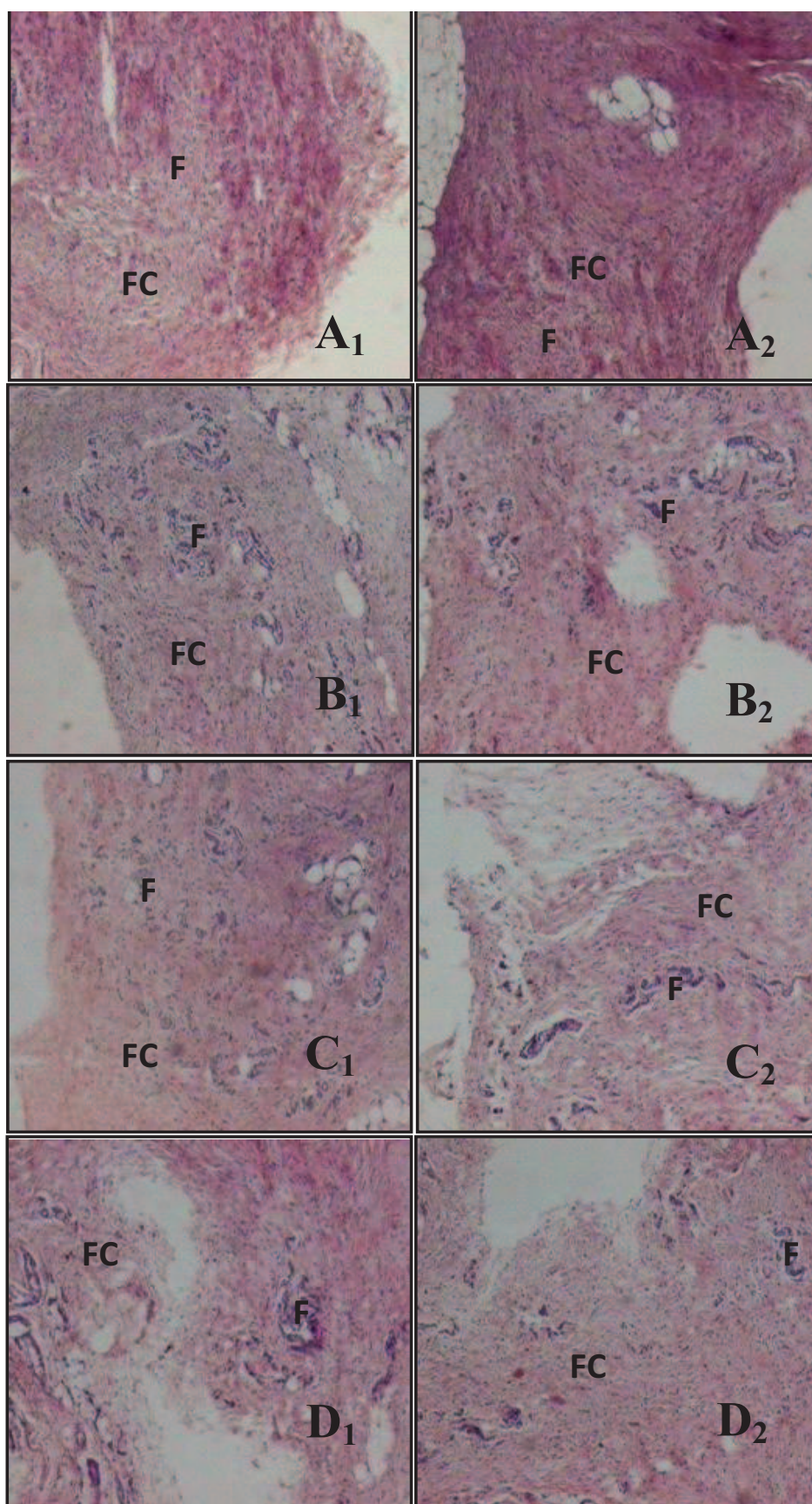


Figura 11. Fotomicrografias do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos albinos. (1) Grupo Controle e (2) Grupo Tratado, após 7(A), 14(B), 28(C) e 32(D) dias da injeção com o extrato aquoso de *P. guineense*. Observar (F) Fibroblastos e (FC) Fibras Colágenas. Aumento (40x) Coloração (HE). (Érika R. S. de Araújo, 2009).

