

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

GUIZELLE APARECIDA DE ALCÂNTARA

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FOLHA E
CASCA DO CAULE DA *Myrcia rostrata* DC. (Myrtaceae)**

**Goiânia
2012**

GUIZELLE APARECIDA DE ALCÂNTARA

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNOSTICA E
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FOLHA E
CASCA DO CAULE DA *Myrcia rostrata* DC.(Myrtaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito necessário à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula

**Goiânia
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

GPT/BC/UFG

Alcântara, Guizelle Aparecida de.

A347c Caracterização farmacognóstica e atividade antimicrobiana da
folha e casca do caule da *Myrcia rostrata* DC. (Myrtaceae)
[manuscrito] / Guizelle Aparecida de Alcântara. - 2012.

77 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Faculdade de Farmácia, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de ilustrações e tabelas.

1. *Myrcia rostrata* DC. (Myrtaceae). 2. Atividade
Antimicrobiana. I. Título.

CDU: 579.222

Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 17 de fevereiro de 2012, pela mestranda Guizelle Aparecida de Alcântara.

Banca Examinadora:


Prof. Dr. José Realino de Paula (FF/UFG)
Presidente


Prof. Dra. Giuliana Muniz Vila Verde (UEG)


Prof. Dra. Joelma Abadia Marciano de Paula (UEG)

Aos meus pais, William de Alcântara Batista e Eloiza Aparecida de Alcântara, guerreiros corajosos que me ensinam a viver e contribuem cada vez mais com meu desenvolvimento moral e intelectual.

A todos os pesquisadores que acreditam e se dedicam a encontrar nas plantas, a cura para as enfermidades que acometem o ser humano e com a vocação e o talento proporcionados por Deus, fazem o máximo pela saúde do próximo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela condução dos meus passos. Com a força da minha fé, ele me tornou farmacêutica e me fez chegar até aqui.

Aos meus familiares, por aceitarem a vontade de Deus em serem meus condutores. Nos momentos difíceis, eles novamente me direcionam para o sentido correto.

Às Profa(s). Dra(s) Joelma Abadia Marciano de Paula e Giuliana Muniz Vila Verde, mesmo não percebendo, foi através delas que durante a minha graduação, a vontade de descobrir e de ensinar o que há de melhor nos vegetais, vieram á tona.

Ao Prof. Dr. José Realino de Paula, não só por me orientar com sabedoria, humildade e paciência, mas por me ensinar a adquirir esses valores.

À Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara, que contribuiu positivamente com a desenvoltura deste trabalho. Com sua calma e generosidade, tornou-se um bom exemplo para o meu progresso pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr Edemilson Cardoso da Conceição, por me fazer entender que é através do dialogo com o reagente da reação que se obtêm um bom produto.

À Profa. Dra Tatiana Fiuza, por acrescentar sugestões extremamente relevantes neste trabalho.

Ao Prof.Dr. Pedro Henrique Ferri do Instituto de Química-UFG, por contribuir com a realização da parte experimental deste estudo.

À todos os estudantes de graduação e pós-graduação do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais/UFG que juntamente com alguns funcionários, alegraram os meus dias de trabalho tornando-os mais prazerosos, além de me acolherem como amiga.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A família Myrtaceae no Brasil é uma das famílias mais importantes, compreendendo 23 gêneros e aproximadamente 130 espécies. A espécie *Myrcia rostrata* DC. popularmente conhecida como “folha miúda” ou “guamirim-chorão” é comumente encontrada em florestas sul-americanas e em algumas Unidades de Federação que possuem parte do Cerrado, como em Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso entre outros Estados. O objetivo geral deste trabalho foi estabelecer parâmetros farmacognósticos para o controle de qualidade da *M. rostrata* e analisar a atividade antimicrobiana das folhas e cascas do caule desta espécie. Para isso, na descrição macroscópica e na realização dos cortes para a análise microscópica, o material botânico foi utilizado fresco. Já para a microscopia de pós, determinação do teor de substâncias voláteis, determinação de cinzas totais e insolúveis em ácido, pesquisa e quantificação de constituintes fitoquímicos, obtenção do extrato bruto etanólico e frações e na extração do óleo essencial, as cascas foram dessecadas em estufa com circulação forçada a 40°C e as folhas ao ar livre. A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) foi utilizada para a caracterização química dos óleos essenciais, o teste de microdiluição seriada em caldo para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a obtenção dos cromatogramas das frações aquosa (FAqC) e diclorometano (FDC) das cascas do caule de *M. rostrata*. As folhas desta espécie são simples de consistência membranacea, com coloração verde-escura brilhante na superfície adaxial e verde-escuro opaco na abaxial. Microscopicamente são hipoestomáticas, apresentam numerosos tricomas tectores unicelulares, têm cavidades secretoras e idioblastos com cristais prismáticos. As cascas do caule são encurvadas e o aspecto da superfície externa é caracterizado como espesso, fissurado e estriado sendo que possuem coloração marrom-escura. Quando analisadas microscopicamente é possível visualizar a periderme, esclereides e séries cristalíferas. Na prospecção fitoquímica foram detectados óleo essencial, taninos e flavonóides, tanto nas folhas como na casca do caule. O teor de fenóis totais, taninos que precipitam proteína, taninos hidrolisáveis e flavonóides nas folhas foram de 7,53% ± 0,14, 4,65% ± 0, 65,39% ± 1,70 e 2,83% ± 0, para as cascas do caule foram de 10,06% ± 0,06, 9,60% ± 0,60, 29,53% ± 0,52 e 0,38% ± 0,009. Na análise dos óleos essenciais de seis constituintes identificados o espatulenol (51,39%) e globulol (6,88%) foram os componentes majoritários na casca e juntamente com o β-Cariofileno estes compostos também predominaram nas folhas, onde foram identificados 32 constituintes. Portanto, os hidrocarbonetos sesquiterpenos e os sesquiterpenos oxigenados predominaram nos óleos essenciais das folhas e cascas de *M. rostrata*. Na análise da atividade antimicrobiana o óleo essencial extraído das folhas de *M. rostrata* apresentou atividade antibacteriana moderada com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 250 µg/mL para a bactéria Gram (-) *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e paratodas as bactérias Gram (+) testadas, o extrato bruto das folhas inibiu bem os fungos com CIM de 31,25 µg/mL para as espécies *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida parapsilosis* 11-A, *Candida albicans* 02 e *Cryptococcus gatti* L1, para o *Cryptococcus neoformans* ATCC 28957 e *Cryptococcus neoformans* L2 a CIM foi de 15,62 µg/mL. Das frações das folhas e cascas do caule testadas as que apresentaram menores Concentração Inibitória Mínima foi a FAqC contra *Cryptococcus neoformans* ATCC 28957 (7,81 µg/mL) e *Cryptococcus gatti* L1(15,62 µg/mL) e a FDC contra as bactérias Gram (-) *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (23,43 µg/mL) e contra a bactéria Gram (+) *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (93,75 µg/mL). Os resultados obtidos contribuem para a identificação da espécie *M. rostrata* além de demonstrarem o seu potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: Controle de Qualidade. Atividade antimicrobiana. Myrtaceae. Folha miúda.

ABSTRACT

The family Myrtaceae in Brazil is one of the most important families, comprising about 23 genera and 130 species. The specie *Myrcia rostrata* DC. popularly known as "folha miúda" or "guamirim chorão" is commonly found in South American forests and in some units that are part of the Federation Cerrado, as in Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso and other states. The aim of this study was to establish parameters pharmacognostic for quality control of *M. rostrata* and analyze the antimicrobial activity of the leaves and stem bark of this species. For this, the macroscopic description and implementation of the sections for microscopic analysis, the plant material was used fresh. As for the post microscopy, determination of volatile substances, total ash and acid insoluble, research and quantification of constituent phytochemicals, obtaining of crude ethanol extract and fractions and essential oil extraction, the shells were dried in an oven with forced circulation at 40 ° C and leaves outdoors. The gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS) was used to characterize the chemistry composition of essential oils, the test of serial broth microdilution for antimicrobial activity and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to obtain the chromatograms of the aqueous fractions (FAqC) and dichloromethane (FDC) from the stem bark of *M. rostrata*. The leaves of this species are simple membranacea consistency, with shiny dark green on the adaxial surface dark green and opaque in the abaxial. Microscopically hypostomaticare present numerous unicellular trichomes have secretory cavities and idioblasts with prismatic crystals. The shells are curved stem and appearance of the outer surface is characterized as thick, fissured and striatum of which have dark-brown color. When examined microscopically is possible to visualize the periderm, sclereids and crystal series. Were detect in the phytochemistry essential oil, tannins, flavonoids and terpenes both the leaves and the bark of the stem. The total phenols content, tannins that precipitate proteins, hydrolysable tannins and flavonoids in the leaves were 7,53% ± 0,14, 4,65% ± 0, 65,39% ± 1,70 and 2,83% ± 0, for the stem bark were 10,06% ± 0,06, 9,60% ± 0,60, 29,53% ± 0,52 and 0,38% ± 0,009. In the analysis of essential oils from six constituencies identified spathulenol (51.39%) and globulol (6.88%) were the major components in the shell, together with the β-Caryophyllene these compounds also predominated in the leaves, which were identified 32 constituents. Therefore, the sesquiterpene hydrocarbons and oxygenated sesquiterpenes predominated in the essential oils from leaves and bark of *M. rostrata*. In the analysis of the antimicrobial activity of essential oil extracted from leaves of *M. rostrata* showed moderate antibacterial activity with minimum inhibitory concentration (MIC) of 250 mg / mL for Gram (-) *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 and for all Gram (+) tested, the crude extract of leaves inhibited fungi with MIC 31.25 mg / mL for the species *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida parapsilosis* 11-a, 02 *Candida albicans* and *Cryptococcus gattii* L1, *Cryptococcus neoformans* ATCC 28957 and *Cryptococcus neoformans* L2 CIM was 15.62 mg / mL. Fractions of the leaves and stem bark tested showed the lowest minimum inhibitory concentration was FAqC against *Cryptococcus neoformans* ATCC 28957 (7.81 mg / mL) and *Cryptococcus gattii* L1 (15.62 mg / mL) and the FDC against Gram (-) *Enterobacter aerogenes* ATCC 13 048 (23.43 mg / mL) and against Gram (+) *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (93.75 mg / mL).The results contribute to the identification of the species *M. rostrata* and demonstrate its potential for treating diseases caused by micro-organisms.

