UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

ESTUDO BIOFARMACOGNÓSTICO
***Campomanesia phaea* (O.Berg.) Landrum.**
MYRTACEAE

ROBERTO TSUYOSHI ADATI

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro

São Paulo

2001

ROBERTO TSUYOSHI ADATI

ESTUDO BIOFARMACOGNÓSTICO

***Campomanesia phaea* (O.Berg.) Landrum.**

MYRTACEAE

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro
Orientador/Presidente

Prof. Dr.
1º. Examinador

Prof. Dr.
2º. Examinador

São Paulo, de de 2001.

Campomanesia
phaea (O . Berg)
Landrum

Cambuci

Dedico este trabalho ao amigo de pós-graduação Ricardo
Silveira Pinto Junior aquele amigo, que mesmo quando estava
longe, se fazia estar muito próximo;
o amigo, que mesmo estando num mundo diferente, se
encontra dentro de cada um de nós, sempre...

SUMÁRIO

Agradecimentos	I
Nota Biográfica	IV
Abreviaturas	V
Figuras	VI
Tabelas	VII
1- Introdução	01
2- Objetivos	05
3- Revisão bibliográfica	07
3.1- Revisão da família <i>Myrtaceae</i>	08
3.2- Revisão do Gênero <i>Campomanesia</i>	11
3.3- A espécie <i>Campomanesia phaea</i> (O . Berg.)L.	19
3.3.1- Estudos botânicos	19
3.3.1.1- Posição taxonômica	19
3.3.1.2- Denominação vulgar e científica	21
3.3.1.3- Características morfológicas da <i>Campomanesia phaea</i> (O . Berg)L.	21
3.3.2- Estudos químicos	23
3.3.2.1- Substâncias do metabolismo secundário das mirtáceas	23
3.3.2.2.- Substâncias encontradas no gênero <i>Campomanesia</i>	23
3.3.3- Estudos farmacológicos	25

3.3.3.1-Aspectos farmacodinâmicos e usos das mirtáceas	25
3.3.4- Estudos microbiológicos	26
3.3.5- Biossíntese de terpenos	27
4- Material e Métodos	31
4.1- Botânica	32
4.1.1- Coleta e identificação	32
4.1.2- Caracterização macroscópica da folha	36
4.1.3- Caracterização microscópica da folha	36
4.2- Química	37
4.2.1--Triagem fitoquímica	37
4.2.2- Preparação do extrato	39
4.2.3- Perfil cromatográfico do óleo essencial	40
4.2.3.1- Isolamento e identificação dos componentes do óleo essencial (CG/EM)	40
4.2.4- Cromatografia em camada delgada preparativa do óleo essencial	42
4.2.5- Doseamento de taninos	43
4.2.5.1- Extrato liofilizado de folhas (E.B)	43
4.2.5.2- Droga constituída de folhas	43
4.3-Ensaio biológicos	46
4.3.1- Ensaio de toxicidade aguda em camundongos	46
4.3.2- Ensaio microbiológico do óleo essencial em bactérias, levedura e bolor	48

4.3.3- Ensaio microbiológico do E.B. em bactérias e levedura	50
5- Resultados	56
5.1- Botânica	57
5.1.1- Caracterização macroscópica das folhas	57
5.1.2- Caracterização microscópica das folhas	59
5.2- Química	67
5.2.1- Triagem fitoquímica	67
5.2.2- Rendimento (g/mL) do óleo essencial nas folhas	68
5.2.3- Rendimento do extrato liofilizado (E.B)	68
5.2.4- Perfil cromatográfico do óleo essencial	69
5.2.5- Cromatografia gasosa do óleo essencial de cambuci	70
5.2.6- Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa	73
5.2.7- Cromatografia em camada delgada preparativa do óleo essencial	82
5.2.8- Cromatografia gasosa da fração isolada e dos respectivos padrões	84

5.2.9- Doseamento de taninos	93
5.2.9.1- Extrato liofilizado de folhas(EB)	93
5.2.9.2- Folha pulverizada	93
5.3- Farmacologia	93
5.3.1- Ensaio de toxicidade aguda em camundongos	93
5.3.2- Atividade antimicrobiana do óleo essencial para bactérias, levedura e bolor	100
5.3.3- Atividade antimicrobiana do EB de folhas para bactérias e levedura	100
6- Discussão	101
6.1- Botânica	103
6.1.1- Caracterização macroscópica	103
6.1.2- Caracterização microscópica	104
6.1.2.1- Anatomia da lâmina foliar	104
6.1.2.2- Anatomia da nervura mediana	106
6.1.2.3- Anatomia do pecíolo	106
6.2- Química	107
6.3- Toxicidade aguda	109
6.4- Atividade antimicrobiana	109
7- Conclusões	111
8- Referências Bibliográficas	114
9- Resumo	121
10- Abstract	124

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo fato de estar me acompanhando e dando-me forças para lutar .

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho, assim como para o desenvolvimento de uma fase da minha formação profissional.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro oferecido nesta dissertação.

Ao Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro, pela orientação, amizade e pelos ensinamentos que me auxiliaram a vencer mais uma etapa da minha vida.

Aos professores da disciplina de Biofarmacognosia da Universidade de São Paulo, Prof. Dra. Elfriede Marianne Bacchi, Prof. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato, Prof. Dra. Dominique Corinne Fischer e Prof. Dr. Paulo Chanel Deodato de Freitas, que primeiramente, tão bem me acolheram a esta disciplina, que tanto me ensinaram, e tanto me apoiaram em todos os momentos da minha vida científica, como também, fora dela.

A todos os professores do curso de pós-graduação que prepararam-me para desvendar os verdadeiros “mistérios” que estariam por vir.

A todos os pós-graduandos do Laboratório de Biofarmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados, em particular à Helena Onishi Ferraz, pelo auxílio dado no laboratório, seja nas tarefas mais simples como naquelas mais complexas, sempre com paciência e acima de tudo, com a vontade de ensinar a mim e a todos.

À Prof. Dra. Amelia T. Henriques da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Renata Limberger, pela ajuda na confecção dos espectros das análises do óleo volátil em CG/EM.

À Prof. Dra. Mitsuko Taba Ohara, do Controle Microbiológico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo pela orientação dada à realização dos ensaios.

À Prof. Dra. Maria Inês de Almeida Gonçalves, pelas sugestões e ajuda na interpretação dos espectros de cromatografia gasosa.

À Dra. Maria Lúcia Kawasaki, do Instituto Botânico de São Paulo, pela identificação da espécie estudada neste trabalho.

Aos colegas pós-graduandos, Paulo Carvalho e Ivana Barbosa Sufredini, e o aluno de graduação em farmácia e bioquímica, Nelson Massaki Hiramatsu da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelas importantes contribuições cedidas ao desenvolvimento desta dissertação.

À secretária do Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, Elisabete Claro de Souza Paiva pelo carinho e amizade.

A todos os funcionários do bloco 15 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo que de uma maneira ou de outra participaram na realização deste trabalho.

À minha família, especialmente meus pais, irmãos e esposa que tanto me ajudaram, seja em palavras de estímulo, seja em palavras de conforto, seja apenas num sorriso, mas que estiveram sempre presentes.

NOTA BIOGRÁFICA

O autor graduou-se em Farmácia e Bioquímica, modalidade Fármaco e Medicamentos pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Araraquara em julho de 1994. Em agosto do mesmo ano, na cidade de Palmas/TO, tornou-se gerente-proprietário de farmácia de manipulação (medicamentos e cosméticos). Permaneceu nessa capital até abril de 1998. Ingressou no curso de pós-graduação, nível mestrado, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, na área de Insumos Farmacêuticos, disciplina de Biofarmacognosia sobre a orientação do Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro, em julho de 1998.

Participou do Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE) da própria universidade (USP) de julho a dezembro de 1999, adquirindo experiência na atividade docente em aulas teóricas e práticas.

O autor participou ainda de eventos programados pela universidade bem como em congressos no qual apresentou trabalhos de pesquisa.

Foi auxiliado pelo CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), que concedeu bolsa-auxílio, nível mestrado.

ABREVIATURAS

USP - Universidade de São Paulo

CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa

PAE - Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CC - Cromatografia em Coluna

CG - Cromatografia Gasosa

CG/EM - Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa

CMI - Concentração Mínima Inibitória

EB - Extrato Hidroalcoólico 70% Liofilizado de Folhas

UFC - Unidade Formadora de Colônia

ATB - Antibiótico

FIGURAS

<i>Figura I</i> - Distribuição das colunas das microplacas nas quais os extratos foram ensaiados quanto à atividade antimicrobiana.	55
<i>Figura II</i> - Droga constituída de folhas de <i>Campomanesia phaea</i> (O. Berg.) L.	58
Figura 1: <i>Campomanesia phaea</i> (O. Berg.) L. – Folha	60
Figura 2: <i>Campomanesia phaea</i> (O. Berg.) L. – Folha	61
Figura 3: <i>Campomanesia phaea</i> (O. Berg.) L.- Nervura Mediana	63
Figura 4: <i>Campomanesia phaea</i> (O. Berg.) L. – Pecíolo	65
<i>Figura III</i> - Cromatografia do óleo bruto de <i>Campomanesia phaea</i> (O. Berg.) L.	69
<i>Figura IV</i> - Cromatografia do óleo bruto e suas principais frações.	82
<i>Figura V</i> - Cromatograma comparativo do óleo bruto com as suas frações e respectivos padrões (linalol e óxido de cariofileno)	83

TABELAS

Tabela 1 - Resultados das reações de identificação de princípios ativos (triagem fitoquímica)	67
Tabela 2-A: Constituintes do óleo essencial de <i>Campomanesia phaea</i> (O.Berg) L.	71
Tabela 2-B: Constituintes do óleo essencial de <i>Campomanesia phaea</i> (O.Berg) L.	72
Tabela 3: Comparação entre controle e teste fêmeas para ração e água consumidos durante o experimento.	95
Tabela 4: Comparação entre controle e teste machos para ração e água consumidos durante o experimento.	96

“Que deixemos de lado um pouco do nosso egoísmo e unamo-nos um pouco mais em prol da ciência”.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Talvez não haja no Brasil outra família de plantas mais característica da nossa flora do que a das *Myrtaceae* (CORRÊA, 1978).

Compreende esta família, cerca de 140 gêneros com aproximadamente 3000 ou mais espécies (CRONQUIST, 1996), sendo a maior família da ordem, com dois grandes centros de dispersão, nas Américas e na Austrália, embora ocorram em todo o mundo (JOLY, 1975; CRONQUIST, 1996).

O que se sabe a respeito das propriedades ativas das mirtáceas, resume-se quase exclusivamente no que, desde séculos é referido nos compêndios. Os seus óleos voláteis, resinas e extratos fluidos encontram larga aplicação na indústria de perfumarias entrando na fabricação de sabões, pastas dentífricas, loções e vários outros produtos nacionais. Outras fornecem chás maravilhosos, muito mais saudáveis e mais aromáticos que os da Índia (CORRÊA, 1978).

O nosso caboclo aplica muito bem as folhas de diferentes mirtáceas como recurso terapêutico, especialmente para combater as disenterias agudas, onde emprega-se os rebentos novos, tanto das "Goiabeiras" como das "Jaboticabeiras", obtendo-se resultados bastante satisfatórios (CORRÊA, 1978).

Curas admiráveis são obtidas com tais processos, porque nas folhas das mirtáceas encontram-se as

Introdução

substâncias tânicas necessárias para contrair, secar e cicatrizar os pontos atacados pelas úlceras (CORRÊA, 1978).

Dentre as frutíferas indígenas que pertencem às *Myrtaceae*, talvez nenhuma outra tenha mais interesse para o paulista, do que a “Jaboticaba-assu” ou “Jaboticaba-tuba”, - *Myrciaria jaboticaba* Berg. e o “Cambuci”, *Campomanesia phaea* (O. Berg.) L, (= *Abbevillea phaea* Berg, *Paivaea langsdorffii* Berg.).

O Cambuci, objeto de estudo desta dissertação, é uma árvore das matas primitivas, e os exemplares que ainda existem são os últimos representantes da floresta atlântica (MORI, 1981), conservados talvez, pelo seu belo porte ou pela forma de seus frutos (PORTO, 1920). Segundo nos informa KAWASAKI, (1997), é importante chamarmos a atenção dos especialistas para um maior cuidado com esta espécie nativa. O cambuci é uma espécie ameaçada de extinção (MORI, 1981) e possui alto valor econômico, podendo até mesmo ser cultivado para fins comerciais. Seus frutos exóticos e comestíveis (HOLANDA, 1994), possuem interessantes propriedades aromáticas sendo utilizados como agentes flavorizantes em alimentos e bebidas. Ele é nativo da região ao redor de São Paulo, que apropriadamente inclui um bairro chamado Cambuci. Acredita-se ainda que ele seja nativo também da cidade próxima à Cambuci, no centro-norte do

Introdução

estado do Rio de Janeiro (PORTO, 1920; L, 1986; HOEHNE, 1979).

Os frutos e as cascas do caule têm usos medicinais tradicionais (PORTO, 1920; CORRÊA, 1926; HOEHNE, 1939). O povo atribui aos frutos do cambuci, virtudes anti-febris aplicando-o em todos os casos em que a medicina recomenda o limão (PORTO, 1920). O mesmo autor também reproduz parte de um documento colonial escrito por B. Rodrigo de Souza Coutinho de 1802 a informação do uso das cascas do caule para "moléstias graves".

Apesar de nada sabermos sobre o uso das folhas desta planta na medicina popular, resolvemos estudá-la, visto que a mesma apresenta óleos essenciais, indicado pelas pontoações translúcidas que ocorrem em sua superfície, correspondendo às cavidades secretoras (CORRÊA, 1978; JOLY, 1975). O conhecimento antecipado de que as folhas de muitas mirtáceas apresentam taninos, conforme já citado, levou-nos também a um interesse maior em estudá-la.

