

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária



Tese

**Atividade antimicrobiana *in vitro* e antidiarréica em modelo experimental de extratos de folhas de plantas da família Myrtacea**

**Luciana de Souza Prestes**

Pelotas, 2011

**Luciana de Souza Prestes**

**Atividade antimicrobiana in vitro e antidiarréica em modelo experimental de extratos de folhas de plantas da família Myrtaceae**

Luciana de Souza Prestes  
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Sanidade Animal).

Orientador: Mario Carlos Araújo Meireles  
Co-Orientador (es): Prof. Dr. Luiz Filipe Damé Schuch  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Regina Alves Rodrigues  
Dr. Gilberto Antônio Peripolli Beviláqua

Pelotas, 2011

**Banca examinadora:**

---

Dra. Marlete Brum Cleff

---

Dr. João Luiz Zani

---

Dra. Patrícia da Silva Nascente

---

Dr. Mário Carlos Araújo Meireles (Orientador)

Aos meus pais, irmãos  
e amigos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que me ampara ao cruzar meus obstáculos.

A Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Veterinária (UFPel), CAPES, CNPq pelo apoio ao desenvolvimento deste projeto.

Ao meu orientador, Mario Carlos Araujo Meireles e co-orientadores pela confiança e paciência.

A FIOCRUZ que gentilmente cedeu as cepas utilizadas nos experimentos.

Ao pessoal da COOPAVA, que cederam seu tempo e paciência durante as coletas.

A todos do Laboratório de Doenças Infeciosas, minhas colegas da Micologia e da Bacteriologia.

Aos funcionários da Faculdade de Veterinária por seu auxílio e amizade.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Química e Geociências, pela ajuda, apoio e colaboração.

Aos amigos e irmãos do Lar Espírita e Assistencial Irmão Fabiano de Cristo e aos idosos atendidos no Lar, pela amizade, apoio e lições que só poderiam ser aprendidas em uma casa de amor, fé e caridade.

E a todos que contribuíram com seu conhecimento, trabalho braçal e apoio moral durante estes quatro anos.

## EPIGRAFE

"Que Deus não permita que eu perca o romantismo mesmo sabendo que as rosas não falam.

Que eu não perca o otimismo, mesmo sabendo que a vida pode ser dolorosa. Que eu não perca a vontade de viver(...).

Que eu não perca a vontade de ter grandes amigos, mesmo sabendo que, com as voltas que a vida dá, eles podem ir embora de nossas vidas.

Que eu não perca a vontade de ajudar as pessoas, mesmo sabendo que muitas são incapazes de reconhecer a ajuda.

Que eu não perca o equilíbrio, mesmo sabendo que pode haver forças que queiram que eu caia."

Francisco Cândido Xavier

## RESUMO

Prestes, Luciana de Souza. **Atividade antimicrobiana in vitro e antidiarréica em modelo experimental de extratos de folhas de plantas da família Myrtaceae.** 2011. 64f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades acompanha a história da humanidade. Em países do terceiro mundo, incluindo o Brasil, onde 70-80% da população não tem assistência farmacêutica, as plantas medicinais são utilizadas como alternativa terapêutica. Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de extratos das plantas da família *Myrtaceae* frente a microrganismos que causam diarreia e seu efeito sobre motilidade intestinal através de modelo biológico em ratos. Foram selecionadas três plantas da família *Myrtaceae* utilizadas popularmente no tratamento de diarreia: goiabeira (*Psidium guajava* L.), pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) pertencentes à COOPAVA (Cooperativa de Produção Agropecuária Vista Alegre). Foram preparados extratos hidroalcóolicos e óleos essenciais com folhas das plantas colhidas em três fases fenológicas: frutificação, floração e repouso. Os extratos foram testados quanto a sua atividade antimicrobiana frente a (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*). Além dos extratos hidroalcóolicos foram preparados óleos essenciais das três plantas e testados frente aos mesmos microrganismos e alguns de seus constituintes foram identificados por cromatográfico a gás acoplado ao espectrômetro de massas-GC/MS. O extrato hidroalcólico e um infuso de araçá com melhor resultado *in vitro* foi escolhido para o teste de avaliação da atividade antidiarréica da planta *in vivo*. Os testes *in vitro* foram realizados através da técnica de Microdiluição em Caldo para avaliação da atividade bactericida mínima (CBM). Os testes *in vivo* foram realizados através do teste de indução da diarreia com óleo de rícino em ratos. Os constituintes encontrados em todas as plantas através da análise cromatográfica foram o  $\alpha$ -Copaene e  $\alpha$ -Humulene. O melhor resultado do extrato hidroalcólico frente ao *S. aureus* foi o preparado com as folhas frescas de goiabeira colhidos durante a época de floração com média geométrica entre quadruplicatas de 3,25%, frente a *S. typhimurium* as três plantas apresentaram atividade bactericida na concentração de 25% com os extratos colhidos na época de frutificação e folha seca (araçazeiro e pitangueira) e durante o repouso com folha fresca e seca de goiabeira. Frente a *E. coli*, a concentração bactericida mínima foi

de 25% com o extrato de folha de pitangueira seca colhida no repouso, folha seca araçazeiro colhida na época de frutificação e folha seca de goiabeira colhida no repouso. O óleo de goiabeira apresentou atividade bactericida frente a *E.coli* na concentração de 2%, e frente ao *S.aureus* e *S. typhimurium* na concentração de 8%. O óleo de araçá não apresentou atividade bactericida frente aos microrganismos testados e o óleo de pitangueira apresentou atividade bactericida na concentração de 8% frente ao *S.aureus* e *S. typhimurium*. Com o método utilizado, o extrato hidroalcolico e o infuso das folhas secas colhidas na época de frutificação do araçá, não apresentaram atividade antidiarréica.

**Palavras-chave:** Plantas. Antidiarréica. Antimicrobiana. Myrtaceae. Ratos.

## ABSTRACT

Prestes, Luciana de Souza. **In vitro antimicrobial activity and antidiarrhoeal in experimental leaf extracts of plants of the family Myrtaceae.** 2011. 64f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The use of medicinal plants in treatment of disease follows the history of mankind. In third world countries, including Brazil, where 70-80% of the population lacks health pharmaceutical, medicinal plants are used as alternative therapy. To evaluate the antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo*, extracts of plants of the family Myrtaceae against microorganisms that cause diarrhea and its effect on intestinal motility through biological model in rats. We selected three plant family Myrtaceae popularly used in the treatment of diarrhea: guava (*Psidium guajava* L.), surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.) and strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) belonging to the COOPAVA (Cooperative Agricultural Production Vista Alegre). Hydroalcoholic extracts were prepared with essential oils and leaves of plants harvested at three phenological stages: fruit set, flowering, and rest. The extracts were tested for their antimicrobial activity against bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*). Besides the hydroalcoholic extracts prepared essential oils from three plants and tested against the same microorganisms and some of its constituent were identified by gas chromatography coupled to the spectrometer massas-GC/MS. The hydroalcoholic extract of guava and infused with a better outcome *in vitro* test was chosen for the evaluation of antidiarrhoeal activity of the plant *in vivo*. *In vitro* tests were performed by broth microdilution technique for assessment of minimal bactericidal (MBC). The *in vivo* tests were performed by testing for induction of diarrhea with castor oil in rats. The constituents found in all plants by chromatographic analysis were  $\alpha$ -and  $\alpha$ -humulene copaene. The best result of the hydroalcoholic extract against *S. aureus* was prepared with fresh guava leaves harvested during the flowering season with geometric mean of quadruplicates of 3.25%, against *S. typhimurium* the three plants showed antibacterial activity at concentration of 25% with extracts harvested at the time of fruiting and leaf dry weight (strawberry guava and surinam cherry) and at home with fresh and dry leaf of guava. *E. coli*, the minimum bactericidal concentration was 25% with the leaf extract surinam cherry harvested in dry home, dry leaves harvested at the time of strawberry guava fruit and dried leaves of guava harvested in the home. The oil of

guava showed bactericidal activity against *E. coli* at a concentration of 2%, compared to *S. aureus* and *S. typhimurium* at a concentration of 8%. The oil of guava showed no bactericidal activity against microorganisms tested and the oil surinam cherry showed bactericidal activity at a concentration of 8% compared to *S. aureus* and *S. typhimurium*. With our method, the hydroalcoholic extract and the infusion of the dried leaves harvested at the fruiting of guava, showed no activity antidiarrhoeal.

**Keywords:** Plants. Antidiarrhoeal. Antimicrobial. Myrtaceae. Rats.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Comparação entre o percentual redução da defecação e o número de gotas de diarréia entre a droga padrão e os grupos tratados com o EHA.....	54
Figura 2	Comparação entre o percentual redução da defecação e o número de gotas de diarréia entre a droga padrão e os grupos tratados com o infuso.....	55
Figura 3	Relação do peso intestino/carcaça para o tratamento com os dois extratos no teste de indução de diarréia.....	55

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

#### Artigo 1

Tabela 1	Concentração bactericida mínima de extratos de plantas da família Myrtaceae frente bactérias padrão expresso em mL/100mL.....	31
----------	---	----

#### Artigo 2

Tabela 1	Compuestos identificados en los aceites esenciales extraídos de las hojas de las plantas y comparados con los identificados por otros autores.....	43
Tabela 2	Resultado de la CBM de los aceites frente a los microorganismos testados.....	43

#### Artigo 3

Tabela 1	Resultados do teste de inibição da diarréia pelo EHA das folhas de araçá.....	54
Tabela 2	Resultados do teste de inibição da diarréia pelo infuso das folhas de araçá.....	54

## Sumário

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	4
<b>EPÍGRAFE</b> .....	5
<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	11
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
Objetivo.....	14
Hipótese.....	14
<b>PROJETO DE PESQUISA</b> .....	15
Justificativa.....	15
Objetivos Gerais.....	17
Objetivos Específicos.....	17
Hipótese.....	18
Materiais e Método.....	18
Referências Bibliográficas.....	22
<b>ARTIGO 1: Atividade antimicrobiana de plantas da família Mytaceae em três fases fenológicas</b> .....	25
Resumo.....	26
Introdução.....	27
Materiais e Métodos.....	28
Resultados e Discussão.....	29
Conclusão.....	30
Referências Bibliográficas.....	33
<b>ARTIGO 2: Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá</b> .....	37
Resumo.....	39
Introdução.....	40
Materiais e Métodos.....	40

Resultados e Discussão.....	42
Conclusão.....	43
Referências Bibliográficas.....	45
<b>ARTIGO 3: Atividade antidiarréica de extratos de araçá (<i>Psidium catleyanum</i> Sabine).....</b>	<b>48</b>
Resumo.....	49
Introdução.....	50
Materiais e Métodos.....	50
Resultados e Discussão.....	52
Conclusão.....	54
Referências Bibliográficas.....	57
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

Durante a Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde foram estabelecidas diversas diretrizes para todos os países onde foi estabelecido conceito amplo de saúde:

“1) A Conferência enfatiza que a saúde - estado de completo bem-estar físico, mental e social, e não simplesmente a ausência de doença ou enfermidade - é um direito humano fundamental, e que a consecução do mais alto nível possível de saúde é a mais importante meta social mundial, cuja realização requer a ação de muitos outros setores sociais e econômicos, além do setor saúde.”

Este conceito nos mostra que saúde vai muito além do simples tratamento, envolve muito outros setores da sociedade chamando a atenção dos governos para políticas que tratem do ser humano como um ser integral.

