

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

Estudo das atividades cicatrizante e antimicrobiana do extrato
glicólico e do gel de *Psidium guajava* L.
e estudo da estabilidade do gel

Marise Kiyoko Hasegawa Okamoto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

O41e Okamoto, Marise Kiyoko Hasegawa
Estudo das atividades cicatrizante e antimicrobiana do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. e estudo da estabilidade do gel / Marise Kiyoko Hasegawa Okamoto. -- São Paulo, 2010. 118p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Bacchi, Elfriede Marianne

1. Farmacognosia 2. *Psidium* : Farmacologia I. T. II.
Bacchi, Elfriede Marianne, orientador.

615.321 CDD

Marise Kiyoko Hasegawa Okamoto

Estudo das atividades cicatrizante e antimicrobiana do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. e estudo da estabilidade do gel

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ao meu esposo Neil e à minha filha Karina,
com muito amor e gratidão pelo carinho,
compreensão e apoio, fundamentais
para a elaboração deste trabalho.

À Profª. Drª. Elfriede Marianne Bacchi,
pela orientação, amizade e ensinamentos
responsável pela minha formação.

AGRADECIMENTOS

- . Sobretudo agradeço a Deus pelo êxito neste trabalho.
- . Aos meus pais pela compreensão, afeto e apoio durante estes anos.
- . À minha irmã, cunhados e familiares pelo apoio e incentivo.
- . Aos meus sogros pela compreensão e apoio.
- . Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e convívio.
- . À Prof^a. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato, pela amizade e colaboração neste trabalho
- . À Elisabete Claro de Souza Paiva, secretária do Departamento de Farmácia, pelo apoio e carinho durante estes anos.
- . À Elaine Midori Ychico e Jorge Alves Lima, secretários da pós-graduação, pelo apoio e incentivo.
- . Ao Prof. Dr. Paulo Chanel Deodato de Freitas e à Prof^a. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer, pela amizade e apoio.
- . À Prof^a. Dra. Telma Mary Kaneko e a pós-graduanda Delia Manuela Luna Pinto, pela amizade e colaboração neste trabalho.
- . Ao Prof. Dr. José Rubens Pirani, pela identificação da exsicata.
- . À Sra. Leila Aparecida Bonadio, pela revisão das referências bibliográficas.
- . Ao Sr. Roberto de Jesus Honório, técnico do laboratório de Farmacognosia, pelo incentivo e amizade.
- . Ao diretor da saúde da Universidade Nove de Julho, Willian Silvestre Bendazzoli, pelo apoio e amizade.
- . Aos coordenadores do curso de farmácia da Universidade Nove de Julho, Regina Hiroko Hasegawa, Ana Cláudia Vallin Cruz de Mello, Alfredo Ribeiro Filho e aos ex-coordenadores Cláudia Moreno e Oswaldo da Cruz Júnior (*in memorian*) pelo apoio e amizade.
- . À Prof^a. Dra. Nilsa Sumie Yamashita Wadt, pela amizade, incentivo e colaboração neste trabalho.
- . À Prof^a. Terezinha Regina Prupere Ogata pelo apoio e colaboração neste trabalho.

- . À Profª Erna Bach pela amizade e apoio durante estes anos
- . Aos alunos da iniciação científica, Roberta Sanae Kawata; Leandro Tabal de Almeida e Silva e Carlos Eduardo Alves, pelo apoio e colaboração neste trabalho.
- . À Profª. Sandra Emi Kitahara, pela amizade e apoio durante estes anos.
- . Aos professores, técnicos e amigos da Universidade Nove de Julho.
- . Aos professores, amigos, funcionários e colegas de pós-graduação do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo apoio e amizade durante todos estes anos.
- . À todos que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor... Lembre-se.

Se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo.

Albert Einstein

RESUMO

OKAMOTO, M. K. H. **Estudo das atividades cicatrizante e antimicrobiana do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. e estudo da estabilidade do gel.** 2010. 118 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Psidium guajava L. é um arbusto perene, nativo da América tropical, cujas folhas são usadas na medicina tradicional latino-americana como antimicrobiano, antidiarreico e auxiliar no tratamento de diabetes. As caracterizações morfoanatômica e histoquímica das folhas, realizadas neste trabalho, contribuem no controle de qualidade da matéria-prima vegetal, empregada em formulações farmacêuticas. Os principais caracteres diagnósticos utilizados para a sua identificação foram: venação, tipo de tricomas, número de camadas de células epidérmicas, tipo de mesofilo e localização/tipo de cristais de oxalato de cálcio. Na triagem fitoquímica foi verificada a presença de taninos, flavonóides, óleos essenciais e de saponinas nas folhas e no extrato glicólico de *P. guajava* L. Após realizar o teste de estabilidade acelerada do gel de *P. guajava* L. foi observada a estabilidade de flavonóides e de taninos na formulação. Foram realizadas diferentes técnicas para verificar a atividade antimicrobiana do extrato e do gel de *Psidium guajava* L. tais como: microdiluição em placas utilizando detector de Elisa, difusão em disco, em “template” e macrodiluição em tubos. Os microrganismos testados foram *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027), *Escherichia coli* (ATCC10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) e *Cândida albicans* (ATCC10231). Dimetilsulfóxido foi utilizado para a diluição do extrato glicólico e do gel. O meio de cultura utilizado para os métodos de microdiluição e macrodiluição foi o caldo caseína soja, para as técnicas de difusão o ágar caseína soja, ambos para bactérias; para levedura o meio Sabouraud em caldo e ágar. Foi observada eficácia antimicrobiana do gel (200 mg/mL) contra *E. coli* e (200 mg/mL e 500 mg/mL) contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os extratos glicólicos (200 µL/mL e 500 µL/mL) apresentaram atividade antimicrobiana para *E. coli*. O extrato glicólico (500 µL/mL) apresentou atividade contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, porém assim como o gel, não apresentou ação antifúngica, através da técnica de microdiluição (ELISA), que se destacou por ser mais econômica e eficiente que as

demais. No teste de cicatrização ocorreu cicatrização da lesão através da utilização de extrato glicólico e gel de *Psidium guajava* L., porém macroscopicamente não foi significativo em relação à solução fisiológica. No entanto, em análise histológica das lesões, foram observadas diferenças qualitativas, evidências de fibroplasia e proliferação vascular, características de fase granulatória, nos grupos tratados com extrato glicólico e gel de *Psidium guajava* L. a partir de 72 horas, o que não foi observado no grupo solução fisiológica nem no grupo Dersani®. Comprova-se assim a eficácia do gel de extrato glicólico de *Psidium guajava* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Esta pode ser uma nova opção de medicamento para pacientes que dependam do Sistema único de saúde (SUS).

PALAVRAS-CHAVE: *Psidium guajava* L. Morfoanatomia. Atividade antimicrobiana. Cicatrizante. Estabilidade do gel.

ABSTRACT

OKAMOTO, M. K. H. **Study of the healing and antimicrobial activities of the glycolic extract and gel of *Psidium guajava* L. and study of the stability of the gel.** 2010. 118 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010

Psidium guajava L. is a perennial shrub, native of tropical América used in Latin American traditional medicine as antimicrobial, antidiarrheic, and in the treatment of diabetes. The morphoanatomical characteristics and histochemistry of the leaves have been proven to be a rapid method for quality control of the crude drug used in pharmaceutical formulations. The main diagnostic characters for the identification of its leaves in the present paper were: venation, trichomes type, number of layers of epidermal cells, mesophyll type and location/type of crystals of calcium oxalate. The presence of tannins, flavonoids, essential oils and saponins was verified in the leaves and in the glycolic extract of *P. guajava* L. through phytochemical screening. The accelerated stability study of the gel *P. guajava* L. showed the stability of flavonoids and tannins in the formulation. Different techniques were performed to verify the antimicrobial activity of the extract and of the gel of *Psidium guajava* L. such as microdilution plates using Elisa detector, disk diffusion, in "template" and macrodilution tubes. The tested microorganisms were *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027), *Escherichia coli* (ATCC10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) and *Candida albicans* (ATCC10231). Dimethyl sulfoxide was used for dilution of the glycolic extract and the gel. The culture medium used for the methods of macrodilution and microdilution was casein soy broth and casein soy agar for the diffusion technique, both for bacteria; for the yeast the Sabouraud medium in broth and agar. Antimicrobial efficacy of the gel (200 mg / mL) was observed against *E. coli* and (200 mg / mL and 500 mg / mL) against *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Glycolic extracts (200 mL / mL and 500 mL / mL) showed activity against *E. coli*. The glycolic extract (500 µL/mL) showed activity against *P. aeruginosa* and *S. aureus* but similar to the gel, the extract didn't show antifungal action, through the microdilution technique (ELISA), which showed to be more efficient and cheaper than all other. In the healing test cicatrization occurred through the use of gel and glycolic extract of *Psidium guajava* L.; macroscopically the result was not significant compared to saline. However, histologically there were qualitative differences in the lesions, evidence of fibroplasia and vascular proliferation, granulati phase characteristic in the groups treated with gel and glycolic extract of *Psidium guajava* L. from 72 hours on. This was not observed in the saline nor DERSANI® groups. So the effectiveness of the gel and of the glycolic extract of *Psidium guajava* L. on the healing of skin wounds can be proven in rats. This can be a new option for patients who depend on the Unique Health System (SUS).

