

TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE PLANTAS MEDICINAIS NATIVAS DA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ

Vânia Cristina Desoti¹
Cleiton Luis Maldaner¹
Marla Susane Carletto¹
Adriano Alex Heinz¹
Michel Salamanca Coelho¹
Daiane Piati¹
Tatiana Shioji Tiuman²

DESOTI, V. C.; MALDANER, C. L.; CARLETTO, M. S.; HEINZ, A. A.; COELHO, M. S.; PIATI, D.; TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 3-13, jan./abr. 2011.

RESUMO: Muitas plantas não apresentam suas potencialidades terapêuticas comprovadas por meio de estudos científicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo fitoquímico, antimicrobiano e citotóxico das espécies vegetais *Eupatorium serratum* (Asteraceae), *Myrcianthes pungens* (Myrtaceae), *Urera nitida* (Urticaceae), *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae) e duas variedades de *Psidium cattleianum* (Myrtaceae). Para tanto, as plantas foram secas e extraídas com diferentes solventes (hexano, metanol e acetato de etila) obtendo-se 18 extratos brutos. Métodos específicos foram usados para identificação de alcalóides, saponinas, flavonóides, taninos e esteróides. Para determinar as concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) utilizaram-se bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*) e Gram negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhi*). O método de difusão em disco foi usado contra leveduras (*Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*). *C. xanthocarpa*, *M. pungens* (extratos acetato de etila e hexano) e uma variedade de *P. cattleianum* (extrato acetato de etila), apresentaram CIM $\leq 62,5$ $\mu\text{g/ml}$ contra bactérias Gram-positivas, o que pode estar relacionado aos taninos encontrados nas folhas dessas plantas. O extrato hexânico de *M. pungens* mostrou a mais forte inibição, apresentando CBM de mesma concentração. Os extratos metanólicos de *C. xanthocarpa* e *M. pungens* mostraram boa atividade antifúngica. O ensaio citotóxico verificou o efeito hemolítico e o extrato hexânico de uma variedade de *P. cattleianum* apresentou alta citotoxicidade nas concentrações testadas.

PALAVRAS-CHAVE: Triagem fitoquímica; Plantas medicinais; Atividade antimicrobiana; Citotoxicidade.

PHYTOCHEMICAL SCREENING AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF NATIVE MEDICINAL PLANTS FROM WEST REGION OF PARANÁ STATE

ABSTRACT: Many plants do not present its proven therapeutic potentialities through scientific studies. Thus, the aim of this work was to accomplish a phytochemical, antimicrobial and cytotoxic study of the vegetal species *Eupatorium serratum* (Asteraceae), *Myrcianthes pungens* (Myrtaceae), *Urera nitida* (Urticaceae), *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae) and two varieties of *Psidium cattleianum* (Myrtaceae). The plants were dried and extracted with different solvents (hexane, methanol and ethyl acetate) resulting in 18 crude extracts. Specific methods had been used for identification of alkaloids, saponins, flavonoids, tannins and steroids. To determine the minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations were used Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*) and Gram negative (*Escherichia coli* and *Salmonella typhi*) bacteria. The method of disc diffusion was used against yeasts (*Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*). *C. xanthocarpa*, *M. pungens* (ethyl acetate and hexane extracts) and a variety of *P. cattleianum* (ethyl acetate extract), presented MIC ≤ 62.5 $\mu\text{g/ml}$ against Gram-positive bacteria, which may be related to tannins in the leaves of these plants. The hexanic extract of *M. pungens* showed the strongest inhibition, presenting MBC of equal concentration. The methanolic extracts of *C. xanthocarpa* and *M. pungens* showed good antifungal activity. The cytotoxic assay verified the hemolytic effect and the hexanic extract of a variety of *P. cattleianum* presented high cytotoxicity at the concentrations tested.

KEYWORDS: Phytochemical screening; Medicinal plants; Antimicrobial activity; Cytotoxicity.

Introdução

O estudo de plantas medicinais teve início paralelo à evolução humana (ALONSO, 1998) e por muito tempo, esse foi o principal e único recurso disponível para tratamento médico e matéria prima para fabricação de medicamentos (VOLÁK; STODOLA, 1990).

É de suma importância, que seja comprovada a eficácia de plantas que são usadas na medicina popular, ou que ainda se descubram novos usos para as plantas conhecidas (GONÇALVES; ALVES FI-

LHO; MENEZES, 2005). Isso porque grande parte das plantas ditas medicinais, não tem seu potencial terapêutico e farmacológico realmente comprovado. Apesar dos avanços conseguidos com a química orgânica sintética, produtos naturais permanecem como parte integrante da terapêutica moderna (SUFFREDINE et al., 2004).

Devido à resistência de patógenos aos antimicrobianos, é necessária a pesquisa de novos agentes para o combate de infecções. Drogas constituídas por extratos brutos ou compostos biologicamente ativos isolados de espécies vegetais usadas na medicina

¹Discente do Curso de Farmácia - Universidade Paranaense (UNIPAR) - Campus Toledo-PR

²Docente do Curso de Farmácia - Universidade Paranaense (UNIPAR) - Campus Toledo-PR. Avenida Parigot de Souza, 3636, Jardim Prada, Cep 85903-170, Toledo - PR. Telefone: (45) 3277-8500. Email: tiuman@unipar.br

popular podem ser fontes promissoras para a pesquisa de novos fármacos antimicrobianos (AL-FATIMI et al., 2007). Estas substâncias também podem agir sinergicamente com outras melhorando o potencial antibiótico (COUTINHO et al., 2004).