Keywords: Quality control. Antimicrobial activity. Myrtaceae. Folha miúda.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mapa da distribuição da espécie <i>Myrcia rostrata</i> DC. (folha-miúda) no território brasileiro e sua inflorescência.....	16
Figura 2. Aspecto geral das folhas da espécie <i>Myrcia rostrata</i> DC.....	31
Figura 3. Casca do caule da <i>Myrcia rostrata</i> DC.....	32
Figura 4. Aspecto geral dos frutos maduros de <i>Myrcia rostrata</i> DC..	33
Figura 5. Secções paradérmicas da lâmina foliar da <i>Myrcia rostrata</i> DC. coloridas em azul de Alcian/Safranina..	34
Figura 6: Secções transversais do mesofilo e bordo da lâmina foliar da <i>Myrcia rostrata</i> DC. coloridos em azul de Alcian/Safranina..	37
Figura 7. Secção transversal da nervura principal ao nível mediano da lâmina foliar da <i>Myrcia rostrata</i> .DC., colorida com azul de Alcian/Safranina.	39
Figura 8. Secção transversal do pecíolo da folha da <i>Myrcia rostrata</i> DC. coloridos em azul de Alcian/Safranina..	
Figura 9. Secções transversais do caule jovem da <i>Myrcia rostrata</i> DC. nas regiões do segundo, terceiro e quinto entrenó coloridas com azul de Alcian/Safranina..	41
Figura 10. Corte transversais das casca do caule de pequeno calibre e casca do caule adulto da <i>Myrcia rostrata</i> DC., coloridos em azul de Alcian/Safranina.....	43
Figura 11. Microscopia do pó das folhas da <i>Myrcia rostrata</i> DC. em reagente Steinmetz....	45
Figura 12. Microscopia do pó das cascas do caule da <i>Myrcia rostrata</i> DC. em reagente Steinmetz.....	46
Figura 13. Cromatogramas da fração aquosa (FAqC) das cascas da <i>M. rostrata</i> e dos padrões ácido elágico, rutina e quercetina obtidos por CLAE a 254nm.....	63
Figura 14 . Principais espectros no ultravioleta da fração aquosa das cascas (FAqC) de <i>M. rostrata</i> e dos padrões ácido elágico, rutina e quercetina.	64
Figura 15. Cromatograma da fração diclorometano (FDC) das cascas de <i>M. rostrata</i> e cromatograma da hesperidina, obtidos por HPLC a 254nm... ..	65
Figura 16. Cromatogramas de varredura na faixa de 200 a 400nm da fração diclorometano (FDC) das cascas de <i>M. rostrata</i> e do padrão hesperidina.....	67
Quadro 1: Microrganismos utilizados na triagem da atividade antimicrobiana de <i>Myrcia rostrata</i> DC.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores de voláteis, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico expressos em porcentagem (p/p) \pm desvio padrão nas amostras da <i>M. rostrata</i>	47
Tabela 2. Classes de metabólitos secundários pesquisados nas amostras da <i>M. rostrata</i>	48
Tabela 3. Média dos valores obtidos nos doseamentos de compostos fenólicos em folhas e cascas da <i>M. rostrata</i> expressos em porcentagem (p/p) \pm desvio padrão.	48
Tabela 4. Compostos identificados no óleo essencial das cascas da <i>M. rostrata</i> no mês de abril/2010 e seus respectivos teores.	51
Tabela 5. Compostos identificados no óleo essencial das folhas da <i>M. rostrata</i> no mês de abril/2010 e seus respectivos teores.	52
Tabela 6. Rendimento das frações obtidas por partição líquido/líquido do extrato etanólico bruto das folhas e cascas do caule da <i>M. rostrata</i> expresso em porcentagem (p/p).	54
Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) observada no teste de suscetibilidade antibacteriana e antifúngica para o extrato bruto e óleo essencial das folhas da <i>M. rostrata</i> e controles antibióticos e antifúngico.	55
Tabela 8. Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) observada para as frações das folhas e cascas do caule da <i>Myrcia rostrata</i>	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 METODOLOGIA	17
3.1 Coleta e processamento das amostras	17
3.2 Descrição macroscópica.....	17
3.3 Descrição microscópica.....	17
3.4 Testes de pureza.....	18
3.4.1 <i>Determinação do teor de voláteis</i>	18
3.4.2 <i>Determinação do teor de cinzas</i>	19
3.4.3 <i>Determinação do teor de cinzas insolúveis</i>	19
3.4 Prospecção fitoquímica	19
3.5 Análise quantitativa.....	19
3.5.1 <i>Quantificação de fenóis totais (FT)</i>	19
3.5.2 <i>Quantificação de taninos por precipitação de proteínas (TPP)</i>	20
3.5.3 <i>Quantificação de taninos hidrolisáveis (TH)</i>	21
3.5.4 <i>Quantificação de flavonóides totais (FvT)</i>	22
3.6 Extração e análise da composição química do óleo essencial	22
3.7 Obtenção do extrato bruto vegetal	23
3.8 Obtenção das frações dos extratos etanólico bruto	23
3.9 Determinação da atividade antimicrobiana	24
3.9.1 <i>Determinação da CIM para bactérias</i>	26
3.9.2 <i>Determinação da CIM para fungos</i>	27
3.10 Perfil cromatográfico das frações FDC E FAqC	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Descrição macroscópica.....	29
4.2 Descrição microscópica.....	32
4.2.1 <i>Lâmina foliar</i>	32

4.2.1.1 Epiderme.....	32
4.2.1.2 Mesofilo e bordo	35
4.2.1.3 Nervura principal	37
4.2.2 <i>Pecíolo</i>	38
4.2.3 <i>Caule jovem</i>	39
4.2.4 <i>Cascas</i>	41
4.2.5 <i>Microscopia de pós</i>	43
4.3 Testes de pureza.....	45
4.4 Prospecção fitoquímica	46
4.5 Análise quantitativa.....	47
4.6 Extração e análise da composição química do óleo essencial	49
4.7 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto	53
4.8 Determinação da atividade antimicrobiana	53
4.9 Perfil cromatográfico das frações FAqC E FDC	60
5 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, milhares de compostos naturais são conhecidos e há uma incansável busca por novos compostos. O avanço da química sintética, combinatória e dos *screenings* em alta escala, contribuíram para o uso dos produtos naturais como fontes de descoberta de novos fármacos (KINGSTON, 2011). Segundo Newman e Cragg (2007) de 1981 a 2006, aproximadamente dois terços de novos fármacos sintetizados originaram-se de produtos naturais, principalmente vegetais.

Nos últimos anos o tratamento com medicamentos à base de plantas medicinais tem aumentado, principalmente no caso de doenças crônicas, cujos resultados do tratamento pela medicina convencional nem sempre são satisfatórios. O Brasil tem um enorme potencial nesse campo. É fundamental que a comunidade médica assim como outros profissionais da área da saúde ligados às universidades atentem para esse potencial, para que possa ser melhor aproveitado (BOTSARIS; MACHADO, 1999).

O Cerrado é a segunda maior zona de vegetação do país é natural que as espécies que compõem esta vegetação tenham forte inserção na medicina popular. E um melhor aproveitamento das riquezas desse bioma poderia ser conseguido através da análise química e, paralelamente, a investigação da atividade biológica de suas espécies vegetais (GUARIM NETO et al., 2003).

Uma das famílias de grande importância neste bioma é a Myrtaceae. Esta família compreende aproximadamente 140 gêneros, com cerca de 3.000 espécies subdivididas em duas subfamílias, a Mytoideae e Leptospermoideae. No Brasil, esta é uma das famílias mais importantes, compreendendo 23 gêneros e aproximadamente 130 espécies, sendo que, na flora brasileira, todos os representantes nativos pertencem à subfamília Myrtoideae. (LIMBERGER, 2004; JUDD et al., 2009).