KEYWORDS: *Psidium guajava* L. Morphoanatomy. Antimicrobial. Healing activity. Stability of the gel.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - *Psidium guajava* L. A. arbusto. B. Droga vegetal. C. Detalhe da face abaxial, com destaque aos tricomas tectores. D. Detalhe da face adaxial. E. Destaque aos pontos translúcidos e à nervura marginal (seta). F. Detalhe da nervura mediana e face abaxial recoberta por tricomas tectores. Escalas: barra correspondente a A = 1 m; B = 1 cm; C, D, E, F = 0,3 cm..... 59
- Figura 2 - *Psidium guajava* L. Folha. A, C, D, E, H. Seções transversais. B, F, G. Vista frontal. A. Feixe vascular em arco aberto no pecíolo. B. Detalhe de cristais de formas variadas no colênquima. C, D. Detalhe do mesofilo. E. Drusa (seta) na camada subepidérmica. F. Detalhe dos campos de pontuação na face adaxial. G. Estômatos na face abaxial. H. Nervura mediana com feixe vascular em arco aberto. Escalas: barra correspondente a B, E, F. = 5 μ m. C = 50 μ m. D, G = 12 μ m. A, H = 100 μ m.. 61
- Figura 3 - *Psidium guajava* L. Folha. A. Drusas (dr) e areia cristalina (ac). B. Drusas (seta). C. Cristais prismáticos (seta) na região floemática. D. Drusas próximas à cavidade secretora (cs). E. Cristais prismáticos (seta). F, G, H, I Tricomas tectores. Escalas: barra correspondente a A, B, E, G, H = 12 μ m. D, C, F = 50 μ m. I = 100 μ m.. 62
- Figura 4 - Variação da viscosidade durante o teste de estabilidade acelerada do gel de *Psidium guajava* L..... 66

Figura 5 - Cromatografia de camada delgada de *Psidium guajava* L., fase móvel: ácido acético glacial: água: ácido clorídrico:metanol (45:15:4,5:19,3); suporte: celulose sobre placa de vidro; revelador: cloreto férrico 5 % em metanol; percurso de 10 cm; 1- Folha *Psidium guajava* L. extraída com álcool (7 toques capilares); 2- Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. (7 toques capilares); 3- Gel de *Psidium guajava* L. T = 0 dia (25 toques capilares); 4- Gel de *Psidium guajava* L. T = 30 dias (25 toques capilares); 5- Gel de *Psidium guajava* L. T = 60 dias (25 toques capilares); 6- Gel de *Psidium guajava* L. T = 90 dias (25 toques capilares); 7- Padrão ácido gálico 1mg/mL metanol (2 toques capilares); 8- Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. (9 toques capilares); 9- Gel de *Psidium guajava* L. T = 0 dia (30 toques capilares); 10- Gel de *Psidium guajava* L. T = 0 dia (25 toques capilares); 11- Padrão ácido gálico 1mg/mL metanol (2 toques capilares)....

68

Figura 6 - Cromatografia de camada delgada de *Psidium guajava* L.; fase móvel: clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (60:32:12:8); suporte: sílica gel 60 F₂₅₄ nm sobre placa de vidro; revelador: NP – “Natural products reagent” – difenilboriloxietilamina a 1% em metanol; percurso de 10 cm; 1- Gel de *Psidium guajava* L. T = 0 dias (20 toques capilares); 2- Gel de *Psidium guajava* L. T = 30 dias (20 toques capilares); 3- Gel de *Psidium guajava* L. T = 60 dias (20 toques capilares); 4-5-6 (triplicata) Gel de *Psidium guajava* L. T = 90

dias (20 toques capilares); 7- Gel de *Psidium guajava* L. T = 90 dias (25 toques capilares); 8-9(duplicata) Gel de *Psidium guajava* L. T = 90 dias (25 toques capilares); 10- Padrão quercetina (2 toques capilares); 11- Padrão ácido gálico (2 toques capilares); 12- Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. (5 toques capilares); 13- Folha *Psidium guajava* L. extraída com álcool (5 toques capilares)..... 69

Figura 7 - Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e tratamento. A, E, I, M, Q. Tamanho da lesão após tratamento com Dersani® durante 24 hs., 48 hs., 72 hs., 7 dias e 14 dias respectivamente. B, F, J, N, R. Tamanho da lesão após tratamento com Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. durante 24 hs., 48 hs., 72 hs., 7 dias e 14 dias respectivamente. C, G, K, O, S. Tamanho da lesão após tratamento com gel de *Psidium guajava* L. durante 24 hs., 48 hs., 72 hs., 7 dias e 14 dias respectivamente. D, H, L, P, T. Tamanho da lesão após tratamento com solução fisiológica durante 24 hs., 48 hs., 72 hs., 7 dias e 14 dias respectivamente. Escala 1,0 mm..... 72

Figura 8 - Efeito da administração tópica do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. na cicatrização de lesões..... 73

Figura 9 - Efeito cicatrizante da lesão em ratos, após incisão dorsal e 24 horas de tratamento com A. Solução fisiológica. B. Dersani®. C. Extrato

	glicólico de <i>Psidium guajava</i> L. e D. Gel de <i>Psidium guajava</i> L.....	76
Figura 10 -	Efeito cicatrizante da lesão em ratos, após incisão dorsal e 48 horas de tratamento com A. Solução fisiológica. B. Dersani®. C. Extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L. e D. Gel de <i>Psidium guajava</i> L.....	77
Figura 11 -	Efeito cicatrizante da lesão em ratos, após incisão dorsal e 72 horas de tratamento com A. Solução fisiológica. B. Dersani®. C. Extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L. e D. Gel de <i>Psidium guajava</i> L.....	78
Figura 12 -	Efeito cicatrizante da lesão em ratos, após incisão dorsal e 7 dias de tratamento com A. Solução fisiológica. B. Dersani®. C. Extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L. e D. Gel de <i>Psidium guajava</i> L.....	79
Figura 13 -	Efeito cicatrizante da lesão em ratos, após incisão dorsal e 14 dias de tratamento com A. Solução fisiológica. B. Dersani®. C. Extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L. e D. Gel de <i>Psidium guajava</i> L.....	80
Figura 14 -	Porcentagem de inibição microbiana do extrato glicólico e do gel de <i>Psidium guajava</i> L. através do método de microdiluição.....	83
Figura 15 -	Efeito da atividade antimicrobiana do extrato glicólico e do gel de <i>Psidium guajava</i> L. frente	

a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*, através do método de difusão em “templates”..... 86

Figura 16 - Efeito da atividade antimicrobiana do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. frente a *S. aureus*, através do método de difusão em disco..... 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado da triagem fitoquímica da folha e do extrato glicólico <i>Psidium guajava</i> L.....	63
Tabela 2 - Teor de flavonóides totais de <i>Psidium guajava</i> , após reação com cloreto de alumínio a 2% (p/V) em metanol e leitura a 425 nm.....	64
Tabela 3 - Teor de taninos totais de <i>Psidium guajava</i> L., determinado por reação com reagente de Folin-Denis e solução de carbonato de sódio e leitura da absorbância a 715 nm.....	65
Tabela 4 - Viscosidade do gel de <i>Psidium guajava</i> L., medido no viscosímetro ViscoStar (R) com agulha (spindle) TR 11 e velocidade de agitação 200 rpm.....	66
Tabela 5 - Resultados da avaliação do gel de <i>Psidium guajava</i> L. submetido à temperatura de 40 ± 2 °C e umidade relativa (UR) de $75 \pm 5\%$ em câmara climática.....	67
Tabela 6 - Contagem microbiana do gel do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.....	70
Tabela 7 - Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e 24 horas de tratamento com solução fisiológica, Dersani®, extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L. e gel do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.....	70

Tabela 8 - Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e 48 horas de tratamento com solução fisiológica, Dersani®, extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L. e gel do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.....	70
Tabela 9 - Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e 72 horas de tratamento com solução fisiológica, Dersani®, extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L. e gel do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.....	71
Tabela 10 - Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e 7 dias de tratamento com solução fisiológica, Dersani®, extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L. e gel do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.....	71
Tabela 11 - Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e 14 dias de tratamento com solução fisiológica, Dersani®, extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L. e gel do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.....	71
Tabela 12 - Avaliação histológica comparativa do efeito cicatrizante do extrato glicólico e gel de <i>Psidium guajava</i> L., em feridas cutâneas em ratos – Aspecto qualitativo.....	74
Tabela 13 - Porcentagem de inibição do micro-organismo <i>E. coli</i> (10^4 UFC/mL), frente ao extrato e ao gel de <i>Psidium guajava</i> L., através do método de microdiluição.....	81