(...) “Envolvem, além do setor saúde, todos os setores e aspectos correlatos do desenvolvimento nacional e comunitário, mormente a agricultura, a pecuária, a produção de alimentos, a indústria, a educação, a habitação, as obras públicas, as comunicações e outros setores.” (...) (DECLARAÇÃO DE ALMA-ATA, 1978).

O Brasil passou por um período em sua história em que foi essencialmente rural. As plantas, tanto exóticas como nativas, eram utilizadas no tratamento de diversas doenças. Hoje o mercado de medicamentos preparados de plantas medicinais e mesmo de princípios ativos extraídos de plantas, movimentam bilhões de dólares em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o uso de fitoterápicos recomendando a difusão do conhecimento para seu uso, e para corresponder a esta recomendação da OMS se faz necessário a capacitação das universidades e dos centros de pesquisa para atender esta demanda e validar o conhecimento popular de diversas etnias tornando o uso dos fitoterápicos seguro. O Sistema Único de Saúde (SUS) elaborou diversas portarias para introduzir o uso dos fitoterápicos e outras terapias no sistema para torná-las acessíveis a população. (A FITOTERAPIA NO SUS E O PROGRAMA DE PESQUISAS DE PLANTAS MEDICINAIS DA CENTRAL DE MEDICAMENTOS, 2006).

A atenção primária veterinária encaixa-se neste contexto, buscando soluções através da validação do uso popular das plantas medicinais, para torná-lo seguro como pede a OMS e torná-lo acessível à população.

O araçazeiro, a goiabeira e a pitangueira são árvores frutíferas nativas do Rio Grande do Sul e tem sua indicação etnográfica para o tratamento de diarreia. Com este trabalho buscamos validar o conhecimento popular de plantas da família Myrtaceae, baseados no seu uso popular.

#### **OBJETIVO:**

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas da família Myrtaceae frente a *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis.*, *Staphylococcus aureus* e seu efeito sobre motilidade intestinal através de modelo biológico em ratos cepa UFPel.

#### **HIPÓTESE**

Os extratos das folhas das plantas araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine), pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e goiabeira (*Psidium guajava* L.) apresentam atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e o extrato de araçá têm efeito no acúmulo de líquidos no intestino de ratos Wistar cepa UFPel.

## PROJETO DE PESQUISA

### ATENÇÃO PRIMÁRIA VETERINÁRIA: USO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE PLANTAS DA FAMÍLIA *Myrtaceae* NO TRATAMENTO DE DIARRÉIA

#### JUSTIFICATIVA

O uso de plantas medicinais confunde-se com a história do homem, com fortes indícios de seu manuseio desde o homem primitivo. As plantas medicinais são amplamente utilizadas em todo o mundo para o tratamento e prevenção de doenças, não só no homem, mas também nos animais. No Brasil 20% da população consome 63% de todos os medicamentos sintéticos fabricados, sendo que o restante da população lança mão principalmente de plantas medicinais como alternativa terapêutica (SIMÕES, et al. 2004).

Segundo a Declaração de Alma-Ata (1978) a atenção primária, entre outros aspectos, constitui os primeiros cuidados de saúde baseados em métodos e práticas embasados cientificamente e que envolvem diversos setores da sociedade, como agricultura, pecuária, educação e etc. Dentro deste contexto se faz prioridade que o uso de plantas com finalidade medicinal tenha suas propriedades e toxicidade verificados para tornar o uso, já tão arraigado nas comunidades, seguro e que este processo possa ser extrapolado para a produção animal.

O mercado de fitoterápicos no país cresce a taxa de 15% ao ano, demonstrando um maior uso das plantas medicinais. Com o aumento da utilização surge a necessidade da realização de estudos aprofundados sobre as indicações terapêuticas, as formas de atuação e toxicidade destes fitoterápicos. A crescente demanda por espécies medicinais pela população indica o surgimento de um mercado com alto potencial de consumo, necessitando de matéria prima de alta qualidade, com oferta regular e de fácil disponibilidade. Também nas produções animais os fitoterápicos podem ser amplamente utilizados na prevenção e controle de doenças. Na Europa as fortes pressões da sociedade levaram a promulgação de leis que respeitam o bem-estar animal e proíbem o uso de antibióticos como promotores de crescimento, buscando criações que resultem num produto isento de resíduos químicos e que sejam ecologicamente sustentáveis.

A diarreia é a principal causa de mortalidade em animais de produção recém-nascidos, sendo uma das mais importantes causas de baixa produtividade nas criações animais, principalmente em suínos, ovinos e bovinos.

Trabalhos empíricos tem se tornado base para pesquisas científicas quanto ao uso popular das plantas como medicinais. Alguns estudos comprovam o efeito antimicrobiano e antidiarréico de plantas da família Myrtaceae.

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma planta amplamente distribuída no território nacional e bem adaptada. O seu cultivo para venda de frutos “*in natura*” e a industrialização com produção de polpa e de goiabada é conhecida. Outras utilidades da goiaba tem sido exploradas, como a produção de variados doces e farinha com alto potencial nutricional (BERNARDINO-NICANOR et al. 2005).

Salix e Rodrigues (2004), em um experimento envolvendo 100 pessoas com diarreia aguda demonstraram que a tintura de folhas de goiabeira a 20% curou clinicamente 92% dos pacientes em 72 horas.

Chah et al., (2006) relataram efeito antibacteriano de extratos metanólicos da goiabeira frente a diversas espécies bacterianas, entre elas a *Escherichia coli*, principal bactéria causadora de diarreia em recém-nascidos. Da mesma forma, Voravuthikunchai et al., (2004) demonstrou efeito anti *E. coli* dos extratos alcoólico e aquoso de folhas da planta. Ação antibacteriana frente a agentes de outras enfermidades também são encontradas na literatura como para *Propionibacterium acne* e outros microorganismos causadores de acne (QADAN et al., 2005). A ação antirotavirus foi demonstrado em extratos de *P. guajava* L. em concentrações muito baixas (8 µg/mL) (GONÇALVES et al., 2005).

Almeida et al. (1995) observou um aumento na reabsorção de água do intestino e na redução da propulsão do trânsito de alimentos no intestino. A quercetina, principal flavanóide constituinte da folha de goiabeira, apresenta efeito anti-propulsor do trânsito intestinal e reduz a permeabilidade dos capilares abdominais (ZHANG et al., 2003). Também, a atividade antiinflamatória tem sido demonstrada (SCHAPOVAL et al., 1994).

O araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine), pertence à família Myrtaceae, nativo no Brasil, é encontrado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. Esta planta é uma das fruteiras nativas mais abundantes no Rio Grande do Sul, tendo grandes perspectivas de cultivo econômico. O Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima

Temperado (CPACT/EMBRAPA), Pelotas/RS há vários anos desenvolve pesquisas com esta espécie produzindo novas tecnologias de produção e novas variedades. Souza et al. (2004), comprovaram a atividade antibacteriana do araçazeiro. Brito et al. (2002), demonstraram a inibição do crescimento “in vitro”, por decocto de folhas do araçazeiro de mais de 90% de 20 cepas de *S. aureus* e 20 cepas de *C. Bovis* isoladas de mastite bovina. Sua ação hipotensiva foi descrita em camundongos (CONSOLINI et al., 1999; CONSOLINI E SARUBBIO, 2002). Taninos com ação inibidora da polimerase do vírus Epstein-Barr estão presente nas folhas do araçazeiro (LEE et al., 2000).

A Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) pertence à família Myrtaceae, seus frutos são muito apreciados e seu chá é utilizado em medicina popular como hipotensor, antigota, em distúrbios estomacais e hipoglicemiante (AURICCHIO e BACHI, 2003). No Rio Grande do Sul, é bastante utilizado popularmente como anti-diarréico. No Brasil a *Eugenia uniflora* pode ser encontrada em Goiás, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os extratos das folhas apresentam uma forte atividade antimicrobiana, atuando frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos (LIMA et al.; 2003; HOLETZ et al. 2002).

## **OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de extratos da plantas da família Myrtaceae frente a microrganismos que causam diarreia e seu efeito sobre motilidade intestinal através de modelo biológico em ratos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos das plantas frente a microrganismos que causam diarreia;
- Comparar a atividade antimicrobiana entre os extratos preparados com as plantas colhidas em diferentes épocas do ano.
- Comparar diferentes formas de extração quanto à atividade antimicrobiana e rendimento.
- Avaliar o efeito sobre a motilidade e acúmulo de líquido intestinal em modelo biológico.

## **HIPÓTESE**

Os extratos das folhas das plantas araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine), pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e goiabeira (*Psidium guajava* L.) apresentam atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e o extrato de araçá têm efeito no acúmulo de líquidos no intestino de ratos Wistar cepa UFPel.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1- COLHEITA DO MATERIAL**

Serão colhidas amostras de folhas de goiabeira, pitangueira e araçazeiro em pequenas propriedades da região e do assentamento da reforma agrária (Cooperativa de Produção Agropecuária Vista Alegre), Município de Piratini (31°39'41"S; 53°03'49"O), em três fases fenológicas das plantas no repouso, durante a floração e frutificação.

### **2- SECAGEM DAS AMOSTRAS**

As amostras das folhas serão secas em local apropriado à temperatura ambiente protegidos do sol, da chuva e de insetos, até atingirem teor de água inferior a 10%.

### **3- EXTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS**

Serão utilizadas duas formas de extração dos constituintes farmacológicos das plantas.

#### **Extrato hidroalcoólico (EHA):**

O EHA das plantas serão preparados utilizando-se uma parte da planta seca para dez partes de álcool de cereais a 70° GL. A planta permanecerá em maceração por 15 dias e os frascos serão agitados três vezes por dia durante este período (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988), quando será filtrado, repostado o volume inicial com o álcool e armazenado em frasco âmbar até o seu uso. Após, o solvente será extraído utilizando-se evaporador rotativo a 55°C sob 600 mm/hg de pressão negativa. Após a retirada do álcool o volume inicial será restituído com água destilada estéril e utilizado para avaliação em no máximo 24 horas.

**Extração do óleo:**

A extração dos óleos essenciais será feita por arraste de vapor com aparelho tipo Clevenger (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988) modificado (Rodrigues, 2002). O material a ser extraído será colocado em um balão de vidro, com água destilada estéril na proporção de 100g de planta para 500 mL de água destilada estéril, e através da ebulição, uma corrente de vapor de água retirará o óleo.

**4- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Será avaliada a atividade antimicrobiana dos diferentes extratos obtidos frente a três microrganismos: *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium* e *Staphylococcus aureus* e comparados os extratos obtidos em diferentes época do ano, através da técnica de diluição em caldo com determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos (Schuch, 2008). Os inóculos serão preparados contendo  $10^6$  UFC/mL de cada microrganismo. Os extratos serão diluídos em base logarítmica dois em água destilada estéril e com tantas diluições quanto o suficiente para detecção da CIM. Igual volume (100µL) de cada diluição do extrato em água estéril e de inóculo preparado em meio de cultura à 2 vezes a concentração indicada pelo fabricante, serão confrontados em uma microplaca de 96 orifícios, sob temperatura de 37°C por 48 horas. Controles positivos e negativos contendo meio de cultura e microrganismo e meio de cultura e extrato, serão mantidos. O crescimento microbiano será observado através da verificação de turbidez nos poços em contraste com os controles, e a CBM pela recíproca da diluição onde não for possível recuperar microrganismos em subcultivo de uma alíquota de cada orifício testado. Controles serão realizados: positivo através da utilização de um antimicrobiano reconhecidamente ativo contra os microrganismos teste; de esterilidade do extrato cultivando uma alíquota do extrato em agar sangue; e de crescimento dos microrganismos preenchendo orifícios com meio de cultura e inóculo.