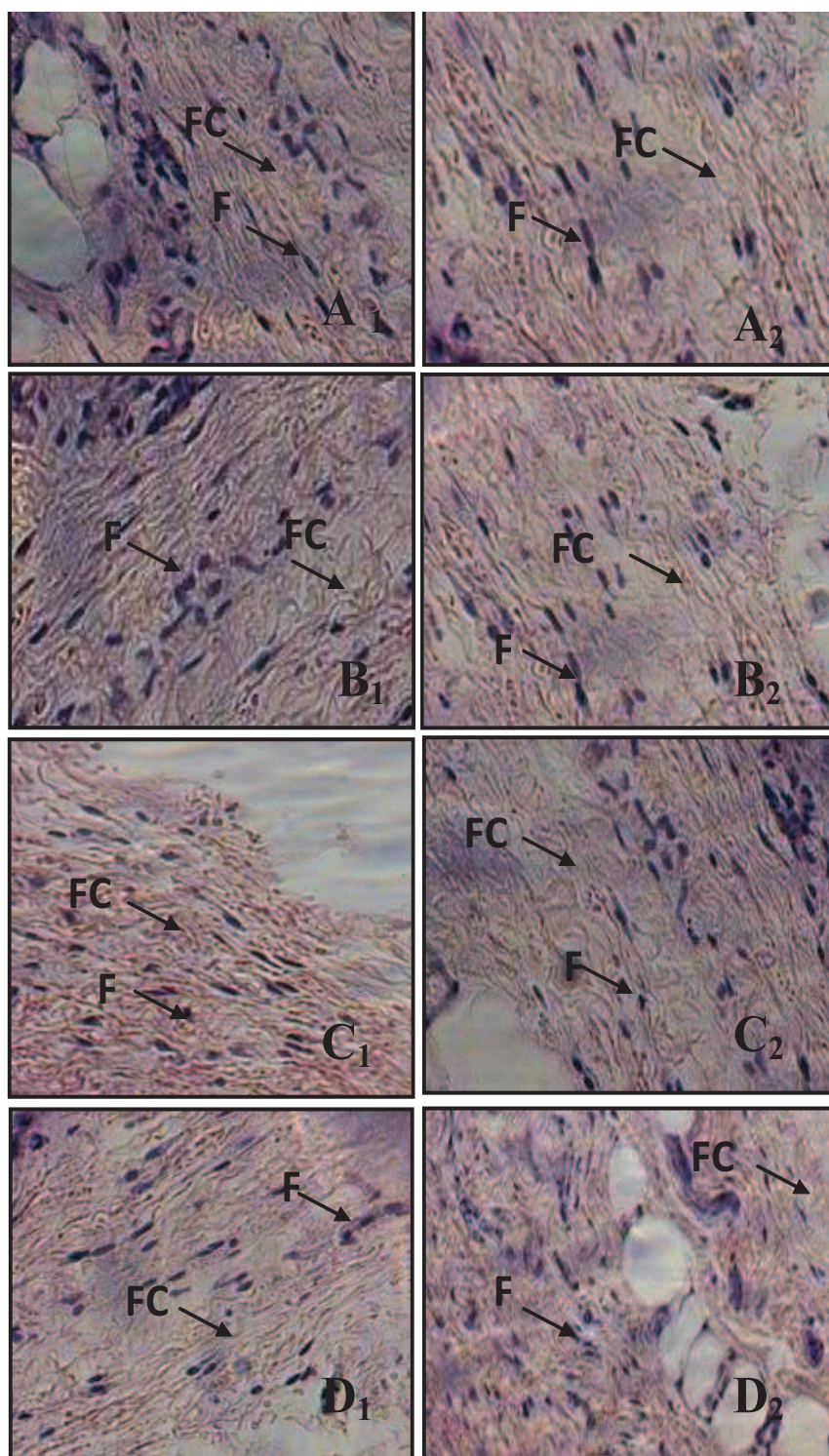


Figura 12. Fotomicrografias do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos albinos. (1) Grupo Controle e (2) Grupo Tratado, após 7(A), 14(B), 28(C) e 32(D) dias da injeção com o extrato aquoso de *P. guineense*. Observar (F) Fibroblastos e (FC) Fibras Colágenas. Aumento (200x) Coloração (HE). (Érika R. S. de Araújo, 2009).

O recente crescimento no interesse da fitoterapia alternativa para o tratamento e prevenção de várias doenças, acarreta uma ampla preocupação a respeito da segurança do uso de plantas medicinais. Existem inúmeros cuidados a respeito do uso dos fitoterápicos e sua habilidade de produzir efeito tóxico e reações adversas. A toxicidade acidental ocorre principalmente devido à crença de que remédios à base de plantas são isentos de reações adversas, sendo vistos como “naturais” (SAAD, 2006).

Dessa maneira, fazem-se necessários estudos que possam garantir o efeito não tóxico desses medicamentos. Devido à atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato aquoso das folhas de *P. guineense* Swartz foi realizada a biocompatibilidade com tecido subcutâneo de ratos albinos (wistar).

A modulação do processo inflamatório com formação e amadurecimento de fibroblastos, responsável pela produção de matriz de colágeno e pela formação do tecido de granulação, quando significantes, são características de indução de atividade de cicatrização. (ROCHA, GURJÃO & BRITO JUNIOR, 2005).

As reações de células granulares caracterizam-se por coleções de histiócitos com citoplasma eosinofílico granular no sítio do trauma operatório. Essas reações histiocíticas têm particular semelhança com tumores de células granulares, mas geralmente podem ser diferenciadas pelo fato de que os núcleos nestas reações são pequenos e os grânulos são grandes (MACEDO NETO, 2000). Além disso, as células geralmente cercam nódulos de material inerte (corpos estranhos), similares ao material granular citoplasmático (SOBEL, AVRIN & SCHWARZ, 1974).

O reparo tecidual envolve regeneração e cicatrização, chamada também de fibroplasia ou fibrose, caracterizadas pela migração, proliferação e diferenciação celular. O controle da proliferação celular é feito por fatores solúveis no microambiente, as citocinas, que podem estimular ou inibir este processo, (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000).

O aumento do número de células fibroblásticas e da epitelização, sugere atividade cicatrizante (MARTINS & *et al*, 2006).

A presença de taninos, flavonóides, açúcar, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas, no extrato aquoso das folhas de *P. guineense* Swartz não causaram no tecido conjuntivo analisado quaisquer alterações morfológicas, sendo isto um indicativo da compatibilidade do extrato com o tecido animal.

É importante destacar que dos pedidos de patentes das plantas brasileiras da Amazônia observados por Moreira *et al.* (2006), 89,3% foram pedidos para aplicações terapêuticas, principalmente para uso dermatológico, o que só aumenta a relevância de estudos que avaliem a biocompatibilidade desses medicamentos com o tecido animal.

Em virtude da atividade antimicrobiana observada do extrato aquoso de *P. guineense* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (sete das oito cepas são resistentes a diversos antimicrobianos), pode-se pensar na utilização desta planta na formulação de um medicamento, uma vez que este microrganismo está entre os mais envolvidos em infecções hospitalares principalmente os resistentes a meticilina (WALDVOGEL 2000; LOWY 2003, DE LANCASTRE *et al.*, 2007; RATTI, 2009).

Desta posição, a busca de novos compostos vegetais com ação antimicrobiana se apresenta como um modelo experimental, ecologicamente correto, para se produzir substâncias que sejam eficazes e menos agressivas aos homens, contribuindo, assim, com a melhoria da qualidade de vida.

6. CONCLUSÕES

A presença de metabólitos secundários, como taninos e flavonóides, nos extratos de *P. guineense* Swartz parece estar relacionada com a atividade antimicrobiana verificada contra os microrganismos testados, uma vez que esses metabólitos agem precipitando proteínas e formando complexos na célula bacteriana.

Dentre os microrganismos estudados, o que apresentou maior susceptibilidade aos extratos de *P. guineense* Swartz foi *Staphylococcus aureus*.

Em que se concerne aos estudos *in vivo*, não houve alterações morfológicas nem celulares no tecido analisado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SHANAB, B. et al. Antibacterial activities of some lant extracts utilized in popular medicine in alestine. **Turkish Journal of Biology**, v. 28, p. 99- 102, 2004.

AKERELE O. Tradicional Medicine Programme. Tradicional herbal medicines around the glob: modern perspectives. **Swiss Pharma**. 13:57-62. 1991.

ALCERITO, T.; BARBO, F.E.; NEGRI, G.; SANTOS, D.Y.A.C.; MEDA, C.L.; YOUNG, M.C.M.; CHÁVEZ, D.; BLATT, C.T.T. - Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, 30: 677-83, 2001.

ALONSO, J.R. **Tratado de Fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis ediciones SRL, 1039 p. 1998.

AMORIM, J. A. **Fitoterapia popular e saúde da comunidade: diagnóstico para proposta de integração nos serviços de saúde em Campina Grande, Paraíba, Brasil**. 316 f. Tese (Doutorado em Prática de Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo. 1999.

AMOROZO, M.C.M. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP. p. 47-68.1996.

ANDRADE, L.D. **Estudos fitogeográficos de Pernambuco**. Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco, 50 p. (Publicação, n.2). 1957

ANJANEYULU, M.; CHOPRA, K. Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Carlton, v. 31, n. 4, p. 244- 8, 2004.

APEL, M. A., LIMBERGER, R. P., SOBRAL, M., et al. Investigação da atividade antimicrobiana de espécies da família Myrtaceae. **XV Simpósio De Plantas Medicinais Do Brasil**. Águas de Lindóia, São Paulo, SP. p.51.1998.

APEL, M. A.; LIMA, M. E.; SOUZA, A.; et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest (São Paulo – Brasil). **Pharmacology online** 3:376-383, 2006.