Tabela 14 - Porcentagem de inibição do micro-organismo <i>P. aeruginosa</i> (10^4 UFC/mL), frente ao extrato e ao gel de <i>Psidium guajava</i> L., através do método de microdiluição.....	82
Tabela 15 - Porcentagem de inibição do micro-organismo <i>S. aureus</i> (10^4 UFC/mL), frente ao extrato e ao gel de <i>Psidium guajava</i> L., através do método de microdiluição.....	82
Tabela 16 - Porcentagem de inibição do micro-organismo <i>C. albicans</i> (10^4 UFC/mL), frente ao extrato e ao gel de <i>Psidium guajava</i> L., através do método de microdiluição.....	84
Tabela 17 - Medida do halo de inibição (mm) das amostras de <i>Psidium guajava</i> L. (50 μ L) frente ao microrganismo <i>E. coli</i> (10^4 UFC/mL), inoculado em “templates”.....	85
Tabela 18 - Medida do halo de inibição (mm) das amostras de <i>Psidium guajava</i> L. (50 μ L) frente ao microrganismo <i>P. aeruginosa</i> (10^4 UFC/mL), inoculado em “templates”.....	85
Tabela 19 - Medida do halo de inibição (mm) das amostras de <i>Psidium guajava</i> L. (50 μ L) frente ao microrganismo <i>S. aureus</i> (10^4 UFC/mL), inoculado em “templates”.....	86
Tabela 20 - Medida do halo de inibição (mm) das amostras de <i>Psidium guajava</i> L. frente ao microrganismo <i>S. aureus</i> (10^4 UFC/mL), em discos de papel de filtro.....	87

Tabela 21 - Verificação da turbidez dos tubos (crescimento microbiano) do extrato e gel de *Psidium guajava* L. em relação a *P. aeruginosa* (10^4 UFC/mL), *S. aureus* (10^4 UFC/mL), *C. albicans* (10^2 UFC/mL)..... 89

Tabela 22 - Porcentagem da lesão dos ratos tratados com solução fisiológica, Dersani®, extrato glicólico e gel de *Psidium guajava* L., considerando o primeiro dia como 100% de lesão para cada grupo..... 94

LISTA DE SIGLAS

ANFARMAG	Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMI	Concentração mínima inibitória
CMB	Concentração mínima bacteriana
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
Tc	Tecnécio
IN	Integrase
UR	Umidade relativa
NP	Difenilboriloxietilamina
TSA	Caldo de ágar de caseína-soja
SA	Caldo de agar de Sabouraud-dextrose
DMSO	Dimetilsulfóxido
UFC	Unidade formadora de colônias
ELISA	Detector de eletroimunoensaio
AGE	Ácidos graxos essenciais

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
®	Registrado
μ	Micro
±	Mais ou menos
>	Maior
<	Menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3 OBJETIVOS	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Coleta e identificação.....	40
4.2 Análise farmacobotânica.....	40
4.3 Preparo do material vegetal e elaboração dos extratos	41
4.4 Composição e preparação do gel de <i>Psidium guajava</i> L.....	41
4.5 Triagem fitoquímica da droga vegetal e do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.....	42
4.5.1 Verificação da presença de taninos.....	42
4.5.2 Verificação da presença de flavonóides.....	42
4.5.3 Verificação da presença de saponinas.....	43
4.5.4 Verificação da presença de óleos essenciais.....	43
4.6 Teste de estabilidade.....	44
4.6.1 Teste estabilidade acelerada.....	44
4.6.1.1 Verificação de separação de fases.....	44
4.6.1.2 Perfil cromatográfico.....	44
4.6.1.3 Quantificação de flavonóides totais.....	45
4.6.1.4 Quantificação de taninos totais.....	46
4.6.1.5 Teste de viscosidade.....	47

4.6.1.6 Contagem microbiana de bactérias, bolores e leveduras	47
4.7 Atividade cicatrizante.....	48
4.7.1 Cirurgia.....	48
4.7.2 Pós operatório.....	49
4.7.3 Análise estatística.....	50
4.7.4 Análise histológica.....	50
4.8 Atividade antimicrobiana.....	51
4.8.1 Validação prévia da metodologia de microdiluição em micro placas.....	51
4.8.2 Os testes foram realizados com os seguintes micro-organismos.....	52
4.8.3 Meios de cultura:.....	52
4.8.4 Preparo dos meios de cultura:.....	52
4.8.5 Preparo e padronização das suspensões de micro-organismos.....	53
4.8.6 Preparação das soluções padrão dos antibióticos (controle positivo ou de atividade antimicrobiana).....	53
4.8.7 Preparação das amostras.....	54
4.8.8 Procedimento do teste de atividade antimicrobiana (microdiluição e leitura em detector de ELISA).....	54
4.8.9 Procedimento do teste de atividade antimicrobiana (difusão em placas).....	55
4.8.9.1 Teste com “Template”.....	55
4.8.9.2 Teste com disco	55
4.8.10 Método de macrodiluição (diluição em caldo - tubos)	56
5 RESULTADOS.....	57
5.1 Caracterização farmacobotânica da folha.....	58
5.1.1 Descrição macroscópica.....	58
5.1.2 Descrição microscópica.....	60
5.2 Triagem fitoquímica.....	63
5.3 Teste de estabilidade acelerada do gel de <i>Psidium guajava</i> L.....	64

5.3.1 Teor de flavonóides.....	64
5.3.2 Teor de taninos totais.....	65
5.3.3 Análise Estatística da viscosidade do gel de <i>Psidium guajava</i> L. durante o teste de estabilidade acelerada.....	66
5.3.4 Resultados da avaliação do gel de <i>Psidium guajava</i> L. submetido à temperatura de 40±2 °C e umidade relativa (UR) de 75±5% em câmara climática.....	67
5.3.5 Perfil cromatográfico.....	68
5.3.6 Contagem microbiana.....	70
5.4 Teste de cicatrização.....	70
5.4.1 Avaliação macroscópica.....	70
5.4.2 Avaliação histológica	74
5.5 Teste atividade antimicrobiana.....	81
5.5.1 Método microdiluição (ELISA).....	81
5.5.2 Método Difusão em placas.....	85
5.5.2.1 Técnica “templates”	85
5.5.2.2 Técnica em discos.....	87
5.5.3 Método de macrodiluição (diluição em tubos).....	89
6 DISCUSSÃO.....	90
7 CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
ANEXO A – Parecer do Comitê de ética em Pesquisa.....	112
ANEXO B – Artigo derivado da dissertação.....	114

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O ser humano utiliza as plantas para o tratamento de várias enfermidades desde tempos remotos. Hoje as plantas medicinais correspondem de 20 a 24% do total das prescrições médicas em países industrializados e nos países em desenvolvimento, correspondem a 80%; sem dúvida, é uma área de grande importância mundial (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE FARMACÊUTICOS MAGISTRAIS, 2005).

O Brasil destaca-se por conter a maior biodiversidade do planeta (55 mil espécies) de plantas superiores conhecidas e atualmente. O comércio de medicamentos fitoterápicos brasileiros movimenta cerca de US\$ 260 milhões de dólares ao ano (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2008).

Dentre as riquezas naturais disponíveis encontra-se a goiabeira (*Psidium guajava* L.), que é uma planta da família das mirtáceas, considerada a espécie do gênero *Psidium* mais distribuída e de grande importância econômica, devido a suas diversas formas de utilização, tanto na indústria como *in natura* (SOUZA JÚNIOR et al., 2002; NATALE; PRADO, 2006).

A espécie tem como nomes populares: guava, goyave, guayaba e sinônimas científicas: *Guajava pyrifera* (L.) Kuntze; *Myrtus guajava* (L.) Kuntze; *Psidium guajava* var. *cujavillum* (Burman) Krug & Urb.; *Psidium guajava* var. *guajava*; *Psidium guava* Griseb.; *Psidium guajava* Raddi; *Psidium igatemyensis* Barb. Rodr.; *Psidium pomuferum* L.; *Psidium pumilum* Vahl; *Psidium pumilum* var. *guadalupense* DC.; *Psidium pyrifera* L. (TRÓPICOS. ORG. MISSOURI GARDEN, 2008).

O Brasil é considerado um dos maiores produtores de goiaba do mundo, com cerca de 390 mil toneladas, em 2002. A produção concentra-se nas regiões sudeste e nordeste do país, sendo o Estado de São Paulo responsável por mais de 60% do total (MANTOVANI et al., 2004).

As folhas de goiaba secas contêm, no mínimo, 5,5% de taninos totais, 1,0% de flavonóides totais calculados como quercetina, 0,2% de óleo essencial, sendo este último constituído de, no mínimo, 15% de β -cariofileno (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002).

As cascas da goiabeira apresentam aplicações terapêuticas tais como adstringente e antidiarréico, útil também no tratamento da leucorréia, da cólera asiática e úlceras externas; os brotos são eficientes contra as afecções do estômago e certas doenças da pele; os botões floríferos são indicados para combater os fluxos de sangue; as folhas assim como outros órgãos da goiabeira são antidiarreicos (PIO CORREA, 1984), e usados no tratamento da diabetes mellitus (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008).

Devido ao alto teor de taninos e de flavonóides na folha de goiabeira, o extrato glicólico pode apresentar atividade cicatrizante.

O presente trabalho visa o estudo do extrato glicólico, em substituição ao hidroalcoólico, que proporcionará mais uma opção para futuras formulações de uso tópico, evitando a desidratação da pele.

O ensaio microbiológico foi realizado porque não foi encontrada na literatura a verificação da contagem microbiana do gel de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L. Este ensaio teve o objetivo de proporcionar maior segurança e eficácia aos usuários.

Embora as análises farmacobotânicas constem na farmacopéia brasileira IV, estas foram necessárias para o controle de qualidade da droga vegetal, resultando num artigo publicado. A descrição farmacobotânica foi realizada em comparação com monografias da referida droga vegetal.