**5- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARRÉICA DOS EXTRATOS**

Todos os experimentos que utilizarão animais para pesquisa seguirão os protocolos do COBEA com mínimo sofrimento aos animais. Este projeto será submetido ao comitê de ética e experimentação animal da UFPel.

### **5.1-Indução de diarreia com óleo de castor:**

Para este experimento serão utilizados grupos de seis animais, jejuados por 18h antes da realização do experimento. Cada grupo de animais receberá extratos da planta em três doses diferentes. Serão utilizados grupos controle positivo, tratado com loperamida (5mg/kg de peso, v.o), e negativo que receberá diluente.

A diarreia será induzida através da administração de óleo de castor a todos os animais, que permanecerão em gaiolas forradas com papel filtro de peso conhecido e avaliados por 6h. Os parâmetros que serão avaliados neste experimento serão: número de gotas de diarreia; quantidade de fezes em grama (diferença de peso do papel filtro em gramas antes e depois do período experimental); conteúdo de água nas fezes (diferença de peso em gramas do papel filtro antes e depois de submetido a secagem em estufa bacteriológica) e número de defecações.

### **5.2-Teste de acúmulo de líquido no intestino delgado:**

Neste teste serão utilizados grupos de seis camundongos lactentes para cada extrato que será testado. Três grupos receberão extratos em doses progressivas. O controle positivo será tratado com loperamida (5mg/kg de peso vivo, v.o.) e o controle negativo com o solvente dos extratos diluído em salina normal. A diarreia será induzida pela inoculação intragástrica de toxina STa de *E. coli* logo após a administração dos extratos. Após 30 minutos, os animais serão sacrificados e o intestino ligado do piloro ao ceco. Então, este será dissecado, pesado e o índice de diarreia estabelecido pela razão entre peso do intestino e peso corpóreo. Ainda, o líquido intestinal será recuperado com uma seringa e mensurado em ml. (Nwafor & Basse, 2007).

### **5.3-Teste de motilidade intestinal:**

Também para o teste de motilidade intestinal serão utilizados grupos de seis animais. Três grupos receberão doses progressivas de extrato. Da mesma forma que nos testes anteriores, o controle positivo será feito com loperamida e o controle negativo com veículo. Após 1 hora da administração do tratamento, será

administrado uma solução de carvão ativado a 10% em goma acácia a 5% na dose de 0,3ml por rato.

Trinta minutos depois os animais serão sacrificados, seus intestinos serão dessecados e a distância de migração do carvão a partir do piloro será medida em milímetros. O resultado será expresso como a percentagem de migração em comparação a extensão total do intestino delgado do camundongo (POONIA et al, 2007).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Almeida CE, Karnikowski MG, Foletto R, Baldisserotto B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Rev Saude Publica*. 29(6):428-33, 1995.
- Auricchio, M.T. e Bacchi, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L.(Pitanga): Propriedades farmacobotânicas , químicas e farmacológicas. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. v.62(1): 55-61, 2003.
- Bernardino-Nicanor A, Anon MC, Scilingo AA, Davila-Ortiz G. Functional properties of guava seed glutelins. *J Agric Food Chem*. 4;53(9):3613-7,2005.
- Brito, D. C., Zani, J.L., Schuch, L., Schramm, R. C. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre agentes causadores de mastite bovina. XI Congresso De Iniciação Científica. Ufpel/Furg/Ucpel, 2002.
- Chah KF, Eze CA, Emuelosi CE, Esimone CO. *J Ethnopharmacol*. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. 8;104(1-2):164-7, 2006.
- Consolini AE, Baldini OA, Amat AG. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *J Ethnopharmacol*. 66(1):33-9, 1999.
- Consolini AE e Sarubbio MG. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *J Ethnopharmacol*. 81(1):57-63, 2002.
- Da Silva, P.L. Potencialidades e limites na produção de leite ecológico na Cooperativa de Produção Agropecuária Vista Alegre Piratini Ltda (COOPAVA). Monografia apresentada para conclusão do CURSO DE ENSINO MÉDIO NA MODALIDADE DE EDUCAÇÃO JOVENS E ADULTOS, INSTITUTO DE EDUCAÇÃO JOSUÉ DE CASTRO, sob orientação da Eng<sup>a</sup>. Agr. Rosemari B. Olanda e do M.V. Luiz Filipe Damé Schuch, Viamão-RS, 2005, 17 p.
- Declaração de Alma-Ata. Conferência Internacional Sobre Cuidados Primários de Saúde, Alma-Ata, URSS. 1978. <http://www.opas.org.br/coletiva/uploadArq/Alma-Ata.pdf> Acesso em: 28/07/2008.

Farias, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p. 263-288.

Farias, N.A.R.; Dos Santos, T.R.B.; Schuch, L.S.D. Relatório de projeto de pesquisa “ Implantação de Novas Tecnologias para produção de Leite Ecológico”. Proc.nº00/2648.5, FAPERGS, Porto Alegre-RS.2003

Farmacopéia Brasileira, ed. Atheneu (S. Paulo), 4º ed., v.1, 1988.

Goncalves JL, Lopes RC, Oliveira DB, Costa SS, Miranda MM, Romanos MT, Santos NS, Wigg MD. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. J Ethnopharmacol. 14;99(3):403-7,2005.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97(7):1027-31, 2002.

Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J.; Nychas, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, v.91, 453-462, 2001.

Lee MH, Chiou JF, Yen KY, Yang LL. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. Cancer Lett. 30;154(2):131-6, 2000.

Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM, Paulo MQ. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. Mycoses. 36(9-10):333-6, 1993.

Manohar, V.; Ingram, C.; Gray, J.; Talpur, N.A.; Echard, B.W.; Bagchi, D.; Preuss, H.G. Antifungal activities of origanum oil against *Cândida albicans*. Molecular and Cellular Biochemistry 228: 111-117, 2001.

Martins, P. M. Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2000, 77p.

Poonia, B.S., Sasmal, D., Mazumdar, P.M. Anti-diarrheal activity of methanol extract of *Listea polyantha* bark in mice. *Fototerapia* 78: 171-174, 2007.

Qadan F, Thewaini AJ, Ali DA, Afifi R, Elkhawad A, Matalaka KZ. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. *Am J Chin Med.* 33(2):197-204, 2005.

RODRIGUES, M.R.A. Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.

Schapoal EE, Silveira SM, Miranda ML, Alice CB, Henriques AT. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *J Ethnopharmacol.* 44(3):137-42, 1994.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, g.; Mello, J.C.P.; Mentz, I.a.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.* Ed. da UFRGS/ed. da UFSC, Porto Alegre, RS/Florianópolis, SC, 2004, p.1002.

Souza GC, Haas AP, von Poser GL, Schapoal EE, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 90(1):135-43, 2004.

Salix, C.E.E. e Rodriguez, F.J.M. Tintura de hojas de *Psidium Guajava* L. en pacientes com diarrea aguda simple. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 9, n. 3, 2004.

Teke, G.N., Kuate, J.R., Ngouateu, O.B., Gatsing, D. Antidiarrhoeal and antimicrobial activities of *Emilia coccinea* (Sims) G. Don extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 112: 278-283, 2007.

Voravuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S, Supawita T Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Ethnopharmacol.* 94(1):49-54, 2004.

Zhang WJ, Chen BT, Wang CY, Zhu QH, Mo ZX. Mechanism of quercetin as an antidiarrheal agent. *Jour Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 23(10):1029-31, 2003.

## **ARTIGO 1**

**TÍTULO: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS DA FAMÍLIA MYTACEAE  
EM TRÊS FASES FENOLÓGICAS**

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS DA FAMÍLIA MYRTACEAE EM TRÊS FASES FENOLÓGICAS

PRESTES, L.S.; SCHUCH, L.F.D.; OYARZABAL, M.E.B. COIMBRA,  
H.S.; MEIRELES, M.C.A., GARCIA, E.N.; SCHIAVON, D.A.B.

### RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Algumas das plantas da família Myrtaceae tem seu uso popular como medicinais na cultura mundial.

**OBJETIVO:** testar a atividade antimicrobiana de extratos das folhas das plantas goiabeira (*Psidium guajava* L.), pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) colhidas em diferentes fases fenológicas, preparadas frescas ou secas, frente a *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*.

**MÉTODOS:** Foram produzidos 18 extratos hidralcoólicos das folhas frescas e secas de goiabeira, araçazeiro e pitangueira colhidas na fase de floração, frutificação e repouso. Estes extratos foram avaliados através do teste de microdiluição em caldo onde foram consideradas as diluições que apresentaram ação bactericida nos microrganismos testados.

**RESULTADOS:** Todos os extratos apresentaram ação frente ao *S. aureus* e todas as plantas apresentaram ação sobre *E. coli* e *S. typhimurium*. Houve diferença de atividade dos extratos quanto ao modo de preparo do extrato (folha seca x folha fresca), mas não com relação a época do ano em que as folhas foram colhidas. Ressalta-se que foram encontradas diferenças na atividade antimicrobiana quanto à época de colheita das folhas.

**Palavras-chaves:** Myrtaceae, extratos hidroalcoólicos, fases fenológicas.

## INTRODUÇÃO

Alguns estudos comprovam o efeito antimicrobiano e antidiarréico de plantas da família Myrtaceae. A *Psidium guajava* L. (goiabeira) é uma árvore frutífera de copa aberta, de até 7m de altura, nativa da América do Sul, desde a Venezuela até o Rio de Janeiro e cultivada em todo o país. É utilizada de forma caseira no tratamento de diarreia na infância, bochechos e gargarejos com o chá têm seu uso descrito nos casos de inflamações da boca e garganta (LORENZI e MATOS, 2008).

Almeida et al. (1995) observou um aumento na reabsorção de água do intestino e na redução da propulsão do trânsito de alimentos no intestino. A quercetina, principal flavonóide constituinte da folha de goiabeira, apresenta efeito anti-propulsor do trânsito intestinal e reduz a permeabilidade dos capilares abdominais (ZHANG et al., 2003).

A *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) tem em seu uso caseiro propriedades consideradas excitante, febrífuga, aromática, anti-reumática e antidisintérica, é rica flavonóides e taninos (LORENZI e MATOS, 2008). É bem distribuída no território brasileiro, alguns autores demonstraram a ação analgésica e a diminuição no trânsito intestinal. Seus óleos essenciais tiveram seu efeito antimicrobiano testado frente a diversas bactérias e fungos como *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes* (AURICCHIO e BACCHI, 2003).

O óleo essencial de araçá foi caracterizado quimicamente por Paroul et al (2009) e foi identificados sesquiterpenos como componentes majoritários e além disso, encontrou importante atividade antimicrobiana o seu melhor resultado com o método de difusão em Agar foi frente ao *Proteus vulgaris*.