Apresentando esta comunicação, desejamos tornar bem conhecida uma das mais interessantes espécies da família das *Myrtaceae*, única do gênero *Campomanesia*, muito importante pelo potencial econômico que apresenta e que, cultivada e selecionada, poderá ainda ter grande aplicação industrial pelo valor dos frutos, além do seu valor ornamental e medicinal.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Constitui objetivos desta dissertação:

- Estudar a espécie vegetal *Campomanesia phaea* (O. Berg.)L., sobre os aspectos botânicos, químicos e farmacológicos.

Sobre o aspecto botânico:

- caracterizar macro e microscopicamente as folhas da espécie vegetal em estudo.

Sobre o aspecto químico:

- Isolar e identificar a presença de grupos de princípios ativos na espécie vegetal em estudo.
- Estabelecer o perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas da espécie estudada, utilizando métodos cromatográficos.
- Extrair, quantificar e analisar o óleo essencial da planta em estudo pelos métodos tradicionais (CCD, CG, e CG/EM), identificando seus componentes.

Sobre o aspecto farmacológico:

- Avaliar as propriedades antimicrobiana em bactérias, levedura e bolor e a toxicidade aguda dos extratos obtidos da espécie vegetal em camundongos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Revisão da família *Myrtaceae*

3.2- Revisão do Gênero *Campomanesia*

3.3- A espécie *Campomanesia phaea* (O. Berg.) L.

3.3.1- Estudos botânicos

3.3.1.1- Posição taxonômica

3.3.1.2- Denominação vulgar e científica

3.3.1.3- Características morfológicas da *Campomanesia phaea* (O. Berg.) L.

3.3.2- Estudos químicos

3.3.2.1- Substâncias do metabolismo secundário das *Myrtaceae*

3.3.2.2- Substâncias encontradas no gênero *Campomanesia*

3.3.3- Estudos farmacológicos

3.3.3.1- Aspectos farmacodinâmicos e usos das *Myrtaceae*

3.3.4- Estudos microbiológicos

3.3.5- Biossíntese de terpenos

3.1- Revisão da família *Myrtaceae*

As mirtáceas são plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com folhas inteiras, de disposição alterna ou oposta e às vezes, oposta cruzada, com estípulas muito pequenas ou ausentes (JOLY, 1975). A cauliflora é freqüente, e as flores são em geral brancas (às vezes, vermelhas), efêmeras, hermafroditas, de simetria radial, em geral pentâmeras, mono ou diclamídeas, muitas vezes com um receptáculo bem desenvolvido. A corola é às vezes

Revisão Bibliográfica

suprimida e o cálice gamossépalo com deiscência transversal. Estames geralmente muito numerosos. Ovário súpero a semi-ífero até ífero, pentacarpelar e pentalocular, com muitos óvulos. O fruto é baciforme ou capsular loculicida. As sementes mostram muitas vezes, poliembrionia e às vezes são aladas (JOLY, 1975).

Há dois tipos de subfamílias bem acentuadas mas evidentemente relacionadas: a Myrtoideae, muito difundida mas mais desenvolvida na América Tropical, com ovário bilocular ou às vezes, frutos drupados, e a Leptospermoideae (incluindo Chamaelaucioideae), também espalhada, mas mais desenvolvida na Austrália, Malásia e Polinésia, com cápsulas di a pentaloculares ou às vezes, frutos multiloculares (CRONQUIST, 1996).

Podemos citar como exemplos de mirtáceas brasileiras freqüentes entre nós (com folhas opostas e fruto baciforme) a goiaba, araçá (*Psidium*), jabuticaba, ponhema, sabará (*Myrciaria*), pitanga, uvaia, cabeludinha, grumixama, cereja-nacional (*Eugenia*), cambucá (*Martierea*), guabiroba (*Campomanesia*), cambuci (*Paivaea*, *Abbevillea*, *Campomanesia*) (JOLY, 1975). Talvez o *Eucalyptus* introduzido, poderia também dar idéia das mirtáceas aos que não conseguem tê-las com as ditas frutíferas, ou ainda, o "sete-cascas", o "cambuí" e o "casca-lisa".

Revisão Bibliográfica

Dentre as cultivadas merecem destaque especial as introduzidas da Austrália, em geral com folhas alternas e fruto seco, capsular: *Eucalyptus*, o popular eucalipto ou “calipe” dos caboclos com muitas espécies produtoras não só de madeira, mas de essências importantes, além de espécies ornamentais com flores vermelhas; *Callistemon*, de belo efeito ornamental com cauliflora em torno dos eixos terminais, simulando uma escova cilíndrica vermelha, devido aos longos estames vermelhos, com frutos longipersistentes; *Melaleuca*, também introduzida como árvore florestal ou ornamental (JOLY, 1975).

Outra cultura mais ou menos recente entre nós é a do cravo ou craveiro-da-índia (*Syzygium*), cujos botões florais são colhidos verdes para o preparo da inigualável especiaria. Outra espécie do mesmo gênero é muito freqüente no litoral onde é cultivado sob o nome de jambolão, ou de azeitona no nordeste. O jambeiro (jambosa) é outra planta cultivada, freqüente no litoral (JOLY, 1975).

Revisão Bibliográfica

3.2- Revisão do gênero *Campomanesia* (Index Kwensis)

Espécies descritas do gênero *Campomanesia*:

CAMPOMANESIA, Ruiz & Pav. Prod. 72. T. 13 (1797).
MYRTACEAE, Benth. & Hook. f. i. 712. *ABBEVILLEA*, *ACRANDA*,
BRITOA, *LACERDAEA*, Berg, in *Linnaea*, xxvii. (1854) 425-437.

1. *C. adamantium*, Blume

Origem: Brasil

2. *C. affinis*, Berg.

Origem: Brasil

3. *C. aprica*, Berg.

Origem: Brasil

4. *C. arenaria*, Berg.

Origem: Argentina

5. *C. aromatica*, Griseb.

Origem: Índia Ocidental

6. *C. aurea*, Berg.

Origem: Brasil

7. *C. australis*, Berg.

Origem: Brasil

8. *C. beaurepairiana*, Kiaersk.

Origem: Brasil

9. *C. bracteolata*, Kiaersk.

Origem: Brasil

10. *C. caerulea*, Berg.

Origem: Brasil

Revisão Bibliográfica

11. *C. caerulescens*, Berg.

Origem: Brasil

12. *C. cagaiteira*, Kiaersk.

Origem: Brasil

13. *C. Cambessedeanana*, Berg.

Origem: Brasil

14. *C. campestris*, Blume.

Origem: Argentina

15. *C. campestris* (Cambess) Diego Legrand in Not. Syst., (1958): *Psidium campestre*.

16. *C. cerasoides*, A Gray.

Origem: Brasil

17. *C. chrysophylla*, Niedenzu.

Origem: Brasil

18. *C. ciliata*, Berg.

Origem: Brasil

19. *C. coaetanea*, Berg.

Origem: Am. Tropical

20. *C. cornifolia*, H. B. & K. Nov. Gen. Et Sp.

Origem: N. Granat.

21. *C. corymbosa*, Blume

Origem: Brasil

22. *C. crassifolia*, Benth.

Origem: N. Granat.

23. *C. crenata*, Berg.

Origem: Brasil

Revisão Bibliográfica

24. *C. cuneata*, Berg.

Origem: Brasil

25. *C. cyanea*, Berg.

Origem: Brasil

26. *C. dentata*, Berg.

Origem: Brasil

27. *C. desertorum*, Berg.

Origem: Brasil

28. *C. dimorpha*, Berg.

Origem: Brasil

29. *C. discolor*, Berg.

Origem: Brasil

30. *C. diversifolia*, Barb. Rodr.

Origem: Paraguai

31. *C. dulcis* (Vell) Macbride in Candollea (1934): *Psidium dulce*

32. *C. dusenni* Kausel

Origem: Brasil

33. *C. eriantha*, Blume.

Origem: Brasil

34. *C. eugenoides*, Blume.

Origem: Brasil

35. *C. eugenoides* (Cambess.) Diego Legrand, l. c. 274: *Psidium eugenoides*.

Origem: Brasil

36. *C. fenzliana* Berg.

Origem: Brasil

37. *C. fruticosa*, Berg.

Origem: Brasil

Revisão Bibliográfica

38. *C. fusca*, Berg.

Origem: Brasil

39. *C. Gardineriana*, Berg.

Origem: Brasil

40. *C. glabra*, Berg. in Mart.

Origem: Brasil

41. *C. Glazioviana*, Kiaersk.

Origem: Brasil

42. *C. grandiflora*, Sagot. in Ann.

Origem: Guiana

43. *C. gracilis* Kausel

Origem: Brasil

44. *C. Guaviroba*, Benth. & Hook.

Origem: Brasil

45. *C. guazumaefolia*, Blume.

Origem: Brasil

46. *C. hasslerii*, Barb. Rodr.

Origem: Paraguai

47. *C. heterophylla*, Berg.

Origem: Brasil

48. *C. hirsuta*, Gardn. In Hook

Origem: Brasil

49. *C. Houlettii*, Berg. in Mart.

Origem: Brasil

50. *C. itanarensis*, Kiaersk.

Origem: Brasil

Revisão Bibliográfica

51. *C. klotzschiana* Berg.

Origem: Brasil

52. *C. lanceolata*, Berg.

Origem: Brasil

53. *C. Langsdorffii*, Berg. Bras. = *Paivaea langsdorffii*

Origem: Brasil

54. *C. laurifolia*, Gardn.

Origem: Brasil

55. *C. lineatifolia*, Ruiz & Pav.

Origem: Peru

56. *C. littorallis* C. D.

Origem: Brasil

57. *C. malifolia*, Berg,

Origem: Brasil

58. *C. martiana*, Berg.

Origem: Brasil

59. *C. maschalantha*, Kiaersk.

Origem: Brasil

60. *C. mediterranea*, Berg.

Origem: Brasil

61. *C. microcarpa*, Berg.

Origem: Brasil

62. *C. multiflora*, Blume

Origem: Brasil

63. *C. nerifolia*, Niedenzu.

Origem: Brasil

Revisão Bibliográfica

64. *C. nitidifolia*, Barb. Rodr.

Origem: Paraguai

65. *C. obscura*, Berg.

Origem: Brasil

66. *C. obversa*, Berg.

Origem: Brasil

67. *C. ovalifolia*, Berg.

Origem: Brasil

68. *C. paraguayensis*, Barb. Rodr.

Origem: Paraguai

69. *C. paranensis* C. D. Legrand

Origem: Paraguai

70. *C. pohliana*, Berg.

Origem: Brasil

71. *C. poiteaui*, Berg.

Origem: Brasil

72. *C. prosthecesepala*, Kiaersk.

Origem: Brasil

73. *C. psidioides*, Niedenzu.

Origem: Brasil

74. *C. pubescens*, Berg.

Origem: Brasil

75. *C. rabeniana*, Kiaersk.

Origem: Brasil

76. *C. racemosa*, Berg.

Origem: Brasil

Revisão Bibliográfica

77. *C. recurvata*, Niedenzu.

Origem: Brasil

78. *C. regeliana*, Kiaersk.

Origem: Brasil

79. *C. reitziana* Diego Legrand

Origem: Brasil

80. *C. repanda*, Berg.

Origem: Brasil

81. *C. resinosa*, Barb. Rodr.

Origem: Paraguai

82. *C. reticulata*, Berg.

Origem: Brasil

83. *C. rhombea*, Berg.

Origem: Brasil

84. *C. rhytidophylla*, Berg.

Origem: Brasil

85. *C. riedeliana*, Berg.

Origem: Brasil

86. *C. rivulares*, Niedenzu.

Origem: Brasil

87. *C. rufa* Niedenzu, l. c. (= *Abbevillea rufa*, Berg.)

Origem: Brasil

88. *C. rugosa*, Berg.

Origem: Brasil

89. *C. salviaefolia*, Berg.

Origem: Brasil

Revisão Bibliográfica

90. *C. sellowiana* (Berg) Mattos in Arq. Bot. Est. S.P. (1970): *Acranda sellowiana*.

Origem: Brasil

91. *C. Schelechtendaliana*, Niedenzu

Origem: Brasil

92. *C. sparsiflora* (DC) Macbride, l. c.: *Eugenia sparsiflora*

93. *C. speciosa* (Diels) Mc. Vaugh in Publ. (1958): *Psidium speciosum*

94. *C. stictopetala*, Kiaersk.

Origem: Brasil

95. *C. suaveolens*, Blume.

Origem: Brasil

96. *C. suffruticosa*, Berg.

Origem: Brasil

97. *C. synchrona*, Berg.

Origem: Brasil

98. *C. tenuifolia*, Berg.

Origem: Brasil

99. *C. terminalis* (Vell.) Mattos in Arq. Bot. Est. S.P (1970): *Psidium terminale*

100. *C. tomentosa*, H. B.

Origem: N. Granat.

101. *C. transalpina*, Berg.

Origem: Brasil

102. *C. triflora*, Baill.

Origem: Brasil

103. *C. Trichosepala*, Barb. Rodrig.

Origem: Paraguai

104. *C. vaccinioides*, Berg.

Origem: Brasil

Revisão Bibliográfica

105. *C. velutina*, Blume.

Origem: Brasil

106. *C. virescens*, Berg.

Origem: Brasil

107. *C. warmingiana*, kiaersk.

Origem: Brasil

108. *C. Widgreniana*, Berg.

Origem: Brasil

109. *C. xanthocarpa*, Berg.

Origem: Brasil

110. *C. yerutiensis*, Barb. Rodr.

Origem: Paraguai

3.3- A espécie *Campomanesia phaea* L.

3.3.1- Estudos botânicos

3.3.1.1- Posição taxonômica

De acordo com o sistema de Cronquist (CRONQUIST, 1996), a espécie *Campomanesia phaea* (O. Berg) L. tem a seguinte posição taxonômica:

DIVISÃO: Magnoliophyta Cronquist, Takhtajan,
Zimmermann; Taxon 15: 129-134. 1966.