Uma das famílias estudadas é a Myrtaceae, conhecida por possuir espécies cultivadas para obtenção de madeira e fins ornamentais, além de ser muito apreciada na alimentação em função do grande número de espécies produtoras de frutos (VIEIRA et al., 2004). Os frutos mais conhecidos são a goiaba, a pitanga, a cereja, o jambo e a jabuticaba (SOUZA; LORENZI, 2008). Apesar da grande variedade de mirtáceas nativas frutíferas, poucas espécies são exploradas economicamente.

O *Psidium cattleianum* Sabine uma espécie da família Myrtaceae, conhecido popularmente como araçá, é uma espécie encontrada de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul e Nordeste do Uruguai, onde é a árvore frutífera nativa mais abundante (CASA-GRANDE JUNIOR et al., 1999). É usado popularmente como antidiarreico e antidisentérico (ALICE et al., 1995). A atividade antimicrobiana do óleo essencial do araçá foi descrita por Limberger (1998), que comprovou o efeito pelo método de difusão em ágar, frente a alguns micro-organismos Gram positivos, Gram negativos e leveduras (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*). Souza et al (2004), realizaram um estudo em que comprovaram a atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos das folhas do araçazeiro, por meio do método de difusão em ágar, verificando atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*.

A *Campomanesia xanthocarpa* Berg, cujo nome popular é guabiroba (Myrtaceae), é uma árvore frutífera, lenhosa, nativa da região Sul do Brasil, onde a ocorrência de suas variedades arbustivas e silvestres é abundante. Popularmente a infusão das folhas é usada para tratar diarreia, problemas estomacais, reumatismo, hipercolesterolemia dentre outras doenças (ALICE et al., 1995).

A *Myrcianthes pungens*, conhecida como guabijú (Myrtaceae), apresenta espécies distribuídas principalmente na América do Sul. E é utilizada na medicina popular por suas propriedades antidisentéricas (APEL; SOBRAL; HENRRQUES, 2006).

Eupatorium serratum Spreng (Asteraceae) é a planta popularmente conhecida por erva milagrosa. É utilizada para inúmeras alterações patológicas na medicina popular da região: contra picadas

de animais peçonhentos e insetos, como antibiótico, anestésico e cicatrizante, em feridas crônicas, reumatismo, cãibras, erisipela, intoxicações, problemas estomacais e no fígado, diabetes, câncer e bronquite asmática. Sabe-se que esta planta apresenta em sua composição flavonóides, glicosídeos, terpenóides, triterpenos, esteróis, óleo volátil, resina, cera cristalina, polissacarídeos e ácido gálico (FETROW; AVILA, 2000). Silveira (1997) demonstrou que outra espécie de *Eupatorium* (*E. littorale*) possui excelente atividade contra *Staphylococcus aureus*.

Urera nitida (Vell.) Brack (Urticaceae), possui propriedades terapêuticas como antirreumática, antianêmica, adstringente, anti-inflamatória, antidiabética, antioxidante, bactericida, depurativa, revulsiva e homeostática (FONSECA, 2000). São utilizadas as raízes e folhas, sendo que o decocto das folhas serve também para combater a anúria e também é diurético e estomático (BUTTURA, 2003). Conhecido popularmente como urtiga.

De acordo com a literatura, a utilização de extratos naturais no tratamento de doenças infecciosas é promissora, entretanto, o estudo da atividade antimicrobiana de diferentes extratos deve ser ampliado. Desta forma, este trabalho teve por objetivo verificar os principais compostos fitoquímicos e avaliar preliminarmente o potencial antimicrobiano e citotóxico das espécies vegetais citadas anteriormente, nativas da região oeste do Estado do Paraná.

Material e Método

Material botânico e preparo dos extratos

As folhas de *Psidium cattleianum* var. lucidum (araçá amarelo) e *P. cattleianum* var. *cattleianum* (araçá vermelho) foram colhidas em dezembro de 2007, no Município de Toledo. No mês de março de 2008, foram coletadas as folhas de *Eupatorium serratum*, no município de Entre Rios do Oeste e as demais plantas, no município de São Pedro do Iguaçu. As exsiccatas dessas plantas encontram-se armazenadas no Laboratório de Botânica da Universidade Paranaense, Campus de Toledo, sob N^{os} 01A, 02A, 03A, 04A, 05A e 06A.

As plantas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante em temperatura de 45 °C. Posteriormente, foram trituradas em processador e tamizadas em malha 20, abertura 850 mm.