Dentre as espécies dessa família que mais se destacam na literatura estão a *Psidium guajava* L. (goiaba), *Eucalyptus globulus* L. (eucalipto) e espécies do gênero *Eugenia*, como *Eugenia puniceifolia* (Kunth.) DC. (pitanga-de-folha-fina), *Eugenia jambos* L. (jambo), *Eugenia uniflora* L. (pitanga) e *Eugenia dysenterica* DC (cagaita) (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; DI STASI et al., 2002; SOUZA et al., 2002; PESSINI et al., 2003; PALHARES, 2003; CRUZ; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2007; FIUZA et al., 2008). Porém existem outras espécies desta família que apresentam estudos

farmacognósticos, como *Syzygium aromaticum* (L.) Merr e Perry, *Psidium widgrenianum* Berg., *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg, *Marliera tomentosa* Camb., *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, *Corymbia calophylla* (Lindl.) K.D.Hill e L.A.S. Johnson, dentre outras (DORMAN; DEANS, 2000; DONATO; MORRETES, 2005; PAULA et al., 2008; GOMES et al., 2009; DÖLL-BOSCARDIN et al., 2010).

Algumas das espécies citadas são empregadas principalmente em distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos e doenças infecciosas, podendo sua ação estar relacionada à propriedade adstringente presentes na planta. Também são relatadas atividades antimicrobiana, antimutagênica, hipoglicêmica, antioxidante, anti-inflamatória e diurética (FERNÁNDEZ et al., 2001; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; GONDIM et al., 2006; AMARAL et al., 2006; IHA et al., 2008). As partes da planta utilizadas pelas propriedades medicinais são as folhas, casca e os frutos, sendo alguns comestíveis (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; CRUZ; KAPLAN, 2004).

Nesta família existem espécies com utilização popular que fazem parte de Monografias da Farmacopéia Brasileira V Edição (BRASIL, 2010). Dessa forma, é imprescindível a existência de referências morfológicas e anatômicas com as quais as amostras das espécies possam ser confrontadas, garantindo assim a autenticidade. Isso é importante porque entre as plantas, muitas espécies podem ser confundidas morfológicamente e por apresentarem os mesmos nomes populares (DONATO; MORRETES, 2011). Farias (2004) ressalta que a identificação rigorosa das plantas e o estabelecimento de parâmetros de qualidade necessários à utilização das mesmas, além de garantir um uso seguro, evita fraudes e intoxicações por utilização do material mal identificado. Nas espécies americanas de Myrtaceae, as espécies se assemelham bastante morfológicamente, logo a identificação e classificação das mesmas é algo trabalhoso (MCVAUGH, 1968, *apud* DONATO; MORRETES, 2011). Portanto, os caracteres anatômicos ganham importância nesta família, por acrescentarem dados ao conjunto de informações que possibilitam a diagnose das espécies vegetais.

Outro exame necessário na identificação de produtos naturais tecnologicamente processados das espécies de Myrtaceae é o microscópico. Segundo Jorge et al. (2005), esse tipo de exame permite a identificação de fraudes e adulterações na matéria-prima vegetal.

O gênero *Myrcia* DC. é um dos gêneros americanos de Myrtaceae, com mais de 300 espécies distribuídas do México até o sul do Brasil. Algumas espécies desse gênero possuem amplo espectro de atividades farmacológicas, tais como propriedades hipoglicemiante, diurética, hipotensora, antagonista da bradicinina (MORS; GRUNE, 1978), antidiarréica (ALMEIDA, 1993), antimicrobiana (CERQUEIRA et al., 2007) e antitumoral (HECHT, 1984), além da atividade hepatoprotetora comprovada por Xu et al. (2009).

As folhas da *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. (pedra-ume-caá) são utilizadas como hipoglicemiante na forma de infuso ou decocto e possuem atividade antidiabética atribuídas ao isolamento da mirciatricina I e mirciafenona B. Essa atividade está associada à inibição das enzimas aldose redutase e alfa-glicosidase. Estudos farmacológicos demonstraram atividade de extratos de folhas de *Myrcia fallax* (Rich.) DC. contra células tumorais do tipo KB (LIMBERGER, 2004).

Vários são os estudos na literatura a respeito do óleo essencial extraído de partes dos vegetais da família Myrtaceae, principalmente das folhas, sendo a atividade antimicrobiana, a principal ação analisada nesses compostos (LIMBERGER et al., 2001; FRANCO et al., 2005; MAGINA et al., 2009). O potencial antimicrobiano dos óleos essenciais das folhas de *Myrcia fallax* (Rich.) e *Myrcia myrtifolia* variou de bom a moderado contra bactérias Gram (+) *Staphylococcus aureus* ATCC 24923 e o óleo essencial dessa última espécie é ativo na inibição do crescimento de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (CERQUEIRA et al., 2007, ALARCÓN et al., 2009).

A antibioticoterapia não é uma metodologia com garantida de resposta ao tratamento de microrganismos patogênicos. Isso ocorre devido à alta resistência desses seres vivos frente aos antibióticos, principalmente pelo uso popular excessivo desses medicamentos (SILVA, 2006; OSTROSKY et al., 2008). Por tanto, a busca por drogas antibacterianas derivadas de plantas teve um grande impulso nos últimos anos (COELHO et al., 2004).

Os compostos naturais podem agir nos microrganismos através de mecanismos como desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo algum sítio ser afetado em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004).

Dentre os microrganismos que dificilmente possuem o crescimento inibido por estes compostos está a bactéria Gram (-) *Escherichia coli*. Uma espécie versátil, podendo ser comensal ou causadora de infecções intestinais, urinárias, septicemias, meningites entre outros (ALBERT et al., 1995). A bactéria Gram (+) *Staphylococcus aureus*, um pouco mais fácil de ser inibida, pode causar infecção em qualquer sistema de órgãos e as piores infecções são a bacteremia, endocardite, sendo as mais associadas a complicações e alta taxa de mortalidade (PETTI, 2003) e infecções do trato respiratório (KANAFANI, 2006). No geral, o gênero *Staphylococcus* é encontrado na forma de cocos Gram-positivos ou agrupados em cachos. Esses Microrganismos são anaeróbios facultativos, não formadores de esporos com temperatura de crescimento variando entre 7 °C a 48,7 °C e podem produzir enterotoxina em temperaturas variando de 10°C a 46°C (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

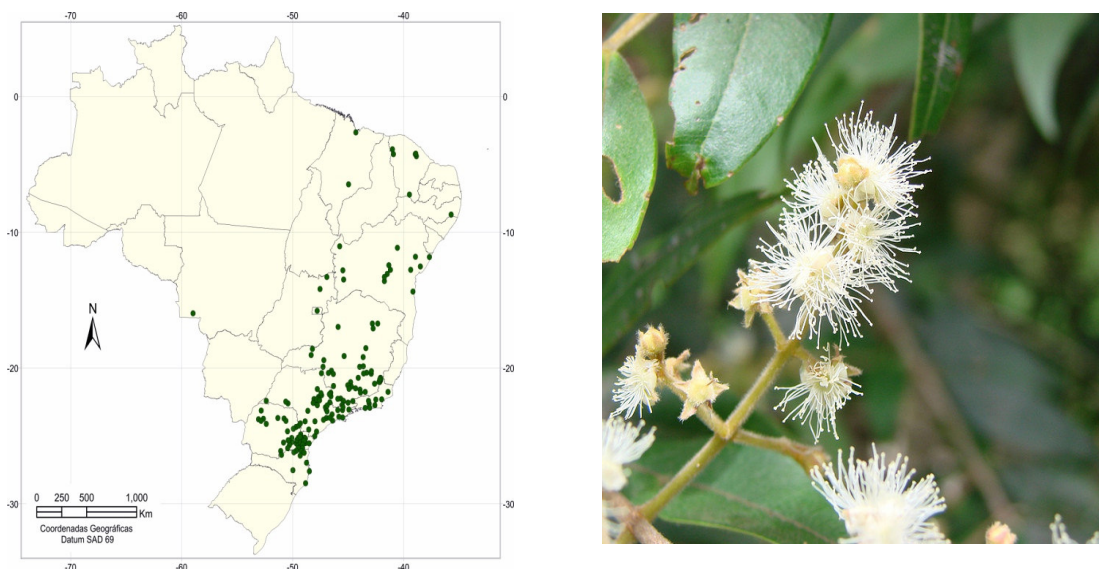
Os fungos também apresentam difícil inibição. Segundo Cuenca-Estrella e Rodríguez-Tudela (2007), a levedura *Candida albicans* é atualmente responsável por quase 50 % de todas as candidíases, e está em quarto lugar nas infecções nosocomiais. Já o fungo *Cryptococcus neoformans* tem se convertido em uma das causas mais habituais de meningoencefalites em adultos devido à Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA) (MAGINA et al., 2009).

Existem diversos microrganismos patogênicos que já não são sensíveis a ação de antibióticos de amplo espectro de ação como Gentamicina, Vancomicina, Cloranfenicol e a medicamentos antifúngicos como o Itraconazol. Por isso, espécies vegetais com potencial antimicrobiano desconhecido devem ser avaliadas para que novos compostos naturais capazes de inibirem o crescimento bacteriano e fúngico sejam descobertos.

No gênero *Myrcia*, ainda existem espécies sem investigação científica. A espécie *Myrcia rostrata* DC., por exemplo, é popularmente conhecida como “folha miúda” ou “guamirim-chorão” é comumente encontrada em florestas sul-americanas e em algumas Unidades de Federação que possuem parte do Cerrado, como em Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso entre outros Estados (Figura 1A). No ecossistema, *M. rostrata* é muito importante como núcleo de atração da avifauna na dispersão de sementes, sendo indicada para a composição de plantios heterogêneos destinados à restauração de ambientes fluviais ou ripários e à recuperação de áreas degradadas. Suas flores pequenas, brancas e hermafroditas (Figura 1B) são polinizadas por abelhas, como de costume na família Myrtaceae, e o pólen é a

única recompensa oferecida às abelhas sociais dos gêneros *Trigona*, *Apis* e *Augochloropsis* (CARVALHO, 2005).