CLASSE: Magnoliopsida ("Magnoliata") Cronquist
The evolution and classification of flowering
plants. Boston, Houghton, Mifflin Company 1968.

Revisão Bibliográfica

SUB-CLASSE: Rosidae Cronquist

The evolution and classification of flowering plants. Boston, Houghton, Mifflin Company 1968.

ORDEM: Myrtales ("Myrtiflorae") Endlicher

Gen. Pl. 2 (16): 1205. 1840.

FAMÍLIA: Myrtaceae Jussieu

Gen. Pl. ed. 322. 1789.

SUB-FAMÍLIA: Myrtoideae

TRIBO: Myrteae

SUB-TRIBO: Myrtinae

GÊNERO: *Campomanesia* Berg.

in Mart. Fl. Bras. Suppl. 14 (1)¹⁸: 613. 1859.

ESPÉCIE: *Campomanesia phaea* (O .Berg) L.

in Mart. Fl. Bras. Suppl. 14 (1)¹⁸: 614. 1859.

Revisão Bibliográfica

3.3.1.2- Denominação vulgar e científica

Denominação vulgar: Cambuci (PORTO, 1920; CORRÊA, 1984; L, 1986).

Denominação científica:

-*Abbevillea phaea* Berg.

-*Paivaea langsdorffii* Berg. var. *lauroana* Mattos (PORTO, 1920; CORRÊA, 1984; L, 1986).

3.3.1.3- Características morfológicas da *Campomanesia phaea* (O. Berg.) L.

Imagina-se que o nome "Cambuci" seja derivado do Tupi-guarani para "pote de barro" (às vezes escrito Cambuchi) (TIBIRIÇÁ, 1989), porque os frutos assemelham-se a potes de barro previamente feito pelos índios (PORTO, 1920).

Os frutos do cambuci, de 4,0 a 6,0 cm de diâmetro por 3,5 a 4,5 cm de espessura, contendo cada fruto 1 a 4 sementes, cada um com 8 mm de comprimento (PORTO, 1920), são únicos no gênero, caracteristicamente ovóide-romboidais com uma aresta horizontal. Eles têm forte fragrância adocicada mas são extremamente azedos como limão. São muito apreciados pela população que os conhecem, e são processados caseiramente obtendo-se geléias, gelatinas, sorvetes e licôres (L, 1986) e nos tempos coloniais, foram muito apreciados quando inseridos em

Revisão Bibliográfica

aguardente de cana, sós ou juntamente com os de Uvaia, dando a essa combinação, um aroma e paladar, particular e agradável (CORRÊA, 1984). É comum, atualmente, serem observados nas casas de bebidas em São Paulo, frutos inseridos em aguardente, para darem sabor a refrescos, ou para serem servidos como conserva, muito agradável segundo os apreciadores (PORTO, 1920). São verdes, mesmo quando maduros, carnudos e sem caroço, muitas vezes rachando-se quando caem ao solo. Vistos de lado são convexos na parte superior e turbinado-achatados na inferior; vistos de cima são às vezes de forma orbicular, mas geralmente apresentam a forma de um polígono irregular. Das sementes que apresentam (até 4), somente uma parte destas germinam. A germinação da semente demora 30 dias ou mais e o desenvolvimento da planta é muito lento (LORENZI, 1992).

A árvore do Cambuci que pode atingir até 10 metros de altura, apresenta ramos fosco-pubescentes enquanto jovens, folhas simples, opostas, pecioladas, elípticas a elíptica-oblongas com 4,0 a 10,0 cm de comprimento por 2,0 a 3,3 cm de largura. O pedúnculo é unifloral (ou raramente trifloral) com 5,0 a 18,0 mm de comprimento e 1,0 a 1,5 mm de largura, densamente pubescente (KAWASAKI, 1997). Flores brancas, de 5 sépalas, obtusas, carnosas, pontudas e aveludadas de ambos os lados e 5 pétalas, brancas e aveludadas exteriormente.

Revisão Bibliográfica

A espécie fornece madeira ótima para marcenaria e carpintaria, mas cujas dimensões permitem apenas o seu emprego em cabos de ferramentas e de instrumentos agrícolas (CORRÊA, 1984).

3.3.2- Estudos químicos

3.3.2.1- Substâncias do metabolismo secundário de mirtáceas

A família *Myrtaceae* apresenta folhas com tricomas glandulares unicelulares, ou às vezes pluricelulares, contendo óleo essencial (variados monoterpenóides, sesquiterpenóides, triterpenóides, outros terpenóides, ou polifenóis) em abundância, cavidades secretoras esquizógenas que ocorrem na maioria ou em todos os tecidos não lignificados e também com células taníferas espalhadas. Plantas quase sempre com proantocianidinas e normalmente também com ácidos gálico e elágico, às vezes produzindo saponinas (CRONQUIST, 1981).

3.3.2.2- Substâncias encontradas no gênero *Campomanesia*

Os metabólitos secundários principais da classe dos flavonóides já descritos em algumas espécies de

Revisão Bibliográfica

Campomanesia (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995) são os seguintes:

- *Campomanesia quazumaefolia* (Camb.) Berg.

Miricetina e Miricitrina (miricetina 3-*O* ramnosídeo)

- *Campomanesia pubescens* (DC) Berg.

Miricitrina (miricetina 3-*O* ramnosídeo)

- *Campomanesia xanthocarpa* Berg.

Miricitrina (miricetina 3- *O* ramnosídeo) e rutina (quercetina 3-*O* rutinosídeo).

MIRICITRINA

MIRICETINA

RUTINA

Metabólitos principais da classe dos flavonóides em *Campomanesia*.

Revisão Bibliográfica

3.3.3- Estudos farmacológicos

3.3.3.1- Aspectos farmacodinâmicos e usos das mirtáceas.

A família *Myrtaceae*, uma das mais características da nossa flora (BARROSO, 1984) apresenta grande interesse econômico. Entre suas espécies são citadas plantas produtoras de madeira, de óleos essenciais e de taninos.

O óleo essencial e as resinas obtidas a partir de suas folhas são aproveitadas na fabricação de diversos produtos: sabonetes, sabões, pastas dentifrícias, desinfetantes, inseticidas e desodorantes domiciliares.

Diversos tipos de óleos essenciais são obtidos de espécies de mirtáceas, tais como: *Eucalyptus polybracteata* RT. Baker, *Eucalyptus dumosa* A Cunn, *Eucalyptus globulus* Labildandiere, *Eucalyptus citriodora* Hoker, *Melaleuca leucadendron* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merril et Perry.

A espécie *Eucalyptus occidentalis* Endl. é boa produtora de taninos (METCALFE e CHALK, 1979).

Entre as plantas medicinais podem ser citadas o cravo da índia, *Syzygium aromaticum* (L.) Merril et Perry; a goiaba, *Psidium guayava* L.; a pimenta, *Pimenta officinalis* Lindl e o jambo, *Eugenia jambolana* Lam. As raízes e as folhas de algumas são prescritas contra as

Revisão Bibliográfica

disenterias agudas e o seu decocto em regra as cura bem depressa (CORRÊA, 1978).

Existem aproximadamente 200 espécies de mirtáceas que são produtoras de frutos comestíveis. Dentre elas, há dezenas que poderiam, como as goiabeiras e as jaboticabeiras, transformarem-se em fontes de renda, contribuindo para o abastecimento de frutos no mercado nacional (GOMES, 1973).

Entre as espécies prestigiadas pelo povo por seus frutos, temos: cambucazeiros, cambucieiras, goiabeiras, guabijueiros, gabirobeiras, jaboticabeiras, jambolaneiras, grumixameiras, araçaeiros, jambeiros, pitangueiras, pitombeiras e uvalheiras (HOEHNE, 1979).

3.3.4- Estudos microbiológicos

A falta de estudos biológicos do óleo essencial, estimulou-nos a iniciar através deste trabalho. Apesar de desconhecermos registros do uso da planta como agente antimicrobiano na medicina popular, o fato de vários óleos essenciais, extraídos de plantas medicinais, possuírem atividade antimicrobiana, levou-nos a testar o óleo e os extratos da espécie contra bactérias e fungos.

Revisão Bibliográfica

3.3.5. Biossíntese de terpenos

Os compostos terpênicos e os derivados politerpenóides, estão dentre as substâncias do metabolismo secundário das plantas de maior diversidade estrutural e pertencem a uma classe muito variada de produtos orgânicos.

Os óleos essenciais caracterizam-se por serem formados fundamentalmente desses componentes. Os de menor peso molecular são conhecidos desde muitos anos tendo sido isolados de plantas e utilizados para uma grande variedade de finalidades desde tempos pré-históricos. Sua volatilidade os fizeram fáceis de serem descobertos em material vegetal aromático e ao mesmo tempo rápidos de serem extraídos por destilação de folhas ou outros órgãos dos vegetais, Isso fez com que se chamassem de óleos 'essenciais'.

Os terpenos por seu fácil acesso e abundância, facilidade de obtenção e constituição química bruta relativamente simples, os fazem elementos favoritos de estudo dos químicos orgânicos (GEISSMAN, 1969).

Revisão Bibliográfica

Estudos realizados levaram à determinação das estruturas brutas da maioria dos terpenos mais comuns e os estudos mais recentes permitiram conhecermos a estereoquímica, as reações, os rearranjos e a biossíntese desses compostos.

A maioria dos terpenóides ocorrem livres nos tecidos vegetais, mas muitos aparecem nas formas glicosídicas, ésteres de ácidos orgânicos e até combinado com proteínas. Os componentes de menor peso molecular podem ser obtidos de material vegetal fresco por destilação à vapor, enquanto que os de peso mais elevado (C₂₀), são isolados por extração com solventes e purificados por cristalização, destilação e métodos cromatográficos. O ácido mevalônico que é um composto com seis átomos de carbono, derivado da condensação de três moléculas de ácido acético, é o “pai” dos compostos terpenóides, dando origem à unidade isoprênica fundamental. O uso de ácido acético e mevalônico marcados, permitiram estabelecer as rotas de biossíntese para os terpenos e derivados.

Revisão Bibliográfica

Numerosos estudos dos constituintes voláteis de algumas espécies vegetais como o eucalipto, os *Pinus* e espécies de menta, com auxílio de CO₂, ácido acético e mevalônico marcados com ¹⁴C, permitiram reconhecer as etapas do caminho biossintético principal Acetato>mevalonato > geranilpirofosfato > monoterpenos. Esse caminho biossintético fundamental é o início de uma rota de síntese que se ramifica em um número grande de caminhos subsequentes, dando como produtos, os componentes característicos dos óleos essenciais como monoterpenos acíclicos, terpenos mono, di e tricíclicos e componentes substituintes isoprenóides dos compostos fenólicos (BANTHORPE & CHARLWOOD, 1980).

Revisão Bibliográfica

Rota biossintética do cariofileno a partir do gama bisaboleno (sesquiterpeno cíclico)

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Botânica

4.1.1- Coleta e identificação

4.1.2- Caracterização macroscópica da folha

4.1.3- Caracterização microscópica da folha

4.2- Química

4.2.1-Triagem fitoquímica

4.2.2- Preparação do extrato

4.2.3- Perfil cromatográfico do óleo essencial

4.2.3.1- Isolamento e identificação dos componentes do óleo essencial (CG/EM)

4.2.4- Cromatografia em camada delgada preparativa do óleo essencial

4.2.5- Doseamento de taninos

4.2.5.1- Extrato liofilizado de folhas (E.B)

4.2.5.2- Droga constituída de folhas

4.3- Ensaaios biológicos

4.3.1- Ensaio de toxicidade aguda em camundongos

4.3.2- Ensaio microbiológico do óleo essencial em bactérias levedura e bolor

4.3.3- Ensaio microbiológico do E.B. em bactérias e levedura

4.1- Botânica

4.1.1- Coleta e identificação

O material vegetal, correspondente à folha de *Campomanesia phaea* L. utilizado para os estudos botânicos, químicos e farmacológicos foi coletado no Instituto de Agronomia da Estação Experimental de Ubatuba, no litoral norte de São Paulo.

Após as coletas, estas foram separadas e uma quantidade de folhas foi armazenada em um recipiente contendo etanol 70 %.

O material foi identificado por Dra. Maria Lúcia Kawasaki do Instituto de Botânica de São Paulo e sendo reconhecido como autêntico, seguiu-se o trabalho de pesquisa. O mesmo foi dividido em três partes, sendo uma destinada ao estudo morfológico e anatômico, outra

Material e Métodos

destinada ao preparo do extrato liofilizado (E.B) e a última, ainda fresca, para obtenção do óleo essencial em aparelho de Clevenger modificado (WASICKY e AKISUE, 1969). Para o preparo do extrato liofilizado, procedeu-se a limpeza, secagem e moagem do material vegetal.

Foram efetuadas duas coletas, sendo que todos os estudos realizados, derivaram-se da primeira coleta, sendo a segunda, utilizada para a extração do óleo essencial para os ensaios microbiológicos.

Material e Métodos

Material e Métodos

Amostra	Data da coleta	Descrição
01	21/08/98 (Ubatuba)	Quantidade: 3 Kg Material provido de muitas folhas, caules verdes, ausência de flores. Horário de coleta: 11:00 H (AM).
02	19/01/2000 (Ubatuba)	Quantidade: 5 Kg Material provido de muitas folhas, caules verdes e ausência de flores. Horário de coleta: 10:00 H (AM).

Material e Métodos

4.1.2 - Caracterização macroscópica da folha

Folhas adultas, secas, de vários tamanhos, foram analisadas quanto às suas dimensões, forma, aspectos externos de suas superfícies, cor, odor, sabor, e outras peculiaridades consideradas importantes para a diagnose da droga (OLIVEIRA e AKISUE, 1989). Para tanto, o material foi observado a olho nu, ou através de lupa de pequeno aumento. As medidas foram obtidas com régua e paquímetro.