Em seguida, foram preparados três extratos brutos de cada planta por intermédio da técnica de maceração (1:5), utilizando-se metanol (M), acetato de etila (AE) e hexano (H). As misturas foram acondicionadas em frasco âmbar, por um período de 7

dias, sendo agitadas diariamente sem renovar o líquido extrator. Após este período, os extratos foram filtrados e uma parte foi armazenada em vidros âmbar para os testes fitoquímicos e outra parte foi seca em ar circulante. Os extratos secos foram pesados e diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e meio de cultura, obtendo-se uma solução estoque de 8000 µg/mL e 10000 µg/mL, os quais foram utilizados nos testes antimicrobianos e citotóxicos.

Triagem fitoquímica

Os testes consistiram em reações químicas qualitativas simples, que demonstraram a presença de compostos como: taninos, flavonoides, esteroides, saponinas e alcaloides. Para taninos, utilizaram-se os métodos de precipitação com sais de ferro, acetato de chumbo, alcaloides, gelatina e acetato de cobre. Para flavonóides, foram usadas as reações de cloreto de alumínio, *Shinoda* e com hidróxidos alcalinos, que apresentam cor específica quando há a presença destes compostos. Os esteróides foram identificados pela reação de *Liebermann-Burchard* e as saponinas pela agitação do extrato aquoso com formação de espuma persistente. Finalmente, os alcalóides foram detectados pelo método de precipitação, usando os reativos de *Bertrand*, *Bouchardat*, *Dragendorf* e *Mayer* (COSTA, 1994; WHO, 1998).

Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados nos testes foram os Gram-positivos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), os Gram-negativos *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Salmonella typhi* (IAL 1434) e as leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601).

Para os experimentos, foram utilizadas culturas na fase logarítmica de crescimento, ou seja, após 24 horas de incubação depois do subcultivo. Assim, preparou-se uma suspensão padrão de cada uma das espécies de micro-organismos em salina estéril, através da comparação com a escala 0,5 de *Mac Farland*.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, técnica descrita pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2003). Neste ensaio foram utilizadas microplacas de 96 poços com volume de meio de cultura de 100 µL de caldo *Muller Hinton* (CMH). Nos primeiros poços foram

adicionados 100 µL das soluções estoque de 8000 µg/mL dos extratos brutos, obtendo-se desta forma a concentração de 4000 µg/mL. Fez-se então uma diluição seriada nos 6 poços consecutivos, retirando-se 100 µL do poço de maior concentração para o poço seguinte, até obter a concentração de 62,5 µg/mL. A partir das suspensões padrões de cada espécie bacteriana, realizou-se uma diluição 1:10 e pipetou-se 5 µL dessa suspensão em cada poço. No último poço não se adicionou inóculo nem extrato, a fim de se ter um controle negativo. Foi realizado ainda o controle de crescimento microbiano (culturas dos micro-organismos com ou sem a adição das diferentes concentrações de DMSO utilizadas para solubilizar os extratos testados) e os controles positivos com antibióticos padrões (penicilina para Gram positivos e tetraciclina para Gram negativos).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C, por 24 horas. Ao término deste período, determinou-se a CIM, que é definida como a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento microbiano, observando-se ausência de turvação visível.

Para a determinação da CBM, realizou-se o subcultivo em ágar *Muller Hinton* (AMH) daqueles poços que apresentaram a CIM e de dois anteriores. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. A CBM é definida como a menor concentração que apresentar subcultivo negativo ou poucas colônias.

Os testes foram realizados em triplicata.

Atividade antifúngica

A partir das suspensões padrão de cada levedura, embebeu-se um *swab* e semeou-se na superfície do ágar *Sabouraud*, de modo a se obter um inóculo homogêneo por toda a placa. A partir da solução estoque de 10000 µg/mL dos extratos brutos, pipetou-se o equivalente a 100 µg, 200 µg e 300 µg de extrato em cada disco de papel filtro estéril (diâmetro de 5,5 mm). Os discos foram aplicados na superfície do ágar, de forma equidistante. A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada pela medida do halo de inibição após 24 horas de incubação em estufa a 35°C.

Os testes foram realizados em triplicata. O antifúngico padrão nistatina foi utilizado nos testes na quantidade de 10 µg contra a levedura *S. cerevisiae*, como controle positivo. Controles negativos utilizando discos com e sem DMSO nas concentrações utilizadas para dissolver os extratos também foram testados (BAUER et al., 1966).

Ensaio de Citotoxicidade

Preparou-se uma suspensão de hemácias 4% em solução de glicose 5%. Em seguida, 1 mL desta suspensão foi distribuída em tubos de ensaio e homogeneizadas com 1 mL dos extratos brutos diluídos em diferentes concentrações a fim de se obter 4000, 2000, 1000, 500 e 250 µg/mL. Após 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos e realizou-se a leitura visual levando em consideração a quantidade de hemácias que sofreram lise. A visualização da hemólise foi classificada como: - (0% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise). Adicionalmente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (540 nm), utilizando

como branco a solução de glicose 5% para confirmar os resultados da leitura visual. Neste teste, utilizou-se como controle negativo a suspensão de hemácias 4% e controle positivo uma solução de *Triton X 114* a 1% (LUIZE et al., 2005).