ARAÚJO, A.A. **Medicina rústica**. 3 ed. São Paulo: Brasiliense; 1979.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias Aukre e Pykanu – sudeste do Pará. **Revista Brasileira de farmacognosia**, São Paulo, v. 13, supl., p. 47-49, 2003.

BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, *et al.* **Sistemática de angiospermas do Brasil**. v.2. Editora UFV, Viçosa. 1984.

BARROSO, G.M.; PERÓN, V. Myrtaceae. *In* Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, RJ. **Aspectos florísticos das espécies vasculares**. (M.P.M. Lima & R.R. Guedes-Bruni, eds.). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v.1, p.261-302. 1994.

BENSOUSSAN A.; MYERS, S. P.; CALTON A. L. Risk associated with the practice of traditional Chinese Medicine: an Australian study. **Archives of Farm Medicine**, Chicago, v. 9, p. 1071-1078, Nov/Dec, 2000.

BITTENCOURT, S. C.; CAPONI, S.; FALKENBERG, M. B. O uso das plantas medicinais sob prescrição médica: pontos de diálogo e controvérsia com o uso popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, supl., p. 89-91, 2002.

BORN, G. C. C. **Plantas Medicinais da Mata Atlântica (Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil):extrativismo e sustentabilidade**. 289 f. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo. 2000.

BRANDÃO, M. G. L. A participação do laboratório farmacognosia da UFMG no aprimoramento dos produtos fitoterápicos em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 201-210, 1996.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDIA, J. P.; MACEDO, J. F. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte:EPAMIG. 528p. 2002.

BRIGGS, B.G., JOHNSON, L.A.S. Evolution in the Myrtaceae - Evidence from inflorescence structure. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales** 102(4): 160-250. 1979.

BRUNETON, J.; **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**, Ed. Acribia,SA: Espanha, 1991.

CAETANO, N. N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R *et al.* Determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, supl., p. 132-135, 2002.

CAETANO, N. N.; FONTE, J. R.; BORSATO, A. V. Sistemas de produção de plantas medicinais na região metropolitana de Curitiba. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, supl., p. 74-77, 2003.

CALIXTO J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p 318- 334; 2001.

CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A.; SANTANA, E. W. P. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 541-544, ago. 2004.

CHAVARRÍA F, MASÍS A, ESPINOZA R, GUADAMUZ A, PÉREZ D. **Species de *Psidium guineense* (Myrtaceae)**. [serie en internet]. [citado 26 Sep 1998]. Disponível em: <http://www.acguanacaste.ac.cr>

CLSI (NCCLS). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. v.2.

COSTA, A. F.S. **Tecnologias para produção de goiaba**. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência técnica e extensão Rural. Vitória, ES. 2003

COUTO, G. B. L.; XIMENES, E.; SANTANA, *et al.* Biocompatibilidade do Extrato Hidroalcoólico da *Lippia sidoides* Cham (*verbenaceae*). **Revista do Conselho Regional de Odontologia de Pernambuco**, Pernambuco, v. 3, n. 2, p. 83-90, 2000.

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

CRONQUIST, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York Botanical Garden, Columbia University Press, New York. Pp. 639-642.

DE LENCASTRE H, OLIVEIRA D, TOMASZ A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. **Current Opinion of Microbiology**. 2007; 10(5):428-35.

DEMATTE, M.E.S.P. **Princípios de paisagismo**. Jaboticabal: Funep, 1997. 104p.

ELIZABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. UFSC. p. 87-99.2001.

FERRO, V. O. Produtos naturais e o farmacêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 2/4, p. 102-105, 1987/1989.

FONTE, N.N. **A complexidade das plantas medicinais: algumas questões atuais de sua produção e comercialização**. Curitiba: 183 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 2004.

GONZÁLEZ, A M N., GONZÁLEZ, M B R., PINTO, N L S. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. **Revista Cubana Plantas Medicinales**,10(3-4); 2005.

GUILHERME, F.A.G., MORELLATO, L.P.C. & ASSIS, M.A. Horizontal and vertical tree community structure in a lowland Atlantic rain forest, Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** 27:725-737. 2004.

HAIDA, K. S., PARZIANELLO, L., WERNER, S., GARCIA, D. R., INÁCIO, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos Ciência Saúde Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 3, p. 185-192, set./dez. 2007.

HARBORNE J.B. **Phytochemical Methods**. Third ed. Chapman & Hall. London. 1998.

HARBORNE, J.B.; INGHAM, J.L.; KING, L.; PAYANE, M. - The isopentenyl isoflavone luteone as a pre-infectional antifungal agent in the genus *Lupinus*. **Phytochemistry**, 15:1485-7, 1976.

HASHIMOTO, Y. Diferenciação de esteróides e triterpenóides pela reação corada. **Simpósio sobre Produtos Naturais da América Tropical**. Rio de Janeiro – GB, p.95-96, 1970.

HOSTTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos. Universidade Federal de São Carlos, 2003.

JAIARJ, P.; KHOOHASWAN, P.; WONGKRAJANG, Y, *et al.* Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 67, p. 203-12, 1999.

JENSEN, P. R.; JENJINS, K. M.; PORTER, D.; FENICAL, W. - Evidence that a new antibiotic flavone glycoside chemically defends the sea grass *Thalassia testudinum* against zoosporic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 1490-6, 1998.

KATAOKA, V.M.F.; MELO, A.M.M.F.; EBERHARDT, G.N, *et al.* Avaliação da composição química e atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das cascas, dos frutos e das folhas de *Campomanesia adamantium*. **IX Simpósio Nacional Cerrado, II Simpósio Internacional de Savanas Tropicais**. ParlaMundi, Brasília, DF. 2008.

KONEMAN EW, ALLEN SE, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PD, *et al.* **Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color**. 5. ed. Buenos Ayres: Panamericana. 1999.

KOROKOLVAS , A. A riqueza potencial de nossa flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 1, p. 1-7, Jan/Jun, 1996.

LANDRUM L R; CLARK W. D., SHARP W. P., *et al.* Hybridization between *Psidium guajava* L. and *P. guineense* Sw. (MYRTACEAE). **Economic Botany** 49(2):153-161. 1995.

LANDRUM, L.R. & KAWASAKI, M.L.. The genera of Myrtaceae in Brazil. An illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia** 49:508-536. 1997.

LAPCIK, O., KLEJDUS, B., KOKOSKA, L., *et al.* Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and *Psidium* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 33, 983-992, 2005.

LIMBERGER, R.P., APEL, M.A., SOBRAL, M., *et al.* Investigação da atividade antimicrobiana do óleo volátil de espécies da família Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, 79:49-52, 1998.

LOZOYA, X.; REYES-MORALES, H.; CHÁVEZ-SOTO, *et al.* Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava folia* in the treatment of acute diarrheic disease. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 83, p. 19-24, 2002.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**. 111, 1265–1273. 2003

LUTTERODT, D.G., MALEQUE, A. Effects on mice locomotor activity of a narcotic-like principle from *Psidium guajava* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, 24:219-231, 1988.