4.1.3- Caracterização microscópica da folha

O estudo anatômico foi executado mediante a elaboração de cortes, à mão livre, no terço médio inferior do material vegetal conservado em etanol 70%, de acordo com as técnicas usuais (OLIVEIRA e AKISUE, 1989). As observações das estruturas e as fotomicrografias foram obtidas em aparelho Nikon®.

Na identificação de paredes e inclusões celulares foram utilizados diversos reagentes e corantes. A celulose foi caracterizada com o emprego de azul de astra, hematoxilina de delafield e cloreto de zinco iodado; a lignina com cloreto de zinco iodado, floroglucina clorídrica, fucsina ácida e safranina; o óleo fixo e óleo essencial com sudan III; o amilo, com lugol a 1% em água;

Material e Métodos

os taninos, com solução de cloreto férrico 2% em etanol absoluto. (OLIVEIRA e AKISUE, 1989).

4.2- Química

As folhas do vegetal foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar aquecido a 40-45 °C por cerca de 24 horas sendo posteriormente pulverizadas em moinho de facas e martelos, obtendo-se pó semi-fino (FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil, 1959).

4.2.1- Triagem fitoquímica

Foram feitos os ensaios , em duplicata, com as folhas de *Campomanesia phaea* L. a pesquisa de alcalóides (COSTA, 1978; DOMINGUES, 1973), saponinas (COSTA, 1978), cardiotônicos (COSTA, 1978; DOMINGUES, 1973), antraderivados (COSTA, 1978; DOMINGUES, 1973), flavonóides (COSTA, 1978; GRAYER, 1989), taninos e compostos fenólicos (COSTA, 1978, GRAYER, 1989; FARMACOPÉIA, 1959; SPENCER, 1988) e óleo essencial (COSTA, 1978).

- Flavonóides

Dois gramas de amostra foram fervidos com cerca de 30mL de etanol 70 % por 2 minutos, e após o

Material e Métodos

resfriamento, submeteu-se à filtração, obtendo-se o extrato. Com este extrato obtido, foram realizadas as seguintes reações de identificação:

- Reação de Shinoda;
- Reação com cloreto de alumínio;
- Reação com hidróxidos alcalinos;

- Taninos e compostos fenólicos

Um grama de droga pulverizada foi levado à fervura durante 5 minutos com 50,0 mL de água. Após resfriamento e filtração foram separadas alíquotas de 1,0 a 2,0 mL do extrato para a realização das seguintes reações de identificação:

- Adstringência;
- Reação com sais de ferro;
- Reação com acetato de chumbo;
- Reação com acetato de cobre;
- Reação com alcalóides;
- Reação com gelatina.

Material e Métodos

- Óleo essencial

O óleo essencial foi extraído das folhas frescas utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (WASICKY e AKISUE, 1969).

Utilizando-se a primeira coleta do material vegetal (Estação Experimental de Ubatuba - SP), 0,30 Kg de folhas foram extraídas por aproximadamente 4 horas. Da segunda coleta do material, foram empregados 6,00 Kg de folhas, extraídos por seis vezes. O tempo de extração para cada quilo de folhas foi de aproximadamente 8 horas. A análise dos componentes do óleo essencial foi feita através da cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em coluna (CC) e cromatografia gasosa (CG).

Parte do óleo essencial obtido da planta fresca foi estudado, com vistas à determinação de seus constituintes químicos principais. Empregou-se neste estudo, cromatógrafo a gás e cromatógrafo a gás acoplado à espectrômetro de massas.

4.2.2- Preparação do extrato

Quantidade de cem gramas de folhas pulverizadas obtidas da primeira coleta (item 4.2.1), foram percolados segundo o método A da Farmacopéia Brasileira II, empregando-se como líquido extrator, etanol

Material e Métodos

70%. O extrato hidroalcoólico foi, então, concentrado em rota-evaporador a vácuo sob pressão reduzida, e em seguida, liofilizado, obtendo-se assim, o extrato bruto (E.B).

4.2.3- Perfil cromatográfico do óleo essencial

Cinco microlitros (5 μ L) de uma mistura de 1 mL de óleo essencial com 9 mL de etanol absoluto, foram usados para cromatografia em camada delgada (CCD). Soluções de referência foram usadas como padrões (3 μ L): óxido de cariofileno e linalol.

4.2.3.1- Isolamento e identificação dos componentes do óleo essencial (CG/EM)

Para isolamento dos componentes do óleo essencial, foi utilizada a cromatografia em camada delgada preparativa com espessura de sílica 600 micra e para identificação dos componentes isolados foi feita inicialmente uma análise da fração volátil em um cromatógrafo a gás (CG)¹ seguida de cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massa (CG/EM)² e posteriormente, em CG/EM que tem um banco de dados³.

Material e Métodos

Dados dos aparelhos:

1- CG HP 6890 c/ injetor 6890

Injetor automático G 1530-A, G 1513-A

Amostra: Temperatura: 80 °C - 250 °C (10 ° C/min)

Fluxo de nitrogênio: 27,7 mL/min

Fluxo de hidrogênio: 40 mL/min

Ar comprimido: 200 mL/min

Temperatura do injetor: 250 °C

Temperatura do detector: 300 °C

Tempo de retenção: 1,28 min.

Amostra do óleo essencial: 4 µ L a 10%

Coluna: Metilsilicone com 0,32 mm/diam. 30 m comprimento.

2- CG/EM HP 5988 A

Cromatógrafo: HP 5890

Coluna: DB5 25 X 0,200 X 0,33

Temperatura do injetor: 230 °C

Temperatura do detector: 280 °C

Fluxo de Hélio: 85 mL/min

Temperatura inicial: 80 °C

Temperatura final: 250 °C

Rampa: 10 °C/min

Quantidade injetada: 1 µL

Solvente: Diclorometano

Material e Métodos

3- CG/EM com banco de dados

Cromatógrafo: SHIMADZU 17 A QP 5000

Coluna: DB5 (30 m x 0,25 mm)

Temperatura do injetor: 220 °C

Temperatura do detector: 250 °C

Fluxo de Hélio: 1,0 mL/min

Temperatura inicial: 60 °C

Temperatura final: 300 °C

Rampa: 30°C/min

4.2.4- Cromatografia em camada delgada preparativa do óleo essencial.

Foram comparados os perfis cromatográficos dos óleos essenciais obtidos das duas coletas e, observando-se que os perfis eram semelhantes, procedeu-se o ensaio utilizando-se o sistema cromatográfico abaixo.

1. Suporte: placa de vidro 20 X 20 cm

Adsorvente: sílica gel preparativa PF 254

Fase móvel: tolueno e acetato de etila (80:20)

Saturação: completa

Percurso: 12 cm

Espessura da sílica: 600 μ

Revelador: Anisaldeído sulfúrico

Material e Métodos

O revelador anisaldeído sulfúrico não foi aplicada à placa toda (apenas em uma pequena faixa lateral).

Baseado na faixa revelada (3,0 cm) onde foi possível a visualização das manchas, foram retirados as partes da sílica onde possivelmente estariam as substâncias de interesse, sendo armazenadas em frascos âmbar, e hermeticamente fechados. O monitoramento foi feito em CCD partindo-se da eluição do pó obtido com o mesmo solvente utilizado para a fase móvel (tolueno / acetato de etila).

4.2.5- Doseamento de taninos

4.2.5.1- Extrato liofilizado de folhas (E.B)

4.2.5.2- Droga constituída de folhas

As folhas pulverizadas de *Campomanesia phaea* L., bem como seu extrato liofilizado foram submetidas a ensaios de quantificação de taninos. Os ensaios foram feitos em triplicata.

Ensaio:

Foram adicionados a 0,750 g da droga em pó, 150 mL de água em um erlenmeyer. Aqueceu-se até a fervura e manteve-se em “banho-maria” por 30 minutos. Esfriou-se

Material e Métodos

em água corrente, e a mistura foi transferida com água para um balão volumétrico e completado a 250 mL. Deixou-se decantar os sólidos e o líquido foi filtrado através de um papel de filtro. Desprezou-se os primeiros 50 mL do filtrado e o restante foi usado para o ensaio.

Polifenóis totais: Diluiu-se 5,0 mL do filtrado para 25,0 mL com água, em balão volumétrico. Foi misturada 5,0 mL dessa solução com 1,0 mL de solução R de ácido fosfotúngstico e o volume, completado para 50,0 mL com uma solução de 15% (m/V) de carbonato de sódio R. Exatamente após 2 minutos da adição do último reagente, foi medida a absorbância a 715 nm (A1), usando água como o branco.

Polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele. A 10,0 mL do filtrado, foram adicionados 0,10 g de pó de pele CRS e agitada por 60 minutos. Filtrou-se, e 5,0 mL do filtrado foi diluída a 25 mL com água, em balão volumétrico. Foi misturada 5,0 mL dessa solução com 1,0 mL de solução R de ácido fosfotúngstico e o volume completado a 50,0 mL com uma solução a 15% (m/V) de carbonato de sódio R. Exatamente 2 minutos após adição do último reagente, foi medida a absorbância a 715 nm (A2), usando água como o branco.

Padrão. Realizou-se as seguintes operações à proteção da luz.

Material e Métodos

Dissolveu-se 50,0 mg de pirogálool R em água e o volume foi completado a 100 mL com o mesmo solvente. Diluiu-se 5,0 mL da solução a 100 mL com água. Foram misturadas 5,0 mL dessa solução com 1,0 mL de solução R de ácido fosfotúngstico e diluiu-se a 50,0 mL com uma solução de 15% (m/V) de carbonato de sódio R. Exatamente 2 minutos após a adição do último reagente, e 15 minutos da dissolução do pirogálool, mediu-se a absorbância a 715 nm (A3), usando água como o branco.

Calculou-se a porcentagem do conteúdo em taninos com a expressão:

$$\underline{13,12 (A1-A2)}$$

$$A3 \times m$$

onde: A1= absorbância a 715 nm da solução contendo polifenóis totais;

A2 = absorbância a 715 nm da solução contendo polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele;

A3 = absorbância a 715 nm da solução padrão de pirogálool;

m = massa inicial

13,12 = constante

Material e Métodos

4.3- Ensaio biológicos

Animais utilizados

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.

Os animais foram mantidos em gaiolas e em condições apropriadas por uma semana antes de iniciar o ensaio, fornecendo-lhes ração Purina® e água *ad libitum*.

4.3.1- Ensaio de toxicidade aguda em camundongos (THOMPSON, 1952; BRITO, 1994).

Para verificação de toxicidade aguda da droga, utilizaram-se grupos de 20 camundongos Swiss adultos e sadios que assim foram divididas: 10 fêmeas nulíparas e não-grávidas, sendo 5 para teste e 5 para controle e 10 machos, sendo 5 para teste e 5 para controle, acomodados em 4 gaiolas de tamanhos iguais.

A diferença de peso entre os grupos utilizados neste experimento não ultrapassou 20% do peso médio.

A temperatura do laboratório ficou entre 19°C a 25°C e os períodos de claro e escuro de 12 horas foram obedecidos.

Material e Métodos

No dia anterior à administração da dose, os camundongos foram pesados e submetidos a jejum por 6 horas.

Aos animais foram administrados, por via oral, água (grupo controle) e suspensão aquosa do extrato bruto 0,5 g/mL (grupo teste), na dose de 1mL/100g de massa corpórea (= 5g/Kg). Para isso, foram efetuados pesagens imediatas de cada camundongo. Uma vez administrado a dose, os animais foram observados por 14 dias seguidos, sendo que, nas primeiras 4 horas, efetuou-se uma observação mais cuidadosa, sendo ainda que, a ração e a água foram suspensas neste intervalo.

Após 24 horas da administração da droga, os camundongos foram novamente pesados e as quantidades de ração e água passaram a ser controlados.

A observação clínica dos sintomas (depressão, excitação, convulsão, estereotipia, piloereção, diarreia, constipação) produzidos pela administração da substância-teste nos animais foi feita diariamente durante todo o período dos experimentos.

Findo o tempo de contenção, os animais foram sacrificados com éter etílico e os órgãos como o coração, fígado, pulmão e rim foram observados macroscopicamente quanto ao tamanho e coloração.

Material e Métodos

4.3.2- Ensaio microbiológico do óleo essencial em bactérias, leveduras e bolor.

Microrganismos empregados: Na avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato bruto liofilizado foram empregados os seguintes microrganismos:

<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 6538)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 9027)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)
<i>Aspergillus niger</i>	(ATCC 16404)

Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial.

Os meios de cultura utilizados foram o meio Antibiótico (ATB)1 e o meio Antibiótico (ATB)2.

- PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA:

Os meios de antibióticos 1 e 2 foram preparados a partir do meio desidratado conforme as instruções do fabricante (Difco).

- Preparação do padrão de eugenol.

O padrão de eugenol foi obtido da empresa IFF.

Material e Métodos

- Preparação e padronização das suspensões de microrganismos (inóculo):

Culturas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) foram semeadas em estrias na superfície do meio inclinado de ágar caseína-soja e *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404) no meio de ágar sabouraud-dextrose. As bactérias foram incubadas a 30-35 °C por 24 horas; a levedura foi incubada à temperatura de 20 - 25 °C por 48 horas e o bolor foi incubado à temperatura ambiente por 7 dias.

Para os três primeiros microrganismos, a massa celular resultante do crescimento foi recolhida com 10,0 mL de solução fisiológica estéril e a suspensão obtida foi submetida a uma homogeneização em aparelho agitador Vortex. Foi retirado uma alíquota da suspensão, e diluiu-se com solução fisiológica estéril, de modo a obter em espectrofotômetro, uma transmitância equivalente a 25% no comprimento de onda de 580 nm.