Resultados

Com a realização da caracterização fitoquímica foi possível constatar grupos de compostos químicos provenientes do metabolismo secundário das plantas (taninos, flavonoides, esteroides, saponinas e alcaloides). A Tabela 1 mostra os resultados obtidos na triagem fitoquímica a partir dos extratos de diferentes polaridades das plantas analisadas.

Tabela 1: Triagem fitoquímica dos extratos brutos das folhas de *Campomanesia xanthocarpa*, *Eupatorium serratum*, *Myrcianthes pungens*, *Urera nitida* e *Psidium cattleyanum* (variedade amarela e vermelha), elaborados com solventes de diferentes polaridades: hexano (H), acetato de etila (AE) e metanol (M).

CLASSES DE COMPOSTOS	REAÇÕES	ESPÉCIES VEGETAIS E SEUS EXTRATOS																								
		<i>C. xanthocarpa</i>				<i>E. serratum</i>				<i>U. nitida</i>				<i>M. pungens</i>				<i>P. cattleyanum</i> (amarela)				<i>P. cattleyanum</i> (vermelha)				
		H	AE	M	H	AE	M	H	AE	M	H	AE	M	H	AE	M	H	AE	M	H	AE	M	H	AE	M	
Taninos	Sais de Ferro	NT	NT	+++	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+
	Acetato de Chumbo	NT	NT	+++	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+
	Alcalóides	NT	NT	+	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+
	Gelatina	NT	NT	+	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+
	Acetato de cobre	NT	NT	+++	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	+
Flavonóides	Cloreto de alumínio	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	Shinoda	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	Hidróxidos alcalinos	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Esteróides	Liebermann-Burchard	-	-	+++	+	+	+	+++	+	+	+	+++	+	+	+	+++	+	+	+	+++	+	+	+	+++	+	+
	Índice de Espuma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcalóides	Bertrand	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bouchardat	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dragendorff	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mayer	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Legenda: As cruzes indicam a intensidade da reação da amostra, em que: "++++" intensidade alta, "+++" intensidade média, "++" intensidade baixa, "+" intensidade muito baixa, "-" reação negativa. Os testes "NT" indicam não testado. Índice de espuma < 100: todos os tubos produziram quantidade de espuma menor que 1 cm.

Pôde-se observar que o metanol foi o melhor solvente extrator, em que *P. cattleyanum* (variedade amarela e vermelha) e *U. nitida* apresentaram os 5 grupos químicos estudados, enquanto que as demais plantas apresentaram taninos, esteroides, flavonoides e alcaloides.

No extrato bruto acetato de etila foi encontrado em *P. cattleyanum* (variedade amarela), flavonoides, esteroides e alcaloides e para espécie *P. cattleyanum* (variedade vermelha) apenas flavonoides e esteroides. No extrato acetato de etila de *E. serratum*, encontrou-se apenas esteroides e no de *C. xanthocarpa* apenas flavonoides.

Por outro lado, os extratos brutos obtidos com o solvente hexano apresentaram apenas reação positiva para esteroides em *E. serratum*, *U. nitida* e *P. cattleyanum* e para identificação de flavonoides em *C. xanthocarpa* e *E. serratum*.

Das 6 plantas analisadas, alguns extratos demonstraram atividade antimicrobiana, que foi observada por meio da determinação da CIM e da CBM, contra micro-organismos Gram positivos (*Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*) e Gram negativos (*Escherichia coli* e *Salmonella typhi*) (Tabela 2). As plantas que demonstraram os melhores resultados

foram *C. xanthocarpa* e *M. pungens*, pois esses extratos apresentaram efeito bacteriostático e bactericida, simultaneamente, tanto contra bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas. O extrato bruto hexânico e acetato de etila destas duas plantas apresentaram CIM $\leq 62,5$ $\mu\text{g/mL}$ contra Gram positivos, mas apenas o extrato acetato de etila foi eficaz contra Gram negativos, apresentando CIM de 500 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* e *S. typhi*, respectivamente.

Os extratos de *P. cattleyanum* mostraram-se ativos apenas contra Gram positivos. O extrato bruto acetato de etila de *P. cattleyanum* (variedade amarela) foi ativo, apresentando CIM de 125 e 500 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus* e *M. luteus*, respectivamente. Enquanto, o extrato bruto acetato de etila de *P. cattleyanum* (variedade vermelha) apresentou CIM $\leq 62,5$ $\mu\text{g/mL}$ para os mesmos micro-organismos.

Os extratos acetato de etila e metanólico de *E. serratum* inibiram o crescimento de *S. aureus* e *M. luteus* em concentrações a partir de 250 $\mu\text{g/mL}$.

O antibiótico penicilina apresentou CIM de 0,0195 e 0,0039 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* e *M. luteus*, respectivamente. Enquanto, o antibiótico tetraciclina apresentou CIM de 0,78 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* e 1,56 $\mu\text{g/mL}$ para *S. typhi* (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos brutos de *Campomanesia xanthocarpa*, *Eupatorium serratum*, *Myrcianthes pungens*, *Urera nitida* e *Psidium cattleyanum* (variedade amarela e vermelha), preparados com solventes de diferentes polaridades: hexano (H), acetato de etila (AE) e metanol (M), testados contra bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*) e Gram negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhi*).