MACEDO NETO, A.V. & *et al.* Reação granulomatosa do tipo corpo estranho simulando tumor de parede torácica em cicatriz de toracotomia prévia. **Journal of Pneumology**, 26(3):139 141, mai-jun, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, *et al.* **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Química Nova, São Paulo, v. 25. n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGINA, M.D.A.; GILIOLI, A.; DALMARCO, *et al.* Atividade antimicrobiana de três espécies de *Eugenia*. **XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQsul)**. 2008.

MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Letters**, Limerick, p. 1-7, 2005.

MATTOS, P.P; SALIS, S.M. Crescimento de plantas jovens de duas fruteiras nativas da sub-região da Nhecolândia, Pantanal Mato-Grossense, Corumbá, MS. CONGRESSO NACIONAL DE BOTANICA, 44. São Luís. **Resumos. São Luís: Universidade Federal do Maranhão / Sociedade Botânica do Brasil**, 1993. v.2.p.370. 1993.

MARINHO, V.M.C. **Como as empresas brasileiras de cosméticos estão utilizando o conhecimento tradicional e as plantas medicinais**. En: XXVI RESEM – Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. Instituto de Química. Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro, Brasil. 2004.

MARINHO, V.M.C; SEIDL, P. R.; LONGO, W. P. The biological diversity - a potential source of competitive advantage for brazilian pharmaceutical industry. **Espacios**, v.29, no.1, p.49-67. 2008.

MARQUES, M. B. **Patentes farmacêuticas e acessibilidade a medicamentos no Brasil.** História, Ciências, Saúde-Manguinhos, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p.7-21, 2000.

MARTIN, M. J.; LA-CASA, C.; ALARCON-DE-LA-LASTRA, C.; *et al.* Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 53, n. 1/2, p. 82-8, 1998.

MARTINS, N.L.P. & *et al.* Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu): estudo controlado em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, 21(supl.3): 66-75, 2006.

MELLO, C. P.; SANTOS, S.C. Taninos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Organizadopor Cláudia Maria Oliveira Simões *et al.* 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universitária / UFRGS /Ed. da UFSC, 2002. 950 p.

METZ, H. Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations **Naturwissenschaften**, n.48, p.569-570, 1961.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos**, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília 148 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde), 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE. **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos: versão sistematizada.** Brasília, DF, 2002b. 31p. Documento não publicado.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. **Seminário Nacional de Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Assistência Farmacêutica: preparatório à conferência nacional de medicamentos e assistência farmacêutica.** Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 11 p. Relatório Técnico.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA EXECUTIVA. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC).** Brasília, 2006. 49p. Documento não publicado.

MORALES, M. A.; LOZOYA, X. Calcium-antagonist effects of quercetin on aortic smooth-muscle. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 60, n. 4, p. 313-7,1994.

MOREIRA, A. C.; MÜLLER, A. C. A.; PEREIRA, JR. N.; *et al.* Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: policy, law and statistics. **World Patent Information**. 28: 34-42. 2006

NADERI, G. A.; ASGARY, S.; SARRAF-ZADEGAN, N.; SHIRVANY, H. Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Hingham, v. 246, n. 1/2, p. 193-6, 2003

NEWALL, C.A., ANDERSON, L.A., PHILLIPSON, J.D. Herbal medicines: a guide for health-care professionals. London: **Pharmaceutical Press**, 296p. 1996.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1991 – 2002. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 66, p. 1022, 2003.

OGAVA, S. E. N.; PINTO, M. T. C.; KIKUCHI, *et al.* Implantação do programa de fitoterapia “Verde Vida” na Secretaria de Saúde de Maringá (2000-2003). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, supl., p. 58-62, 2003.

O’HARA, M. A.; KIEFER, D.; FARREL, K.; *et al.* A review of 12 commonly used medicinal herbs. **Archives of Family Medicine**, Chicago, v.7, Nov/Dec. 1998.

OLAJIDE, O.A., AWE, S.O., MAKINDE, J.M. Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. **Fitoterapia**, 70:25- 31, 1999.

OLIVEIRA FILHO, A.T. & FONTES, M.A. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil, and the influence of climate. **Biotropica** 32:793-810. 2000.

OLIVEIRA G. A.; OKADA, S. S.; GUENTA, R. S.; *et al.* Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **Jornal Brasileiro de Patologia**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 4, p. 239-246, 2001.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA (UNESCO). **Culture and Health: Orientation Texts: World Decade for Cultural Development 1988-1997**, Document CLT/DEC/PRO. Paris, 129 p. 1996.

PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI P.L.; MORELLI, I. - In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, 79: 165-8, 2002.

PEIXOTO, A.L.; GENTRY, A.H. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). **Revista Brasileira de Botânica** 13:19-25. 1990.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M.C.; MUÑOZ, J.D.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. - Antimicrobial activity of argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, 77: 37-40, 2001.

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, supl., p. 21-24, 2003.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.v. 6, p.170-175. 1978

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; *et al.* Estudo Farmacognóstico De *Croton Rhamnifolius* H.B.K. E *Croton Rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 89-96, 2004.

RATTI, R.P. 1,2; SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 30(2):9-16, 2009.

REITZ, C. D.; KLEIN, R. **Mirtáceas**. (Flora Ilustrada Catarinense). Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 158 p. 1977.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 65-70, 2005.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiocnologia**, São Paulo: Premier, 1997.

ROBERTS, E. A.H.; CARTWRIGHT, R.A.; WOOD, D.J. Flavonols of tea. **Journal of the Sciences of Food and Agriculture**, n.7, p.637-646, 1956.

ROCHA, R.P. A.; GURJÃO, W.S. & BRITO JR, L.C. **Avaliação morfológica da cicatrização de lesões ulcerativas assépticas tratadas com soluções de papaína**. VII Congresso Virtual Hispano-americano de Anatomia Patológica, Pág. 1 de 8. Disponível em: <http://www.conganat.org/7congreso/final/vistaImpresion/trabajo=494> 01/10/2005

SAAD, B.; AZAIZEH, H.; ABU-HIJLEH, G.; SAID, OMAR. Safety of Traditional Arab Herbal Medicine, **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 3(4)433–439, 2006.

SARTORI, M.R.K.; PRETTO, J.B.; CRUZ, A.B.; *et al.* Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (ASTERACEAE), **Pharmazie**, v.58, n.8, p.567-9, 2003.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Chichester, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC. Cap.15, p.306.1999.

SCHNEIDER, N F. Z.; MOURA, N. F.; COLPO, T.; *et al.* Estudos dos Compostos voláteis e atividade antimicrobiana da *Myrciaria tenella* (cambuí). **Revista Brasileira de Farmácia**, 89(2): 131-133, 2008.

SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; *et al.* Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 17(4): 578-582, Out./Dez. 2007.

SILVEIRA, L. M. S.; ROSAS, L. S.; OLEA, R. S. G.; *et al.* Atividade antibacteriana de extrato de gervão frente cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-sensíveis e oxacilina-resistentes isoladas de amostras biológicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 39(4): 299-301, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN G.; *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis/Porto Alegre; Ed. Da UFSC, 1999.