Para o quarto microrganismo (*Aspergillus niger*), a massa celular, resultante da incubação do mesmo por 7 dias à temperatura ambiente, foi recolhida com 10 mL de uma solução 1% de polissorbato (Tween 40) em solução fisiológica 0,9%. Desta suspensão, o volume utilizado para inóculo foi de 0,075mL/100 mL de meio.

Material e Métodos

Foi distribuído para cada placa, volume de 10,0 mL de meio ATB 2 e após solidificação, foi adicionado sobre o mesmo, 5,0 mL de meio ATB 1 inoculado com suspensão padronizada (0,025 a 0,25 mL/100 mL de meio).

Após solidificação, usando-se de um furador de rolhas de 6 mm de diâmetro, foram feitos 3 orifícios em cada placa. Ao fundo do mesmo, foi adicionado uma gota de meio ATB 2 e a seguir, 0,025 mL das seguintes substâncias: eugenol, óleo de cambuci puro.

Findo o processo de aplicação das amostras e do padrão de eugenol, as placas foram incubadas em estufa a 35-37 °C durante 18 a 24 horas para as bactérias e leveduras, e 7 dias para os bolores.

4.3.3- Ensaio microbiológico do E.B. em bactérias e levedura

- Preparação da amostra:

O extrato bruto liofilizado de folhas preparado segundo a metodologia descrita no item 4.2.2 foi empregado na determinação de CMI (concentração mínima inibitória). Os meios de cultura utilizados foram o caldo e ágar de caseína-soja para as bactérias, e caldo e ágar de Sabouraud-dextrose para a levedura.

Material e Métodos

- Preparação dos meios de cultura:

Os meios de caseína-soja (ágar e caldo) e Sabouraud-dextrose (ágar e caldo) foram preparados a partir do meio desidratado, conforme as instruções do fabricante (Difco).

-Preparo e padronização das suspensões de microrganismos (inóculo):

Culturas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231), foram repicadas em estrias na superfície do meio inclinado de ágar caseína-soja no caso dos dois primeiros microrganismos e no meio inclinado de ágar sabouraud-dextrose, no caso dos dois últimos microrganismos. As bactérias foram incubadas a 30-35 °C por 24 horas; a levedura foi incubada à temperatura ambiente por 48 horas e o bolor foi incubado à temperatura ambiente por uma semana.

A massa celular resultante do crescimento microbiano foi recolhida com 9,0 mL de solução fisiológica estéril e a suspensão obtida foi submetida à contagem de microrganismos viáveis, pela técnica de semeadura em profundidade. Para isto, uma gota da suspensão original foi adicionada em 9,0 mL de solução fisiológica estéril e a partir desta, foram efetuadas diluições seriadas até 10^{-6}

Material e Métodos

em 9,0 mL de solução fisiológica estéril. Aliquotas de 0,5 e 1,0 mL da diluição 10^{-3} a 10^{-5} e 1,0 e 2,0 mL da diluição 10^{-6} das suspensões do microrganismo foram transferidas para placas de Petri e homogeneizadas com 15 mL de meio de cultura esterilizado, ágar caseína-soja para bactérias e ágar Sabouraud-dextrose para fungos e leveduras. Após incubação das placas, durante 24 horas a 30-35 °C para as bactérias ou por 48 horas em temperatura ambiente para o fungo ou levedura, foi efetuada a contagem de colônias utilizando-se contador de colônias Phoenix.

O número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) da suspensão original foi determinada, considerando-se a contagem das placas com cerca de 30 a 300 colônias.

A partir da suspensão original de cada microrganismo, de concentração conhecida, foram efetuadas diluições com solução fisiológica para a obtenção de suspensão contendo 10^2 UFC/mL.

- Preparo das soluções de antibióticos:

O padrão secundário de cloranfenicol serviu para o preparo das soluções deste antibiótico.

Material e Métodos

O cloranfenicol foi diluído em etanol até a concentração desejada e, a partir desta, as soluções-testes foram preparadas empregando como diluente, água estéril, de modo a obter no teste, as seguintes concentrações: 40,00; 20,00; 10,00 $\mu\text{g/mL}$.

Dez $\mu\text{g/mL}$ de cada concentração foram utilizados para a determinação de Concentração Mínima Inibitória para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

- Preparo da amostra:

Foram preparadas suspensões aquosas contendo 5,0 mg/mL, 2,5 mg/mL e 1,125 mg/mL do extrato bruto liofilizado de *Campomanesia phaea* L.

- Determinação da Concentração Mínima Inibitória pela técnica de diluição em meio líquido em microplacas KUBOTA & OHARA, 1998).

A partir da suspensão de cada microrganismo, de concentração conhecida, foram efetuadas diluições necessárias com solução fisiológica para se obter uma suspensão com 1×10^2 UFC/mL, considerando que para cada microplaca eram necessários 30 mL de meio de cultura (SDB e TSB, para levedura e bactérias, respectivamente).

Material e Métodos

Um modelo de microplaca pode ser vista na figura I.

Foram utilizados meios de cultura sem microrganismos como controle de contaminação, que foram transferidos para a microplaca com micropipetas multicanal no volume de 200 μ L (coluna 1). Como controle de crescimento, foram transferidos 200 μ L do meio inoculado para os poços correspondentes a meio + bactéria (coluna 2). Para os extratos orgânicos, foi utilizado um sistema de solventes composto por DMSO e água (1:1) e uma coluna (coluna 3) foi composta por 190 μ L de meio + bactéria + 10 μ L do solvente.

Cada poço das colunas 4 e 5 foram usadas para avaliar se os extratos estavam contaminados, e foram adicionados 190 μ L do meio sem inóculo + 10 μ L do extrato (um extrato por poço). As outras colunas foram utilizadas para a avaliação dos extratos, e sua composição era de 190 μ L do meio inoculado + 10 μ L da amostra.

Após a inoculação, as placas foram mantidas em incubadoras por 24 H, a uma temperatura de 30-35 °C, sendo os resultados lidos após 24 H, observando-se a presença ou não de turvação.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1- Botânica

5.1.1- Caracterização macroscópica das folhas

5.1.2- Caracterização microscópica das folhas

5.2- Química

5.2.1- Triagem fitoquímica

5.2.2- Rendimento (g/mL) do óleo essencial nas folhas

5.2.3- Rendimento do extrato liofilizado (E.B)

5.2.4- Perfil cromatográfico do óleo essencial

5.2.5- Cromatografia gasosa do óleo essencial de cambuci

5.2.6- Cromatografia gasosa acoplada a massa

5.2.7- Cromatografia em camada delgada preparativa do óleo essencial

5.2.8- Cromatografia gasosa das frações isoladas e dos respectivos padrões

5.2.9- Doseamento de taninos

5.2.9.1- Extrato liofilizado de folhas

5.2.9.2- Folha pulverizada

5.3- Farmacologia

5.3.1- Ensaio de toxicidade aguda em camundongos

5.3.2- Atividade antimicrobiana do óleo essencial para bactérias, levedura e bolor

5.3.3- Atividade antimicrobiana do EB de folhas para bactérias e levedura

5.1- Botânica

5.1.1- Caracterização macroscópica das folhas

As folhas se apresentam inteiras, de consistência submembranosa à subcoriácea, superfície lisa, levemente glabra e possuem cor verde-escura em sua face

Resultados

superior que é luzidia e verde-clara na face inferior. Quando transformadas em drogas, as folhas apresentam-se enroladas e tornam-se friáveis. A coloração adquirida na porção adaxial é marrom-avermelhada e marrom-castanho para a região abaxial. Apresentam odor aromático com sabor adstringente e ligeiramente amargo.

Quanto à lâmina foliar, o contorno da folha é elíptica a elíptica-lanceolada de 3,9 cm a 10,2 cm de comprimento por 1,8 cm a 3,4 cm de largura, ápice agudo à acuminado, base aguda, margem lisa, nervação peninérvea (Fig. II). As nervuras secundárias unem-se, próximo à borda foliar, formando arcos salientes.

O pecíolo, de inserção lateral, apresenta-se curvo, ligeiramente achatado e de secção transversal ovalada.

Fig. II - Droga constituída de folhas de *Campomanesia phaea* L.

Resultados

5.1.2- Caracterização microscópica das folhas

A análise minuciosa da folha de *Campomanesia phaea* L., possibilitou a verificação de características histológicas que se encontram descritas a seguir:

- Lâmina foliar

A cutícula é lisa nas duas faces (1 A, 1B, 3A, 3B - ct.) e a folha é hipoestomática.

A figura 1A (e. ad.) mostra superfície adaxial da epiderme constituída de células poligonais de paredes retas em vista frontal.

A porção abaxial apresenta estômatos anomocíticos (fig. 1B - e.). A cutícula é lisa nas duas faces (fig. 1A e 1 B).

A fig. 2A mostra secção transversal de folha destacando a região de nervura mediana. O contorno é aproximadamente plano-convexo.

O corte transversal da lâmina foliar de *Campomanesia phaea* L. (fig. 2A) permite observar a porção superior da epiderme, formada por células aproximadamente quadrangulares de paredes ligeiramente espessadas e celulósicas (fig. 3A - e. ad.). As células da porção inferior, apresentam também, células aproximadamente quadrangulares, porém menores (fig. 2A - e. ab.).

Figura 1- *Campomanesia phaea* L. – Folha

Vista frontal. A- Epiderme adaxial (400 X). B- Epiderme abaxial (400 X). Secção trnasversal. C- Mesofilo (200 X); D- Detalhe do mesofilo (400 X). Parênquima paliçádico – p.p.; Parênquima lacunoso – p.l; Epiderme adaxial – e.ad.; Epiderme abaxial – e.ab.; Estômato – e.; Drusas – d..

Resultados

Figura 2 – *Campomanesia phaea* L. – Folha

Secção transversal. A- Detalhe da região de nervura mediana (40 X). B- Lâmina foliar (100 X). C- Detalhe da lâmina foliar (200 X). t.t.s.- tricoma tector simples; ct.- cutícula; e.ad.- epiderme adaxial; c.s.- cavidade secretora; fl.- floema; x.- xilema; fb.- fibras; co.- córtex; p.p.- parênquima paliçádico; p.l.- parênquima lacunoso; c.- colênquima; e. ab.- epiderme abaxial.

Resultados

Resultados

O colênquima, constituído de 2 a 4 camadas de células arredondadas em secção transversal, apresentam espessamento celulósico aproximadamente uniforme (fig. 3A - c.). O feixe vascular da nervura central é bicolateral e apresenta-se disposto em arco (fig. 2A). No xilema, os vasos estão dispostos em fileiras radiais e encontram-se separados por raios parenquimáticos (fig. 3C - r.p.), estando os mesmos, presentes também no floema.

O floema, constituído de tubos crivados, células companheiras e parenquimáticas, mostra grande número de cristais prismáticos de oxalato de cálcio (fig. 3 C - c.p.).

O córtex mostra células aproximadamente arredondadas com espaços intercelulares do tipo meato (fig. 2A - co.). A figura 3-B mostra em detalhe as células do córtex com paredes celulósicas levemente espessadas.

O mesofilo dorsiventral mostra-se constituído de 2 camadas de parênquima paliçádico (fig. 1C e 2B - p.p.) e de 8 a 12 camadas de parênquima lacunoso (fig. 1C e 2A - p.l.). Drusas podem ser encontradas no parênquima lacunoso (fig. 1C e 1D - d.).

Cavidades secretoras podem ser observadas nas regiões de nervura mediana (fig. 2A - c.s.) e no mesofilo, intercaladas entre células do parênquima paliçádico (fig. 2A - c.s.) e células do parênquima lacunoso (fig. 2B e 2C - c.s.).

Figura 3- *Campomanesia phaea* L. – Nervura mediana

Secção transversal. A- Região de face adaxial (200 X).

B- Detalhe das células do córtex da região de nervura central (400 X). C- Detalhe do sistema vascular (200 X). e.
ad.- epiderme adaxial; c.- colênquima; c.s.- cavidade secretora; fl.- floema; v.- vaso do xilema; c.p.- cristal prismático; fb.- fibra; t.t.s.- tricoma tector simples; co.- córtex; r.p.- raio parenquimático.

Resultados

Resultados

As cavidades secretoras encontram-se com frequência próximo às epidermes (fig. 2A, 2B e 2C - c.s.). Tricomas tectores simples e cônicos podem ser observados (fig. 2A e 3A - t.t.s.).

- Pecíolo

O pecíolo em secção transversal apresenta células de contorno aproximadamente arredondado. O sistema vascular, bicolateral está disposto em arco. Cristais prismáticos podem ser observados na região de floema externo (fig. 4E - c.p.) e drusas, na região do córtex (fig. 4E - co.).

A epiderme, constituída de uma camada de células aproximadamente quadrangulares mostra tricomas tectores simples e cônicos (fig. 4F - t.t.s.), cavidades secretoras (fig. 4A - c.s.) que se distribuem próximos à epiderme.

As células do córtex apresentam paredes celulósicas espessadas (fig. 4B e 4D - co.). Drusas (fig. 4C e 4E - d.) e cristais prismáticos (fig. 4B, 4C e 4E - c.p.) ocorrem nesta região.

Figura 4 - *Campomanesia phaea* L. – Pecíolo

Secção transversal. A- Cavidade secretora e córtex (100 X). B- Córtex e cristal prismático (200 X). C- Cristal prismático e drusa (400 X). c.s.- cavidade secretora; co.- córtex; c.p.- cristal prismático; d.- drusa.

Resultados

Figura 4 - *Campomanesia phaea* L. – Pecíolo

Secção transversal. D- Detalhe do córtex (400 X). E- Feixe vascular (200 X). F- tricoma tector simples (200 X). fl.- floema; fb.- fibra; v.- vaso do xilema

Resultados

Resultados

5.2- Química

5.2.1- Triagem fitoquímica

As reações de identificação realizadas nas folhas da *Campomanesia phaea* L. apresentaram resultados positivos para taninos, flavonóides, saponinas e óleo essencial (Tab. 1).