Figura 1. Mapa da distribuição da espécie *Myrcia rostrata* DC. (folha-miúda) no território brasileiro e sua inflorescência.



Fonte: Embrapa Florestas, Brasília, 2005.

Não são encontrados na literatura, estudos que forneçam subsídios farmacognósticos para o estabelecimento dos parâmetros de controle de qualidade da matéria-prima vegetal de *M. rostrata*. Por isso considerando a representatividade da família Myrtaceae no Cerrado brasileiro e ainda a escassez de investigações da atividade biológica dessa espécie, neste trabalho encontra-se o estudo farmacognóstico e da atividade antimicrobiana das folhas e cascas do caule da *M. rostrata*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer parâmetros farmacognósticos para o controle de qualidade da *M. rostrata* e analisar a atividade antimicrobiana das folhas e cascas do caule desta espécie.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a análise morfoanatômica das folhas e cascas do caule da *M. rostrata*;
- Realizar testes de pureza que contribuem no controle de qualidade de matérias-primas obtidas desta espécie;
- Verificar os principais metabólitos secundários presentes nas folhas e cascas do caule da *M. rostrata*;
- Quantificar fenóis totais, taninos e flavonóides nas folhas e cascas do caule da espécie em estudo;
- Extrair e identificar os principais constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas e cascas do caule da *M. rostrata*;
- Avaliar *in vitro*, a atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto e óleo essencial das folhas e das frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e aquosa do extrato das folhas e cascas do caule da *M. rostrata*.

3 METODOLOGIA

3.1 Material Botânico

A espécie *M. rostrata* foi coletada e identificada pelo Prof. Dr. José Realino de Paula na Fazenda Lageado localizada no município de Hidrolândia – GO (16° 53' 59,4" S e 49° 13' 29,4" W a 786m de Altitude). As amostras de folhas e cascas do caule foram coletadas de um único indivíduo adulto em abril/2010. A exsicata foi preparada e depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás sob registro UFG- 45519.

Para a descrição macroscópica e na realização dos cortes para a análise microscópica, o material botânico foi utilizado fresco. Já para a microscopia de pós, determinação do teor de substâncias voláteis, determinação de cinzas totais e insolúveis em ácido clorídrico, pesquisa e quantificação de constituintes fitoquímicos, obtenção do extrato etanólico bruto e frações e na extração do óleo essencial, as cascas foram dessecadas em estufa com circulação forçada a 40°C e as folhas ao ar livre. Posteriormente o material vegetal seco foi moído em moinho de facas até a forma de pó com tamis número 100 (150µm), devidamente identificado e armazenado até sua utilização.

3.2 Descrição macroscópica

A caracterização morfológica das folhas e da casca foi realizada por meio de observações, seguindo os parâmetros descritos por Oliveira, Akisue e Akisue (1998) e Oliveira e Akisue (2003).

3.3 Descrição microscópica

Para a descrição microscópica das amostras foram realizados cortes a mão livre em folhas do 3º ao 5º nó. Fragmentos transversais da região intercostal e bordo (apical, mediano e basal) da lâmina foliar; e do pecíolo, foram fixados em FPA 70% (formaldeído a 37%, ácido propiônico e etanol a 70% na proporção de 1:1:18 – (v/v)) por 3 dias. Posteriormente foram preservados em etanol 70%, até o momento da execução dos cortes (JOHANSEN, 1940). Já os fragmentos das cascas com cerca de 2,0 cm, foram mantidos em etilenodiamina 10% por 24 h a fim de amolecer o material para a realização dos cortes transversais e longitudinais radiais (KRAUS & ARDUIN, 1997).

Foram feitos cortes paradérmicos das faces adaxial e abaxial, além de cortes transversais da nervura principal, caule jovem do 2º, 3º e 5º entrenó e longitudinais da casca

do caule de pequeno calibre. Todos os cortes foram submetidos ao processo de dupla coloração com Azul de Alcian/Safranina (9:1) e montados em lâmina com glicerina a 50% (v/v) conforme técnica adaptada de Bukatsch (1972).

Para a microscopia de pó utilizou-se procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira da 5 ed (BRASIL, 2010) utilizando o reagente Steinmetz para identificação das estruturas presentes (COSTA, 2001).

As fotomicrografias referentes às estruturas anatômicas foram feitas em fotomicroscópio modelo ZEISS-AXIOSTAR PLUS acoplado a câmera CANON POWERSHOT G10 e o *software* utilizado foi o AXION VISION RELEASE 4.7. As escalas que acompanham as ilustrações foram obtidas nas mesmas condições ópticas. Alguns cortes histológicos foram submetidos à luz polarizada a fim de evidenciar constituintes celulares de natureza cristalina.

3.4 Testes de pureza

3.4.1 *Determinação do teor de voláteis*

Na determinação do teor de voláteis, foi utilizada uma balança de infravermelho com lâmpada de halogênio, (Ohaus, Florham Park, USA) modelo MB 35. Os ensaios foram realizados em triplicata com 1,5 g do material botânico.

3.4.2 *Determinação do teor de cinzas totais*

Cerca de 3 g de amostra pulverizada foram transferidos em triplicata, uniformemente, para cadinhos de porcelana previamente calcinados em mufla a 450°C e tarados. Os cadinhos foram novamente levados à mufla para incineração, aumentando gradativamente a temperatura até no máximo 600 °C (30 minutos a 200°C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C) até a obtenção de cinzas brancas. Após a incineração, os cadinhos contendo as amostras foram resfriados à temperatura ambiente em dessecador e pesados (BRASIL, 2010). A porcentagem de cinzas totais foi calculada pela massa da amostra incinerada em relação à massa inicial da amostra, conforme equação 1:

$$\% \text{ teor de cinzas} = 100 \times N / P \quad (1)$$

Onde:

N – massa de cinzas totais da amostra em gramas;

P – massa da amostra em gramas.

3.4.3 Determinação do teor de cinzas insolúveis em HCl

Na determinação de cinzas insolúveis em HCl utilizou-se o resíduo obtido nas cinzas totais. O resíduo foi fervido em 25 mL de ácido clorídrico a 7% (p/v) durante 5 minutos no cadinho coberto com vidro de relógio, o qual foi lavado com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. O resíduo insolúvel em ácido após a fervura foi recolhido sobre papel filtro, isento de cinzas e lavado com água quente até que o pH do filtrado permaneceu igual ao da água de lavagem. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, seco em chapa quente e incinerado em mufla a 500°C por aproximadamente 3 horas até peso constante. A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido foi calculada em relação à massa inicial pesada para cinzas totais (BRASIL, 2010).

3.4 Prospecção fitoquímica

A análise fitoquímica do pó das folhas e cascas de *M. rostrata* foi realizada para investigar a presença de classes de constituintes químicos naturais, através de técnicas específicas descritas em publicações especializadas de Matos e Matos (1989) e Costa (2001). Os metabólitos pesquisados foram heterosídeos antraquinônicos, digitálicos, flavonóides, saponínicos; cumarina, taninos e alcalóides.

3.5 Análise quantitativa

3.5.1 Quantificação de fenóis totais (FT)

A quantificação de fenóis totais presentes no pó das folhas e cascas da *Myrcia rostrata* foi determinada pela metodologia proposta por Hagerman e Butler (MOLE & WATERMAN, 1987a), com adaptações, em triplicata.

No processo extrativo, 0,75 g do material vegetal pulverizado foi transferido para um erlenmeyer e 150 ml de água destilada foram adicionados. A mistura foi aquecida até a fervura e mantida sob refluxo entre 80 e 90°C durante 30 min. O extrato aquoso resultante foi resfriado e transferido para um balão volumétrico de 250 ml, e teve seu volume completado com água destilada. A mistura resultante foi filtrada em papel de filtro qualitativo,

desprezando-se os 50 ml iniciais. Em um tubo de ensaio foram acrescentados 2 ml de solução de lauril sulfato de sódio/trietanolamina, 1 ml da solução de cloreto férrico e 1ml do extrato aquoso filtrado. Após 15 minutos de repouso, a leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm. O “branco” foi preparado com a seguinte composição: 2ml de lauril sulfato de sódio/trietanolamina, 1 ml da solução de cloreto férrico e 1ml de água destilada.

A curva padrão foi preparada com ácido tânico nas seguintes diluições: 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30 mg/ml. A partir da equação obtida da curva padrão, foi possível calcular a concentração (mg/mL) de fenóis totais no extrato aquoso e a porcentagem presente no material vegetal pulverizado, a partir das equações 2 e 3:

$$c = \frac{\text{Absorbância} - A}{B} \quad c = \frac{\text{Absorbância} - A}{B} \quad (2)$$

$$\%(\text{Pt}) = \frac{c \times 250 \times 0,010}{m(\text{g})} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

c = concentração de ácido tânico em mg/mL

A = coeficiente linear da equação da reta

B = coeficiente angular da equação da reta

m = massa inicial descontado o teor de substâncias voláteis na amostra

3.5.2 Quantificação de taninos por precipitação de proteínas (TPP)

Para a determinação quantitativa de taninos por precipitação de proteínas presentes no pó das folhas e casca do caule de *M. rostrata* foi utilizado o método de Hagerman e Butler (MOLE & WATERMAN, 1987b), com adaptações, em triplicata.