As quantificações de taninos e flavonóides da folha, do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. são importantes para o controle de qualidade da matéria-prima, sendo também parâmetros para o teste de estabilidade acelerada do gel.

Este trabalho visa garantir mais uma opção de tratamento eficaz e econômico contra ferimentos, visto ser a goiabeira um vegetal de fácil acesso.

Os materiais utilizados foram folhas adultas que eram consideradas descarte na região produtoras de frutos (maior interesse econômico). Se comprovada a ação do gel de goiabeira, o mesmo poderá ser utilizado no SUS (Sistema Único de Saúde), sendo a matéria-prima as folhas que seriam descartadas.

O trabalho foi realizado também com gel devido ao baixo custo e por ser uma forma farmacêutica de fácil manipulação e estabilidade. O gel foi ensaiado quanto à sua estabilidade, sendo utilizado o natrosol® com extrato glicólico de *Psidium guajava* L.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os principais constituintes dos óleos voláteis das folhas de *Psidium guajava* L. analisados por GC/MS são β -cariofileno (21,6%), (E)-nerolidol (19,2%) e selin-11-en-4 α -ol (13,4%) (PINO et al., 2001). Segundo Domingos et al. (2003), os principais componentes de óleo essencial de folhas e caules de *Psidium guajava* L. são α -pineno (23,9%), 1,8-cineol (21,4%) e β -bisabolol (9,2%).

Em estudos realizados com extratos aquosos obtidos por infusão de folhas de *Psidium guajava* L. foram constatados efeitos de bio-proteção contra radicais livres, analgésico, sedativo, depressor do sistema nervoso central e antitussígeno (TONA, 1998). Essas atividades foram atribuídas à presença de flavonóides, tais como quercetina, canferol e miricetina (ALMEIDA et al., 2006). Almeida et al. (2006) avaliaram a citotoxicidade de infusos das folhas de *Psidium guajava* L. em monocamadas de macrófagos peritoniais de camundongos albinos através do ensaio de exclusão do azul de Trypan. As infusões aquosas foram testadas imediatamente após o seu preparo e também após 48 horas estocadas a 4 °C. Os autores verificaram que apenas as preparações que foram estocadas apresentaram toxicidade, matando 31,82% das células após 60 minutos de exposição.

Furlan e Salatino (2006) identificaram os flavonóides de três variedades comerciais de *P. guajava*: Paluma´, Pedro Sato´ e Sassaoca´ todas produtoras de frutos de polpa vermelha. Mudanças de cerca de 30 cm de altura foram transplantadas para vasos plásticos de 2 litros, preenchidos com fibra de coco moída. Após 60 dias em estufa, as folhas do 4º nó foram coletadas e submetidas à análise de flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), através de comparação com padrões autênticos. As três variedades apresentaram perfis semelhantes, com presença de 14 picos, sendo a maioria correspondente aos derivados de quercetina. Os mais abundantes foram quercetina-3-O-arabinosila, quercetina-3-O-glucosila, quercetina-3-O-xilosila, quercetina-3-O-ramnosila e um diglicosídeo de quercetina não identificado. Neste trabalho a cultura Paluma´ diferiu das variedades Sassaoca´ e Pedro Sato´ por não apresentar quercetina-3-O-ramnosila.

Segundo Carvalho et al. (2002), existe uma relativa segurança para o uso terapêutico de *Psidium guajava* L., comprovado pelo resultado do estudo de

toxicidade aguda e de Dose Letal 50 do extrato hidroalcólico seco do caule e da folha (779,17 mg/kg).

No trabalho de Teixeira et al. (2003), as folhas de *Psidium guajava* L. foram preparadas por infusão e testadas nas células meristemáticas apicais da raiz de *Allium cepa* L. (concentração de 2,62 e 26,2 mg/mL) e em células da medula óssea de ratos Wistar de peso aproximado de 100g (via intraperitoneal, na concentração de 2,62 e 2,2 mg/100g de massa corporal). Foram também realizados testes *in vitro*, com 0,262 e 2,62 µg/mL em meio de cultura de linfócitos de sangue periférico humano. A infusão de *Psidium guajava* L. em elevadas concentrações causou significativa inibição da divisão celular nas células meristemáticas apicais da raiz de *Allium cepa* L. Não foram observadas alterações significantes no ciclo de células e nem alterações no número de cromossomos após tratamento com *Psidium guajava* L., em células de ratos ou em cultura de linfócitos humanos. Considerando estes resultados, esta planta nas concentrações testadas, não apresentou citotoxicidade e mutagenicidade, informações importantes para o uso seguro como agente terapêutico.

Luize et al. (2005) analisaram o extrato de *Psidium guajava* contra formas amastigotas, axênicas e promastigotas de *Leishmania amazonensis* e formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, na concentração de 100 mg/mL. O extrato apresentou inibição significativa contra os parasitas, com porcentagem de inibição de crescimento entre 49,5 e 99%. Ainda foi constatado que o extrato não mostrou efeito citotóxico em hemácias de carneiro, podendo assim ser fonte alternativa de novos compostos eficazes contra *L. amazonensis* e *T. cruzi*.

De acordo com Lozoya et al. (2002), cápsulas de extrato das folhas de *Psidium guajava* L., padronizadas em quercetina, administradas por via oral em pacientes adultos com diarreia aguda, proporcionaram redução da duração de dor abdominal nestes pacientes, confirmando o efeito anti-espasmódico.

Conforme observado na pesquisa de Zhang et al. (2003), a quercetina extraída de *Psidium guajava* L. foi a responsável pela inibição da contração do íleo de cobaias, *in vitro*, do peristaltismo do intestino de camundongos e pela redução da permeabilidade capilar abdominal, justificando o uso do extrato desta espécie como anti-diarréico.

Salix e Rodriguez (2004) estudaram o efeito da tintura (etanol 70%) de folhas secas de goiabeira a 20% sobre diarreia aguda simples em adultos, após 24, 48 e 72 horas de tratamento e verificaram a não ocorrência de reações adversas.

Em estudos de Almeida et al. (1995), o extrato aquoso bruto das folhas de *Psidium guajava* L. apresentou um potencial efeito antidiarréico e segundo Roy et al. (2006), também apresentou atividade hepatoprotetora *in vivo*.

Foi realizado estudo *in vitro* sobre a atividade anti-rotavírus de algumas plantas medicinais no Brasil contra diarreia; entre elas constatou-se que *Psidium guajava* L. (8 µg/mL) apresentou atividade somente contra rotavírus de macacos (GONÇALVES et al., 2005). No entanto, na pesquisa de Wei et al. (2000), observou-se o efeito clínico do extrato de *Psidium guajava* L. no tratamento de infecções infantis por rotavírus. Os valores da conversão negativa de rotavírus humano nas fezes de grupos tratados com extrato de *Psidium guajava* L. foi 87,1%, significativamente melhor que do grupo controle (58,1%, $P < 0,05$), confirmando o efeito curativo do extrato de *Psidium guajava* L. também no tratamento de infecções infantis causadas por rotavírus.

Segundo Vieira et al. (2001), constituintes do extrato do broto de goiaba são mais uma opção de tratamento exequível para diarreia causada por toxinas produzidas por *E. coli* ou por *S. aureus*, devido a sua ação curativa, fácil disponibilidade em países tropicais e baixo custo de consumo.

Os extratos de folhas de goiaba (etanol:água) apresentaram maior atividade antibacteriana quando comparados com os extratos aquosos, em ensaio de microdiluição em caldo. Os extratos aquosos das folhas, raízes e casca do caule foram ativos contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (GNAN; DEMELLO, 1999) e *Bacillus subtilis*, e foram inativas contra as bactérias gram-negativas *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (SANCHES et al., 2005).

Quatro componentes antibacterianos foram isolados das folhas de goiabeira, sendo definidas as estruturas químicas. Foram identificados dois novos glicosídeos flavonoídicos, morin-3-o- α -L-lixopiranosídeo e morin-3-o- α -L-arabopiranosídeo, e dois flavonóides já conhecidos, guajavarina e quercetina. Os autores verificaram que a concentração inibitória mínima tanto de morin-3-o- α -L-lixopiranosídeo, como de morin-3-o- α -L-arabopiranosídeo contra *Salmonella enteritidis* foi de 200 mg/mL, 250 mg/mL e 300 mg/mL contra *Bacillus cereus*, respectivamente (ARIMA; DANNO, 2002).

Além destas atividades, os extratos das folhas de goiabeira (doses de 2 e 5 g/kg) apresentaram atividade antitussígena em ratos, diminuindo a frequência da tosse induzida pelo aerosol de capsaicina em 35 e 54%, respectivamente, quando comparado com o controle, até 10 minutos após injeção intraperitoneal do extrato, ($p < 0,01$). Essa atividade antitussígena, porém, foi menos potente que de 3 mg/kg de dextrometorfano, com diminuição de 78% da frequência da tosse ($p < 0,01$) (JAIARY et al., 1999). Os referidos extratos também apresentaram ação benéfica no tratamento de acne, especialmente pela atividade anti-inflamatória (KAVIMANI et al., 1997; QADAN et al., 2005).