SIQUEIRA Jr., J.F. & DANTAS, C.J.S.. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 1a. Edição, São Paulo, SP: Medsi, 238p, 2000.

SIXEL, P.J.; PECINALLI, N.R. Seleção de Plantas para pesquisa farmacológica. **Infarma**, v. 15, n.3, p.70-73, 2002.

SOARES, S.P.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. Revista **Odonto Ciência**, 23(2):141-144, 2008.

SOBEL, H.J.; AVRIN, E.; MARQUET, E. & SCHWARZ, R.. Reactive granular cells in sites of trauma - a cytochemical and ultra structural study. **American Journal of Clinical Pathology**, 61:223-234, 1974.

STERN, J. L.; HAGERMAN, A. E.; STEINBERG, P. D.; MASON, P. K. Phlorotanninprotein interactions. **J. Chem. Ecol.**, v. 22, p. 1887–1899. 1996.

STIASNY, E. The qualitative detection and differentiation of vegetable tannins. **Collegium**, p.483-499, 1912.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. A riqueza de espécies arbóreas na floresta atlântica de encosta no estado de São Paulo (Brasil). **Revista Brasileira de Botânica** 22:217-223. 1999.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; *et al.* Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 27–34. 1996.

TUCKER, A.O., MARCIARELO, M.J. Volatile leaf oils of american myrtaceae.III. *Psidium cattleyanum* Sabine, *P. friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu, *P. guajava* L., *P. guineense* Sw., and *P. sartorianum* (Berg) Niedenzu. **Journal of Essential Oil Research.**, 7, 187-190. 1995.

TYLER, V.E. Phyto medicines: back to the future. **Journal of Natural Products**, 62:1589-1592, 1999.

URS, N. V. R. R.; DUNLEAVY, J. M. Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds. **Phytopathology**, v. 65:686–690. 1975.

VASCONCELOS, A. G.; BRANQUINHO, F. B.; SANCHEZ, C.; LAGE, C. L. S. Fitofármaco, fitoterápico, plantas medicinais: o reducionismo e a complexidade na produção do conhecimento científico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, supl., p. 103-105, 2002.

WAGNER, H. BLADT. S. **Plant Drug Analysis**. 2nd, Ed. Springer, New York. 1996.

WALDVOGEL, F.A. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In **Principles and Practice of Infectious Diseases**. ed. Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R. pp. 2069–2092. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone. 2000.

WANG, H. K. The therapeutic potential of flavonoids. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, London, v. 9, n. 9, p. 2103-19, 2000.

WANNMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?** Brasília, 2004. v.1,n.4. (Boletim de Saúde, 4).

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de Plantas Medicinais e Alimentos: Importância e Perspectivas Terapêuticas. In: YUNES, R.A.;

WOODMAN, O. L.; CHAN, E. C. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Carlton, v. 31, n. 11, p. 78. 2004.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINELI FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

XAVIER C. *et al.* **Comportamento histopatológico do tecido conjuntivo de *Rattus norvegicus* var *albinus* a implante dos cimentos para obturações de canis: rickert, AH-26E endométerasone**. Bauru (Tese, Faculdade de Odontologia de Bauru), 1973.

XAVIER, H.S. *et al.* **Contribuição à caracterização dos taninos hidrolisáveis**. Recife, 53 Congresso Nacional de Botânica. Resumos p. 20, 2002.

8. ANEXOS

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 21 de maio de 2008

Ofício nº 32/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profa. Eulália de Azevedo Ximenes**
Departamento de Antibióticos - CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.00669 / 2008-89

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado ***"Contribuição ao Estudo de Psidium guineense: Determinação Farmacognóstica e Atividade Biológica"***.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Profa. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

UFPE

[Página inicial](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > [Submissões Ativas](#)

Submissões Ativas

[ATIVO](#) | [ARQUIVO](#)

ID	ENVIAR SEC	AUTORES	TÍTULO	STATUS
RBFAR08-19 -45		Farmacol Araujo, da Silva1, Melo, Randau,...	PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE	Aguardando designação

1 a 1 de 1 Itens

Iniciar Nova Submissão

[CLIQUE AQUI](#) para iniciar os cinco passos do processo de Submissão.


[Página inicial](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > [Submissões](#) > [#RBFAR-45](#) > **Resumo**

#RBFAR-45 : PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE

[RESUMO](#) | [AVALIAÇÃO](#) | [EDIÇÃO](#)

Submissão

Autores	Érika Roberta Araujo, Antônio André Lima da Silva ¹ Lima da Silva ¹ , René Rodrigues Melo, Karina Perrelli Randau, Eulalia Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
Título	PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
Documento Original	RBFAR-45-17327-84726-2-SM.DOC 2009-08-19
Doc. Sup.	Nenhum INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR
Submetido por	Eulalia Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
Data de submissão	August 19, 2009 - 01:56 PM
Seção	Farmacologia
Editor	Nenhum designado
Comentários do Autor	Este artigo científico é parte dos resultados obtidos pela aluna Erika Araújo. A luna é do mestrado de Patologia -UFPE. TODOS OS AUTORES ESTÃO CIENTES DESTA PUBLICAÇÃO

Status

Status	Aguardando designação
Iniciado	2009-08-19
Última alteração	2009-08-19

Metadados da Submissão

[EDITAR METADADOS](#)

Autores

Nome	Érika Roberta Araujo
Instituição	UFPE
País	Brasil
Resumo da Biografia	aluna da Pós Graduação em Patologia -UFPE
Nome	Antônio André Lima da Silva ¹ Lima da Silva ¹
Instituição	UFPE
País	Brasil
Resumo da Biografia	aluno da Pós Graduação em Patologia -UFPE
Nome	René Rodrigues Melo
Instituição	UFPE
País	Brasil
Resumo da Biografia	aluno da Pós Graduação em Ciencias Farmacêuticas -UFPE
Nome	Karina Perrelli Randau
Instituição	UFPE
País	Brasil
Resumo da Biografia	Professora adjunta 1 na Unidade Acadêmica de Saúde - Universidade Federal de Campina Grande - Campus Cuité.

Nome Eulalia Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes 
Instituição Universidade Federal de Pernambuco
País Brasil
Resumo da Biografia Professora associada 2 no Departamento de Antibióticos
atua na área de microbiologia
Contato Principal para correspondência.