A extração seguiu o mesmo procedimento descrito no item 3.5.1., para fenóis totais. Uma alíquota de 1 ml do extrato aquoso foi acrescentado em um tubo de ensaio com 2 ml de solução de albumina bovina sérica, preparada em solução tampão de acetato 0,2 M, pH=4,9, contendo cloreto de sódio 0,17 M. Após 15 minutos em repouso, a amostra foi centrifugada a

3000 r.p.m durante 15 minutos, logo em seguida o sobrenadante foi desprezado e o precipitado dissolvido com 4 ml de solução de lauril sulfato de sódio/trietanolamina e 1 ml da solução de cloreto férrico foi adicionada. Depois de 15 minutos a leitura da absorbância a 510 nm foi realizada. O “branco” foi preparado com a seguinte composição: 4ml de lauril sulfato de sódio/trietanolamina e 1 ml da solução de cloreto férrico.

A curva padrão foi preparada com ácido tânico nas seguintes diluições: 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30 mg/ml. A partir da equação obtida da curva padrão, foi possível calcular a concentração (mg/mL) de taninos totais que precipitam proteínas no extrato aquoso e a porcentagem presente no material vegetal pulverizado, a partir das mesmas equações do item 3.5.1.

3.5.3 *Quantificação de taninos hidrolisáveis (TH)*

Para a determinação quantitativa de taninos hidrolisáveis presentes nas folhas e casca do caule de *M.rostrata*, foi utilizado o método do iodato de potássio (WILLIS & ALLEN, 1998), com adaptações, em triplicata.

No processo extrativo, 0,5 g de material vegetal foi transferido para um erlenmeyer de 250 ml, onde foram acrescentados 20 ml de uma solução de acetona: água (7:3 v/v) e após 1 hora de agitação a 60 r.p.m. em mesa agitadora, a mistura foi filtrada em papel de filtro. Um volume de 20 ml foi adicionado ao resíduo presente no erlenmeyer e o mesmo procedimento foi realizado, reunindo o segundo filtrado ao primeiro. O processo foi repetido até a terceira filtração. Após a extração ser realizada em três etapas, o filtrado resultante foi levado a um evaporador rotativo para a evaporação da acetona, com a temperatura não ultrapassando 40°C. O extrato aquoso obtido a partir da rotaevaporação foi extraído com três alíquotas de 30 ml de éter etílico para a retirada de ácidos graxos e clorofila em funil de separação. Após desprezar a camada etérea, a fase aquosa é congelada e posteriormente submetida à liofilização.

O doseamento foi realizado após o preparo de uma solução de concentração 1,0 mg/ml a partir do extrato liofilizado utilizando água destilada. Em banho de água a 25°C foram colocados tubos de ensaio com 5 ml de solução de KIO₃ a 2,5%. Após 10 minutos (para atingir o equilíbrio térmico), 1 ml da solução aquosa foi adicionada ao tubo de ensaio e após agitação em vórtex, os tubos são recolocados no banho de água a 25°C. Depois de mais 5 minutos (“tempo ótimo” para a reação), os tubos foram retirados do banho e a leitura da

absorbância efetuada em 550 nm. O “branco” foi preparado com 5 ml de solução de KIO_3 a 2,5% e 1 ml de água destilada.

A curva padrão foi preparada com ácido tânico nas seguintes diluições: 0,3 ; 0,4 ; 0,5; 0,6 e 0,7 mg/ml. A partir da equação obtida da curva padrão, foi possível calcular a concentração (mg/mL) de taninos hidrolisáveis no extrato aquoso e a porcentagem presente no material vegetal pulverizado, a partir das equações 2 e 4.

$$\text{Teor (\%)} = \frac{\frac{\text{Conc.do padrão (eq.1) na amostra x massa do extrato liofilizado(g) x 100}{\text{Conc.da solução(extrato liofilizado e água) (mg/mL)}}}{\text{Massa do material vegetal(g)}} \quad (4)$$

3.5.4 *Quantificação de flavonóides totais (FvT)*

Para a determinação quantitativa de flavonóides totais presentes nas folhas e casca do caule de *M.rostrata* foi utilizado o método de Rolim et al. (2005) adaptado, em triplicata.

No processo extrativo, 0,25 g do material vegetal pulverizado foram transferidos para um balão esmerilhado de 125 ml, onde foram adicionados 50 ml da solução metanol: ácido acético 0,02 M (99:1 v/v). Posteriormente, as amostras foram aquecidas em banho de água sob refluxo entre 90-100°C durante 40 minutos, filtradas e lidas em espectrofotômetro.

A curva padrão foi preparada com rutina nas seguintes diluições: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/ml. A partir da equação obtida da curva padrão, foi possível calcular a concentração (mg/mL) de flavonóides totais no extrato aquoso e a porcentagem presente no material vegetal pulverizado, a partir das equações 2 e 5.

$$\%(Pt) = \frac{c \times 50 \times 0,010}{m(g)} \times 100 \quad (5)$$

3.6 Extração e análise da composição química do óleo essencial

A extração do óleo essencial das folhas e cascas do caule foi realizada utilizando o método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado durante 4 horas, a partir de aproximadamente 100 g de material vegetal. O volume de óleo essencial foi medido no tubo graduado do próprio aparelho e o rendimento, em porcentagem (v/p), foi calculado em relação à quantidade inicial (g) de material botânico empregado na extração. Após o processo extrativo, os óleos essenciais foram armazenados em frasco âmbar e mantidos a baixas temperaturas (-18°C) até a utilização.

As amostras de óleo essencial foram submetidas à cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), no equipamento SHIMADZU QP5050A. Foi utilizada uma coluna de sílica fundida (CBP – 5; 30m x 0,25mm x 0,25µm), o gás de arraste utilizado foi Hélio com um fluxo de 1ml/min, aquecimento com temperatura programada (60°C/2min; 3°C min⁻¹/240°C; 10°C min⁻¹/280°C; 280°C/10min) e energia de ionização de 70 eV. O volume de injeção foi de 1µL da amostra previamente diluída em CH₂Cl₂ na proporção de 1:5.

Os Índices de Retenção (IR) foram determinados através da co-injeção de uma mistura de hidrocarbonetos com C8–C32 (Sigma, USA), e pela equação de Van Den Dool e Kratz (1963). Dessa forma, os constituintes do óleo essencial das amostras foram identificados por meio da comparação de seus espectros de massas e índices de retenção com os valores da literatura (ADAMS, 2007).

3.7 Obtenção do extrato bruto vegetal

As folhas e cascas do caule previamente pulverizadas foram submetidas a um processo de maceração a frio, por nove dias, com agitação ocasional utilizando como líquido extrator, etanol 96° GL P.A. Os líquidos resultantes foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo (marca TECNAL, modelo MA-120) a uma temperatura de 40°C (FERRI, 1996). Dessa forma, foram obtidos o Extrato Etanólico Bruto das Folhas (EBF) e o Extrato Etanólico Bruto das Cascas do Caule (EBC) da *M. rostrata*.

A proporção utilizada foi de uma parte do material pulverizado, para cinco partes de etanol, sendo que o líquido extrator foi trocado a cada três dias devido a sua saturação pelos componentes da amostra.

3.8 Obtenção das frações dos extratos etanólicos brutos

O fracionamento dos extratos brutos das folhas e da casca do caule de *M. rostrata* foi realizado pelo método de partição líquido:líquido. Cerca de 50g dos extratos foram solubilizados em 300 mL de metanol/água na proporção de 7:3 e foram submetidos à partições em solventes de acordo com a ordem crescente de polaridade. Para isso, foram utilizados 100 mL de cada um dos respectivos solventes: Hexano, Diclorometano e Acetato de Etila. Assim, foram obtidas por rotaevaporação as seguintes frações: Fração Hexano (FHF e FHC), Fração Diclorometano (FDF e FDC), Fração Acetato de Etila (FAcF e FAcC)

e Fração Aquosa (FAqF e FAqC), esta foi refrigerada a -20°C e liofilizadas (FERRI, 1996). O rendimento das frações foi calculado pela expressão: $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa da fração}/\text{massa do extrato bruto}) \times 100$.

3.9 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato e frações das folhas e as frações das cascas do caule da *M.rostrata* foi avaliada a partir da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtida pelo teste de microdiluição em caldo. O ensaio foi realizado conforme descrito pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standart Institute*) para testes de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias (aeróbicas) e testes de diluição em caldo que verificam a sensibilidade à terapia antifúngica das leveduras (CLSI, 2008 e 2009). Portanto, para os ensaios foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collecttion* (ATCC) e isolados clínicos, conservados na bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica e do Laboratório de Micologia, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – UFG, descritos no Quadro1.

Quadro 1: Microrganismos utilizados na triagem da atividade antimicrobiana de *Myrcia rostrata* DC..