Deeni e Sadiq (2002) pesquisaram espécies vegetais utilizadas popularmente na Nigéria, como alimentos humanos e animais, para tratamento de dor de estômago, diarreia, disenteria, ferimento e câncer. Muitas espécies, dentre elas, *Psidium guajava* L., revelaram largo espectro de atividade antimicrobiana, havendo inibição do crescimento de *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus* sp, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Proteus* sp e *Pseudomonas* sp, responsáveis pelos problemas do trato gastrintestinal e ferimentos.

Ainda na Nigéria, Chah et al. (2006) estudaram a atividade antibacteriana de extratos de *Psidium guajava*. Através do método de difusão, os extratos foram testados contra quatro cepas de *Staphylococcus aureus*, duas cepas de *E. coli*, uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, três cepas de *Proteus* spp. e uma cepa de *Shigella* spp.. Verificaram que *Psidium guajava* L. inibiu o crescimento dos microorganismos testados em 81,8%.

Gonçalves et al. (2008) concluíram que extratos de folhas de goiabeira assim como o seu óleo essencial são muito ativos contra *Staphylococcus aureus*, isolado de camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller).

Ali et al. (1997) determinaram a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bacteriana (CMB) de extrato metanol/ água de cascas de *Psidium guajava* L. contra diferentes cepas de *Shigella dysenteriae*. CMI de um extrato metanólico foi de 400 mg/mL e de um extrato aquoso, de 1000 mg/mL contra todas as cepas testadas. A CMB de extrato metanólico foi de 390 mg/mL para cepa número 18 e 400 mg/mL para cepas números 24878 e 25008.

Sato et al. (2000) analisaram a atividade antifúngica de 29 extratos vegetais extraídos com água quente e metanol contra *Arthrimum sacchari* e *Chaetomium funicola* e constataram alta atividade de *Psidium guajava*.

Jimenez-Escrig et al. (2001) verificaram que o fruto de goiaba (*Psidium guajava* L.) apresentou alto conteúdo de fibras dietéticas (48,55–49,42%) e polifenóis estáveis (2,62-7,79%). A atividade antioxidante dos polifenóis foi analisada usando três métodos complementares: a) complexação com radicais livres; b) poder antioxidante reduzindo ferro; c) baixa oxidação lipoprotéica.

Ishihara et al. (1999) extraíram agentes antioxidantes constituídos de proantocianidinas (substâncias inibidoras da biossíntese da peroxidase lipídica) das folhas de *Psidium guajava* L. com solventes como a água ou solução hidroalcolica.

Leong e Shui (2002) também confirmaram a capacidade antioxidante de *Psidium guajava* L., entre outros frutos, nos mercados de Singapura.

Os componentes antioxidantes do extrato de *Psidium guajava* L. foram identificados por CLAE, através do desaparecimento ou da diminuição da intensidade dos picos, após reação induzida pela adição de 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) (MASUDA et al., 2003).

Luximon-Ramma (2003) contribuiu com a pesquisa de 17 frutos, analisando sua capacidade antioxidante, teor de fenóis totais, proantocianidinas, flavonóis e conteúdo de vitamina C. Verificou que os flavonóides parecem contribuir menos para o potencial antioxidante dos frutos. Pouca correlação também foi observada entre o conteúdo de ácido ascórbico e atividade antioxidante; a maior capacidade antioxidante foi observada em frutos caracterizados pelo elevado teor de fenólicos totais, tendo assim potente efeito benéfico à saúde.

Segundo Qian e Nihorimbera (2004), foi comprovada a atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Psidium guajava* L. Os autores extraíram as folhas com água e solução hidroalcolica 50% (1:10), sendo os fenóis totais determinados espectrofotometricamente, de acordo com método de Folin-Ciocalteu e calculados em equivalente de ácido gálico. A atividade antioxidante do extrato foi detectada pela diminuição da formação dos radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH).

A ação antioxidante da *Psidium guajava* L. também foi confirmada com os estudos de Tachakittirungrod; Okonogi e Chowwanapoonpohn (2007); o teor de compostos fenólicos foi calculado em ácido gálico. A atividade antioxidante das frações seguiu a seguinte ordem: metanol > butanol > acetato de etila > hexano.

Em ensaios *in vitro* taninos inibiram glicosiltransferases produzidas por duas bactérias *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, encontradas na cavidade bucal do homem. Essa enzima catalisa a formação de dextranas, que se sedimentam sobre

os dentes e, com isso, facilitam a adesão das bactérias à superfície lisa dos dentes. Placas são os precursores para a formação de cáries e podem também proporcionar a formação de inflamação da gengiva (gengivite). A inativação da glucosiltransferase pelos taninos bloqueia a formação da placa dental e de inflamações na região bucal e garganta (SCHOLZ, 1994; MARUYAMA et al., 2004).

Deo e Shastri (2003), através de preparação de extrato à base de acetona, cromatografia de troca iônica e filtração em gel purificaram e caracterizaram três diferentes formas de enzimas poligalacturonases – proteínas inibidoras encontradas nos frutos de *Psidium guajava* L., responsáveis pela resistência contra ataques de fungos presentes nas paredes celulares da planta.

Makino et al. (2001) verificaram que os polifenóis extraídos de folhas e/ou frutos de goiabeira com solventes hidrofílicos apresentaram ação inibidora da α -amilase e verificaram que os frutos são usados em dietas alimentares e bebidas; Nakazawa et al. (2000) avaliaram estes inibidores por CLAE.

Um extrato etanólico de *Psidium guajava* L. inibiu, *in vitro*, lipase pancreática suína com IC 50 de 0,205 mg/mL, com isso justificando a sua presença em alimentos e cosméticos, para evitar a obesidade ou desordens da pele (YAMANOBE et al., 2000; MATSUURA et al., 2001).

Na medicina nuclear, os constituintes sanguíneos são marcados com tecnécio-99 m e usados para produção de imagens. Entretanto, algumas drogas podem modificar o marcador tecnécio-99m. Abreu et al. (2006) verificaram os efeitos de extratos aquosos de folhas de *Psidium guajava* L. sobre a marcação dos constituintes sanguíneos com tecnécio-99m. Amostras de sangue de ratos Wistar foram incubadas com diferentes concentrações de extrato de goiabeira e marcadas com (99m) Tc, sendo determinadas as porcentagens de radioatividade incorporada em elementos sanguíneos. Os resultados sugeriram que os extratos apresentam ação antioxidante e/ou alterações nas estruturas das membranas envolvidas no transporte iônico da célula, diminuindo a radiomarcagem dos constituintes sanguíneos com tecnécio - 99 m.

O extrato hidroalcolólico a 50% de goiabeira apresentou ação inibitória contra HIV-1 integrase (IN), uma enzima essencial para replicação viral (TEWTRAKUL et al., 2003).

Entre outros efeitos de *Psidium guajava* L., a fração polissacarídica dos frutos deste vegetal, extraída com metanol/água e testada frente a glicemia, colesterol e

níveis de triglicérides em coelhos normais e aloxanizados, apresentou redução dos níveis de glicose no sangue (EL-BADRAWY, 1999).

Deguchi et al. (1998) confirmaram o efeito benéfico do hábito no Japão de consumir extrato aquoso quente de folhas de *Psidium guajava* L. como remédio para diabetes. Foram testadas amostras em camundongos e voluntários humanos e observado o efeito inibitório *in vitro* do extrato sobre a atividade de enzimas de degradação do açúcar, maltase, sucrase e α -amilases. Observou-se a redução da glicemia pós-prandial em humanos, após administração oral do chá de folhas de goiabeira.

Os extratos das folhas de *Psidium guajava* L. estudados por Wu et al. (2009) comprovaram seu efeito benéfico para prevenir complicações em pacientes diabéticos.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivo geral: Estudar as atividades cicatrizante e antimicrobiana do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L., assim como a estabilidade do gel.

São objetivos específicos da presente pesquisa:

- ✓ Análise farmacobotânica de folhas da espécie *Psidium guajava* L.;
- ✓ Triagem dos principais grupos de princípios ativos;
- ✓ Quantificação de taninos totais do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L.;
- ✓ Quantificação de flavonóides do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L.;
- ✓ Estudo da atividade cicatrizante do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. em ratos;
- ✓ Estudo de estabilidade acelerada do gel de extrato glicólico de *Psidium guajava* L.;
- ✓ Contagem microbiana do gel e do extrato glicólico de *P.guajava* L.
- ✓ Estudo da atividade antimicrobiana do gel e do extrato glicólico de *P. guajava* L.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Coleta e identificação.....	40
4.2 Análise farmacobotânica.....	40
4.3 Preparo do material vegetal e elaboração dos extratos	41
4.4 Composição e preparação do gel de <i>Psidium guajava</i> L.....	41
4.5 Triagem fitoquímica da droga vegetal e do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.....	42
4.5.1 Verificação da presença de taninos.....	42
4.5.2 Verificação da presença de flavonóides.....	42
... 4.5.3 Verificação da presença de saponinas.....	43
... 4.5.4 Verificação da presença de óleos essenciais.....	43
4.6 Teste de estabilidade.....	44
4.6.1 Teste estabilidade acelerada.....	44
4.6.1.1 Verificação de separação de fases.....	44
4.6.1.2 Perfil cromatográfico.....	44
4.6.1.3 Quantificação de flavonóides totais.....	45
4.6.1.4 Quantificação de taninos totais.....	46
4.6.1.5 Teste de viscosidade.....	47
4.6.1.6 Contagem microbiana de bactérias, bolores e leveduras	47
4.7 Atividade cicatrizante.....	48
4.7.1 Cirurgia.....	48
4.7.2 Pós operatório.....	49
4.7.3 Análise estatística.....	50
4.7.4 Análise histológica.....	50
4.8 Atividade antimicrobiana.....	51
4.8.1 Validação prévia da metodologia de microdiluição em micro placas.....	51
4.8.2 Os testes foram realizados com os seguintes micro-organismos.....	52
4.8.3 Meios de cultura:.....	52
4.8.4 Preparo dos meios de cultura:.....	52
4.8.5 Preparo e padronização das suspensões de micro-organismos.....	53
4.8.6 Preparação das soluções padrão dos antibióticos (controle positivo ou de atividade antimicrobiana).....	53
4.8.7 Preparação das amostras.....	54
4.8.8 Procedimento do teste de atividade antimicrobiana (microdiluição e leitura em detector de ELISA).....	54
4.8.9 Procedimento do teste de atividade antimicrobiana (difusão em Placas).....	55
4.8.9.1 Teste com “Template”	55
4.8.9.2 Teste com disco	55
4.8.10 Método de macrodiluição (diluição em caldo - tubos)	56