Extratos	CIM (CBM) $\mu\text{g/mL}$			
	Gram positivos		Gram negativos	
	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>
<i>C. xanthocarpa</i> – H	$\leq 62,5$ (125)	$\leq 62,5$ (250)	-	-
<i>C. xanthocarpa</i> – AE	$\leq 62,5$ (250)	$\leq 62,5$ (125)	500 (4000)	2000 (4000)
<i>C. xanthocarpa</i> – M	125 (125)	125 (125)	-	-
<i>E. serratum</i> – H	-	-	-	-
<i>E. serratum</i> – AE	4000 (4000)	500 (1000)	-	-
<i>E. serratum</i> – M	2000 (4000)	250	-	-
<i>M. pungens</i> – H	$\leq 62,5$ (62,5)	$\leq 62,5$ (62,5)	-	-
<i>M. pungens</i> – AE	$\leq 62,5$ (125)	$\leq 62,5$ (125)	500 (4000)	2000 (4000)
<i>M. pungens</i> – M	250 (250)	125 (250)	500	-
<i>U. nitida</i> – H	-	-	-	-
<i>U. nitida</i> – AE	-	-	-	-

<i>U. nitida</i> – M	-	-	-	-
<i>P. cattleyanum</i> (amarela) – H	2000	4000 (4000)	-	-
<i>P. cattleyanum</i> (amarela) – AE	125	500 (1000)	-	-
<i>P. cattleyanum</i> (amarela) – M	250	500 (500)	-	-
<i>P. cattleyanum</i> (vermelha) – H	125	≤62,5	-	-
<i>P. cattleyanum</i> (vermelha) – AE	≤62,5	≤62,5 (125)	-	-
<i>P. cattleyanum</i> (vermelha) – M	125 (500)	125 (250)	-	-
Penicilina	0,0195	0,0039	-	-
Tetraciclina	-	-	0,78	1,56

Quando se verificou a atividade antifúngica, alguns extratos demonstraram atividade dose dependente. Contra *Candida albicans*, o extrato bruto metanólico e acetato de etila de *C. xanthocarpa* e acetato de etila de *M. pungens* apresentaram halos de inibição correspondentes a 6,5 e 7,5 mm, nas quantidades de 200 µg e 300 µg de extrato, respectivamente. A cepa *S. cerevisiae* foi mais susceptível aos extratos, e pôde verificar a presença de halos de inibição, que variaram entre 7,5 e 13,5 mm, ao redor dos discos impregnados com 300 µg dos extratos metanólicos

de *C. xanthocarpa*, *M. pungens* e *P. cattleyanum* (variedade amarela e vermelha) e com o extrato acetato de etila de *P. cattleyanum* (variedade amarela) (Tabela 3).

Em todos os testes foram feitos controles negativos, observando que as diferentes concentrações de DMSO utilizadas no estudo, não inibiram o crescimento microbiano. O controle positivo contendo 10 µg do antifúngico padrão de nistatina no disco, contra a levedura *S. cerevisiae*, mostrou um halo médio de inibição de 20,9 mm.

Tabela 3: Atividade antifúngica dos extratos brutos produzidos com solventes de diferentes polaridades: hexano (H), acetato de etila (AE) e metanol (M), das plantas *Campomanesia xanthocarpa*, *Eupatorium serratum*, *Myrcianthes pungens*, *Urera nitida* e *Psidium cattleyanum* (variedade amarela e vermelha) em diferentes concentrações (100, 200 e 300 µg). Os valores indicam o diâmetro dos halos de inibição em milímetros (mm).

Extratos	<i>S. cerevisiae</i>			<i>C. albicans</i>		
	100 µg	200 µg	300 µg	100 µg	200 µg	300 µg
<i>C. xanthocarpa</i> – H	-	-	-	-	-	-
<i>C. xanthocarpa</i> – AE	-	-	-	-	6,5 mm	7,5 mm
<i>C. xanthocarpa</i> – M	9,5 mm	11 mm	11,5 mm	-	6,5 mm	7,5 mm
<i>E. serratum</i> – H	-	-	-	-	-	-
<i>E. serratum</i> – AE	-	-	-	-	-	-
<i>E. serratum</i> – M	-	-	-	-	-	-
<i>M. pungens</i> – H	-	-	-	-	-	-
<i>M. pungens</i> – AE	-	-	-	-	6,5 mm	7,5 mm
<i>M. pungens</i> – M	10,5 mm	11,5 mm	13,5 mm	-	-	-
<i>U. nitida</i> – H	-	-	-	-	-	-
<i>U. nitida</i> – AE	-	-	-	-	-	-
<i>U. nitida</i> – M	-	-	-	-	-	-
<i>P. cattleyanum</i> (amarela) – H	-	-	-	-	-	-
<i>P. cattleyanum</i> (amarela) – AE	-	7,5 mm	8,5 mm	-	-	-
<i>P. cattleyanum</i> (amarela) – M	-	6,5 mm	7,5 mm	-	-	-