O objetivo do presente trabalho foi analisar a atividade antimicrobiana e a presença de extratos de hidralcoólicos de três plantas da família Myrtaceae.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

**Colheita do material:** foram colhidas folhas de três espécimes das pequenas propriedades da região e do assentamento da reforma agrária (Cooperativa de Produção Agropecuária Vista Alegre), Município de Piratini estado do Rio Grande do Sul-Brasil (31<sup>o</sup>39'13"S; 53<sup>o</sup>03'39"O; altitude 211m), durante o inverno, a floração e a fase de frutificação. A identificação botânica foi realizada pela Dra. Élen Nunes Garcia e as exsicatas foram depositadas no herbário do Instituto de botânica da Universidade federal de Pelotas e identificadas, a goiabeira (*Psidium guajava* L.-Voucher nº PEL 24598), a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.-Voucher nº PEL: 24595) e araçazeiro (*Psidium cattleianum* –Voucher nº PEL é 24599). As amostras das folhas foram secas em bandejas de madeira com fundo telado à temperatura ambiente protegidos do sol, da chuva e de insetos durante o tempo aproximado de 10 e 15 dias.

**Extrato hidroalcoólico (EHA):** foram preparados 18 EHAs de folhas frescas e secas de cada colheita de folhas nas fases fenológicas. Os EHAs foram preparados na proporção de uma parte folhas secas para dez partes de álcool de cereais a 70° GL , durante 15 dias, com agitação diária. Posteriormente, foram filtrados em gaze com oito dobras, volume inicial repostado e armazenadas em geladeira até seu uso (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; PRESTES, et al., 2008).

**Atividade antimicrobiana:** foi avaliada a atividade antimicrobiana dos EHA obtidos frente a três microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) através da técnica de microdiluição em caldo com determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos (SCHUCH, 2008). Os inóculos das bactérias foram preparados

contendo  $10^6$  UFC/mL. Os extratos foram diluídos em base dois partindo de 50% na microplaca até 3,65%. Os inóculos e as diluições dos extratos foram confrontados em microplaca de 96 orifícios, sob temperatura de 37°C por 48 horas. Controles positivos (água destilada estéril e inóculo) e negativos (dos extratos) foram mantidos. Os testes foram feitos em quadruplicatas e a CBM foi estabelecida pela média geométrica das recíprocas das diluições dos extratos onde não foi possível recuperar microrganismos em subcultivo em Agar cérebro-coração de uma alíquota de cada orifício testado. A análise estatística foi realizada utilizando o teste estatístico de Wilcoxon (Statistix 8.0).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as plantas apresentaram atividade frente aos microrganismos testados (Tabela 1). Houve CBM menor de todos os extratos frente a *Staphylococcus aureus*, do que frente a *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* ( $p=0,0002$ ) e dos extratos preparados com as folhas secas, por apresentarem menor concentração de água nas folhas, em relação ao preparado de folhas frescas ( $p=0,0037$ ). É importante ressaltar a ação das plantas sobre as bactérias Gram negativas principalmente sobre a *Salmonella typhimurium*, reforçando a informação etnográfica de uso destas plantas no tratamento de diarreia.

A concentração mínima em que os extratos demonstraram atividade bactericida (CBM) foi calculada através de uma média geométrica entre quatro repetições. O melhor resultado do extrato das folhas frente ao *S. aureus* foi o preparado com as folhas frescas de goiabeira colhidos durante a época de floração com média de 3,125% entre as quadruplicatas. Frente a *S. typhimurium* as três plantas conseguiram atividade bactericida na concentração de 25% com os extratos colhidos na época de frutificação e folha seca (araçazeiro e pitangueira) e durante o

repouso com folha fresca e seca de goiabeira. Frente a *E. coli*, a Concentração Bactericida Mínima foi de 25% com o extrato de folha de pitangueira seca colhida no repouso, de folha seca araçazeiro colhida na época de frutificação e de goiabeira colhida no repouso e seca antes do preparo. Lin, et al. (2002) demonstraram a atividade inibitória significativa do extrato metanólico das folhas secas de goiabeira, através do método de difusão em disco, contra dois isolados de *Salmonella* spp e dois isolados de *E. coli*. O óleo essencial de araçá foi avaliado através da difusão em disco, e produziu atividade inibitória frente a bactérias Gram positivas e negativas (Paroul, et al.,2009). Coelho de Souza, et al. (2004) através do método de difusão em disco, demonstram atividade antimicrobiana do extrato metanólico de pitangueira frente a *S. aureus*, mas *E. coli* foi considerado resistente, e o extrato metanólico de araçá não foi efetivo frente a nenhum destes microrganismo.

## **CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos é possível afirmar que a maior atividade antibacteriana do extrato de *E. uniflora* L. foi aquela obtida de folha seca durante a floração ou a frutificação, de *P. cattleyanum* Sabine obtido de folha seca colhido na frutificação e de *P. guajava* L. de folhas secas colhidas durante a fase de repouso.

**TABELA 1:** Concentração Bactericida Mínima de extratos hidroalóolicos das plantas da família *Myrtaceae* (*Eugenia uniflora* L., *Psidium cattleianum* Sabine e *Psidium guajava* L.) frente a bactérias *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600)

	Microrganismo	Repouso folha Seca	Repouso folha fresca	Floração folha seca	Floração folha fresca	Frutificação folha seca	Frutificação folha fresca
<b><i>Eugenia uniflora</i> L. (Pitangueira)</b>	<i>E. coli</i>	100	25	50	100	50	100
	<i>S. aureus</i>	12,5	50	6,25	50	12,5	50
	<i>S. typhimurium</i>	100	50	50	70,7	25	100
<b><i>Psidium cattleianum</i> Sabine (Araçazeiro)</b>	<i>E. coli</i>	70,7	59,5	50	70,7	25	100
	<i>S. aureus</i>	6,25	84,1	25	25	6,25	3,125
	<i>S. typhimurium</i>	50	70,7	50	70,7	25	100
<b><i>Psidium guajava</i> L. (Goiabeira)</b>	<i>E. coli</i>	25	35,36	100	100	50	100
	<i>S. aureus</i>	6,25	21,02	6,25	3,125	12,5	50
	<i>S. typhimurium</i>	25	25	100	100	100	100

Padrão expresso em mL/100mL, 100-sem efeito bactericida

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida CE, Karnikowski MG, Foletto R, Baldisserotto B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Rev Saude Publica.** 29(6):428-33,1995.
- Auricchio, M.T. e Bacchi, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L.(Pitanga): Propriedades farmacobotânicas , químicas e farmacológicas. **Revista Instituto Adolfo Lutz.** v.62(1): 55-61, 2003.
- Bernardino-Nicanor A, Anon MC, Scilingo AA, Davila-Ortiz G. Functional properties of guava seed glutelins. **J Agric Food Chem.** 4;53(9):3613-7, 2005.
- Brito, D. C., Zani, J.L., Schuch, L., Schramm, R. C. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre agentes causadores de mastite bovina. XI **Congresso de Iniciação Científica.** Ufpel/Furg/Ucpel, 2002.
- Chah KF, Eze CA, Emuelosi CE, Esimone CO. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **J Ethnopharmacol.** 8;104(1-2):164-7, 2006.
- Consolini AE, Baldini OA, Amat AG. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **J Ethnopharmacol.** 66(1):33-9, 1999.
- Consolini AE e Sarubbio MG. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **J Ethnopharmacol.** 81(1):57-63, 2002.
- Da Silva, P.L. Potencialidades e limites na produção de leite ecológico na Cooperativa de Produção Agropecuária Vista Alegre Piratini Ltda (COOPAVA). Monografia apresentada para conclusão do CURSO DE ENSINO MÉDIO NA MODALIDADE DE EDUCAÇÃO JOVENS E ADULTOS, INSTITUTO DE EDUCAÇÃO JOSUÉ DE CASTRO, sob orientação da Eng<sup>a</sup>. Agr. Rosemari B. Olanda e do M.V. Luiz Filipe Damé Schuch, Viamão-RS, 2005. 17 p

Declaração de Alma-Ata. Conferência Internacional Sobre Cuidados Primários de Saúde, Alma-Ata, URSS. 1978. Disponível em: <http://www.opas.org.br/coletiva/uploadArq/Alma-Ata.pdf> Acesso em: 28/07/2008.

Farias, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p. 263-288.

Farias, N.A.R.; Dos Santos, T.R.B.; Schuch, L.S.D. Relatório de projeto de pesquisa “ Implantação de Novas Tecnologias para produção de Leite Ecológico”. Proc.nº00/2648.5, FAPERGS, Porto Alegre-RS, 2003.

Farmacopéia Brasileira, ed. Atheneu (S. Paulo), 4º ed., v.1, 1988.

Goncalves JL, Lopes RC, Oliveira DB, Costa SS, Miranda MM, Romanos MT, Santos NS, Wigg MD. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **J Ethnopharmacol.** 14;99(3):403-7, 2005.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 97(7):1027-31, 2002.

Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J.; Nychas, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, 453-462, 2001.

Lee MH, Chiou JF, Yen KY, Yang LL. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Lett.** 30;154(2):131-6, 2000.

Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM, Paulo MQ. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses.** 36(9-10):333-6, 1993.

Manohar, V.; Ingram, C.; Gray, J.; Talpur, N.A.; Echard, B.W.; Bagchi, D.; Preuss, H.G. Antifungal activities of origanum oil against *Cândida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry** 228, 111-117, 2001.

Martins, P. M. Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*

(D.C.) Stapf). 2000. 77f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.

Poonia, B.S., Sasmal, D., Mazumdar, P.M. Anti-diarrheal activity of methanol extract of *Listea polyantha* bark in mice. **Fitoterapia** 78: 171-174, 2007.

Qadan F, Thewaini AJ, Ali DA, Afifi R, Elkhawad A, Matalka KZ. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. **Am J Chin Med.** 33(2):197-204, 2005.

RODRIGUES, M.R.A. Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.

Schapoal EE, Silveira SM, Miranda ML, Alice CB, Henriques AT. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **J Ethnopharmacol.** 44(3):137-42,1994.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, g.; Mello,J.C.P.; Mentz, I.a.; Petrovick, P.R. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Ed. da UFRGS/ed. da UFSC, Porto Alegre, RS/Florianópolis, SC, 2004, p.1002.

Souza GC, Haas AP, von Poser GL, Schapoal EE, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J Ethnopharmacol.** 90(1):135-43, 2004.

Salix, C.E.E. e Rodriguez, F.J.M. Tintura de hojas de *Psidium Guajava* L. en pacientes com diarrea aguda simple. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 9, n. 3, 2004.

Teke, G.N., Kuate, J.R., Ngouateu, O.B., Gatsing, D. Antidiarrhoeal and antimicrobial activities of *Emilia coccinea* (Sims) G. Don extracts. **J. Ethnopharmacol.** 112: 278-283, 2007.

Voravuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S, Supawita T Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J Ethnopharmacol.** 2004 Sep;94(1):49-54.

Zhang WJ, Chen BT, Wang CY, Zhu QH, Mo ZX. Mechanism of quercetin as an antidiarrheal agent. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.** 23(10):1029-31, 2003.

## **ARTIGO 2**

**Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá.**

**Artigo enviado para a Revista Cubana de Plantas Medicinales e formatado de acordo com as normas da revista.**

Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária

**Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá.**

Luciana de Souza Prestes<sup>1\*</sup>, Luiz Filipe Damé Schuch<sup>2</sup>, Gabriela Hörnke Alves<sup>3</sup>, Marco Aurélio Ziemann dos Santos<sup>4</sup>; Maria Regina Alves Rodrigues<sup>5</sup>, Mario Carlos Araújo Meireles<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Master en Ciencias. Dirección: Departamento de Veterinaria Preventiva, Facultad de Veterinaria, Universidad Federal de Pelotas (UFPel) Campus universitario s/n, CEP 96010900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: [lprestes.mv@hotmail.com](mailto:lprestes.mv@hotmail.com). Autor para correspondencia.