Tabela 1: Resultados das reações de identificação de princípios ativos, realizadas em folhas de *Campomanesia phaea* L., coletadas no mês de agosto de 1998.

Grupo de princípios ativos	Reações	Resultados (folhas)
Glicósidos Cardiotônicos	Liebermann-Burchard	+
	Kedde	-
	Baljet	-
	Keller-Killiani	-
Glicósidos Saponínicos	Espuma	+
	Índice de Espuma (I.E)	+(400)
	Índice de Hemólise (I.H)	-
Antraquinonas	Borntraeger	-
Glicósidos Flavonoídicos	Hidróxidos alcalinos	+
	Shinoda	+
	Cloreto de alumínio	+

Taninos	Adstringência	+
	Sais de ferro	+
	Acetato de chumbo	+
	Alcalóides	+
	Gelatina	+
	Acetato de cobre	+
Alcalóides	Mayer	–
	Bertrand	–
	Dragendorff	–
	Bouchardat	–
Óleo essencial		+

+ teste positivo

– teste negativo

5.2.2- Rendimento (g/mL) do óleo essencial nas folhas

Um volume de 1 mL de óleo essencial foi obtido a partir da hidrodestilação de 400g (0,25 mL/100g) de folhas frescas de *Campomanesia phaea* L., quando submetidas em aparelho de Clevenger modificado (WASICKY e AKISUE, 1969).

5.2.3- Rendimento do extrato liofilizado (E.B)

Partindo-se de 100 g da droga constituída de folhas, após liofilização, foram obtidos 29,98 g (29,98%) de extrato liofilizado (E.B).

Resultados

5.2.4- Perfil cromatográfico do óleo essencial

Após preparação de placas para cromatografia em camada delgada o cromatograma resultante pode ser observado visualmente.

Fig. III : Cromatografia do óleo bruto de *Campomanesia phaea* L.

Resultados

5.2.5- Cromatografia gasosa do óleo essencial de Cambuci

Resultados

Tabela 2-A: Constituintes do óleo essencial de *Campomanesia phaea* L

1	-	-
2	hexanal	799 IK
3	(E)2-hexenal	845 IK
4	(Z)3-hexenol	849 IK
5	n-hexanol	861 IK
6	alfa-pineno	932 IK
7	beta-pineno	975 IK
8	p-cimeno	1020 IK
9	limoneno	1025 IK
10	1,8-cineol	1027 IK
11	linalol	1096 IK
12	alfa-terpineol	1180 IK
13	alfa-copaeno	1364 IK
14	beta-elemeno	1380 IK
15	βcariofileno	1408 IK
16	aromadendreno	1428 IK
17	alfa-humuleno	1443 IK
18	alo- aromadendreno	1451 IK
19	gama-muuroleno	1467 IK
20	beta-selineno	1479 IK
21	alfa-selineno	1488 IK
22	alfa-muuroleno	1491 IK
23	gama-cadineno	1505 IK
24	cis-calameneno	1513 IK
25	cis-calacoreno	1541 IK
26	(E)nerolidol	1554 IK
27	espatulenol	1569 IK
28	óxido de cariofileno	1573 IK
29	globulol	1575 IK
30	epi-globulol	1580 IK
31	não-identificado	1582 IK
32	não-identificado	1589 IK
33	óxido de humuleno II	1595 IK
34	não identificado	1599 IK
35	1-10 epi-cubenol	1615 IK
36	1- epicubeno	1622 IK
37	tau-cadinol + tau-muurolol	1630 IK
38	alfa-cadinol	1646 IK

Nota: IK = Índice de Kovat's

Os índices de Kovat's são índices de retenção usados para indicar as propriedades cromatográficas de retenção de uma coluna relativas aos *n*-alcanos. Os *n*-alcanos são usados como material de referência pois são quimicamente inertes. As porcentagens foram calculadas por normalização.

Resultados

Tabela 2-B: Constituintes do óleo essencial de *Campomanesia phaea* L.

*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : USPCAMP.D01 00/05/10 11:02:26
 Sample : Campomanesia USP
 ID :
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Type : Unknown
 Operator : R. Limberger
 Method File Name : RMOLEO.MET
 Vial No. : 1
 Barcode :

**** Peak Report ****

PKNO	R.Time	I.Time - F.Time	Area	Height	A/H(sec)	MK	%Total	Name
1	3.130	3.100 - 3.175	36820530	25220993	1.460		0.69	
2	3.482	3.458 - 3.533	11864404	6880289	1.724		0.22	
3	4.346	4.317 - 4.383	15033063	8026352	1.873		0.28	
4	4.407	4.383 - 4.483	82959340	41750937	1.987	V	1.55	
5	4.638	4.483 - 4.700	26125004	12946460	2.018	V	0.49	
6	6.295	6.242 - 6.358	112004449	47402024	2.363		2.10	
7	7.552	7.500 - 7.617	73140745	28390818	2.576		1.37	
8	9.109	9.067 - 9.183	27655431	9622372	2.874		0.52	
9	9.291	9.225 - 9.342	93711113	30339121	3.089		1.75	
10	9.378	9.342 - 9.450	57555847	21169720	2.719	V	1.08	
11	12.122	11.942 - 12.175	593582127	87056642	6.818		11.11	
12	15.920	15.833 - 15.992	128473130	32577844	3.944		2.41	
13	24.128	24.025 - 24.200	174288680	40270220	4.328		3.26	
14	24.818	24.708 - 24.892	192228259	42834414	4.488		3.60	
15	26.034	25.892 - 26.100	338197781	59859608	5.650		6.33	
16	26.803	26.717 - 26.917	94628782	19209874	4.926		1.77	
17	27.418	27.333 - 27.492	98297627	23133645	4.249		1.84	
18	27.735	27.650 - 27.808	112136232	27510796	4.076		2.10	
19	28.371	28.250 - 28.483	170713651	23954689	7.127		3.20	
20	28.877	28.708 - 28.983	370039540	58777559	6.296		6.93	
21	29.225	29.100 - 29.292	209318549	39947975	5.240		3.92	
22	29.357	29.300 - 29.433	41551072	11380645	3.651		0.78	
23	29.924	29.850 - 30.000	65852022	16332413	4.032		1.23	
24	30.260	30.192 - 30.342	46905883	11373776	4.124		0.88	
25	31.436	31.383 - 31.525	30961879	8072877	3.835		0.58	
26	31.992	31.908 - 32.058	77838203	19371469	4.018		1.46	
27	32.643	32.508 - 32.683	232542300	40134415	5.794		4.35	
28	32.821	32.683 - 32.875	628457596	70479472	8.917	V	11.77	
29	32.892	32.875 - 32.983	134506570	60166503	2.236	V	2.52	
30	33.125	33.042 - 33.167	84625523	17363447	4.874		1.58	
31	33.197	33.167 - 33.267	68138453	20400875	3.340	V	1.28	
32	33.508	33.425 - 33.633	80826664	14469176	5.586		1.51	
33	33.767	33.675 - 33.833	101676340	23348691	4.355		1.90	
34	33.919	33.833 - 34.025	84871448	17162040	4.945	V	1.59	
35	34.480	34.425 - 34.558	39783138	10640805	3.739		0.74	
36	35.034	34.917 - 35.117	100374249	18509074	5.423		1.88	
37	35.591	35.442 - 35.742	399276423	61933879	6.447		7.48	
38	41.179	41.025 - 41.333	103548311	8193830	12.637		1.94	
Total			5340510354		100.00			

Resultados

5.2.6- Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa

O cromatograma evidenciou que o óleo é constituído de aproximadamente 38 constituintes. A análise CG ofereceu perfil cromatográfico evidenciando pelo menos 9 picos principais (Tabela 2-A e 2B) e os espectros de massa dos componentes do óleo obtidos na cromatografia gasosa, foi detalhado como é mostrado nas páginas seguintes.

Resultados

Espectros de massa dos componentes do óleo essencial obtidos na cromatografia gasosa

IK 799: hexanal

IK 975: beta-pineno

IK 845: (E)-2-hexenal

IK 1020: p-cimeno

IK 849: (Z)-3-hexenol

IK 1025: limoneno

IK 861: n-hexanol

IK 1027: 1,8-cineol

IK 932: alfa-pineno

IK 1096: linalol

Resultados

Espectros de massa dos componentes do óleo essencial obtidos na cromatografia gasosa

IK 1180: alfa-terpineol

IK 1364: alfa-copaeno

IK 1380: beta-elemeno

IK 1408: beta-cariofileno

IK 1428: aromadendreno

Resultados

Espectros de massa dos componentes do óleo essencial obtidos na cromatografia gasosa

IK 1443: alfa-humuleno

IK 1451: alo-aromadendreno

IK 1467: gama-muuroleno

IK 1479: beta-selineno

IK 1488: alfa-selineno

Resultados

Espectros de massa dos componentes do óleo essencial obtidos na cromatografia gasosa

IK 1491: alfa-muuroleno

IK 1505: gama-cadineno

IK 1513: cis-calameneno

IK 1541: alfa-calacoreno

IK 1554: (E)-nerolidol

Resultados

Espectros de massa dos componentes do óleo essencial obtidos na cromatografia gasosa

IK 1569: espatulenol

IK 1573: óxido de cariofileno

IK 1575: globulol

IK 1580: epi-globulol

Resultados

Espectros de massa dos componentes do óleo essencial obtidos na cromatografia gasosa

IK 1582: não identificado

IK 1589: não identificado

IK 1595: óxido de humuleno II

IK 1599: não identificado

Resultados

Espectros de massa dos componentes do óleo essencial obtidos na cromatografia gasosa

IK 1615: 1-10-epi-cubenol

IK 1622: 1-epi-cubenol

IK 1630: tau-cadinol

IK 1630: tau-muuroiol

IK 1646: alfa-cadinol

Resultados

Espectros de massa dos componentes do óleo essencial obtidos na cromatografia gasosa

IK 1799: não identificado

Resultados

5.2.7- Cromatografia em camada delgada preparativa do óleo essencial

O método de isolamento dos componentes do óleo essencial de cambuci utilizado neste trabalho foi a cromatografia em camada delgada preparativa, do qual obteve-se quatro frações principais, aqui chamadas de fração 1 (R_f 0.83), fração 2 (R_f 0.70), fração 3 (R_f 0.61) e fração 4 (R_f 0.52).

Fig. IV : Cromatografia do óleo bruto e suas principais frações.

Resultados

Comparação entre os perfis cromatográficos do óleo bruto, com as frações 1,2,3 e 4.

Fig. V: Cromatograma comparativo do óleo bruto com as suas frações e respectivos padrões (linalol e óxido de cariofileno)

Resultados

5.2.8- Cromatografia gasosa das frações isoladas e dos respectivos padrões

Foram aplicadas em cromatografia gasosa, as frações isoladas 1 e 3 e seus respectivos padrões, (óxido de cariofileno e linalol). Após análise dos espectros, pôde-se deduzir que as substâncias 1 e 3 são provavelmente, o óxido de cariofileno e o linalol, respectivamente. As frações 2 e 4 não foram identificadas.

Resultados

Cromatografia gasosa da fração 1

*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.414	637181	204936			91.9097	
2	6.700	4174	1744			0.6020	
3	8.555	2964	940	V		0.4275	
4	8.624	1361	405	V		0.1962	
5	8.699	2572	487	V		0.3709	
6	8.807	4633	1144	V		0.6683	
7	8.970	1605	367	V		0.2315	
8	9.070	1354	504	V		0.1953	
9	9.125	1510	496	V		0.2178	
10	9.220	2734	811	V		0.3943	
11	9.312	4501	1564	V		0.6493	
12	9.382	6362	1793	V		0.9176	
13	9.506	4334	712	V		0.6251	
14	10.311	10024	1194	V		1.4459	
15	10.498	3289	425	V		0.4744	
16	12.434	2194	545	V		0.3165	
17	13.653	1123	452	V		0.1619	
18	14.114	1357	203			0.1957	

Resultados

Cromatografia gasosa da fração 1

Data:FR1C11.D01 Method:FR1C11.M01 Ch=1
mV Chrom:FR1C11.C01 Atten:3

Resultados

Cromatografia gasosa do padrão de óxido de

*** Chromatogram *** Filename: CARIOC11.C01

*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.399	397445	135246			33.3615	
2	6.705	2608	960			0.2189	
3	8.458	2500	885	V		0.2099	
4	8.705	1079	324	V		0.0905	
5	8.841	712561	235271	SV		59.8123	
6	9.077	52972	18195	T		4.4465	
7	9.390	1590	314	TV		0.1334	
8	9.479	1310	274	TV		0.1100	
9	9.973	2651	686			0.2226	
10	10.312	8947	1047	V		0.7510	
11	10.471	1404	340	V		0.1179	
12	12.001	1005	410	V		0.0843	
13	12.033	1629	836	V		0.1368	
14	12.429	2494	748	V		0.2094	
15	12.510	1133	391	V		0.0951	

1191328

395926

100.0000

Resultados

Cromatografia gasosa da fração 2

*** Chromatogram *** Filename:FR2-2.C01

*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.989	9080	6554			0.1096	
2	1.055	8135645	1260848	SVE		98.1839	
3	3.988	3189	571	T		0.0385	
4	5.165	7122	1065			0.0859	
5	8.521	1135	315	SV		0.0137	
6	8.718	5056	9875			0.0610	
7	9.187	1915	400	V		0.0231	
8	9.273	2699	785	V		0.0326	
9	9.341	2920	682	V		0.0352	
10	9.504	1521	287	V		0.0184	
11	9.732	6706	1283	V		0.0809	
12	9.936	58148	9701	V		0.7018	
13	10.126	15638	2857	V		0.1887	
14	10.217	7010	1704	V		0.0846	
15	10.314	8111	1448	V		0.0979	
16	10.408	11348	1478	V		0.1370	
17	10.675	2931	511	V		0.0354	
18	10.932	3728	523	V		0.0450	
19	11.195	1082	123	V		0.0131	
20	11.391	1148	212	V		0.0139	