<i>P. cattleyanum</i> (vermelha) – H	-	-	-	-	-	-
<i>P. cattleyanum</i> (vermelha) – AE	-	-	-	-	-	-
<i>P. cattleyanum</i> (vermelha) – M	7,5 mm	8,5 mm	9,5 mm	-	-	-

No teste de citotoxicidade, o extrato hexânico de *P. cattleyanum* (variedade vermelha) apresentou 75% de hemólise em todas as concentrações testadas, porém, esse extrato mostrou atividade antimicrobiana em concentrações iguais ou menores do que 125 µg/mL. No caso do extrato metanólico de *C. xanthocarpa*, *M. pungens*, *P. cattleyanum* (variedade amarela e vermelha) e extrato acetato de etila de *E. serratum*, todos apresentaram apenas 25% de hemólise na maior concentração testada que foi de 4000 µg/mL. O controle positivo de *Triton X 114* promo-

veu 100% de hemólise, enquanto que o controle negativo mostrou 0% de lise (Tabela 4).

Alguns extratos de plantas que apresentaram efeito antimicrobiano também mostraram algum efeito citolítico nas concentrações que foram ativas. Este é o caso do extrato bruto acetato de etila e hexânico de *C. xanthocarpa*, acetato de etila e metanólico de *E. serratum*, acetato de etila de *M. pungens* e acetato de etila e hexânico de *P. cattleyanum* (variedade amarela).

Tabela 4: Ensaio de citotoxicidade. Leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com extratos brutos de *Campomanesia xanthocarpa*, *Eupatorium serratum*, *Myrcianthes pungens*, *Urera nitida* e *Psidium cattleyanum* (variedade amarela e vermelha). Utilizou-se como referência: – (0% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise).

Extratos	Concentração (µg/mL)				
	4000	2000	1000	500	250
<i>C. xanthocarpa</i> – H	+++	+++	+++	++	+
<i>C. xanthocarpa</i> – AE	+++	+++	++	+	0
<i>C. xanthocarpa</i> – M	+	+	+	0	0
<i>E. serratum</i> – H	+++	++	0	0	0
<i>E. serratum</i> – AE	+	0	0	0	0
<i>E. serratum</i> – M	+++	+++	++	0	0
<i>M. pungens</i> – H	+++	+++	+++	++	++
<i>M. pungens</i> – AE	+++	+++	++	+	0
<i>M. pungens</i> – M	+	+	+	0	0
<i>U. nitida</i> – H	++	++	++	+	+
<i>U. nitida</i> – AE	+++	+++	++	+	0
<i>U. nitida</i> – M	+++	++	+	+	0
<i>P. cattleyanum</i> (amarela) – H	+++	+++	++	+	0
<i>P. cattleyanum</i> (amarela) – AE	+++	+++	+++	++	+
<i>P. cattleyanum</i> (amarela) – M	+	+	+	0	0
<i>P. cattleyanum</i> (vermelha) – H	+++	+++	+++	+++	+++
<i>P. cattleyanum</i> (vermelha) – AE	++	+	+	0	0
<i>P. cattleyanum</i> (vermelha) – M	+	+	+	0	0

Discussão

A atividade observada nos testes realizados com os extratos brutos pode ser explicada pela presença de determinados componentes químicos. Substâncias que são resultantes do metabolismo secundário das plantas, que no vegetal têm a função de

defesa contra predadores ou atração de agentes polinizadores, mas também apresentam outras atividades biológicas (COSTA et al., 2005). A partir dos extratos de diferentes polaridades das plantas, foi possível constatar que nas plantas há a presença de taninos, flavonoides, esteróides, saponinas e alcaloides, o que praticamente explica a atividade antimicrobiana

(COELHO, 2003).

Das plantas estudadas, com exceção a *U. nitida*, todas apresentaram alguma atividade antimicrobiana. Um estudo mostrou que outra espécie da mesma família, a *Urera baccifera* (L.) Wedd., também não apresentou atividade frente a *E. coli* e *S. aureus* (MELE'NDEZ; CAPRILES, 2006). Em 2004, Coelho de Souza et al. mostraram a atividade de *Psidium cattleianum* frente à *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*, mas através do teste de difusão no ágar.

Mesmo que, aparentemente a intensidade das reações tenham sido diferentes de uma planta para outra, não é possível assegurar maior ou menor concentração dos componentes químicos, pois as reações foram apenas qualitativas e também a realização desse tipo de teste, diretamente com o extrato bruto, pode mascarar algum resultado (SIMÕES et al., 2002). Somente nos extratos brutos acetato de etila e hexânico de *M. pungens* é que não foram identificados nenhum dos compostos fitoquímicos. Sua atividade biológica pode ser devido a outros grupos de substâncias, como o 1,8-cineol que tem sido relatado na literatura como um dos principais compostos da família Myrtaceae, tal como em *Myrcianthes cisplatensis* (LORENZO et al., 2001) e também em *Myrcianthes pungens* (ZYGADLO et al., 1997).

Por meio do estudo químico das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* foram isoladas quercetina, miricetina, quercitrina e rutina (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995). Um estudo relata também, que o extrato das folhas exibe atividade antimicrobiana (MARKMAN et al., 2000). Estes dados corroboram com o presente estudo, em que observou-se a presença de flavonoides nos três extratos testados, além disso, a atividade antimicrobiana em diferentes micro-organismos.