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação

As folhas de *Psidium guajava* L. foram coletadas na pré-floração na Chácara Wadt, situada na cidade de Valinhos – São Paulo, cujas coordenadas são 22° 58' 14" S e 46° 59' 45" W e cuja altitude é de 660 m. A espécie foi identificada pelo Prof.Dr.José Rubens Pirani e a exsicata depositada sob registro M.K.H. Okamoto 001 no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

4.2 Análise farmacobotânica

As folhas plenamente desenvolvidas, a partir do 4º nó, foram coletadas de três indivíduos. No estudo da morfologia e anatomia foram empregadas 10 unidades de cada indivíduo.

Amostras de folhas foram conservadas em etanol a 70% (BERLYN; MISKSCHE, 1976). O material previamente descolorido com hipoclorito de sódio 2%, foi seccionado à mão livre, nos sentidos transversal e longitudinal, na região mediana inferior; e posteriormente corado com azul de astra e fucsina (ROESER, 1962); reações histoquímicas realizadas com cloreto férrico (JOHANSEN, 1940), lugol (BERLYN; MIKSCHE, 1976), sudan III (FOSTER, 1949). Parte do material também foi dissociada com a mistura de água oxigenada e ácido acético glacial (1:1), sob aquecimento a 60° C. O pecíolo foi seccionado na região proximal, mediana e distal.

Os cortes foram analisados, empregando-se o microscópio de luz Olympus BX 40 e registrados em fotomicroscópio acoplado à máquina digital Sony 6.0 mega pixels. Escalas foram obtidas nas mesmas condições.

4.3 Preparo do material vegetal e elaboração dos extratos

As folhas de *Psidium guajava* L. foram secas em estufa à temperatura de 40 °C. A moagem do material foi realizada em moinho de facas e martelos, obtendo um pó grosso (5 -10 mm), conservado ao abrigo de umidade, luz e calor (SIMÕES et al., 2007).

Através do processo C (FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil, 1926), os extratos glicólicos de *Psidium guajava* L. foram preparados procedendo-se umedecimento do pó com propilenoglicol, álcool e água, acondicionamento do pó no percolador e adição do solvente, realizando-se assim a percolação fracionada propriamente dita (SIMÕES et al., 2007).

4.4 Composição e preparação do gel de *Psidium guajava* L.

Composição do gel de *Psidium guajava* L.

Natrosol® (hidroxietilcelulose)	8,0 g
Nipagin® (metilparabeno)	0,4 g
Glicerina	40,0 g
Extrato glicólico <i>Psidium guajava</i> L.....	40,0 g
Água destilada qsp.....	400 g

Preparação: Foram agitados no gral natrosol®, nipagin®, glicerina, extrato glicólico de *Psidium guajava* L. com auxílio de um pistilo e em seguida adicionada água destilada fervida. A agitação continuou até dar a consistência de gel (PRISTA; ALVES; MORGATO, 1990; VELASCO-DE-PAULA; RIBEIRO, 2001).

4.5 *Triagem fitoquímica da droga vegetal e do extrato glicólico de *Psidium guajava* L.*

4.5.1 *Verificação da presença de taninos*

Foram realizados os seguintes ensaios no extrato aquoso da droga e no extrato glicólico diluído em água (1:10) (SIMÕES et al., 2007):

a) cloreto férrico a 2 %

Observação da formação de precipitado escuro.

b) acetato de chumbo a 10%

Observação da formação de precipitado cinza.

c) solução aquosa de gelatina a 2,5%

Observação da formação de precipitado amarelo esverdeado.

d) solução aquosa de acetato de cobre 3%

Observação da formação de precipitado marrom.

4.5.2 *Verificação da presença de flavonóides*

Foram realizados os seguintes testes com o extrato alcoólico a partir da droga vegetal e com o extrato glicólico diluído em álcool 70% (1:15) (SIMÕES et al., 2007):

a) Reação com cloreto de alumínio

Observação da fluorescência amarelada a 366 nm na região de contato do extrato com o reativo.

b) Reação de Shinoda utilizando magnésio metálico e ácido clorídrico concentrado

Observação da coloração variando de róseo a vermelho.

c) Reação com hidróxido alcalino

Observação da coloração amarela intensa.

4.5.3 *Verificação da presença de saponinas*

A droga vegetal e o extrato glicólico foram extraídos com água e verificado se houve a formação de uma espuma persistente (SIMÕES et al., 2007).

4.5.4 *Verificação da presença de óleos essenciais*

a) Em um papel de filtro foi colocada 1 gota de extrato alcoólico e após evaporação do álcool, foi observado se houve ocorrência de mancha oleosa no papel, que desaparece com o tempo e possui odor característico (indicação de óleo essencial) (SIMÕES et al., 2007).

b) Extração com aparelho de Clevenger, após reação positiva no procedimento anterior (SIMÕES et al., 2007).

4.6 *Teste de estabilidade*

4.6.1 *Teste estabilidade acelerada:*

O gel de *Psidium guajava* L. foi submetido à temperatura de 40 ± 2 °C e umidade relativa (UR) de $75\pm 5\%$ em câmara climática (marca Nova Ética) durante 3 meses, com análises em 0, 30, 60 e 90 dias. Os parâmetros pH, aspecto, cor, odor, separação das fases, perfil cromatográfico, quantificação de flavonóides totais, taninos totais, viscosidade e contagem microbiana de bactérias, bolores e leveduras foram observados em triplicata (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; DECCACHE, 2006; BABY et al., 2008).

4.6.1.1 *Verificação de separação de fases*

10 g do gel foram submetidos à centrifugação a 3000 rotações por minuto (RPM), durante 30 minutos, em centrífuga Excelsa modelo 206 BL – FANEM (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; DECCACHE, 2006; BABY et al., 2008) .

4.6.1.2 *Perfil cromatográfico*

Preparo da amostra: 3 g do gel foram extraídos com 15 mL de metanol, agitando-se com auxílio do bastão de vidro. Após 15 minutos foram filtrados e evaporados em banho-maria até a secura, em seguida o resíduo foi ressuspenso com 3 mL de metanol.

Foram aplicados 25 toques capilares da amostra (gel)

Foram utilizados os seguintes sistemas cromatográficos em camada delgada:

Para verificação de compostos fenólicos

Suporte: celulose sobre placa de vidro

Fase móvel: ácido acético glacial:água:ácido clorídrico:metanol (45:15:4,5:19,3)

Revelador: cloreto férrico 5 % em metanol (SANTOS et al., 2002).

Para verificação de flavonóides

Suporte: sílica gel 60 F_{254 nm} sobre placa de vidro

Fase móvel: clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (60:32:12:8)

Revelador: NP – “Natural products reagent” – difenilboriloxietilamina a 1% em metanol (WAGNER; BLADT, 1996).

4.6.1.3 *Quantificação de flavonóides totais*

Solução-mãe: 0,5 g da amostra foram pesados e transferidos para o balão de fundo redondo de 100 mL, aquecidos em banho-maria com 6 mL metanol, sob refluxo, durante 30 minutos, em temperatura de 45-50 °C. A mistura foi filtrada por algodão para balão volumétrico de 10 mL. O resíduo insolúvel e o algodão foram retornados para o mesmo balão de fundo redondo e adicionados 4 mL de metanol. Após aquecimento, sob refluxo, durante mais 10 minutos, a mistura foi novamente filtrada para o mesmo balão volumétrico de 10 mL. Este foi completado com metanol após resfriamento.

Solução amostra: a solução mãe (0,4 mL) foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, adicionados 0,2 ml de solução de cloreto de alumínio a 2% (p/v) em metanol e o volume completado com metanol.

Solução-branco: A solução mãe (0,4 mL) foi transferida para o balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com metanol.

A absorvância da solução amostra foi medida em 425 nm, 30 minutos após seu preparo, utilizando a solução-branco para ajuste do zero. O teor de flavonóides totais foi calculado segundo a expressão (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002):

$$Q = \frac{A \times 62500}{500 \times m \times (100 - Pd)}$$

Em que

A = absorvância medida

m = massa da droga (g)

Pd = determinação de água (%)

Foi determinada a % de água da amostra, de acordo com Farmacopéia Brasileira (2002) no laboratório.