<sup>2</sup> Codiretor - Departamento de Veterinaria Preventiva, Facultad de Veterinaria, Universidad Federal de Pelotas (UFPel) responsable por los análisis estadísticos.

<sup>3</sup> Practicante del Laboratorio de de oleoquímicos y biodiesel del Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química e Geociências, UFPel, Pelotas, RS, Brasil

<sup>4</sup> Técnico en cromatografía del Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química e Geociências, UFPel, Pelotas, RS, Brasil

<sup>5</sup> Codiretora - Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química e Geociências, UFPel, Pelotas, RS, Brasil, responsable por los análisis de los resultados de la cromatografía.

<sup>6</sup> Diretor- Departamento de Veterinaria Preventiva, Facultad de Veterinaria, Universidad Federal de Pelotas (UFPel)

---

\* Este trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor.

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** El guayabo, el pitango y el arazá son árboles fructíferos, nativos de América del Sur. El té de sus hojas es utilizado popularmente en el tratamiento de la diarrea.

**OBJETIVO:** evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites de las hojas *Psidium guajava* L., *Eugenia uniflora* L. y *Psidium cattleianum* Sabine y sus constituyentes.

**MÉTODOS:** Los aceites esenciales fueron extraídos con un aparato tipo Clevenger modificado. El análisis de los aceites esenciales fue realizado en cromatógrafo (GC/MS). Fue evaluada la actividad antimicrobiana de los aceites obtenidos frente a *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, a través de la técnica de microdilución en caldo con determinación de la Concentración Bactericida Mínima del aceite.

**RESULTADOS:** El aceite del guayabo presentó actividad bactericida frente a *E.coli* en la concentración de 2% y de 8% frente al *S.aureus* y *S. typhimurium*. El aceite de arazá no presentó actividad bactericida frente a los microorganismos testados y el aceite de pitango presentó actividad bactericida en la concentración de 8% frente al *S.aureus* y *S. typhimurium*. Los constituyentes principales encontrados en común en los aceites de las tres plantas fueron el  $\alpha$ -Copaene y  $\alpha$ -Humulene.

**CONCLUSIÓN:** Los aceites presentaron actividad bactericida frente a los microorganismos testados y los constituyentes en ellos encontrados son compatibles con los encontrados en otros trabajos.

**Palabras claves:** Myrtaceae, aceites esenciales, actividad antimicrobiana, constituyentes

## INTRODUCCIÓN

La familia Myrtaceae contiene cerca de 100 géneros y 3.600 especies entre ellas están el pitango (*Eugenia uniflora* L), el arazá (*Psidium catteleyanum* Sabine) y el guayabo (*Psidium guajava* L.). La *Eugenia uniflora* L. (pitango) es bien distribuida en el territorio brasileño, algunos autores demostraron la acción analgésica y la disminución en el tránsito intestinal. Sus aceites esenciales tuvieron su efecto antimicrobiano testado frente a diversas bacterias y hongos como *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*<sup>2</sup>. El guayabo (*Psidium guajava* L.) es un arbolillo fructífero cultivado en todo el país para la producción de frutas. Es nativa de América del Sur y cultivada en diversos países tropicales. Es utilizado como planta medicinal en el tratamiento de diarreas en la infancia, en el tratamiento de inflamaciones de la boca y de la garganta<sup>3</sup>. El arazá (*Psidium cattleyanum* Sabine) es una planta nativa de Brasil, encontrada desde el estado de Minas Gerais hasta Rio Grande do Sul<sup>4</sup> utilizada, popularmente, en el tratamiento de diarrea<sup>5</sup>.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad bactericida de los aceites esenciales de las hojas del guayabo, arazá y pitango y comparar los constituyentes de estas plantas relacionándolos con los constituyentes ya identificados por otros autores.

## MÉTODOS

**Cosecha e identificación del material:** Fueron recogidas muestras de hojas de un espécimen de guayabo, de pitango y de arazá de las pequeñas propiedades de la región y del sitio de la reforma agraria (Cooperativa de Producción Agropecuaria Vista Alegre), Municipio de Piratini (4587E, 6070N, J22). La identificación botánica fue realizada por la Dra. Élen Nunes Garcia y una exsicata fue depositada en el

herbario del Instituto de Biología de la Universidad Federal de Pelotas bajo los números: *Psidium guajava* L.-Voucher nº PEL 24598, *Eugenia uniflora* L.-Voucher nº PEL: 24595 y *Psidium cattleianum* –Voucher nº PEL es 24599.

**Secamiento de las muestras:** Las hojas fueron secas en un conjunto de bandejas de madera con fondo de tela, con capacidad para 1Kg de hojas cada, en local apropiado a temperatura ambiente protegidos del sol, de la lluvia y de los insectos, hasta alcanzar teor de agua inferior a 10%.

**Extracción del aceite:** La extracción de los aceites esenciales fue hecho por arrastre de vapor con aparato tipo Clevenger modificado<sup>1</sup>. Las hojas secas fueron cortadas y colocadas en un globo de vidrio, en la proporción de 100g de planta para 500 mL de agua destilada estéril, y a través de la ebulición, una corriente de vapor de agua retiró el aceite.

**Análisis cromatográfica:** El análisis del aceite fue realizado en cromatográfico a gas acoplado al espectrómetro de masas-GC/MS (Shimadzu GC-MS QP 2010 Plus Rtx-5MS (30mX0,25µmX0,25mm) y la identificación de los compuestos por la biblioteca NIST05 del GC/MS, en el laboratorio de fitoquímica, del Instituto de Química Orgánica de la Universidad Federal de Pelotas, con el objetivo de caracterizar y comparar a algunos de los constituyentes de los aceites de las plantas.

**Actividad antimicrobiana:** Fue evaluada la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos frente a tres microorganismos: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), a través de la técnica de dilución en caldo con determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos<sup>6</sup>. Los inóculos de bacterias fueron preparados conteniendo 10<sup>6</sup> UFC/mL. Los aceites fueron diluidos en base

logarítmica dos en agua destilada estéril con 1% de tween 20 y con tantas diluciones suficientes para la detección de la CBM. Igual volumen (100 $\mu$ L) de cada dilución del extracto en agua estéril y de inóculo preparado en un medio de cultura a 2 veces la concentración indicada por el fabricante, fueron confrontados en una microplaca de 96 orificios, bajo temperatura de 37°C durante 48 horas para las bacterias. Controles positivos y negativos conteniendo medio de cultura y microorganismo y medio de cultura y aceite fueron mantenidos. El crecimiento microbiano a CBM por la recíproca de la dilución donde no fue posible recuperar microorganismos en subcultivo de una alícuota de cada orificio testado<sup>7</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis cromatográfico de los aceites fue realizado por CG/MS y los constituyentes identificados en cada aceite fueron comparados entre sí, para verificar las semejanzas entre estas especies de la familia Myrtaceae.(TABLA 1). Todas las plantas presentaron en común los contituyentes  $\alpha$ -Copaene y  $\alpha$ -Humulene. El arazá y el guayabo presentaron más constituyentes comunes entre sí que cuando comparados al pitango. No fueron encontrados trabajos sobre los constituyentes del aceite esencial de las hojas de arazá, sin embargo, identificamos algunos constituyentes que el aceite presenta en común con el guayabo y el pitango. Ogunwande et al.(2003)<sup>8</sup> en el aceite esencial de hojas de guayabo,se encontró el p-Cimene, Limonene, Terpinen-4-ol  $\alpha$ -Terpineol,  $\alpha$ -Copaene,  $\beta$ -Caryophyllene, Aromadendrene,  $\alpha$ -Humulene, Allo-aromadendrene,  $\gamma$ -Muurolene  $\beta$ -Selinene,  $\alpha$ -Selinene, Caryophyllene oxide y Viridiflorol.

El aceite esencial de las hojas de guayabo analizado por Lima et al.(2009)<sup>9</sup> presentó entre otros constituyentes el 1,8-Cineole,  $\alpha$ -Terpineol,  $\beta$ -Caryophyllene,  $\alpha$ -Humulene y  $\alpha$ -Selinene. Costa et al. (2009)<sup>10</sup> identificó Spathulenol y  $\beta$ -Elemene en

el aceite esencial de las hojas de pitango, también identificados en nuestro aceite. Sin embargo, el Caryophyllene oxide no fue encontrado por nosotros en el aceite de pitango, pero sí en los aceites de arazá y de guayabo. Gallucci et al. (2010)<sup>11</sup> identificó en el aceite esencial de las hojas de pitango el  $\alpha$ -Copaene,  $\beta$ -Elemene, Aromadendrene,  $\alpha$ -Humulene,  $\beta$ -Selinene,  $\alpha$ -Selinene, Ledol, y Spathulenol. El aceite de guayabo presentó actividad bactericida frente a *E.coli* en la concentración de 2% y de 8% frente al *S.aureus* y *S. typhimurium*. El aceite de arazá no presentó actividad bactericida frente a los microorganismos testados y el aceite de pitango presentó actividad bactericida en la concentración de 8% frente al *S.aureus* y *S. typhimurium* (TABLA 2). Gonçalves et al.(2008)<sup>12</sup> testó el aceite de guayabo frente a los mismos microorganismos, a través de la técnica de difusión en disco, y concluye que el aceite presentó importante actividad antimicrobiana frente al *S. aureus*. El aceite esencial de arazá fue evaluado a través de la difusión en disco, y produjo actividad inhibitoria frente a las bacterias Gram positivas y negativas<sup>13</sup>.

## **CONCLUSIÓN**

Los aceites esenciales de guayabo y de pitango presentan actividad bactericida importante y en bajas concentraciones y por eso deben continuar siendo observados y no descartadas otras formas de extracción de sus constituyentes. El hecho de que la especie de arazá del cual extraímos el aceite esencial no haya presentado actividad bactericida no descarta la posibilidad de que otras especies puedan presentar esta propiedad, ya que sabemos que la época del año, la altitud, tipo de suelo y muchos otros factores ambientales, influyen en la constitución de los aceites esenciales.

AGRADECIMIENTOS: CAPES, CNPq y FIOCRUZ.

**TABLA 1:** compuestos identificados en los aceites esenciales extraídos de las hojas de las plantas y comparados con los identificados por otros autores

Compuesto	Pitango	Arazá	Guayabo
Benzaldehyde			X
p-Cimene			X
Limonene			X
1,8-Cineole		X	X
$\beta$ -linalool		X	
Terpinen-4-ol		X	X
$\alpha$ -Terpineol		X	X
$\alpha$ -Copaene	X	X	X
$\beta$ -Elemene	X		
$\beta$ -Caryophyllene		X	X
Aromadendrene		X	
$\alpha$ -Humulene	X	X	X
Allo-aromadendrene	X		
$\gamma$ -Muurolene		X	
$\beta$ -Selinene	X		X
$\alpha$ -Selinene			X
Ledol	X		
Spathulenol	X		
Cis-nerolidol		X	
Trans-nerolidol			X
Caryophyllene oxide		X	X
Cubenol	X		X
Viridiflorol			X
$\beta$ -eudesmol		X	
$\Delta$ -cadinol		X	
7(11)-Selinen-4.alpha.-ol			X

**TABLA 2:** Resultado de la CBM de los aceites frente a los microorganismos testados

Microorganismo	<i>Psidium guajava</i> L.-	<i>Eugenia uniflora</i> L	<i>Psidium cattleyanum</i> Sabine
<b><i>S.aureus</i></b> <b>(ATCC 12600)</b>	8%	8%	N
<b><i>S. typhimurium</i></b> <b>(ATCC 14028)</b>	8%	8%	N
<b><i>E.coli</i></b> <b>(ATCC 8739)</b>	2%	N	N

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Simões, CMO, Schenkel, EP, Gosmnn, G, Mello, JCP, Mentz, LA, Petrovick, PR. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Ed. da UFRGS/ed. da UFSC, Porto Alegre, RS/Florianópolis, SC, 2004; p. 1002.
2. Auricchio, M.T., Bacchi, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 62(1): 55-61, 2003.
3. Lorenzi, H. e Matos, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas, Ed. Nova Odessa, S. P., 2º ed.,2008,544p.
4. Nachtigal, J.C.; Fachinello, J.C. Efeito de substratos e do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) Rev.Brás. de Agrociência, v.1, N°1, Jan.-Abr., 1995.
5. Ritter, M.R, Sobierajski, G.R., Schenkel, E.P., Mentz, LA. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia. v.12, n.2, p.51-62, jul.-dez. 2002.
6. Schuch, L.; Wiest, J.; Coimbra, H.; Prestes, L.; De Toni, L.; Lemos, J.Cinética da Atividade Antibacteriana in vitro de Extratos Naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. Ciência Animal Brasileira, Goiania, 9 3 04 2008.