O grupo químico dos flavonoides tem, entre outras atividades estudadas, a atividade antibiótica, que provavelmente está relacionada à capacidade desse grupo de se complexar com proteínas solúveis e extracelulares e com a parede de células bacterianas. Alguns membros desse grupo (flavonoides lipofílicos) podem romper as membranas bacterianas. Propriedades antifúngicas foram encontradas em grupos de isoflavonoides (COELHO, 2003).

O *Eupatorium serratum* apresenta em sua composição flavonoides, glicosídeos, terpenoides, triterpenos, esteróis, óleo volátil, resina, cera cristalina, polissacarídeos e ácido gálico (FETROW; AVILA, 2000). Os resultados encontrados em nosso estudo confirmam a presença de flavonoides e esteróides. Além disso, estudos com outra espécie,

o *Eupatorium odoratum* Linn., também demonstrou a atividade antimicrobiana, além das respostas anti-inflamatórias e cicatrizantes desta planta (BISWAL et al., 1997; MULLIKA et al., 2005; UMUKORO; ASHOROBI, 2006).

De acordo com Simões et al. (2002), os esteróides fazem parte de um grupo fitoquímico, oriundo da via do mevalonato, metabólitos dos triterpenos. Dentro do grupo dos triterpenos e esteróides, estão compostos de grande importância, como as saponinas. Para Bruneton (1999), as saponinas são praticamente livres de atividade antibacteriana, mas sua atividade antifúngica para fitopatógenos, variações de *Candida* sp. e dermatófitos é bem evidente, sendo o mecanismo de ação mais provável, relacionado com a interação das saponinas com esteróis de membrana.

Para Monteiro et al. (2005), os taninos são compostos que possuem a habilidade de formar complexos com proteínas que são insolúveis em água. O efeito antimicrobiano dos compostos pertencentes a este grupo, já foi comprovada em inúmeros estudos relacionados a diferentes bactérias e fungos. Segundo Simões et al. (2002), acredita-se que esta atividade é devido à inibição de enzimas de bactérias e fungos, à ação direta na membrana dos micro-organismos ou pela competição pelos íons metálicos, essenciais ao metabolismo microbiano. Além disso, devido ao seu caráter fenólico, são conferidas propriedades desinfetantes (COSTA, 1994). Substância encontrada em todas as plantas estudadas.

Segundo Costa (1994), os alcaloides são compostos complexos, de natureza básica, definidos pela função amina, que confere aos seus constituintes, propriedades químicas que estão relacionadas a uma toxicidade elevada e uma atividade farmacológica notável. Compostos isolados e extratos de plantas ricas em alcaloides, já demonstram atividade antimicrobiana em vários estudos (BRUNETON, 1999).

O estudo dos constituintes químicos presentes nessas plantas representa, na maioria das vezes, um motivo para novos estudos, pois permite o conhecimento prévio dos extratos e aponta a provável natureza das substâncias presentes, tornando mais fácil a escolha de uma futura técnica de identificação e fracionamento cromatográfico (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

Por outro lado, sabe-se que muitas plantas medicinais utilizadas pela população na forma de chás e infusões não são suficientemente estudadas quanto à presença de substâncias citotóxicas que podem causar efeitos adversos e conseqüentemente danos à saúde (BAGANTINI; SILVA; TEDESCO,

2007).

Para Veiga Junior, Pinto e Maciel (2005), a citotoxicidade de plantas medicinais deve ser considerada um problema de saúde pública, pois efeitos adversos, intoxicação e interações com outras drogas comumente ocorrem. Como observado neste estudo, algumas plantas utilizadas apresentaram efeito hemolítico nas concentrações que mostraram atividade antimicrobiana.

Segundo Volpato (2005), vários compostos isolados de plantas consideradas medicinais possuem atividade citotóxica e mostram relação com a incidência de tumores. Como exemplo de toxicidade relacionada a substâncias presentes em vegetais, pode ser citado o efeito tóxico renal causado por espécies que contêm saponinas e terpenos.

Ritter et al. (2002) realizaram um levantamento das plantas medicinais utilizadas pela população do município de Ipê, RS, Brasil, resultando em 105 táxons identificados até a espécie. Destas, apenas 11 foram encontradas referências que indicam segurança e eficácia para alguns dos usos indicados e 9 foram descritas com toxicidade reconhecida. Plantas que por apresentarem substâncias tóxicas causam efeitos colaterais como, por exemplo, *Chelidonium majus* L., que por produzirem alcaloides extremamente tóxicos causam estomatites, gastroenterites, bradicardia, alterações na pressão sanguínea, paralisia e espasmos musculares. Outro exemplo é *Ficus carica* L. que apresenta um látex cáustico, rico em furanocumarinas fotossensibilizantes, provocando danos quando em contato com a pele exposta à luz solar.