MICROORGANISMOS	ATCC	ISOLADO CLÍNICO
Bactérias Gram (+)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12229	
<i>Micrococcus roseus</i>	1740	
<i>Micrococcus luteus</i>	9341	
Bactérias Gram (+) esporuladas		
<i>Bacillus cereus</i>	14579	
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	
Bactérias Gram (-)		
<i>Escherichia coli</i>	8739	
<i>Escherichia coli</i>	11229	
<i>Enterobacter cloacae</i>		HMA/FTA502
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27483	
<i>Serratia marcescens</i>	14756	
<i>Salmonella sp</i>	19430	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		SPM1
Fungos		
<i>Candida parapsilosis</i>	22019	

<i>Cryptococcus neoformans</i>	28957
<i>Candida albicans</i>	02
<i>Candida parapsilosis</i>	11-A
<i>Cryptococcus gatti</i>	L1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	L2

Os Microrganismos foram reativados antes da realização dos testes. Para isso, as bactérias foram repicadas para caldo Casoy e posteriormente para Ágar Casoy inclinado em tubos de ensaio, e mantidas a 37°C por 24h. Os fungos foram repicados diretamente em Ágar Sabouraud Dextrose e incubados a temperatura ambiente por 24h a 48h (*Candida* spp.) ou por 48h a 72h (*Cryptococcus* spp.).

3.9.1 Determinação da CIM para bactérias

O meio de cultura utilizado neste ensaio foi o caldo Müller Hinton (MH) duas vezes concentrado. Em microplacas estéreis de 96 orifícios com fundo em “U”, providas de tampa, foram colocados 100 µL de caldo MH em todos os orifícios da coluna 2 até a coluna 12. As amostras foram solubilizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% e diluídas em caldo MH de modo a obter uma concentração inicial de 2000 µg/mL, exceto para a fração diclorometano das cascas, cuja concentração inicial variou conforme a quantidade disponível da substância. Para o preparo da amostra com óleo essencial foram acrescentados 0,02% de Tween 80®.

Na coluna 1, da letra A até G foram colocados 200 µL da amostra na sua respectiva concentração inicial e na linha H foram colocados 200 µL de uma solução contendo apenas DMSO a 10% em caldo MH. As diluições seriadas foram realizadas com o auxílio de uma pipeta multicanal, sendo que, foram retirados 100 µL dos oito orifícios da coluna 1 e transferidos para a coluna 2, após homogeneização foram retirados 100 µL da coluna 2 e transferidos para a coluna 3 e este procedimento foi repetido até a coluna 11 de onde foram descartados 100 µL. A linha 12 foi separada para o controle do crescimento microbiano no respectivo meio de cultura utilizado, por isso, não houve diluição em seus orifícios.

Os antibióticos Vancomicina (Sigma), na concentração de 32 µg mL⁻¹, e Gentamicina (Sigma) a 128 µg mL⁻¹, foram utilizados como controles para bactérias Gram(+) e Gram(-), respectivamente.

Os inóculos bacterianos foram preparados em solução salina estéril (NaCl 0,85%) suspendendo-os até obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland, obtida por leitura em espectrofotômetro a 625 nm (79,4% a 83,2% de Transmitância). Posteriormente, foi preparada uma diluição 1:10 em salina, de forma a obter uma concentração de células de 10^7 UFC mL⁻¹ (Unidade Formadora de Colônia). Em seguida, foram depositados nos orifícios de duas linhas da placa (duplicata), 5 µL de cada inóculo preparado. Nos orifícios da linha G não ocorreu inoculação, pois serviram como controle da esterilidade do meio e das amostras testadas. A diluição final dos inóculos nos orifícios permaneceu em torno de 5×10^5 UFC mL⁻¹ ou 5×10^4 UFC/orifício.

Após as inoculações, as microplacas foram tampadas e incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-24h e para *Staphylococcus* incubadas por 24h. A CIM foi definida como a menor concentração da amostra, em µg/mL, capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano. Para a obtenção final desta concentração, após o período de incubação foram acrescentados em todos os orifícios 20 µL de cloreto de trifetil tetrazolium (TTC) a 0,5%, e as microplacas foram reincubadas por aproximadamente 30 min. O aparecimento de coloração avermelhada foi considerado prova de crescimento bacteriano. Isso ocorre porque o TTC, um reagente comumente utilizado para detecção de metabolismo celular, reduz-se na presença de H⁺, formando o trifetil formazan, de cor vermelha.

3.9.2 Determinação da CIM para fungos

O meio de cultura utilizado neste ensaio foi o RPMI. Em microplacas estéreis de 96 orifícios com fundo em “U”, providas de tampa, foram colocados 100 µL RPMI em todos os orifícios da coluna 2 até a coluna 12. As amostras foram solubilizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% e diluídas em RPMI de modo a obter uma concentração inicial de 2000 µg/mL, exceto para a fração diclorometano das cascas, cuja concentração inicial variou conforme a quantidade disponível da substância. Para o preparo da amostra com óleo essencial foram acrescentados 0,02% de Tween 80®.

Na coluna 1, da letra A até G foram colocados 200 µL da amostra na sua respectiva concentração inicial e na linha H foram colocados 200 µL de uma solução contendo apenas DMSO a 10% em RPMI. As diluições seriadas foram realizadas com o auxílio de uma pipeta multicanal, sendo que, foram retirados 100 µL dos oito orifícios da coluna 1 e transferidos para a coluna 2, após homogeneização foram retirados 100 µL da coluna 2 e transferidos para a coluna 3 e este procedimento foi repetido até a coluna 11 de onde foram descartados 100

μL . A linha 12, foi separada para o controle do crescimento microbiano no respectivo meio de cultura utilizado, por isso, não houve diluição em seus orifícios.

O antifúngico Itraconazol (Sigma), na concentração de $16 \mu\text{g/mL}$, foi utilizado como controle.

Os inóculos fúngicos foram preparados em solução salina estéril ($\text{NaCl } 0,85\%$) suspendendo-os até obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland, obtida por leitura em espectrofotômetro a 530 nm ($83,2\%$ a 85% de Transmitância). Posteriormente, foi preparada uma primeira diluição 1:50 e uma segunda diluição de 1:20 ambas em RMPI, de forma a obter uma concentração de células entre $1 - 5 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$. Em seguida, foram depositados nos orifícios de duas linhas da placa (duplicata), $100 \mu\text{L}$ de cada inóculo preparado. Dessa forma, a concentração das amostras foi reduzida a metade em cada orifício. Nos orifícios da linha G não ocorreu inoculação, pois serviram como controle da esterilidade do meio e das amostras testadas. A diluição final dos inóculos nos orifícios permaneceu em torno de $0,5-0,25 \times 10^3 \text{ UFC mL}^{-1}$.

Após as inoculações, as microplacas foram tampadas e incubadas a temperatura ambiente por 48h, para espécies de *Candida* e por 72h para espécies de *Cryptococcus*. A ocorrência de crescimento fúngico foi verificada visualmente após o período de incubação.

3.10 Perfil cromatográfico das frações FAqC e FDC

Com base nos resultados obtidos na análise da atividade antimicrobiana, optou-se pela realização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com as frações aquosa e diclorometado das cascas do caule.

O cromatógrafo utilizado foi o líquido de alta eficiência Waters (Massachusetts, USA) equipado com bomba quaternária, módulo de separação e2695, detector de arranjo de diodos (PDA) 2998 e sistema de processamento de dados Enpower 2.0. Utilizou-se coluna cromatográfica de fase reversa Varian $5\mu \text{ C18}$ ($250 \times 4.6 \text{ mm}$). A temperatura do forno para coluna foi mantida em $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e os cromatogramas foram observados a 254 nm .

Para a amostra FAqC a separação cromatográfica foi realizada utilizando água: $0,1 \%$ de Ácido acético (v/v) (fase A) e acetonitrila: $0,1\%$ de Ácido acético (v/v) (fase B) em sistema gradiente, com vazão de $0,8 \text{ mL/min}$. O programa estabelecido foi: 0 min: 5% fase B; 08 min: 15% fase B; 12 min: 20% fase B; 20 min: 50% fase B; 25 min: 80% fase B; 40 min: 25% fase B; 50 min: 5% fase B; o volume injetado foi de $10 \mu\text{L}$ da amostra a uma concentração de

142mg/mL. Em paralelo ao cromatograma da amostra foram injetados padrões de ácido elágico (SIGMA), rutina (SIGMA) e quercetina (SIGMA), na concentração de 0,4 mg/mL. As substâncias presentes na fração FAqC foram identificadas por comparação dos tempos de retenção e espectros UV visível com os padrões.

Para a amostra FDC a separação cromatográfica foi realizada utilizando acetonitrila (fase A), metanol (fase B) e água (fase C) em sistema gradiente, com vazão de 0,5 mL/min. O programa estabelecido foi: 0 min: 22% fase A, 3% fase B e 75% fase C; 08 min: 44% fase A, 11% fase B e 45% fase C; 12 min: 62% fase A, 16% fase B e 22% fase C; 15 min: 62% fase A, 16% fase B e 22% fase C; 20 min: 22% fase A, 3% fase B e 75% fase C; 25 min: 22% fase A, 3% fase B e 75% fase C; o volume injetado foi de 10 µL da amostra a uma concentração de 30 mg/mL. Em paralelo ao cromatograma da amostra foram injetados padrões de ácido oleanólico (SIGMA) e hesperetina (SIGMA), ambos a 0,4 mg/mL. As substâncias presentes na fração FDC foram identificadas por comparação dos tempos de retenção e espectros Ultra Violeta visível com os padrões.