7. Prestes, L. S.; Frascolla, R.V.; Santin, R.; Santos, M.A.Z.; Schramm, R.C.; Rodrigues, M.R.A. Schuch, L.F.D.; Meireles, M.C.A. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados com otitis externa. Rev. Cubana de Plantas Medicinales, v.13 (4), 2008. [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol13\\_4\\_08/pla03408.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol13_4_08/pla03408.htm) Acesso em: 16/06/09.
8. Ogunwande, I.A., Olawore, N.O., Adeleke, K.A., Ekudayo, O., Koenig, W.A. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. Flavour and Fragrance Journal. v.18, p. 136-138, 2003.
9. Lima, R.K, Cardoso, M.G., Santos, C.D., Moraes, J.C., Néri, D.K.P., Nascimento, E.A. Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Ciênc. agrotec. v.33, n.spe, p. 1777-1781, 2009.
10. Costa DP, Santos SC, Seraphinb JC, Ferri PH, Seasonal Variability of Essential Oils of *Eugenia uniflora* Leaves. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 20, No. 7, 1287-1293, 2009.
11. Gallucci S., Neto A.P., Porto C., Barbizan D., Costa I., Marques K., Benevides P., Figueiredo R. Essential Oil of *Eugenia uniflora* L. : an Industrial Perfumery Approach. **Journal of Essential Oil Research.** 22: 176-180, 2010.

12. Gonçalves FA., Andrade NM, Bezerra JNS., Macrae A, Sousa OV, Fonteles-Filho AA, Viera RHSF, Antibacterial activity of GUAVA, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from Seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). **Rev. Inst. Med. trop.** 50(1): 11-15, 2008.

13. Paroul, N. Mossi, A., Cansian, R. L., Emmerich, D., Faggion, A., Scoloski, E., Liotto, F.R., Rovani, A.S., Filla J., Munik, R. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Psidium cattleianum* (Araçá-do-campo). Disponível em: <http://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0507-1.pdf> Acesso em: 16/06/09.

### **ARTIGO 3**

**ATIVIDADE ANTIDIARRÉICA DE EXTRATOS DE ARAÇÁ (*Psidium catleyanum*  
Sabine)**

## **ATIVIDADE ANTIDIARRÉICA DE EXTRATOS DE ARAÇÁ (*Psidium catleyanum* Sabine)**

Luciana de Souza Prestes, Luiz Filipe Damé Schuch, Gabriela Olanda, Gilberto Antônio Perippolli Bevilaqua, Mario Carlos de Araujo Meireles

### **RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** O araçazeiro é uma árvore frutífera usada popularmente como antidiarréica.

**OBJETIVO:** Testar a atividade antidiarréica *in vivo* de dois tipos de extratos de folhas secas de araçá colhidas na fase de frutificação da planta.

**MÉTODO:** Foram preparados extratos hidroalcoólico e infuso das folhas de araçá secas e colhidas na fase de frutificação da planta. A atividade antidiarréica foi testada em ratos Wistar cepa UFPel utilizando-se diferentes concentrações do extrato através do teste de indução de diarreia com óleo de rícino.

**RESULTADOS:** O efeito de ambos extratos não diferiu do controle negativo (solução salina) nos parâmetros analisados.

**CONCLUSÃO:** Conclui-se que nas condições do experimento os extratos de araçá não tiveram ação na motilidade intestinal nem no acúmulo de líquidos no intestino.

**PALAVRAS-CHAVE:** atividade antidiarréica, *Psidium cattleyanum* Sabine, extrato hidroalcoólico, infuso, *in vivo*.

## INTRODUÇÃO

O araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) é uma das árvores frutíferas mais abundantes do Rio Grande do Sul pertencente a família Myrtaceae. Os seus frutos são ricos em vitamina C, são consumidos “in natura” ou na forma de doces e geléias. (Natchigal e Fachinello, 1995). Popularmente esta planta é usada no tratamento de diarreia (Ritter et al, 2002). Outras plantas da família Myrtaceae como a goiabeira e a pitangueira tem o seu uso popular descrito como antidiarréicas (Lorenzi e Matos, 2008). Da mesma forma a diarreia é a principal causa de mortalidade em animais de produção recém-nascidos, sendo uma das mais importantes causas de baixa produtividade nas criações animais, principalmente em suínos, ovinos e bovinos. Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antidiarréica em modelo experimental de dois preparados extrativos das folhas de araçá secas colhidas durante a fase de frutificação da planta.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Colheita do material:** foram colhidas amostras das folhas de araçazeiro “amarelo” (*Psidium cattleianum* Sabine) em área de cultivo da espécie (31<sup>0</sup>39’13”S; 53<sup>0</sup>03’39”O; altitude 211m), durante a fase de frutificação da planta. A identificação botânica foi realizada pela Dra. Élen Nunes Garcia e uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto de botânica da Universidade federal de Pelotas sob identificação e número: *Psidium cattleianum* Sabine –Voucher nº PEL 24599. As amostras das folhas foram secas em bandejas de madeira com fundo telado à temperatura ambiente protegidos do sol, da chuva e de insetos por um período de 15 dias.

### Preparo dos extratos

**Extrato hidroalcoólico (EHA):** o EHA das folhas secas e de araçá foi preparado utilizando-se uma parte das folhas para dez partes de álcool de cereais a 70° GL e este preparado foi agitado diariamente um período de 15 dias. Após, foi filtrado em gaze e armazenado em geladeira em temperatura abaixo de 8°C (Farmacopéia Brasileira, 1988; Prestes, et al, 2008)

**Infuso:** o infuso foi preparado na concentração de 10% de folhas secas e cortadas em pequenos pedaços, em água destilada estéril. A água foi fervida e vertida sobre as folhas e abafada por 10 min, o extrato foi filtrado, liofilizado e mantidos sob refrigeração até seu uso (Lorenzi, 2008).

### **Avaliação da atividade antidiarréica dos extratos**

Todos os experimentos que utilizam animais para pesquisa seguiram os protocolos do COBEA com mínimo sofrimento aos animais. Este projeto foi submetido ao comitê de ética e experimentação animal da UFPel (processo nº 23110. 005446/2009-25, CEEA 5446) e todos os procedimentos com os animais foram aprovados. Foram utilizados 30 fêmeas de Ratos albinos Wistar (cepa UFPel) com peso 120-180g e 20 dias de vida em cada experimento. Para homogeneização dos grupos teste obteve-se 5 animais além do necessário e os pesos extremos foram descartados.

#### **Indução de diarreia com óleo de rícino:**

Os animais foram previamente adaptados e em jejum de 18h antes da realização do experimento, com água *ad libitum*. Cada animal foi pesado um dia antes e teve sua dose individualizada de acordo com seu peso. Durante o período experimental os ratos ficaram alojados individualmente em gaiolas metabólicas.

Os animais foram divididos em cinco grupos de seis cada. Os grupos 1, 2 e 3 receberam os extratos hidroalcolico e o infuso nas doses de 200, 400 e 800 mg/kg/v.o., respectivamente. O Grupo 4 (controle positivo) recebeu a droga antidiarréica padrão Loperamide (5 mg/kg/v.o) e o Grupo 5 (controle negativo) recebeu água destilada estéril (5ml/kg). Os animais foram sondados para receberem os tratamentos.

Após 1h, todos receberam 1mL de óleo de rícino para a indução da diarreia. Em cada gaiola foi colocada uma folha de papel filtro previamente pesado ( $M_0$ ). Logo, os animais foram observados durante seis horas. A cada hora os filtros foram trocados e o número de defecações e o número de gotas de diarreia foi anotado. Os papéis filtro foram pesados após serem retirados da gaiola ( $M_1$ ), secos ao ar e pesados novamente ( $M_2$ ) (Teke ET al,2007).

O resultado foi expresso segundo Teke et al. (2007) como peso total de fezes úmidas ( $M_1-M_0$ ) e conteúdo de água nas fezes ( $M_2-M_1$ ) produzidas durante o experimento, percentual da redução de defecações e de gotas de fezes com relação ao controle negativo, pelas fórmulas:

$$\text{- Inibição da defecação (\%): } \frac{Mc - Md}{Mc} \times 100$$

Sendo que Mc = média do nº de defecações grupo controle negativo , Md = nº de defecações causada pelo extrato.

$$\text{- A Inibição das gotas de diarreia (\%): } \frac{Mc - Md}{Mc} \times 100$$

Sendo que Mc = nº de gotas causada pelo óleo de castor, Md = nº de gotas causada pelo extrato.

Após o período de avaliação (6 horas), os animais foram eutanasiados e o intestino amarrado e retirado. Carcaça e intestino foram pesados e a relação entre eles estabelecida (Teke, et al, 2007).

#### **Teste de motilidade intestinal:**

Foram utilizados 30 machos de Ratos albinos Wistar previamente adaptados e em jejum de 18h antes da realização do experimento, distribuídos nos mesmos tratamentos do grupo anterior. Após 1 hora do tratamento, foi administrado por sonda intra-gástrica uma solução de carvão ativado a 10% em goma acácia a 5% na dose de 0,3ml por rato.

Trinta minutos depois os animais foram sacrificados com T-61®, seus intestinos foram dessecados e a distância de migração do carvão a partir do piloro foi medida em centímetros. O resultado foi expresso como a percentagem de migração em comparação a extensão total do intestino delgado dos ratos (POONIA et al, 2007).

#### **Análise estatística:**

Foi realizado o teste ANOVA para comparação das médias entre os grupos de tratamento e Tukey para a comparação entre o EHA e o infuso.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O componente ativo do óleo de rícino, o ácido rinoleico, é liberado por lípases produzindo irritação e ação inflamatória na mucosa intestinal liberando prostaglandinas induzindo um aumento na permeabilidade das células da mucosa

mudando o transporte eletrolítico e causando uma resposta hipersecretória estimulando o peristaltismo e a diarreia (Teke, 2007).