Apesar do crescente uso de plantas medicinais com fins terapêuticos é importante a comprovação do seu efeito farmacológico. As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular, caracterização dos princípios ativos, avaliação farmacológica dos extratos e compostos químicos identificados e estudo do mecanismo de ação dos princípios ativos (MACIEL et al., 2002). No Brasil, onde a população tem baixo acesso a medicamentos, a comprovação científica da ação das plantas medicinais e uso delas como uma terapia alternativa traria vantagens, como baixo custo e fácil acesso, diminuição de efeitos adversos, evitando ou diminuindo os riscos de intoxicações por uso inadequado (ALVARENGA et al., 2007).

Conclusão

Os resultados deste estudo confirmam o grande potencial das plantas medicinais para o de-

envolvimento de novos antimicrobianos. Há perspectivas inegáveis para aplicação destes produtos naturais, pois além de possuir atividade individual, podem ainda ser associados a outros antimicrobianos usados na clínica. *C. xanthocarpa*, *M. pungens* e *P. cattleyanum* poderiam ser uma fonte de drogas antibacterianas, especialmente contra bactérias Gram positivas e leveduras. Entretanto, novos estudos devem ser realizados, a fim de isolar os constituintes fitoquímicos responsáveis por tal atividade, por meio do fracionamento biomonitorado destes extratos, visando melhorar a seletividade destes produtos e, conseqüentemente, o uso racional como recurso terapêutico.

Agradecimentos

À Universidade Paranaense – UNIPAR, pelo apoio financeiro.

Referências

AL-FATIMI, M. et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 657-666, 2007.

ALICE, C. B. et al. **Plantas medicinais de uso popular**: atlas farmacognóstico. Canoas: Ulbra, 1995. 205 p.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: ISIS, 1998. 1039 p.

ALVARENGA, A. L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.

APEL, A. M.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 402-407, 2006.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method.

- American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BISWAL, P. R. et al. Wound healing effects of *Eupatorium odoratum* L. and *Himex* in rabbits. **Indian Journal of Indigenous Medicine**, v. 19, p. 71-74, 1997.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants**. 2. ed. Paris: Lauvoisier, 1999. 1119 p.
- BUTTURA, E. **Plantas medicinais do oeste paranaense**. Itaipu Binacional, 2003.
- CASAGRANDE JUNIOR, J. G. et al. Influência do sombreamento sobre os teores de carboidratos e fenóis em estaca semilenhosas de araçazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 2219-2223, 1999.
- COELHO, A. M. S. P. et al. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 47-54, 2003.
- COELHO DE SOUZA, G. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-143, 2004.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. 1031 p.
- COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente a larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Revista Conceitos**, v. 10, n. 10, p. 77-85, 2004.
- FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 729 p.
- FONSECA, Z. A. **Plantamed: plantas e ervas medicinais e fitoterápicos**. Fundação Biblioteca Nacional do Ministério Cultura do Brasil, 2000.
- GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.
- LIMBERGER, R. P. **Estudo de óleos voláteis de espécies do gênero Mikania (Asteraceae) e da subtribo Myrtinae (Myrtaceae) de ocorrência no Rio Grande do Sul**. 1998. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- LORENZO, D. et al. Uruguayan essential oils. Composition of leaf oil of *Myrcianthes cisplatensis* (Camb.) Berg. (Guayabo Colorado) (Myrtaceae). **Journal of Flavour Fragrance**, v. 16, p. 97-99, 2001.
- LUIZE, P. S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. R. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MARKMAN, B. E. O. et al. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Campomanesia xanthocarpa*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, p. 55, 2000.
- MELE'NDEZ, P. A.; CAPRILES, V. A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**, v. 13, p. 272-276, 2006.
- MONTEIRO, J. M. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- MULLIKA, T. et al. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 330-333, 2005.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution. Antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 6. ed. Wayne: NCCLS, 2003. (NCCLS document

M7-A6)

RITTER, M. R. et al. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 51-62, 2002.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, v. 66, p. 373-374, 1995.

SILVEIRA, F. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais**. 1997. 91 f. Monografia (Especialização em Ciências Farmacêuticas – Produtos Naturais) - Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

SIMÕES, C. M. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 4. ed. Porto Alegre: UFSC, 2002. 798 p.

SOUZA, G. C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p. 297-298.

SUFFREDINI, I. B. et al. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 3, n. 37, p. 379-394, 2004.

UMUKORO, S.; ASHOROBI, R. B. Evaluation of the anti-inflammatory and membrane-stabilizing effects of *Eupatorium odoratum*. **International Journal of Pharmacology**, v. 2, p. 509-512, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEIRA, T. R et al. Constituintes químicos de *Malaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, p. 536-539, 2004.

VOLÁK, J.; STODOLA, J. **Plantas medicinais**. Portugal: Inquérito, 1990. 319 p.

VOLPATO, A. M. M. **Investigação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico**. 2005. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

WHO (World Health Organization). **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: Switzerland, 1998.

ZYGADLO, J. A. et al. Leaf oils of two Myrcianthes species from Argentina: *M. pungens* (Berg.) Legrand and *M. cisplatensis* (Camb.) Berg. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 237-239, 1997.

Recebido em: 17/06/2009

Aceito em: 17/03/2011

Received on: 17/06/2009

Accepted on: 17/03/2011