5 CONCLUSÃO

Esse estudo possibilitou a caracterização farmacognóstica de mais uma espécie da família Myrtaceae. A caracterização anatômica das folhas e cascas desta espécie mostrou conformidade com os dados da literatura para outras espécies dessa família. Microscopicamente, a lâmina foliar é constituída por epidermes revestidas por cutícula, a epiderme adaxial possui células com parede celular anticlinal sem tricomas tectores e estômatos. Já a epiderme abaxial é rica em tricomas, além de apresentar estômatos e cristais prismáticos. Portanto, são necessários estudos detalhados que analisem com maior exatidão os tipos de estômatos da superfície abaxial para verificar a conformidade com outras espécies da família Myrtaceae e estudos ontogenéticos que possam elucidar as camadas subepidérmicas a fim de elucidar a ocorrência de epiderme uniestratificada, pluriestratificada e hipoderme. Outras características verificadas como presença de cavidade secretora, mesofilo dorsiventral, nervura principal biconvexa, pecíolo côncavo-convexo, feixes vasculares coleterais no mesofilo e bicolaterias na nervura principal, presença de drusas no caule jovem e de esclereides nas cascas, também apresentaram conformidade com o descrito na literatura para a família Myrtaceae.

Os teores de substâncias voláteis, cinzas totais e insolúveis em ácido clorídrico nas amostras de folhas e cascas pulverizadas estão dentro dos limites estabelecidos para esses procedimentos de controle de qualidade. E os principais metabólitos encontrados nas folhas e cascas da *M. rostrata* foram heterosídeos flavonóides, taninos e óleos essenciais, cujos teores obtidos na quantificação desses compostos fenólicos e os compostos químicos identificados nos óleos essenciais foram semelhantes aos de outras espécies dos gêneros *Eugenia* e *Myrcia*.

O extrato bruto etanólico apresentou boa atividade para os fungos dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, com CIM de 15,62 µg/mL e 31,25 µg/mL dependendo da espécie. A fração aquosa das cascas FAqC apresentou boa inibição do crescimento de *Cryptococcus neoformans* ATCC 28957 (15,62 µg/mL) e *Cryptococcus gatti* L1 (7,81 µg/mL). Já a fração diclorometano FDC foi ativa para as bactérias *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (23,43 µg/mL), *Serratia marcescens* ATCC 14756 (11,71 µg/mL) e *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (93,75 µg/mL). Os perfis cromatográficos dessas frações foram obtidos, porém, são necessários estudos de isolamento mais específico para a identificação dos possíveis compostos presentes nas amostras que apresentaram atividade antimicrobiana, como um biomonitoramento fitoquímico e análise por RMN.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream – USA: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ALARCÓN, L. D.; PEÑA, A. E.; GONZALES, N.; QUINTERO, A.; MEZA, M.; USUBILLAGA, A.; VELASCO, J. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Myrcia fallax* (Rich.) DC. from Venezuela. **Revista de la Sociedad Química del Peru**, v. 75 n. 2, p. 221-227, 2009.
- ALBERT, M.J.; FARUQUE, S.M.; FARUQUE, A.S.G.; NEOGI, P.K.B., ANSARUZZAMAN, M.; BHRUIYAN, K.A.; AKBAR, M.S. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infection in Bangladesh children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 973-977, 1995.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J.M.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, L.C. TANINOS: UMA ABORDAGEM DA QUÍMICA À ECOLOGIA. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus. 1993.
- ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; REIS, A. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; MACEDO, R. O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16 (Supl.) p. 696-720, 2006.
- AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S. ; VIEIRA-JÚNIOR, G. M. ; MENOR, J. C. A. S. ; SILVA, H. B. ; SOARES, M. J. S. ; CHEVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 90-97, jan./mar. 2008.
- BOEGER, M. R. T.; KAEHLER, M.; MELO JÚNIOR, J. C. F.; GOMES, M. Z.; OLIVEIRA, L. S.; CHAVES, C. R. M.; SCHOTTZ, E. S. Estrutura foliar de seis espécies do subosque de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista. **Hoehnea**, v. 33 n. 4, p. 521-531, 2006.
- BOSCARDIN, P. M. D. Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage-Myrtaceae. Curitiba, 2009. 139f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- BOTSARIS, A. S.; MACHADO, P. V. **Momento terapêutico fitoterápico**. Rio de Janeiro: Flora Medicinal, 1999. 90p. v.1.

BOUGATSOS, C.; NGASSAPA, O.; RUNYORO, D.K.B.; CHINOU, I.B. Chemical Composition and in vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Helichrysum* Species from Tanzania. **Z. Naturforsch**, v.59 c, p. 368-372, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v.2.

BUKATSCH F 1972. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablausafranin. **Mikrokosmos** 61: 255. In. Kraus & Arduin. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Universidade Rural, 1997.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-253, 2004.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMAN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 519-535.

CARVALHO, P.E.R. Guamirim-chorão (*Myrcia rostrata*). Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 24 out. 2011), 2005.

CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 998-1003, 2007.

CIRQUEIRA, R.T. **Efeitos dos extratos aquosos de jambolão (*Eugenia jambolana* Lamark) e pitanga (*Eugenia uniflora* Linnaeus) sobre os parâmetros renais e a pressão arterial em ratos *wistar***. 143p. Tese (Doutorado - Área de Concentração em Biologia Comparada) - Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 8rd edn. Approved Standard M07-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 3rd edn. Approved Standard M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Etnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacolog**, v. 90, p.135-143, 2004.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.3

_____. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. v.2.

COUTO, R. O.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 3, p. 59-69, 2009.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomaceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, ago./dez. 2004.

CRUZ, F. G.; CERQUEIRA, M.D.; MARQUES, MARTINS,D.; ROQUE, N.F.; GUEDES, M.L.S. Variação Sazonal de óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (MYRTACEAE). *Quimica Nova*. v. 32, n.6, p. 1544-1548, 2009.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Elección de espécies fúngicas para el panel de pruebas antifúngicas. In: ZACCHINO, S. A.; GUPTA, M. P. **Manual de técnicas *in vitro* para la detección de compuestos antifúngicos**. Rosário: Corpus, 2007.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.

CUNHA, A. Proença da. Obtenção de moléculas com actividade farmacológica a partir de material vegetal e sua transformação em medicamento. In:_____. **Farmacognosia e Fitoquímica**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009. cap.7.

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

DIAS-LEME, C. L.; GASSON, P.; LUGHADHA, E. N. Wood anatomy of four Myrtaceae genera in the subtribe Myrciinae from South América. **International Association of Wood Anatomists**, v. 16, n. 11, p. 87-95, 1995.

DEFAVERI, A.C.A.; SATO,A.; BORRÉ,L.B.; AGUIAR, D.L.M.; GIL,R.A.S.S.; ARRUDA, R.C.O.;RIEHL, C.A.S. *Eugenia neonitida* Sobral and *Eugenia rotundifolia* Casar. (Myrtaceae) Essential Oils: Composition, Seasonality Influence, Antioxidant Activity and Leaf Histochemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 00, n.00, p.01-08. 2011.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69-91, 2002.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M.; FARAGO, P. V.; PAULA, J. P.; NAKASHIMA, T. Anatomia foliar de *Corymbia calophylla* (Lindl.) K.D.Hill. & L.A.S. Johnson, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 361-367, jun./jul. 2010.

DOMINGUES, E. A.; NAKAMURA, C. V.; SOUZA, M. C.; TEIXEIRA, T. S.; PEIXOTO, J. L. B.; SARRAGIOTTO, M. H.; VIDOTTI, G. J. Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg.) Sobral, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 23-27, jan./mar. 2010.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Estudo anatômico das folhas de *Psidium wildgrenianum* Berg. (Myrtaceae), uma potencial espécie medicinal. **Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 86, n. 2, p. 65-70, 2005.

_____. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.426-443, 2007.

_____. Morfoanatomia foliar de *Myrcia multiflora* (Lam.) DC.-Myrtaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p.43-51, 2011.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.308-16, 2000.

DUARTE, M. R.; PAULA, F. M. Morfodiagnose de *Psidium guajava* L., Myrtaceae. Visão Acadêmica, Curitiba, v6, n.2, Jul. – Dez./2005 – ISSN: 1518-5192.

DUARTE, A.R.; NAVES,R.R.; SANTOS, S.C.; SERAPHIN, J.C.; FERRI, P.H. Seasonal Influence on the Essential Oil Variability of *Eugenia dysenterica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 56, n. 5, p. 967-974, 2009.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 263-288.

FERNÁNDEZ, A.; ÁLVAREZ, A.; GARCÍA, M. D.; SÁENZ, M. T. Anti-inflammatory effect of *Pimenta racemosa* var. *ozua* and isolation of the triterpene lupeol. **IL FARMACO**. v. 56, p. 335-338, 2001.

FERRI, P. H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DISTASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. p. 129-156.

FISCHER, DC..H.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T.; MORENO, P.R.H. Essential Oils from Leaves of Two *Eugenia brasiliensis* Specimens from Southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, p. 499-500, sep/oct. 2005.

FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 21-31, 2008.

FRANCO, J.; NAKASHIMA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição química e atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 3, p. 191-194, jul./set. 2005.