Título e Resumo

Título PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE

Resumo *Psidium guineense*, um arbusto popularmente conhecido como araçá, é utilizado como planta medicinal no interior do Brasil, para o tratamento de doenças do trato urinário e gastrointestinal. Entretanto, é pouco estudada quanto a sua composição química e propriedades antimicrobianas. O presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil fitoquímico, dos extratos éter de petróleo, acetato de etila, metanol e água, obtidos das folhas de *Psidium guineense* e determinar a atividade antimicrobiana destes extratos. A análise fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada para a pesquisa de metabolitos secundários. A atividade antimicrobiana foi avaliada sobre 48 microrganismos incluindo cocos Gram-positivos (n=18), bacilos Gram-negativos (n=20), e levedura do gênero *Candida* (n=10). Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada a técnica de micro-diluição em meio líquido. A análise fitoquímica revelou a presença de mono e sesquiterpenos nos extratos éter de petróleo e acetato de etila; flavonóides nos extratos acetato de etila, metanol e água; triterpenos e esteróides nos extratos éter de petróleo, acetato de etila e metanol; açúcares nos extratos metanol e água; proantocianidinas e leucoantocianidinas condensadas nos extratos metanol e água; e taninos hidrolisáveis no extrato aquoso. Todos os extratos ensaiados apresentam atividade antimicrobiana, sendo esta superior para os cocos Gram-positivos. O gênero *Staphylococcus* foi o mais sensível à ação destes extratos cuja CIM foi em média de $0,25 \pm 0,10$ mg/mL. O extrato aquoso foi o mais efetivo frente à totalidade os microrganismos avaliados cuja CIM média foi de 1,52mg/mL. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam o uso popular das folhas *Psidium guineense* como fitoterápico sendo uma planta promissora para o desenvolvimento de medicamentos.

Indexação

Área e sub-área do Conhecimento Acadêmico Microbiologia; Microbiologia aplicada
Idioma pt

Agências de Financiamento

Agências —

ARTIGO:

Perfil Fitoquímico e Atividade Antimicrobiana de *Psidium guineense* Swartz

Phytochemical Screening and antimicrobial activity of *Psidium guineense* Swart

Érika R. S. Araújo^{1*}, Antônio A. L. Silva¹, René R. Melo², Karina P. Randau³, Eulália C. P. A. Ximenes^{1,2,4}

¹Pós-graduação em Patologia – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CEP: 50.670-901, Cidade Universitária, Recife/PE.

²Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CEP: 50.670-901, Cidade Universitária, Recife/PE.

³Unidade Acadêmica de Saúde – Universidade Federal de Campina Grande – Campos Cuité, Olho d'Água da Bica, s/n Cuité-PB

⁴Departamento de Antibióticos – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CEP: 50.670-901, Cidade Universitária, Recife/PE

Corresponding author: Eulália Ximenes

Email: eulaliaximenes@yahoo.com.br

Phone: 550218121268346

Fax:550218121268347

RESUMO

Psidium guineense Swartz, popularmente conhecido como araçá, é pouco estudada quanto a sua composição química, propriedades antimicrobianas e biocompatibilidade. O perfil fitoquímico dos extratos éter de petróleo, acetato de etila, metanólico e aquoso, obtidos das folhas de *P. guineense*, a atividade antimicrobiana destes extratos foram realizados. A análise fitoquímica foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada e a atividade antimicrobiana por micro-diluição em meio líquido. A análise fitoquímica revelou a presença de mono e sesquiterpenos nos extratos éter de petróleo e acetato de etila; flavonóides no acetato de etila, metanólico e aquoso; triterpenos e esteróides no éter de petróleo; açúcares no metanólico e aquoso; proantocianidinas e leucoantocianidinas condensadas no metanólico e aquoso; e taninos hidrolisáveis no aquoso. Todos os extratos ensaiados apresentam atividade antimicrobiana, sendo esta superior para cocos Gram-positivos. Estes resultados corroboram *P. guineense* como uma planta promissora para o desenvolvimento de medicamentos.

Palavras-chave: *Psidium guineense*, composição química, atividade antimicrobiana, biocompatibilidade.

ABSTRACT

Psidium guineense Swartz is a shrub popularly known as araçá. There're not enough studies about this plant related to chemical composition, antimicrobial properties. This study was designed to examine the chemical composition of petroleum ether, ethyl acetate, methanol and water extract obtained of *P. guineense* leaves; antimicrobial activities of these extracts. The chemical composition was realized by Thin Layer Chromatography, the antimicrobial activity was determined by broth microdilution method. The phytochemical screening indicated the presence of mono and sesquiterpenes in petroleum ether extract; flavonoids in ethyl acetate, methanol and water extracts; triterpenes and esteroids in petroleum ether; sugars; proanthocyanidins and leucoanthocyanidins in methanol and water extracts; and hydrolysable tannins in water extract. All of those *P. guineense* extracts showed antimicrobial activity, being better against Gram-positive cocci. The results obtained in this research endorse the popular use of *P. guineense* leaves as a promising plant to developing medicaments.

Key-words: *Psidium guineense*, chemical composition; antimicrobial activity, biocompatibility

INTRODUÇÃO

O emprego de plantas para uso medicinal representou, durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. Elas são freqüentemente utilizadas como agentes antiinflamatórios e no tratamento de infecções microbianas (Apel *et al.* 2006, Calixto *et al.* 2000, Silveira *et al.* 2007). A procura por tratamentos fitoterápicos por parte da população apresenta um notável crescimento, o que torna indispensável uma investigação científica das plantas utilizadas na cura e prevenção de doenças (Newall *et al.* 1996). A família *Myrtaceae* ocorre na Mata Atlântica com mais de 50 espécies, de arbustos e árvores verdes durante todo o ano e cujas folhas opostas, com nervuras marginais são freqüentes nesta família, bem representada na Austrália, no Leste Asiático e nas Américas (Peixoto, Gentry 1990), (Barroso, Perón 1994), (Landrum, Kawasaki 1997), (Tabarelli, Mantovani 1999), (Tyler 1999), (Oliveira Filho, Fontes, 2000), (Guilherme *et al.* 2004). O gênero *Psidium* possui mais de 150 espécies e aproximadamente 15 espécies são nativas da América Tropical (Costa, 2003). Araçazeiro é o nome genérico dado a várias espécies de mirtáceas fruteiras do gênero *Psidium* com ampla disseminação no Brasil. De uma maneira geral estão distribuídos em quase todos os estados do país, existindo relatos de várias espécies que ocorrem do Rio Grande do Sul até a Amazônia. *P. guineense* é de origem sul-americana e apresenta uma ampla área de dispersão (Brandão *et al.*, 2002). No Brasil, esta planta encontra-se desde a Região Norte até a Região Sudeste. No Nordeste, ocorre nas regiões do litoral e zona da mata, principalmente nos tabuleiros costeiros. É um arbusto de 2 a 2,5 m de altura, caule de 1,5 cm de comprimento; frutos globosos, apresentam coloração verde clara a amarelo-verdoso com gosto ácido (Andrade, 1957), (Pio-Corrêa, 1978), (Mattos, 1993), (Demattê, 1997).