8286132

1301221

100.0000

Resultados

Cromatografia gasosa da fração 2

Data:FR2-2.D01 Method:OLEOESSE.MET Ch=1
mV Chrom:FR2-2.C01 Atten:4

Resultados

Cromatografia gasosa da fração 3

*** Chromatogram *** Filename:FR3-2.C01

*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.111	123223	30655			39.2186	
2	6.207	2266	569	V		0.7211	
3	6.355	2330	543	V		0.7414	
4	9.494	1901	503	SV		0.6052	
5	9.696	2705	840	V		0.8609	
6	9.851	23925	5800	V		7.6147	
7	9.917	9624	3945	V		3.0632	
8	9.983	39777	7572	V		12.6600	
9	10.170	7456	2763	V		2.3732	
10	10.260	24733	5462	V		7.8720	
11	10.355	46418	14025	V		14.7737	
12	10.441	16943	3440	V		5.3924	
13	10.609	2899	870	V		0.9227	
14	10.673	1985	692	V		0.6317	
15	10.724	1574	634	V		0.5011	
16	10.764	2510	636	V		0.7988	
17	10.905	1132	333	V		0.3603	
18	11.014	1690	275	V		0.5378	
19	11.194	1104	280	V		0.3514	

314196

79838

100.0000

Resultados

Cromatografia gasosa do padrão de linalol

*** Chromatogram *** Filename: LIN.C01

*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.799	2645	555			3.5670	
2	5.041	3461	690	V		4.6672	
3	5.232	48338	7056	V		65.1873	
4	6.497	2626	155			3.5419	
5	10.337	6159	716	V		8.3058	
6	10.498	4662	449	V		6.2867	
7	11.272	1272	196	V		1.7150	
8	11.347	1294	185	V		1.7453	
9	12.451	1037	275	V		1.3978	
10	13.676	1242	453	V		1.6751	
11	14.146	1417	181	V		1.9108	

74152

10911

100.0000

Resultados

Cromatografia gasosa da fração 4

*** Chromatogram *** Filename:FR4-2.C01

*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.112	1524	410			2.4812	
2	6.350	9877	2477			16.0847	
3	9.818	1070	256			1.7425	
4	9.921	25090	6582	SV		40.8597	
5	10.275	4113	1055	V		6.6975	
6	10.342	15349	3179	SV		24.9961	
7	10.781	1507	335	V		2.4541	
8	10.991	1127	217	V		1.8355	
9	11.431	1749	433	V		2.8487	

61406

14942

100.0000

Resultados

5.2.9- Doseamento de taninos

5.2.9.1- Extrato liofilizado de folhas (EB)

O teor de taninos obtido no extrato bruto, para este experimento e neste lote foi de 13,31%.

5.2.9.2- Folha pulverizada

O teor de taninos obtido para a folha pulverizada nas mesmas condições acima foi de 13,62%.

5.3- Farmacologia

5.3.1- Ensaio de toxicidade aguda em camundongos.

Na toxicidade aguda, a dose testada foi de 5g/Kg, via oral de acordo com Brito (1994).

Na dose citada, não houve morte de nenhum camundongo, tanto para os submetidos a testes como para os controles.

Pôde ser observado que nas primeiras duas horas após a administração da droga e da água, ambos os grupos (teste e controle), ficaram muito agitados, e nas duas horas posteriores, os mesmos ficaram muito sonolentos, “mergulhando na maravalha”. Após o término deste período, os animais voltaram a caminhar pela gaiola.

Resultados

Os grupos de animais, não apresentaram nenhum outro tipo de anormalidade, como por exemplo, apatia, pêlos arrepiados, dificuldade de movimentação nas patas traseiras, respostas tardias aos estímulos, respiração ofegante, etc.

Os órgãos em exame anátomo-patológico (coração, pulmão, rins, fígado e baço) entre os grupos estudados, não apresentaram diferenças entre si.

Toxicidade aguda

A seguir, mostraremos quadros e gráficos comparativos entre testes e controles machos e fêmeas de ração e água consumidas durante o experimento.

Resultados

Tabela 3: Comparação entre controle e teste fêmeas para ração e água consumidos durante o experimento.

*** Dosagem do EB liofilizado: 5g/Kg**

Dia	Ração (g/animal/dia)		Água (mL/animal/dia)	
Fêmeas controle/teste	controle	teste	controle	teste
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	10,48	5,60	10,00	6,00
4	9,00	6,70	9,00	9,00
6	7,63	7,50	8,00	10,00
8	6,13	8,33	9,50	10,63
10	6,07	5,50	7,50	8,75
12	6,91	5,96	8,00	8,13
14	7,20	6,14	9,50	9,38

Não houve morte de nenhum animal.

Resultados

Tabela 4: Comparação entre controle e teste machos para ração e água consumidos durante o experimento.

*** Dosagem do EB liofilizado: 5g/Kg**

Dia	Ração (g/animal/dia)		Água (mL/animal/dia)	
Machos controle/teste	controle	teste	controle	teste
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	10,28	4,04	15,00	4,00
4	9,38	8,80	11,75	9,00
6	10,75	9,80	15,63	11,00
8	11,11	7,85	20,00	10,00
10	8,34	7,94	15,00	9,50
12	9,10	9,00	15,00	10,00
14	8,83	9,17	16,25	10,00

Não houve morte de nenhum animal.

Resultados

Resultados

Resultados

Resultados

5.3.2- Atividade antimicrobiana do óleo essencial para bactérias, levedura e bolor.

Microrganismo	Padrão de eugenol	Óleo de cambuci
<i>S. aureus</i>	inibiu (24-32 mm)	inibiu (12 mm)
<i>P. aeruginosa</i>	não inibiu	não inibiu
<i>C. albicans</i>	inibiu (30 mm)	inibiu (10 mm)
<i>A. niger</i>	inibiu (56 mm)	inibiu (16 mm)

5.3.3- Atividade antimicrobiana do EB de folhas para bactérias e levedura.

Microrganismo	Dose (250 µg)	Dose (125 µg)	Dose (62,5 µg)
<i>S. aureus</i>	+++	+++	++
<i>P. aeruginosa</i>	—	—	+++
<i>C. albicans</i>	—	++	+

- ativo (houve inibição; o microrganismo não cresceu);
- + inibição parcial; o meio não turvou mas o microrganismo cresceu;
- ++ o meio turvou e o microrganismo cresceu;
- +++ turvação intensa e o microrganismo cresceu.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1- Botânica

6.1.1- Caracterização macroscópica

6.1.2- Caracterização microscópica

6.1.2.1- Anatomia da lâmina foliar

6.1.2.2- Anatomia da nervura mediana

6.1.2.3- Anatomia do pecíolo

6.2- Química

6.3- Toxicidade aguda

6.4- Atividade antimicrobiana

Os frutos *édulos* da *Campomanesia phaea* L. são pouco conhecidos pela população brasileira pois são pouco cultivados e comercializados. Raro são os casos em que podem ser vistos em mercado de frutas e legumes.

No presente trabalho, resolvemos trabalhar somente as folhas do vegetal devido à mesma apresentar óleos essenciais. Para tanto, o material foi coletado manualmente no período da manhã e tempo não chuvoso, devido a maior presença de óleos essenciais sob estas condições (OLIVEIRA e AKISUE, 1991).

A diferença no teor de óleo proveniente das diferentes coletas não foi significativa, ou seja, os rendimentos foram praticamente os mesmos.

Discussão

6.1- Botânica

6.1.1- Caracterização macroscópica

Destacam-se para a diagnose macroscópica das folhas, características como a presença de margem lisa, nervação penínérvea saliente em sua face inferior de coloração marrom-acastanhada, sendo que as nervuras são impressas no lado da epiderme superior. Ambas as superfícies apresentam tricomas quando jovens, que passam a ser levemente glabras quando atingem o pleno desenvolvimento.

Em relação à base foliar, JORGE, L.I.F., (1992), afirma que a mesma é do tipo cuneiforme e de acordo com PORTO (1920) e nossas observações, a base é aguda.

O pecíolo piloso apresenta-se levemente curvo, de inserção lateral e constitui um item importante na diagnose.

Confrontando as observações realizadas, no presente estudo, com a literatura, é possível reconhecer, na espécie analisada, algumas características morfológicas da família *Myrtaceae*. Dentre estas se destacam: plantas lenhosas, arbóreas com folhas simples, inteiras, opostas, com estípulas muito pequenas ou ausentes, flores geralmente brancas e frutos carnosos do tipo baga que são édules (JOLY, 1975). As folhas deixam ver por transparência, quando observadas frente a uma fonte luminosa, pontos translúcidos, indicativos da

Discussão

presença de glândulas no mesofilo (CORRÊA, 1978; JOLY, 1975). Em relação às características organolépticas, foi possível verificar, na espécie, sabor adstringente e ligeiramente amargo e presença de odor aromático característico.

Quando transformado em droga, ainda que, sob secagem à sombra, o odor é menos intenso que no vegetal fresco, apresentando-se levemente aromático.

6.1.2- Caracterização microscópica

O estudo microscópico de *Campomanesia phaea* L., abordou a análise da folha sobre vários aspectos anatômicos, tais como, lâmina foliar, nervura central e pecíolo.

6.1.2.1- Anatomia da lâmina foliar

Na análise microscópica de folha, em secções transversais do terço médio inferior, particularmente na região da lâmina foliar, observam-se características importantes, não exclusivas da espécie em questão, mas que podem auxiliar na diagnose: o mesofilo é dorsiventral, constituído de 2 camadas de parênquima paliádico que ocupa cerca de 1/3 do mesofilo, e células do parênquima lacunoso, com 8 a 12 camadas apresentando formato arredondado ou lobado (figuras 1C, 1D e 2B), observando-se ainda, a presença de cavidades secretoras,

Discussão

contendo óleo essencial, que estão distribuídas neste tecido.

Em relação às epidermes, em cortes transversais, ambas as faces são constituídas por uma camada de células quase quadrangulares, sendo que as células da epiderme abaxial são menores (figuras 1C, 2A e 2B). Em cortes paradérmicos (figuras 1A e 1B), é possível verificar a epiderme superior com células de contorno poligonal e a epiderme inferior, com células de contorno ligeiramente sinuoso. Os estômatos, restritos à epiderme inferior, são predominantemente do tipo anomocítico, pouco frequente nas folhas da maioria das mirtáceas, estando de acordo com METCALFE & CHALK (1979). Tricomas tectores cônicos aparecem com certa frequência sobre ambas as epidermes, sendo mais intenso, na inferior.

Segundo JORGE, L.I.F., (1992), o mesofilo apresenta hipoderme constituída por uma única fileira de células, porém, neste trabalho, tal estrutura não foi observada. Nota-se a presença de cavidades secretoras sub-epidérmicas, visualizadas pelas pontoações translúcidas que ocorrem na superfície da folha e que estão distribuídas entre células do parênquima paliádico, do parênquima lacunoso, ou ainda, no córtex (figuras 2A e 2C). Drusas podem ser vistas no mesofilo (figuras 1C e 1D).

Discussão

6.1.2.2- Anatomia da nervura mediana

Secções transversais do terço médio inferior da folha na região de nervura mediana, mostra as seguintes estruturas: feixe vascular do tipo bicolateral o qual está envolvido por uma bainha de fibras (figura 2A), tecido colenquimático, constituído por células arredondadas com espessamento uniforme de celulose (figura 3A e 3B), pequenos grãos de amido dispersos no mesofilo, cavidades secretoras na epiderme abaxial e adaxial (figura 2A) e região floemática apresentando pequenos cristais prismáticos de oxalato de cálcio (figura 3C).

6.1.2.3- Anatomia do pecíolo

O pecíolo de *Campomanesia phaea* L. apresenta-se ligeiramente achatado e de secção transversal ovalada. O sistema vascular bicolateral está disposto em arco (figura 4E).

Assim como nas outras partes da folha, as inclusões celulares inorgânicas de oxalato de cálcio na forma de cristais prismáticos e de drusas estão presentes, e podem ser visualizadas nas regiões de córtex e de floema (figuras 4B, 4C e 4E). Tricomas tectores simples cônicos (figura 4F) com parede celular lignificada aparecem com certa frequência na epiderme, bem como cavidades secretoras, que se localizam próximas à mesma.

Discussão

6.2- Química

Através dos resultados obtidos com a triagem fitoquímica realizada no item 4.2.2, podemos concluir que a droga apresenta saponinas, flavonóides, taninos e óleo essencial.

Em relação às saponinas, o pó da droga, extraído com água, não apresentou hemólise, porém apresentou resultados positivos para a espuma.

Quanto aos glicosídeos flavonoídicos, apesar da clorofila contida na folha ter dificultado a visualização na reação de Shinoda, em outras reações como cloreto de alumínio e hidróxidos alcalinos foi possível detectar a sua presença.

Com a droga pulverizada e com o extrato liofilizado (EB) foram feitos os doseamentos para taninos, uma vez que os ensaios preliminares confirmavam a presença dos mesmos em todas as reações de identificação, vindo a confirmar o que se suspeitava no início do trabalho, pois sabíamos que a medicina popular usava e ainda usa, as folhas e cascas do caule e dos frutos no tratamento da disenteria (JORGE, L.I.F., 1992).

Acredita-se que o resultado positivo do extrato bruto liofilizado frente a *Pseudomonas aeruginosa* deva-se à presença do tanino, que estando em quantidade significativa no órgão em questão, possibilitaria este efeito. Quanto ao óleo essencial, o mesmo foi o objeto

Discussão

maior de estudo. A presença de manchas translúcidas na lâmina foliar, característico das mirtáceas, e o odor que elas exalavam davam evidências de que poderíamos encontrar esta substância; a análise microscópica das folhas possibilitou-nos esta confirmação.