GONDIM, A. N. S.; OLIVEIRA, V. R.; SILVA, L. R.; SILVA, B. A.; CONDE-GARCIA, E. A. Complete atrioventricular block on isolated guinea pig heart induced by an aqueous fraction obtained from *Psidium guajava* L. leaf. **Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 312-316, 2006.

GOMES, S. M.; SOMAVILLA, N. S. D. N.; GOMES-BEZERRA, K. M.; MIRANDA, S. C.; DE-CARVALHO, P. S.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasílica**, v. 23, n. 1, p. 223-238, 2009.

GOMES DMS, NEVES LJ 1993/1997. Anatomia foliar de *Gomidesia spectabilis* (DC) Berg. e *Gomidesia nítida* (Vell.) Legr. (Myrtaceae). **Rodriguésia** 45/49: 51-70.

GUARIM NETO, G. **Plantas utilizados na medicina popular cuiabana: um estudo preliminar**. Cuiabá: UFMT, n.4, p 45-50, 2003.

GUENTHER, E. **Óleo Essencial: Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. [SI]. Disponível em: <<http://pt.scribDC.com/doc/70844333/16-oleos>>. Acesso em: 23 nov. 2011.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985-990, 1999. HECHT, S.M. **Biologically active extracts from *Myrcia fallax* (Myrtaceae) Peru and method of obtaining same**. US Patents. US n.4451459. 29 May 1984, Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/4451459.html>>. Acesso em 05 mar. 2009.

HECHT, S.M. **Biologically active extracts from *Myrcia fallax* (Myrtaceae) Peru and method of obtaining same**. US Patents. US n.4451459. 29 May 1984, Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/4451459.html>>. Acesso em 05 ago. 2011.

HOLETZ, F. B. ; PESSINI, G. L. ; SANCHES, N. R. ; CORTEZ, D. A. G. ; NAKAMURA, C. V. ; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** . Rio de Janeiro. v. 97, n. 7, p. 1027-1031, oct, 2002.

IHA, S. M.; KETYLIN F. MIGLIATO, K. F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B.; BRUNETTI, I. L.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 387-393, jul./set. 2008.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York, McGraw Hill. 1940.

JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. L. P. Anatomia foliar de Pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia puniceifolia* – MYRTACEAE). **Acta Amazônica**, v. 30, n. 1, p. 49-57, 2000.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLONGG, E.A.; STEENS P.F.; DONOGUE, M.J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 416-418.

KANAFI, Z.A., FOWLER, V.G. Jr. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.24, n.3, p.182-93, 2006.

KINGSTON, D.G.I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 496-511, 2011.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997.

KUNDU, S. K.; TIGERSTEDT, P. M. A. Variation in net photosynthesis, stomatal characteristics, leaf area and whole plant phytomass production among ten provenances of neem (*Azadirachta indica*). **Tree Physiology**, n.19, p.47-52, 1998.

- LIMA, N.P.; CERQUEIRA, S.H.F.; FÁVERO, O.A.; ROMOFF, P.; LAGO, J.H.G. Composition and Chemical Variation of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia brasiliensis* Lam. and *Eugenia* sp. (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, may./june. 2008.
- LIMBERGER, R. P., APEL, M. A., SOBRAL, M., SCHAPOVAL, E. S., HENRIQUES, A. T. Investigação da atividade antimicrobiana do óleo volátil de espécies da família Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, n. 1/2, p. 49-52, 1998.
- LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M. E. G.; ZUANAZZI, J. A. S.; MORENO, P. R. H.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T. Biological activities and essential oil composition of leaves of *Blepharocalyx salicifolius*. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 4, p. 308-311, 2001.
- LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.
- MACHADO, K. E. **Atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas da *Eugenia umbelliflora* BERG.** 2005. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.
- MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia species*. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, p. 345-350, 2009.
- MALINOWSKI, L. R. L.; NAKASHIMA, T.; ALQUINI, Y. Caracterização Morfoanatômica das folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill ssp. *bicostata* (Maiden et al.) J.B. Kirkpat. (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy, Buenos Aires**, v. 28, n. 5, p. 756-61, 2009.
- MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982.
- MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. **Farmacognosia**. Fortaleza: UFC, 1989.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy**. Oxford: Clarendon, 1950. v. 1, p. 620-631.
- MOLE S, WATERMAN PG 1987a. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. **Oecologia 72**: 137-147.
- MOLE S, WATERMAN PG 1987b. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II. Techniques for biochemically defining tannins. **Oecologia 72**: 148-156.
- MORS, W.B.; GRUNE, U. *Myrcia sphaerocarpa* DC. Planta diabética. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 5, 1978, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1978. p. 72.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

- OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C.F.; MORAIS, S.M.; COELHO-DE SOUZA, A.N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehneri* in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1471-1474, 2001.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 1991.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K. ; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O. ; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 2, abr./jun. 2008.
- OZÜRK, M.; DURU, M. E.; AYDOGMUS-OZTURK, F.; HARMANDAR, M.; MAHLIÇLI, M.; KOLAK, U.; ULUBEEN, A. CG-MS analysis and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys cretica* subsp. *smyrnaea*. **Natural Products Communication**. v. 4,p. 109-114, 2009.
- PALHARES, D. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae Jussieu). **Revista Lecta**, v.21, n.1/2, p.29-36, 2003.
- PAULA, J. A. M.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H.D. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 265-278, abr./jun. 2008.
- PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 13, supl., p. 21-24, 2003.
- POLESI, N.P.E.; RODRIGUES, R.R.; ALMEIDA, M. Anatomia ecológica da folha de *Eugenia glazioviana* Kiaersk (Myrtaceae). **Árvore**, v. 35, n. 2, p. 255-263, 2011.
- RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. **Fitoterapia**, v. 78, p. 434-436, 2007.
- RISTORI, C. A.; PEREIRA, M. A. S.; GELLI, D. S. O efeito da pimenta do reino preta moída frente a contaminação *in vitro* com *Salmonella* Rubislaw. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.61,p. 131-133, 2002.
- ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L.; O uso comercial e popular do *Eucalipto eucalyptus Globulus Labill*- Myrtaceae. **Revista Duque de Caxias**, v. 2, p. 23-24, 2007.
- RODRIGUES, L. A.; CARVALHO, D. A.; GOMES, L. J.; BOTREL, R. T. **Espécies vegetais nativas usadas pela população local em Luminárias, MG**. 2002. 34f. Parte da dissertação de mestrado da primeira autora. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_52.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2011.

SÁ, Silva Fabyola Amaral da. **Morfoanatomia, composição química do óleo essencial e atividade antimicrobiana das folhas e cascas do caule de *Myrcia tomentosa* (Aubl). DC.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 403-434.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 615-656.

_____. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 615-656.

SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; CRUZ, A. B.; MONACHE, F. D.; GETTE, M. A.; ZACCHINO, S.; CECHINEL FILHO, V. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 578-582, out/dez, 2007.

SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn em amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17,p. 572-577, 2007.

SILVA, C.J.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; MONTANARI, R.M.; PINHEIRO, A.L.; DIAS, I.; ANDRADE, N.J. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 104-108, 2010.

SILVA, N. A.; OLIVEIRA, F. F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, R. A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill. N.E.BR.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 8, P. 52-55. 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 467-495.

SOLEREDER H 1908. **Systematic anatomy of the dicotyledons:** a handbook for laboratories of pure and applied botany. Oxford: Clarendon Press.

SOUZA, A. **Variabilidade dos óleos voláteis de espécies de Myrtaceae nativas da Mata Atlântica.** 2009. 351f. Tese (Doutorado em Ciências, Área de Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOUZA, L. K. H. ; OLIVEIRA, C. M. A. ; FERRI, P. H. ; SANTOS, S. C. ; JÚNIOR, J. G. O. ; MIRANDA, A. T. B. ; LIÃO, L. M. ; SILVA, M. R. R. Antifungal properties of Brazilian Cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 247-249, 2002.

STEFANELLO, M. E. A.; CERVI, A. C.; WISNIEWSKI, A. JR.; SIMIONATTO, E. L. Essential Oil Composition of *Myrcia laruotteana* Camb. **Journal of Essential Oil Research: JEOR**, sep./oct. 2007.

STEFANELLO, M,E,A.; PASCOAL, A.C.R.F.; SALVADOR, M.J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. **Chemistry & Biodiversity**,v.8, p. 73-94, 2011.

VAN DEN DOOL, H.; P. D. J. A. Kratz, Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal Chromatogr**, 11, 463-471 (1963).

VANNUCI, Antonio. Luciano.; REZENDE, Maria. Helena. **Anatomia Vegetal: Noções Básicas**. Edição do autor. Goiânia: 2003.

VICTÓRIO, C.P.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; LAGE, C.L.S. Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. and antimicrobial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia= Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.3, p. 697-701, jul./set, 2009.

XU, L.; GAO, J.; WANG, Y.; YU, W.; ZHAO, X.; YANG, X.; ZHONG, Z.; QIAN, Z. *Myrcia rubra* extracts protect the liver from CCl₄-Induced Damage. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)**. p.1-9, 2009. Disponível em: <<http://ecam.oxfordjournals.org>>. Acesso em: 16 mar. 2010.

WILLIS, R. B.; ALLEN, P. R. Improved method for measuring hydrolysable tannins using potassium iodate. **Analyst**, v. 123, p. 435-439, 1998.

ZABKA, M.; PAVELA, R.; SLEZAKOVA, L. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 250-253, 2009.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 577-614.