A espécie *P. guineense* é utilizada como planta medicinal no interior do Brasil, em uma decocção das raízes é usado para o tratamento de doenças do trato urinário e gastrointestinal. Na Costa Rica é empregada no tratamento de varizes e úlceras nas pernas. Chá das folhas é usado para resfriados e bronquites (Chavarría *et al.* 1998), (Akerele, 1991), (Gonzalez *et al.* 2005). Todavia, ainda são

escassos os estudos sobre a composição fitoquímica e o potencial medicinal das folhas desta planta sobre microrganismos multidroga resistentes freqüentemente isolados da prática médica.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e identificação do material vegetal

Folhas de *P. guineense* Swartz (araçá) foram coletadas no município de Itamaracá (7°46'05''S; 34°50' 14''W) – PE em novembro de 2007. A identificação do material vegetal foi feita pela botânica Olívia Cano no Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA. Uma exsicata da espécie vegetal encontra-se depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima - IPA, sob o número 52.585.

Preparação dos extratos

As folhas de *P. guineense* foram secas à temperatura ambiente e em seguida trituradas em moinho elétrico. Os extratos das folhas (50 g) de *P. guineense* foram obtidos por esgotamento com os seguintes solventes em polaridade crescente: éter de petróleo (EEP), acetato de etila (EAcEt), metanol (EM) e água (EA). Cada extrato foi filtrado e os solventes eliminados com o auxílio de evaporador rotatório sob pressão reduzida. Os extratos foram acondicionados em frasco âmbar e mantidos a baixa temperatura, exceto para o extrato aquoso que foi liofilizado. O rendimento para cada extrato foi calculado a partir de 50 g das folhas sendo de 1,3%, 2,3%, 9,8% e 3,7% (p/p) para os extratos éter de petróleo, acetato de etila, metanólico e aquoso respectivamente.

Determinação do perfil fitoquímico de extratos de *P. guineense*

Dos extratos foram retirados 15µL e submetidos à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) em placas de gel de sílica (MERK-Germany, 15553), empregando-se diversos sistemas de solventes (Quadro 1), bem como reveladores específicos para a pesquisa de metabólitos secundários dos extratos das folhas de *P. guineense* a saber: Alcalóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos, cumarinas, flavonóides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas, taninos hidrolisáveis, mono e sesquiterpenóides, triterpenóides e esteróides,

iridóides, saponinas, açúcares redutores (Randau *et al*, 2004). A determinação de antraquinonas foi realizada pela metodologia de Bornträger em tubos de ensaio (Costa, 2002).

Microrganismos utilizados

Neste experimento foram utilizados 48 microrganismos sendo 42 deles obtidos a partir de espécimes de pacientes acometidos por infecções e com um fenótipo de resistência para diversos agentes antimicrobianos, incluindo cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos, e levedura do gênero *Candida* e 6 microrganismos pertencentes à coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e do American Type Culture Collection *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 27212, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028; *Salmonella enterica* UFPEDA 415, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *P.guineense* (200µL) foi utilizada o método de microdiluição em placas preconizado pelo CLSI (2005). Os extratos das frações éter de petróleo, acetato de etila e metanol (40mg) foram solubilizados num sistema composto por dimetilsufóxido – DMSO, Tween 80, água (1,5:1:17,5) de modo a se adquirir uma concentração final de 2mg/mL. . O pó liofilizado do extrato aquoso de *P. guineense* foi pesado e solubilizado em água destilada e esterilizada de forma a obter uma solução de igual concentração. Todos os extratos foram esterilizados por filtração com filtros de porosidade 0,45µm.

Análise estatística

Os resultados da CIM de *P. guineense* foram expressos em média e desvio padrão. O efeito dos diferentes extratos em cada microrganismo foi avaliado pelo Teste Kruskal-Wallis, com significância de $\alpha=0,05$ pelo software estatístico BioEstat 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil Fitoquímico

A análise fitoquímica dos extratos de *P. guineense* mostrou a presença de mono e sesquiterpenos nos extratos éter de petróleo e acetato de etila; flavonóides nos extratos acetato, metanólico e aquoso; triterpenos e esteróides no extrato éter de petróleo; açúcares nos extratos metanólico e aquoso; proantocianidinas e leucoantocianidinas condensadas no metanólico e aquoso; e taninos hidrolisáveis no extrato aquoso. Não foi observada a presença de alcalóides, saponinas, iridóides, cumarinas, derivados cinâmicos, fenilpropanoglicosídeos e antraquinonas. (Tabela 1).

Tabela 1. Pesquisa dos metabólitos secundários nos extratos de *Psidium guineense* Swartz

Metabólitos secundários	Éter de Petróleo	Acetato de Etila	Metanol	Água
Alcalóides	(-)	(-)	(-)	(-)
Antraquinonas	(-)	(-)	(-)	(-)
Derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	(-)	(-)	(-)	(-)
Cumarinas	(-)	(-)	(-)	(-)
Flavonóides	(-)	(++)	(+++)	(+++)
Proantocianidinas condensadas e leucoantocinidinas	(-)	(-)	(++)	(+)
Taninos hidrolisáveis	(-)	(-)	(-)	(+)
Triterpenóides e esteróides	(+)	(-)	(-)	(-)
Mono e sequiterpenóides	(+++)	(++)	(-)	(-)
Iridóides	(-)	(-)	(-)	(-)
Saponinas	(-)	(-)	(-)	(-)
Acúcares redutores	(-)	(-)	(+)	(+)

(-) Ausência de bandas do metabólito no extrato de *Psidium guineense* Swartz; (+) Presença de uma banda do metabólito no extrato de *Psidium guineense* Swartz; (++) Presença de duas a cinco bandas do metabólito no extrato de *Psidium guineense* Swartz; (+++) Presença de mais de cinco bandas do metabólito no extrato de *Psidium guineense* Swartz.

Atividade Antimicrobiana de *P. guineense*

A análise da atividade antimicrobiana dos extratos éter de petróleo (EEP), acetato de etila (EAcEt), metanólico (EM), e aquoso (EAQ) frente aos 48 microrganismos testados, estão apresentados na

tabela 2. Todos os extratos de *P. guineense* mostraram ativos frente aos microrganismos ensaiados, cujas CIM variou de 2 a 0,2 mg/mL. De todos os microrganismos, as cepas de *Staphylococcus aureus* revelaram ser as mais sensíveis cuja média de concentração inibitória mínima foi de $0,25 \pm 0,20$; $0,34 \pm 0,30$; $0,5 \pm 0,20$; $0,30 \pm 0,10$, respectivamente para o extrato aquoso, metanólico, acetato de etila e éter de petróleo. (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *Psidium guineense*.