O grupo que recebeu a dose de 200mg/kg de extrato apresentou maior peso de fezes úmidas em comparação com os outros dois grupos e não diferiu do controle negativo (água destilada estéril), no entanto, não houve diferença significativa entre os grupos com doses de 400mg/kg e 800mg/kg. Em relação ao controle positivo (Loperamida) nenhum dos três grupos de extrato superou a droga padrão com relação a baixa umidade das fezes. Com relação ao peso de água nas fezes todos os grupos eliminaram mais água que o controle positivo. O grupo que foi tratado com a dose intermediária (400mg/kg) eliminou menos água que o controle negativo. Quanto ao número de defecações e o número de gotas de diarreia, o grupo com dose de 200mg/kg não diferiu do controle negativo e do grupo com dose de 800mg/kg e o grupo com dose intermediária (400mg/kg) não foi tão bom quanto a droga padrão. Na relação intestino/caraça não houve diferença significativa entre os grupos.

O peso total de fezes úmidas não diferiu entre os grupos com dose de 200mg/kg e 400mg/kg de infuso da folhas de araquá. O grupo com dose de 800mg/kg apresentou um percentual maior de fezes úmidas que o controle negativo. Quanto ao percentual de peso de água nas fezes, não houve diferença significativa entre as doses de 400 e 200mg/kg e o grupo com dosagem mais alta apresentou um percentual de água nas fezes maior que o controle negativo. Quanto ao número de defecações e o número de gotas de diarreia, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com o infuso e o controle negativo. Quanto a relação peso intestino/caraça, não houve diferença significativa entre todos os grupos. Quanto a relação entre o percentual entre a redução da defecação e de gotas de diarreia os grupos tratados com diferentes doses de extrato, foram inferiores a droga padrão (figura 3).

Não houve diferença na relação peso Intestino/caraça, a diferença entre a quantidade de água e fezes no intestino entre os grupos tratados com os dois extratos não foi significativa.

Através do mesmo modelo experimental, Teke et al (2007) relata que o extrato aquoso de *Emilia coccinea* não apresentou diferença significativa entre as doses de 200, 400 e 600mg/kg no peso das fezes frescas. O conteúdo de água nas

fezes somente apresentou diferença significativa no grupo com dose de 600mg/kg e não se igualou ou foi melhor que a droga padrão (loperamida). Nenhum dos grupos de tratamento com o extrato, tanto o extrato aquoso quanto o extrato metanólico apresentaram os mesmos resultados ou resultados melhores do que a droga padrão. Quanto a inibição da defecação os melhores resultados foram nos grupos com dose de 600mg/kg e entre o extrato aquoso e o extrato metanólico, o melhor resultado foi do extrato metanólico.

Os resultados que obtivemos nos testes sugerem que talvez concentrações muito altas do extrato não consigam inibir a hipersecreção das células intestinais, provocadas pelo óleo de rícino tal vez por possuírem alguma substância que cause a irritação da mucosa intestinal. Outro tipo de extrato do araçá pode apresentar resultados positivos. Não testamos um extrato preparado com folhas do broto do araçá. No caso da folhas de goiabeira que apresenta o indicativo etnográfico entre outros como antidiarréica, o uso popular descrito por Lorenzi e Matos (2008) utiliza para o preparo do chá o broto desta planta. Não descartamos que outro tipo de extrato preparado com o araçá apresente resultados positivos.

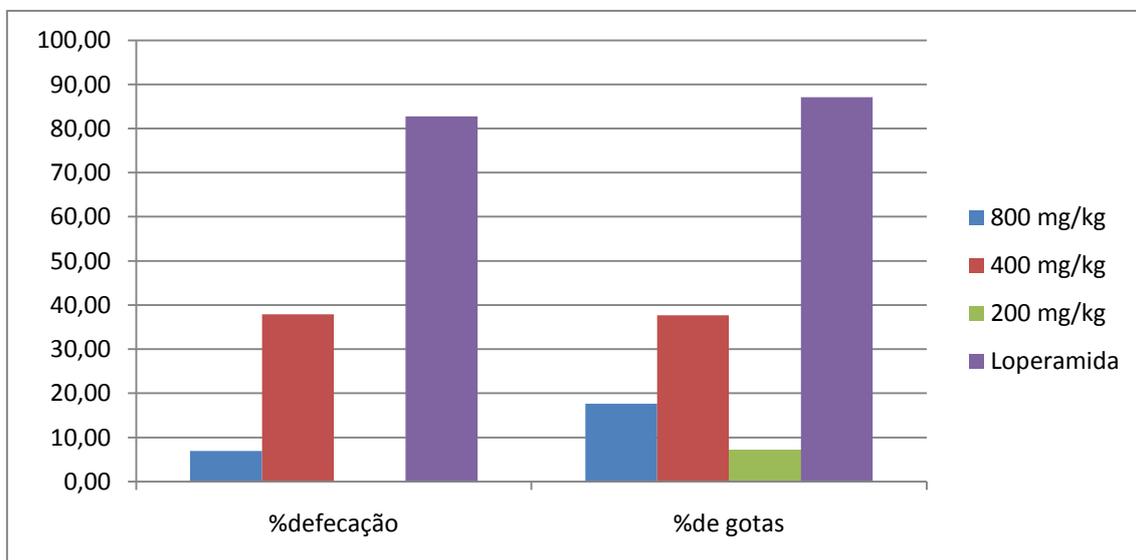
## **CONCLUSÃO**

Através da metodologia utilizada não foi possível comprovar a atividade antidiarréica dos extratos testados das folhas secas de *Psidium cattleianum* Sabine, colhidos na época de frutificação.

**Tabela 1:** Resultados do teste de inibição da diarreia pelo EHA das folhas de araçá

EHA	M1-M0	M2-M1	Número de defecações	Número de gotas	Relação int/carc
800 mg/kg	6,63 <sup>ab</sup>	2,19 <sup>a</sup>	4,50 <sup>b</sup>	11,67 <sup>b</sup>	0,12 <sup>a</sup>
400 mg/kg	6,20 <sup>ab</sup>	1,74 <sup>a</sup>	3,00 <sup>ab</sup>	8,83 <sup>ab</sup>	0,11 <sup>a</sup>
200 mg/kg	8,57 <sup>b</sup>	2,06 <sup>a</sup>	4,83 <sup>b</sup>	13,17 <sup>b</sup>	0,11 <sup>a</sup>
Loperamida	4,44 <sup>a</sup>	0,79 <sup>a</sup>	0,83 <sup>a</sup>	1,83 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>
Água destilada estéril	8,79 <sup>b</sup>	1,78 <sup>a</sup>	4,83 <sup>b</sup>	14,17 <sup>b</sup>	0,10 <sup>a</sup>

M1-M0=peso total de fezes úmidas, M2-M1= peso de água nas fezes.

**FIGURA 1:** Comparação entre o percentual de redução da defecação e o número de gotas de diarreia entre a droga padrão e os grupos tratados com o EHA \*

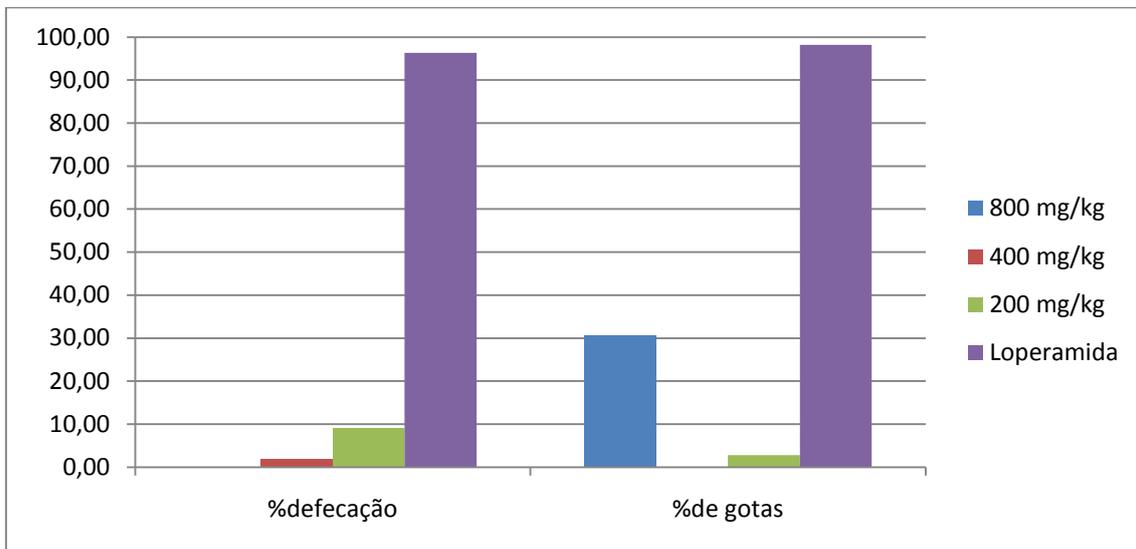
\*Comparação entre as doses de extrato quanto a sua capacidade de reduzir o número de defecações e o número de gotas de diarreia.

**Tabela 2:** Resultados do teste de inibição da diarreia pelo infuso das folhas de araçá

Infuso	M1-M0	M2-M1	Número de defecações	Número de gotas	Relação int/carc
800 mg/kg	9,88 <sup>b</sup>	8,02 <sup>b</sup>	9,17 <sup>b</sup>	12,50 <sup>b</sup>	0,10 <sup>a</sup>
400 mg/kg	7,29 <sup>ab</sup>	5,79 <sup>ab</sup>	9,00 <sup>b</sup>	18,00 <sup>b</sup>	0,09 <sup>a</sup>
200 mg/kg	6,99 <sup>ab</sup>	5,80 <sup>ab</sup>	8,33 <sup>b</sup>	17,50 <sup>b</sup>	0,09 <sup>a</sup>
Loperamida	2,46 <sup>a</sup>	2,28 <sup>a</sup>	0,33 <sup>a</sup>	0,33 <sup>a</sup>	0,11 <sup>a</sup>
Água destilada estéril	7,59 <sup>ab</sup>	6,33 <sup>ab</sup>	9,17 <sup>b</sup>	18,00 <sup>b</sup>	0,09 <sup>a</sup>

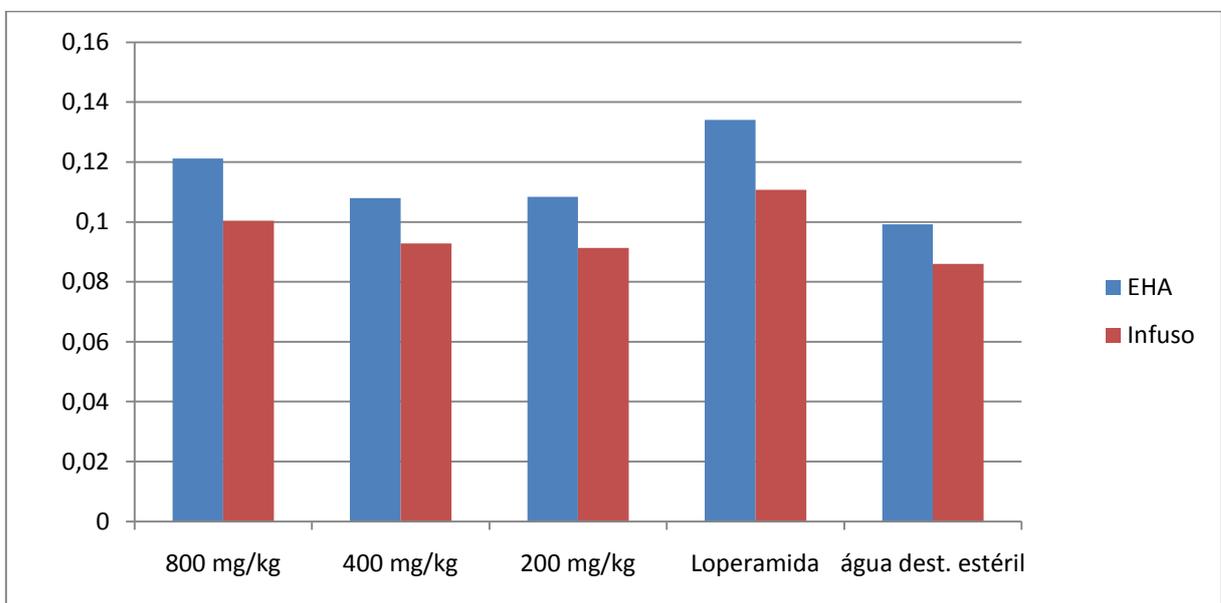
M1-M0=peso total de fezes úmidas, M2-M1= peso de água nas fezes.