4.6.1.4 *Quantificação de taninos totais*

0,75 g da amostra foram transferidos para balão de fundo redondo de 250 mL e adicionados 150 mL de água. Após aquecimento em banho-maria, sob refluxo, por 30 minutos à temperatura de 80-90 °C, a mistura foi transferida para balão volumétrico e diluído a 250 mL com água. Procedeu-se a filtração com papel de filtro, desprezando-se os primeiros 50 mL do filtrado. O restante do filtrado constituiu a solução-mãe (SM).

Polifenóis totais: 5 mL da SM foram transferidos para balão volumétrico 25 mL e o volume foi completado com água. 5 mL desta solução foram misturados com 2 mL do reagente de Folin-Denis e diluídos a 50 mL com solução de carbonato de sódio SR. A absorvância da solução (A1) foi medida em 715 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando água como branco.

Polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele: 0,2 g de pó-de-pele foram adicionados a 20 mL da SM e agitado mecanicamente por 60 minutos. Após filtração, 5 mL dessa solução foram diluídos para 25 mL com água. 5 mL desta solução foram misturados com 2 mL do reagente de Folin-Denis e diluídos a 50 mL com solução de carbonato de sódio SR. A absorvância da solução (A2) foi medida em 715 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando água como branco.

Solução referência: 50 mg de pirogalol foram dissolvidos em água e diluídos a 100 mL. 5 mL desta solução foram diluídos a 100 mL com água e misturados 5 mL

desta solução com 2 mL do reagente de Folin-Denis e diluídos a 50 mL com solução de carbonato de sódio SR. A absorvância da solução (A3) foi medida em 715 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente e dentro de 15 minutos contados da dissolução do pirogalol, utilizando água como branco.

O teor de taninos foi calculado pela expressão:

$$TT = \frac{13,12 \times (A1 - A2)}{A3 \times m}$$

Em que

TT = taninos totais;

A1 = absorvância medida para polifenóis totais;

A2 = absorvância medida para polifenóis não adsorvidos;

A3 = absorvância medida para a substância referência;

m = massa da droga vegetal considerando a determinação de água.

(FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002).

4.6.1.5 *Teste de viscosidade*

15 g da amostra foram acondicionados no compartimento do viscosímetro (Viso star-R , Fingilab SA – Marte).

Foi realizada a programação para agulha spindele TR 11 e verificada a rotação por minuto igual a 200. O botão start foi acionado e após 1 minuto realizada a leitura em centipoise. As amostras foram analisadas em triplicata, totalizando 12 unidades (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; DECCACHE, 2006; BABY et al., 2008).

4.6.1.6 *Contagem microbiana de bactérias, bolores e leveduras*

Para o controle microbiológico do gel de *Psidium guajava* L. foi utilizada a técnica de “pour plate”. 10 g do gel foram pesados e diluídos em solução fisiológica

e 0,1% de tween 80 como inativante de conservante. Volumes de 1 mL correspondente a cada diluição da amostra foram inoculados em placas de Petri estéreis com posterior adição do meio de cultura (TSA - caldo de ágar de caseína – soja para bactérias; SA - caldo de ágar de Sabouraud – dextrose para fungos). Em seguida, as contagens das unidades formadoras de colônias foram realizadas, após incubação a 35 °C / 48 horas de bactérias e após incubação a 24 °C / 5 dias de fungos e leveduras (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

4.7 Atividade cicatrizante

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar machos, adultos, com peso médio de 150 g. Os animais permaneceram acondicionados em gaiolas climatizadas a 25 °C, com livre acesso à água potável e ração industrial própria para ratos tipo Purina[®]. Foi respeitado o período de aclimatização de sete dias antes do início do experimento. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: Grupo C (controle negativo- Salina), Grupo D (controle positivo- Dersani[®]: uma loção à base de ácidos graxos essenciais, com vitaminas A e E), Grupo P (Extrato glicólico de *Psidium guajava* L.), Grupo GG (Gel de *Psidium guajava* L.). Os grupos foram divididos em 5 subgrupos de acordo com o período da morte (24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias e 14 dias) com 03 animais em cada subgrupo. Este experimento teve aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Universidade de São Paulo, protocolo nº 187 (MIRANDA, 2001; GARROS et al., 2006; AMORIM et al., 2006; SCHIRATO et al., 2006).

4.7.1 Cirurgia

Os ratos foram submetidos à anestesia com Xilazina 0,1 mL/100g e Ketamina 0,2 mL/100g. Depois de anestesiados foram posicionados em decúbito ventral, imobilizados em prancha com contenção dos membros por tensores elásticos e

submetidos à epilação por tração manual na região dorsocostal em área de aproximadamente 5 cm².

Para realização do procedimento operatório foi usado um punch metálico contendo lâmina cortante na borda inferior. Com este instrumento foram incisados 2 fragmentos cutâneos de 4 mm de diâmetro na área epilada, até exposição da fáscia muscular dorsal. A hemostasia foi realizada por compressão digital, utilizando-se gaze (MIRANDA, 2001; GARROS et al., 2006; AMORIM et al., 2006; SCHIRATO et al., 2006).

4.7.2 Pós operatório

Logo após o ato operatório, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, divididos de acordo com seus respectivos grupos e foram realizadas as primeiras aplicações tópicas de 0,1 mL do extrato glicólico de *Psidium guajava* L. em cada ferida de cada animal; para isso foi utilizada uma seringa plástica de 1 mL sem agulha. Este procedimento foi repetido diariamente durante 14 dias, respeitando-se a data da morte do animal. No grupo controle negativo, solução fisiológica 0,9% foi aplicada em igual volume, de acordo com o período de morte do animal, semelhante ao proposto para o grupo de *Psidium guajava* L. No grupo Controle Positivo foi realizada a aplicação de Dersani[®], com volume semelhante ao proposto para o Grupo Controle Negativo. Em outro grupo, foram aplicados 0,2 g de gel de *Psidium guajava* L., utilizando-se um “swab”. Todos os ratos foram examinados diariamente quanto à sua mobilidade, comparado ao controle e foi realizada avaliação macroscópica da ferida operatória, observando-se a presença ou ausência de secreção, crostas ou necrose.

No dia pré-estabelecido, os ratos foram mortos, através de dose excessiva de anestésico. As feridas operatórias foram examinadas com uso de lupa para verificação de crostas, secreções, cicatriz hipertrófica e verificação do tamanho da ferida residual, no maior e menor eixo, medidos com régua e através do programa image pró-plus.

A ferida foi excisada com margem de 1 cm de pele íntegra em torno da lesão, em profundidade até a fáscia muscular. Cada peça foi identificada individualmente,

fixada em papel e colocada em solução de formalina a 10%. As lâminas para avaliação histológica foram preparadas no laboratório de Patologia da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) (MIRANDA, 2001; GARROS et al., 2006; AMORIM et al., 2006; SCHIRATO et al., 2006).

4.7.3 *Análise estatística*

A estatística foi realizada através de ANOVA, seguida de teste de Tukey, com nível de significância de 0,05.

4.7.4 *Análise histológica*

Técnica de processamento do material para cortes histológicos (MICHALANY, 1998; GARROS et al., 2006):

Desidratação: O tecido foi colocado no álcool absoluto por 30 minutos, na estufa à temperatura de 60 °C. Em seguida foi transferido para o segundo e terceiro banho de álcool absoluto durante 30 minutos cada, sempre dentro da estufa.

Diafanização: Foram realizados 3 banhos de xilol de 30 minutos, numa estufa a 60 °C. Quando necessário o processamento foi interrompido, deixando o material no segundo banho de xilol, fora da estufa até o dia seguinte, não sendo necessário o terceiro banho.

Parafina: Após deixar escorrer bem o xilol, o material foi transferido para o primeiro banho de parafina por 30 minutos, na estufa. Em seguida para o segundo banho de parafina por mais 30 minutos e foi emblocado.

Emblocação: O material foi dividido em duas partes, dispostas paralelas à margem inferior do bloco e em seguida a parafina fundida foi adicionada até cobrir o material.

Corte: Após 10 minutos de banho de gelo, as peças de parafina foram cortadas através do micrótomo Leica RM 2125 RT, em uma espessura de 3 µm. Os cortes foram colocados na lâmina e levadas à estufa de 60 °C, durante 30 minutos.

Coloração das lâminas: As lâminas foram mergulhadas por 3 vezes consecutivas em cada um dos solventes, xilol 1, xilol 2; álcool 100%, álcool 95%. Os cortes foram hidratados em água corrente por no mínimo 3 minutos, levados em hematoxilina (filtrado previamente) por 10 minutos. Em seguida foram lavados em água corrente até a limpidez, mergulhados uma vez em água ácida (água acetificada a 1%) e novamente lavados com água corrente durante 5 minutos. Foram tratados com corante eosina por 1 minutos, mergulhados no álcool 70%; álcool 95%; álcool 100% até a limpidez das lâminas. Finalmente as lâminas foram mergulhadas no xilol 3, xilol 4, xilol 5, e deixadas neste último até o fechamento das mesmas.

Os cortes foram observados com microscópio NIKON China, modelo Alphaphot-2 YS2-H, utilizando o aumento de 40 vezes e fotografados através da câmera fotográfica NIKON F-70, fabricada no Japão, utilizando-se filme com velocidade 400 ISO.