	Microrganismos	CIM mg/mL	EM $x \pm \delta$	EAcEt $x \pm \delta$	EPP $x \pm \delta$
		EAQ $x \pm \delta$			
Cocos Gram-positivos	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=10)	1,00 $\pm$ 0	0,90 $\pm$ 0,10	0,90 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=8)	0,25 $\pm$ 0,20	0,34 $\pm$ 0,30	0,50 $\pm$ 0,20	0,30 $\pm$ 0,10
	<i>Escherichia coli</i> (n=4)	2,00 $\pm$ 0	2,00 $\pm$ 0	2,00 $\pm$ 0	1,50 $\pm$ 0,50
Bacilos Gram-negativos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	2,00 $\pm$ 0	1,00 $\pm$ 0	0,90 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0
	<i>Salmonella entérica</i> (n=6)	2,00 $\pm$ 0	2,00 $\pm$ 0	2,00 $\pm$ 0	1,10 $\pm$ 0,40
Levedura	<i>Candida albicans</i> (n=10)	1,90 $\pm$ 0,30	2,00 $\pm$ 0	2,00 $\pm$ 0	2,00 $\pm$ 0

CIM= Concentração Inibitória Mínima; EEP= Extrato Éter de Petróleo; EM= Extrato Metanol; EAcET= Extrato Acetato de Etila; EAQ= Extrato Aquoso; x= média de duas manipulações; δ = desvio padrão

Através dos resultados obtidos, verificou-se que nas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, o extrato aquoso apresentou menor atividade antimicrobiana quando comparada com os demais, entre as cepas de *Salmonella enterica*, o extrato éter de petróleo se mostrou o mais ativo. Dentre os demais microrganismos, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os extratos. Dentre os microrganismos testados as cepas de *Staphylococcus aureus* se mostraram mais susceptíveis aos extratos de *P. guineense*. Estes resultados são bastante significativos, uma vez que a literatura tem mostrado um aumento na morbidade e mortalidade causadas por infecções estafilocócicas. Além disso, a maioria dos microrganismos estudados apresenta resistência a diversos antimicrobianos. A presença de metabólitos secundários, como taninos e flavonóides, nos extratos metanólico e aquoso

de *P. guineense* pode estar relacionada à atividade antimicrobiana verificada sobre as cepas de *S. aureus*. Neste sentido, (González *et. al.* 2005), testaram frações do extrato etanólico: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e metanol da casca (verde e madura), folhas e polpa dos frutos (verdes e maduros) de *P. guineense*, os quais demonstraram ter atividade antimicrobiana frente às cepas *Streptococcus mutans* ATCC31089 e *Streptococcus viridans* (isolada de um paciente da Universidade Javeriana) ambos os microrganismos Gram-positivos. Segundo o autor, a ação antimicrobiana está associada aos taninos e flavonóides encontrados no extrato etanólico das folhas de *P. guineense*. A discreta atividade inibitória dos extratos de *P. guineense*, sobre as bactérias Gram-negativas e leveduras *Candida albicans*, está provavelmente relacionada às diferenças estruturais que estas bactérias e leveduras apresentam em relação às Gram-positivas, como a presença de uma membrana externa sobre o peptidoglicano, de cápsula, de porinas, e na própria constituição da parede celular (KONEMAN *et al.*, 1999), o que pode estar dificultando a ação dos componentes bioativos dos produtos vegetais investigados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akerele O. Tradicional Medicine Programme. Tradicional herbal medicines around the glob: modern perspectives. *Swiss Pharma*. 13:57-62. 1991.

Andrade, L.D. *Estudos fitogeográficos de Pernambuco*. Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco, 50 p. (Publicação, n.2). 1957.

Apel, M. A.; Lima, M. E.; Souza, A.; *et al.* Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest (São Paulo – Brasil). *Pharmacology online* 3:376-383, 2006.

Barroso, G.M.; Perón, V. Myrtaceae. *In* Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, RJ. *Aspectos florísticos das espécies vasculares*. (M.P.M. Lima & R.R. Guedes-Bruni, eds.). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v.1, p.261-302. 1994.

Brandão, M.; Laca-Buendia, J. P.; Macedo, J. F. *Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais*. Belo Horizonte:EPAMIG. 528p. 2002.

Calixto J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

Chavarría F, Masís A, Espinoza R *et al.* *Species de Psidium guineense (Myrtaceae)*. [serie en internet]. [citado 26 Sep 1998]. Disponível em: <http://www.acguanacaste.ac.cr>

Costa, A. F. *Farmacognosia*. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. v.2.

Costa, A. F.S. *Tecnologias para produção de goiaba*. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência técnica e extensão Rural. Vitória, ES. 2003

Couto, G. B. L.; Ximenes, E.; Santana, *et al.* Biocompatibilidade do Extrato Hidro-alcoólico da *Lippia sidoides Cham (verbenaceae)*. *Revista do Conselho Regional de Odontologia de Pernambuco*, Pernambuco, v. 3, n. 2, p. 83-90, 2000.

Demattê, M.E.S.P. *Princípios de paisagismo*. Jaboticabal: Funep, 1997. 104p.

González, A M N., González, M B R, Pinto, N L S. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. *Revista Cubana Plantas Medicinales*, 10 (3-4); 2005.

Guilherme, F.A.G., Morellato, L.P.C. & Assis, M.A. Horizontal and vertical tree community structure in a lowland Atlantic rain forest, Southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 27:725-737. 2004.

Koneman E.W, Allen S.E, Janda W.M, *et al.* *Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color*. 5. ed. Buenos Ayres: Panamericana. 1999.

Landrum, L.R.; Kawasaki, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil. An illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* 49:508-536. 1997.

Mattos, P.P; Salis, S.M. Crescimento de plantas jovens de duas fruteiras nativas da sub-região da Nhecolândia, Pantanal Mato-Grossense, Corumbá, MS. *Congresso Nacional De Botanica*, 44. São Luís. *Resumos. São Luís: Universidade Federal do Maranhão / Sociedade Botânica do Brasil*, 1993. v.2.p.370. 1993.

Moreira, A. C.; Müller, A. C. A.; Pereira, Jr. N. *et al.* Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: policy, law and statistics. *World Patent Information*. 28: 34-42. 2006

Newall, C.A., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. Herbal medicines: a guide for health-care professionals. London: *Pharmaceutical Press*, 296p. 1996.

Oliveira Filho, A.T. & Fontes, M.A. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil, and the influence of climate. *Biotropica* 32:793-810. 2000.

Peixoto, A.L.; Gentry, A.H. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 13:19-25. 1990.

Pio Corrêa, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.v. 6, p.170-175. 1978

Randau, K. P.; Florêncio, D. C.; Ferreira, C. P *et al.* Estudo Farmacognóstico de *Croton Rhamnifolius* H.B.K. E *Croton Rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (*Euphorbiaceae*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 14, n. 2, p. 89-96, 2004.

Saad, B.; Azaizeh, H.; Abu-Hijleh, G. *et al.* Safety of Traditional Arab Herbal Medicine, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 3(4)433–439, 2006.

Silveira, L. M. S.; Rosas, L. S.; Olea, R. S. G.; et al. Atividade antibacteriana de extrato de gervão frente cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-sensíveis e oxacilina-resistentes isoladas de amostras biológicas. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, vol. 39(4): 299-301, 2007.

Tabarelli, M.; Mantovani, W. A riqueza de espécies arbóreas na floresta atlântica de encosta no estado de São Paulo (Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 22:217-223. 1999.

Tyler, V.E. Phytomedicines: back to the future. *Journal of Natural Products*, 62:1589-1592, 1999.

Xavier C. et al. *Comportamento histopatológico do tecido conjuntivo de Rattus norvegicus var albinus a implante dos cimentos para obturações de canis: rickert, AH-26E endométerasone*. Bauru (Tese, Faculdade de Odontologia de Bauru), 1973.