**FIGURA 2:** Comparação entre o percentual de redução da defecação e o número de gotas de diarreia entre a droga padrão e os grupos tratados com o infuso\*



\*Comparação entre as doses de extrato quanto a sua capacidade de reduzir o número de defecações e o número de gotas de diarreia.

**Figura 3:** Relação do peso intestino/carcaça para o tratamento com os dois extratos no teste de indução de diarreia\*



\*Comparação entre os dois extratos quanto a relação peso intestino/carcaça.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Farmacopéia Brasileira, ed. Atheneu (S. P.), 4º ed., v.1, 1988, 1102 p.

Lorenzi, H. e Matos, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas, Ed. Nova Odessa, S. P., 2º ed.,2008,544p.

Nachtigal, J.C.; Fachinello, J.C. Efeito de substratos e do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de araçazeiro (*Psidium cattleyanum* Sabine) **Rev.Brás. de Agrociência**, v.1, nº1, 1995.

Poonia B.S., Sasmal D.,Mazumdar P.M Anti-diarrheal activity of methanol extract of *Litsea polyantha* bark in mice. **Fitoterapia**,78(3),pp.171-174, 2007.

Prestes,L. S.; Frascolla, R.V.; Santin, R.; Santos, M.A.Z.; Schramm, R.C.; Rodrigues, M.R.A. Schuch, L.F.D.;Meireles, M.C.A. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados com otitis externa. Rev. Cubana de Plantas Medicinales, v.13 (4), 2008.[http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol13\\_4\\_08/pla03408.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol13_4_08/pla03408.htm)  
Acesso em: 16/06/09.

Ritter, M.R., Sobierajski, G.R., Schenkel, E.P., Mentz, L.A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Bradsil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 12(2) pp. 51-62, 2002.

Teke, G.N., Kuate, J.R., Ngouateu, O.B., Gatsing, D. Antidiarrhoeal and antimicrobial activities of *Emilia coccinea* (Sims) G. Don extracts. **J Ethnopharmacol**. 112(2):278-83, 2007.

## CONCLUSÕES

O “melhor” extrato de *E. uniflora* foi aquela obtida de folha seca durante a floração ou a frutificação, de *P. cattleyanum* obtido de folhas secas colhidas na frutificação e de *P. guajava* de folhas secas colhidas no inverno.

Os óleos essenciais de goiabeira e pitangueira apresentam atividade bactericida importante e em baixas concentrações. O óleo essencial de araçá não apresentou atividade bactericida frente aos microrganismos testados. Os constituintes encontrados em todas as plantas foram o  $\alpha$ -Copaene e  $\alpha$ -Humulene. São necessárias mais análises para identificarmos um número maior de constituintes presentes nos óleos essenciais destas plantas principalmente do araçá, os constituintes dos óleos das folhas desta planta ainda não foram muito explorados. Com a metodologia escolhida para este trabalho, o extrato hidroalcólico e o infuso das folhas secas colhidas na época de frutificação do araçá, não apresentaram atividade antidiarréica. Não descartamos a possibilidade de que os outros extratos que testamos *in vitro* e foram testados *in vivo*, ou mesmo um extrato preparado com o broto do araçá, possam apresentar resultados positivos. Outras formas extrativas e mesmo com outros espécimes de araçá em futuros trabalhos devem ser testados com a finalidade de validarmos o uso popular do araçá com propriedade antidiarréica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Série B. Textos Básicos de Saúde, 2006. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia\\_no\\_sus.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf) Acesso em: 17/11/2008.

Almeida CE, Karnikowski MG, Foletto R, Baldisserotto B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Rev. Saúde Pública.** 29(6):428-33, 1995.

Auricchio, M.T. e Bacchi, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L.(Pitanga): Propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista Instituto Adolfo Lutz.** v.62(1): 55-61, 2003.

Bernardino-Nicanor A, Anon MC, Scilingo AA, Davila-Ortiz G. Functional properties of guava seed glutelins. **J Agric Food Chem.** 4;53(9):3613-7, 2005.

Brito, D. C., Zani, J.L., Schuch, L., Schramm, R. C. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre agentes causadores de mastite bovina. XI Congresso De Iniciação Científica. Ufpel/Furg/Ucpel, 2002.

Chah KF, Eze CA, Emuelosi CE, Esimone CO. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **J Ethnopharmacol.** 8;104(1-2):164-7, 2006.

Consolini AE, Baldini OA, Amat AG. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **J Ethnopharmacol.** 66(1):33-9, 1999.

Consolini AE e Sarubbio MG. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **J Ethnopharmacol.** 81(1):57-63, 2002.

Costa DP, Santos SC, Seraphinb JC, Ferri PH, Seasonal Variability of Essential Oils of *Eugenia uniflora* Leaves. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 20, No. 7, 1287-1293, 2009.

Da Silva, P.L. Potencialidades e limites na produção de leite ecológico na Cooperativa de Produção Agropecuária Vista Alegre Piratini Ltda (COOPAVA). Monografia apresentada para conclusão do CURSO DE ENSINO MÉDIO NA

MODALIDADE DE EDUCAÇÃO JOVENS E ADULTOS, INSTITUTO DE EDUCAÇÃO JOSUÉ DE CASTRO, sob orientação da Eng<sup>a</sup>. Agr. Rosemari B. Olanda e do M.V. Luiz Filipe Damé Schuch, Viamão-RS, 2005. 17 p

Declaração de Alma-Ata. Conferência Internacional Sobre Cuidados Primários de Saúde, Alma-Ata, URSS, 1978. Disponível em: <http://www.opas.org.br/coletiva/uploadArq/Alma-Ata.pdf> Acesso em: 28/07/2008.

Farias, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p. 263-288.

Farias, N.A.R.; Dos Santos, T.R.B.; Schuch, L.S.D. Relatório de projeto de pesquisa "Implantação de Novas Tecnologias para produção de Leite Ecológico". Proc.nº00/2648.5, FAPERGS, Porto Alegre-RS, 2003.

Farmacopéia Brasileira, ed. Atheneu (S. Paulo), 4º ed., v.1, 1988.

Gallucci S., Neto A.P., Porto C., Barbizan D., Costa I., Marques K., Benevides P., Figueiredo R. Essential Oil of *Eugenia uniflora* L. : an Industrial Perfumery Approach. **Journal of Essential Oil Research**. 22: 176-180, 2010.

Goncalves JL, Lopes RC, Oliveira DB, Costa SS, Miranda MM, Romanos MT, Santos NS, Wigg MD. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **J Ethnopharmacol**. 14;99(3):403-7, 2005.

Gonçalves FA., Andrade NM, Bezerra JNS., Macrae A, Sousa OV, Fonteles-Filho AA, Viera RHSF, Antibacterial activity of GUAVA, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from Seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). **Rev. Inst. Med. trop**. 50(1): 11-15, 2008.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 97(7):1027-31, 2002.

Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J.; Nychas, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, 453-462, 2001.

Lee MH, Chiou JF, Yen KY, Yang LL. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Lett.** 154(2):131-6, 2000.

Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM, Paulo MQ. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses.**36(9-10):333-6,1993.

Lima, R.K, Cardoso, M.G., Santos, C.D., Moraes, J.C., Néri, D.K.P., Nascimento, E.A. Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciênc. agrotec.** v.33, n.spe, p. 1777-1781, 2009.

Manohar, V.; Ingram, C.; Gray, J.; Talpur, N.A.; Echard, B.W.; Bagchi, D.; Preuss, H.G. Antifungal activities of origanum oil against *Cândida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry** 228, 111-117, 2001.

Martins, P. M. Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). 2000. 77. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.

Nachtigal, J.C.; Fachinello, J.C. Efeito de substratos e do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de araçazeiro (*Psidium cattleyanum* Sabine) **Rev.Brás. de Agrociência**, v.1, n1, 1995.

Ogunwande, I.A., Olawore, N.O., Adeleke, K.A., Ekundayo, O., Koenig, W.A. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. *Flavour and Fragrance Journal.* v.18, p. 136-138, 2003.

Paroul,N. Mossi, A., Cansian, R. L., Emmerich, D. ,Faggion, A., Scoloski, E., Liotto, F.R., Rovani, A.S., Filla J., Munik, R. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Psidium cattleyanum* (Araçá-do-campo). Disponível em: <http://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0507-1.pdf> Acesso em: 16/06/09.

Poonia, B.S., Sasmal, D., Mazumdar, P.M. Anti-diarrheal activity of methanol extract of *Listea polyantha* bark in mice. **Fitoterapia** 78: 171-174, 2007.

Prestes, L. S.; Frascolla, R.V.; Santin, R.; Santos, M.A.Z.; Schramm, R.C.; Rodrigues, M.R.A. Schuch, L.F.D.; Meireles, M.C.A. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados com otitis externa. **Rev. Cubana de Plantas Medicinales**, v.13 (4), 2008. Disponível em: [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol13\\_4\\_08/pla03408.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol13_4_08/pla03408.htm) Acesso em: 16/06/09.

Qadan F, Thewaini AJ, Ali DA, Afifi R, Elkhawad A, Matalka KZ. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. **Am J Chin Med.**33(2):197-204, 2005.

Ritter, M.R, Sobierajski, G.R., Schenkel, E.P., Mentz, LA. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.12, n.2, p.51-62, 2002.

RODRIGUES, M.R.A. Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.

Schuch, L.; Wiest, J.; Coimbra, H.; Prestes, L.; De Toni, L.; Lemos, J. Cinética da Atividade Antibacteriana in vitro de Extratos Naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, Goiania, 9 (3) 04 2008.

Schapoal EE, Silveira SM, Miranda ML, Alice CB, Henriques AT. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **J Ethnopharmacol.** 44(3):137-42, 1994.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, I.A.; Petrovick, P.R. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Ed. da UFRGS/ed. da UFSC, Porto Alegre, RS/Florianópolis, SC, 2004, p.1002.

Souza GC, Haas AP, von Poser GL, Schapoal EE, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J Ethnopharmacol.** 90(1):135-43, 2004.

Salix, C.E.E. e Rodriguez, F.J.M. Tintura de folhas de *Psidium Guajava* L. em pacientes com diarreia aguda simple. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 9, n. 3, 2004.

Teke, G.N., Kuate, J.R., Ngouateu, O.B., Gatsing, D. Antidiarrhoeal and antimicrobial activities of *Emilia coccinea* (Sims) G. Don extracts. **J Ethnopharmacol.** 112: 278-283, 2007.

Voravuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S, Supawita T Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J Ethnopharmacol.** 94(1):49-54, 2004.

Zhang WJ, Chen BT, Wang CY, Zhu QH, Mo ZX. Mechanism of quercetin as an antidiarrheal agent. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.** 23(10):1029-3, 2003.