A liofilização do extrato bruto obtido, foi feita no intuito de se obter conservação do mesmo durante todo o período de investigação fitoquímica. Assim, os estudos cromatográficos e farmacológicos foram realizados com o extrato bruto liofilizado (EB), ressuspenso convenientemente.

Quimicamente, a amostra do óleo essencial, obtido por hidrodestilação das folhas da planta, foi analisada para identificação de seus componentes através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foram obtidos espectros que interpretados permitiram o reconhecimento de substâncias puras voláteis presentes na mistura. A análise do óleo foi feita em aparelho Shimadzu QP 5000. Foram calculados os índices de Kovat's utilizando série homóloga de hidrocarbonetos. Dentre os 38 componentes reconhecidos, 4 produtos não foram identificados. Dois componentes não identificados (1582 e 1589), são provavelmente isômeros do eudesmol e são estruturas propostas pelo banco de dados, mas como os índices não conferem com os isômeros mais conhecidos, não podemos atribuir as configurações necessárias.

Discussão

O método para isolamento dos componentes do óleo essencial de cambuci, através da cromatografia em camada delgada preparativa, não demonstrou ser um método eficiente. As frações, aparentemente isoladas quando vistas em CCD preparativa, mostraram várias “impurezas” quando submetidas à cromatografia gasosa.

6.3- Toxicidade aguda

No ensaio de toxicidade aguda, a dose única administrada foi de 5,0g /Kg por via oral.

Não houve morte de nenhum animal e nenhum sintoma de toxicidade, seja no sistema digestório, no sistema nervoso central e periférico, no sistema locomotor, urinário e circulatório. Assim, de acordo com a referência (BRITO, 1994), considera-se o extrato como sendo não tóxico.

6.4- Avaliação antimicrobiana

O óleo essencial de *Campomanesia phaea* (O. Berg) L. mostrou atividade somente para bactéria gram positiva (*Staphylococcus aureus*), não mostrando atividade para a *Pseudomonas aeruginosa*.

Quando comparado com o padrão de referência, o eugenol, o mesmo apresentou inibição cerca de quatro

Discussão

vezes menor para *Staphylococcus aureus*, seis vezes menor para a levedura *Candida albicans*, e cinco vezes menor para o bolor *Aspergillus niger*. Esta atividade antimicrobiana não pode ser afirmada que é devida à ação de apenas um dos componentes presentes em maior quantidade no óleo. Não se pode afirmar, portanto, que a atividade antimicrobiana do óleo é devida ao óxido de cariofileno ou ainda, ao linalol, compostos identificados no óleo essencial de cambuci.

Analizando o resultado obtido no ensaio microbiológico do extrato bruto liofilizado (EB) para bactérias e levedura podemos afirmar que a concentração mínima inibitória (CMI) do mesmo para a *Pseudomonas aeruginosa* foi de $62,5 \mu\text{g} < \text{CMI} < 125 \mu\text{g}$.

Na comparação entre os diferentes extratos (óleo e EB) utilizados na avaliação microbiológica, os resultados são “opostos”, ou seja, o óleo essencial não mostrou atividade para *Pseudomonas aeruginosa*, mas mostrou atividade para os demais microrganismos. Já o extrato bruto liofilizado de folhas, mostrou atividade para esta bactéria, que acreditamos ser devido à presença de taninos, porém não mostrou atividade para os demais microrganismos, que provavelmente são sensíveis apenas aos componentes do óleo.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Macroscopicamente, as folhas são simples, providas de pontos translúcidos, com aroma agradável e peculiar com sabor adstringente e amargo.

Microscopicamente, as folhas são hipoestomáticas, com estômatos do tipo anomocítico. Os tricomas tectores são simples, apresentam glândulas subepidérmicas e o mesofilo é heterogêneo e assimétrico. Quanto ao feixe vascular, o mesmo é do tipo bicolateral, apresentando drusas e cristais prismáticos de oxalato de cálcio.

Os grupos de princípios ativos presentes na espécie foram o óleo essencial, os flavonóides e os taninos. O óleo essencial apresentou 38 constituintes dos quais 34 foram identificados neste trabalho, sendo que, 2 deles, que estão em maior quantidade, foram isolados (óxido de cariofileno e linalol).

O teor de taninos nas folhas da espécie em questão foi de 13,62% e no extrato hidroalcoólico 70% liofilizado de folhas (EB), 13,31%.

O método de isolamento utilizado para os constituintes do óleo essencial (cromatografia em camada delgada preparativa) não demonstrou ser eficiente, haja visto que, após análise em cromatografia gasosa, detectou-se a presença de outros constituintes.

No ensaio biológico de toxicidade aguda em camundongos, na dose de 5g/Kg, via oral do EB ressuspendido em água, não houve morte de

Conclusões

nenhum animal, seja para os submetidos a teste, como também para aqueles submetidos a controle.

Na avaliação microbiológica do óleo essencial pela técnica da difusão em ágar, o mesmo demonstrou ter ação, ainda que remota sobre bactérias gram positivas (*S. aureus*), levedura (*C. albicans*) e bolor (*A. niger*).

O EB de *Campomanesia phaea* (O. Berg.) L. pela técnica de diluição em meio líquido em microplacas apresentou atividade antimicrobiana apenas para *P. aeruginosa*. Supõe-se que esta ação seja devida aos taninos que estão presentes no órgão em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANTHORPE, D.V., CHARLWOOD, B.V. - *Secondary Plant Products*. New York: Springer Verlag 1980. p.185.

BARROSO, G.M. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa: Imprensa Universitária - Universidade Federal de Viçosa, 1984. v. 2, p.114-20.

BRITO, A.S. *Manual de ensaios toxicológicos in vivo*. Campinas: editora UNICAMP, 1994. p.11-40.

CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1, 1926.

CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, vol.1, 1984.

CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1, 1978.

COSTA, A . F. *Farmacognosia*. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1978. 3v.

CRONQUIST, A . *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1996.

Referências Bibliográficas

CRONQUIST, A . *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1981. p. 287-340.

DOMINGUES, X. A . *Métodos de Investigation Fitoquímica*. Mexico: Limusa Editorial, 1973.

EUROPEAN PHARMACOPEIA, Second Edition, Part II, 1984.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2. ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959. 1265 p.

GEISSMAN, T. A ., CROUT, D. H. G. *Organic Chemistry Of Secondary Plant Metabolism*. San Francisco: Freeman Cooper and Company, 1969. p.233.

GOMES, P. *Fruticultura Brasileira*. São Paulo. Livraria Nobel S. A ., 1973. p. 243-52, 263-7, 384-8.

GRAYER, R. J. Flavonoids. In: Dey, P.M., Harbone, J.B., eds. *Methods in plant biochemistry*. London: Academic Press, 1989. v. 1., cap. 8, 323 p.

HOEHNE, F. C. *Frutas indí genas*. São Paulo: Secretaria da Agricultura Indústria e Comércio, 1946. p. 54-60.

Referências Bibliográficas

HOEHNE, F. C. *Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais*. São Paulo e Rio de Janeiro: Graphicans, 1939. p. 212.

HOEHNE, F. C. *Plantas e Substâncias Tóxicas e Medicinais*. São Paulo: Secretaria da Agricultura Indústria e Comércio e Instituto de Botânica, 1939.

HOLANDA, S. B. *Caminhos e Fronteiras*. 3 ed. Companhia das Letras, São Paulo, 1994.

INDEX KWENSIS plantarum phaneroganum , ed. B.
Dayton Jackson. London: Oxford University Press, 1886 - 1895.

INDEX KWENSIS plantarum phaneroganum , ed. B.
Dayton Jackson. London: Oxford University Press, 1901-1905.

INDEX KWENSIS plantarum phaneroganum , ed. B.
Dayton Jackson. London: Oxford University Press, 1906 - 1910.

INDEX KWENSIS plantarum phaneroganum , ed. B.
Dayton Jackson. London: Oxford University Press, 1931 - 1935.

Referências Bibliográficas

- INDEX KWENSIS plantarum phaneroganum , ed. B.**
Dayton Jackson. London: Oxford University Press, 1956
- 1960.
- INDEX KWENSIS plantarum phaneroganum , ed. B.**
Dayton Jackson. London: Oxford University Press, 1961
- 1965.
- INDEX KWENSIS plantarum phaneroganum , ed. B.**
Dayton Jackson. London: Oxford University Press, 1971
- 1975.
- INDEX KWENSIS plantarum phaneroganum , ed. B.**
Dayton Jackson. London: Oxford University Press, 1991
- 1995.
- INDEX KWENSIS plantarum phaneroganum , ed. B. v. 1.**
Dayton Jackson. London: Oxford University Press,
1885.
- JOLY, A . B.; 1975. *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*. São Paulo: Comp. Editora Nacional.**
- JORGE, L.I.F. Caracterização Farmacobotânica e Microscopia Alimentar de Seis Espécies Brasileiras de *Myrtaceae* Jussieu. Dissertação de mestrado T 615 3234, J 82 c, São Paulo, 1992.**

Referências Bibliográficas

- KAWASAKI, M. L., L, R.L., A rare and potentially economic fruit of Brasil: Cambuci, *Campomanesia phaea* (Myrtaceae). *Economic Botany*, New York, v.51, n.4, p. 403-7, 1997.
- KUBOTA, K.Y., OHARA, M. T. Determinação do valor de concentração mínima inibitória de drogas e extratos vegetais pelo método da diluição em meio líquido utilizando microplacas. Simpósio de Iniciação Científica da USP, 6º SICUSP, Ribeirão Preto, 1998, p.119.
- LANDRUM, L. R., 1986. *Campomanesia*. Fl. Neotrop.monogr. 45: 7-72.
- LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. São Paulo: Editora Plantarum, Nova Odessa, 1992.
- METCALFE, C. R. e CHALK, K. L. *Anatomy of the Dicotyledons*. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1979. v. 2, p. 620-31.
- MORI, S., B. M. Boom, e G. T. Prance. 1981. *Distribution patterns and conservation of eastern Brazilian Coastal Forest Tree Species*. *Brittonia* 33(2): 233-245.
- OLIVEIRA, F., AKISUE, G. - *Fundamentos de Farmacobotânica*. São Paulo: Atheneu, 1989. 216 p.

Referências Bibliográficas

- OLIVEIRA, F., AKISUE, G. - *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu, 1991. 412 p.
- PORTO, P. C. *O Cambuci* (panfleto do Jardim Botânico do Rio de Janeiro). Steele, Mattos, & CO., Rio de Janeiro, 1920.
- SCHMEDA, HIRSCHMANN, G. - *Flavonoids from calycorectes, Campomanesia, Eugenia and Hexachlamys species*. 104 *Fitoterapia*, Milano, v. 66, n° 4, 1995.
- SPENCER, C. M., CAI, Y., MARTIN, R., GAFFNEY, S. H., GOULDING, P. N., MAGNOLATO, D., LILLEY, T. H., HASLAM, E. Polyphenol complexation some thoughts and observations. *Phytochemistry*, Oxford, v. 27, n. 8, p. 2397-409, 1988.
- THOMPSON, W.R., WEIL, C.S. On the construction of tables for moving average interpolation. *Biometrics*, Washington, march, p.51-4, 1952.
- TIBIRIÇÁ, L. C. *Dicionário Guaraní Português*, Traço, Liberdade, São Paulo, 1989.
- WASICKY, R. & AKISUE, G.. Rev. Farm. Bioquímica da Universidade de São Paulo. *Um aparelho aperfeiçoado para extração de óleos essenciais*. São Paulo 7: 339-405, 1969.

RESUMO

9. RESUMO

Campomanesia phaea L, espécie da família *Myrtaceae*, popularmente denominada de 'cambuci' foi estudada através de uma abordagem botânica, química e farmacológica. A planta foi coletada e é cultivada no Instituto de Agronomia da Estação Experimental de Ubatuba no litoral norte do Estado de São Paulo. O estudo morfo-anatômico das folhas foi realizado conjuntamente com uma triagem fitoquímica de seus constituintes químicos mais importantes e seus extratos foram ensaiados farmacológica e microbiologicamente. O ensaio de toxicidade aguda foi realizado em camundongos e a avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada com o extrato liofilizado contra bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), em levedura, *Candida albicans* (ATCC 10231), e bolor, *Aspergillus niger* (ATCC 16404). O óleo volátil presente nas folhas da espécie, foi extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger. O óleo bruto obtido, foi submetido à análise para identificação de seus componentes por cromatografia em camada delgada preparativa, cromatografia a gás e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) com banco de dados. Dentre 38 componentes reconhecidos, 34 foram identificados. A planta é rica em óleo essencial contendo linalol (11,1%), componente de grande valor

Resumo

comercial para a indústria de cosméticos e na indústria farmacêutica, óxido de cariofileno (11,8%), beta-cariofileno (6,3%), beta-selineno (6,9%) e alfa-cadinol (7,5%).

ABSTRACT

10. ABSTRACT

One of the most important species of *Myrtaceae*, commonly known in the Atlantic coast shore of São Paulo State, is *Campomanesia phaea* L, 'cambuci'. It is widespread near the seashore, utilized not only in folklore medicine, due to a high tanin content of its stem bark, but also due to the exotic fruits that offers special flavor in alcoholic beverages. Botanical, chemical and farmacological approach has been performed to study the plant. Acute toxicity test has been perform in mice and the antimicrobial studies were performed against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans* (ATCC 10231), and *Aspergillus niger* (ATCC 16404). The composition of the water-distilled volatile oil in the leaves has been analysed using gas chromatography, GC/MS and TLC . Among 38 compounds recorded by GC, GC-MS and TLC, 34 components were identified. The volatile oil was found to be rich in linalool (11,1%), important substance that can be utilized in pharmacy and cosmetics, caryophyllene oxyde (11,8%), beta-caryophyllene (6,3%), beta-selinene (6,9%), and alfa-cadinol (7,5%).