4.8 Atividade antimicrobiana

4.8.1 Validação prévia da metodologia de microdiluição em microplacas

Para recuperação dos micro-organismos na mistura de solventes empregada, foram utilizadas microplacas com 96 orifícios (poços) divididas em 12 colunas com 8 poços cada. Nas duas primeiras colunas foram adicionados 200 µL de meio de cultura inoculado com os micro-organismos testes (controle de crescimento). As

colunas restantes foram destinadas ao ensaio de recuperação; em cada uma delas foram adicionadas 20 µL da mistura de solventes analisada e 180 µL de meio TSB (caldo caseína de soja) inoculado. Após incubação de 24 horas a 35-37 °C, as leituras das microplacas foram realizadas por espectrofotometria com detector de ELISA a 630 nm. Para cada micro-organismo em teste, foram realizadas 3 repetições consecutivas e os resultados foram analisados estatisticamente (ELOFF, 1998; KARAMAN et al., 2003; UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2007;).

4.8.2 Os testes foram realizados com os seguintes micro-organismos:

Staphylococcus aureus (ATCC 6538)

Escherichia coli (ATCC 10536)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)

Candida albicans (ATCC 10231)

As cepas microbianas liofilizadas foram adquiridas na seção de Coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz. Foram realizados no máximo 5 repiques a partir de cada cepa, renovados mensalmente.

4.8.3 Meios de cultura:

Caldo e ágar de caseína – soja (TSB e TSA)

Caldo e ágar de Sabouraud – dextrose a 4% (Difco®).

4.8.4 Preparo dos meios de cultura:

Os meios de cultura empregados foram caseína - soja (ágar e caldo), para bactérias e Sabouraud - dextrose (ágar e caldo), para bolores e leveduras, sendo ressuspensos a partir do meio desidratado. Após reidratação, os meios foram

esterilizados a 120 °C por 15 minutos em autoclave, conforme as instruções do fabricante (Difco®).

4.8.5 Preparo e padronização das suspensões de micro-organismos:

A partir das culturas estoque, as bactérias foram repicadas em estrias, na superfície do meio inclinado de ágar caseína - soja. O bolor e a levedura foram repicados na superfície do meio inclinado de ágar Sabouraud dextrose. As bactérias foram incubadas a 35-37 °C por 24 horas, os fungos, a 20-25 °C, por 48 horas para leveduras e por sete dias para bolores.

A massa celular resultante do crescimento foi recolhida em nove mL de solução salina estéril 0,85% (p/v) e a suspensão obtida foi padronizada através de diluições decimais seriadas. A partir da suspensão padronizada de cada microrganismo, foram efetuadas as diluições necessárias com solução salina estéril e caldo para se obter soluções com 10^4 a 10^6 UFC/mL do micro-organismo teste. A confirmação da viabilidade do inóculo foi determinada com o plaqueamento da diluição microbiana ao término de cada experimento. O número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) da suspensão original foi determinado, sendo consideradas as contagens das placas com cerca de 30 a 300 colônias.

4.8.6 Preparação das soluções padrão dos antibióticos (controle positivo ou de atividade antimicrobiana)

Soluções aquosas de padrões secundários de cloranfenicol, amicacina e nistatina de concentrações de 1 mg/mL foram ensaiadas frente aos micro-organismos em experimento.

4.8.7 *Preparação das amostras*

As amostras foram preparadas diluídas com o solvente Dimetilsulfóxido (DMSO): metanol 50:50, com as seguintes proporções:

Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. 200 µL/mL e 500 µL/ mL.

Gel 200 mg/mL e 500 mg/mL

Base do gel 200 mg/mL e 500 mg/mL

Solvente do extrato 200 µL/mL

4.8.8 *Procedimento do teste de atividade antimicrobiana (microdiluição e leitura em detector de ELISA)*

O método de diluição em meio líquido utilizou microplacas ao invés de tubos, adaptando-se os volumes de inóculo, amostra e meio de cultura para 200µL. Foram utilizados como controle do meio de cultura: 200 µL de TSB ou SDB; como controle do solvente: 180-190 µL de meio de cultura e 10-20 µL (Dimetilsulfoxido (DMSO): metanol 50:50); como controle de crescimento: 200 µL de meio de cultura inoculado com o micro-organismo teste; como controle positivo ou de atividade antimicrobiana: 10 µL da solução de antibiótico e 190 µL de meio inoculado com o micro-organismo em estudo. As amostras (10 µL da amostra e 180-190 µL de meio TSB ou SDB inoculado) foram testadas frente ao controle (extrato e meio de cultura não inoculado).

Após inoculação de 24 horas a 35 °C para bactérias ou 48 horas a 25 °C para fungos, foi realizada a leitura a 630 nm por detector de Elisa. Para cada microorganismo em teste, foram realizadas no mínimo 3 réplicas com 3 repetições consecutivas e os resultados foram analisados estatisticamente (MAHBOUBI; HAGHI, 2008; OSTROSKY et al., 2008).

4.8.9 Procedimento do teste de atividade antimicrobiana (difusão em placas)

4.8.9.1 Teste com “Template”

9 mL do meio inoculado de bactérias (1 mL de bactéria/100mL de ágar TSA) foram colocados numa placa de Petri e guardados em estufa durante 24 horas.

Em seguida foi colocado “template” (material de inox com formato circular apresentando orifícios para inoculação) nesta placa inoculada e em cada orifício foram adicionados 50 µL das amostras e após o tempo em estufa à temperatura determinada para cada micro-organismo, foram medidos os halos de inibição.

Foram aplicados 50 µL do antibiótico cloranfenicol, na concentração de 1 mg/ml em água (controle positivo) e as mesmas quantidades de amostras de gel (200 mg/mL e 500 mg/mL) e de extrato glicólico (200 µL/mL e 500 µL/mL) diluídos em DMSO:metanol (1:1) (PINTO et al., 2003; OSTROSKY et al., 2008).

4.8.9.2 Teste com disco

2 mL da diluição 10^{-4} UFC/mL de *S. aureus* foram transferidos no meio TSA (100 mL) e colocados nas placas de Petri. Após endurecimento do meio foram acrescentados os discos contendo os antibióticos cefoxitina (CFO 30 MCG - SENSIFAR) e bacitracina (BAC- 10UI SENSIFAR) nos papéis de filtro (formato de disco), bem como 5 µL e 10 µL da amostra do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L.

Este procedimento foi repetido com *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando como controle positivo o antibiótico cefoxitina e ciprofloxacina (CIP 5 MCG – SENSIFAR). Já para testar *C. albicans* foram utilizados 2 mL da diluição 10^{-2} do fungo em 100 mL do meio SA., seguindo o mesmo procedimento anterior, utilizando os antibióticos clotrimoxazol (UT 25 MCG – SENSIFAR) e eritromicina (ERI 15 MCG -SENSIFAR). Após o tempo de incubação necessário, foram medidos os halos de

inibição (ESMERINO et al., 2004; MAHBOUBI; HAGHI, 2008; OSTROSKY et al., 2008).

4.8.10 Método de macrodiluição (diluição em caldo - tubos)

A inoculação dos micro-organismos (mo) foi realizada juntamente com o meio de cultura. Uma alíquota de 1 mL da suspensão de cultura jovem com carga de 10^2 UFC/mL foi transferida para 9 mL do meio de cultura.

A incubação do meio de cultura contendo os micro-organismos foi realizada a 30-35 °C por 24 horas para bactérias e levedura, quando foi efetuada observação macroscópica (turvação) do crescimento microbiano. Para avaliar se a turvação era interferência ou crescimento microbiano, foram realizadas subculturas. Três tubos foram utilizados para controle positivo (meio + mo + solução fisiológica) e três tubos para cada diluição da amostra (meio + mo + amostra) (PINTO et al., 2003; OSTROSKY et al., 2008).

As diluições das amostras foram: 200 mg do gel do extrato de *Psidium guajava* L. diluídos em 1 mL de solução fisiológica e tween 1%; desta foram retirados 0,1 mL e colocados em 3 mL de TSB contidos em tubo de ensaio. Este mesmo procedimento foi realizado para as demais amostras: extrato glicólico 200 µL/mL e 500 µL/mL; solvente do extrato glicólico 500 µL/mL; base do gel 200 mg/mL.

Para a subcultura: Dos tubos de ensaio dos extratos e géis que turvaram foram retirados 0,1 mL e colocados em outro tubo de ensaio contendo 3 mL de TSB, repetindo a técnica em triplicata para a confirmação do crescimento bacteriano.

Capítulo 5

RESULTADOS

5 RESULTADOS	57
5.1 Caracterização farmacobotânica da folha.....	58
5.1.1 Descrição macroscópica.....	58
5.1.2 Descrição microscópica.....	60
5.2 Triagem fitoquímica.....	63
5.3 Teste de estabilidade acelerada do gel de <i>Psidium guajava</i> L.....	64
5.3.1 Teor de flavonóides.....	64
5.3.2 Teor de taninos totais.....	65
5.3.3 Análise Estatística da viscosidade do gel de <i>Psidium guajava</i> L. durante o teste de estabilidade acelerada.....	66
5.3.4 Resultados da avaliação do gel de <i>Psidium guajava</i> L. submetido à temperatura de 40 ± 2 °C e umidade relativa (UR) de 75 ± 5% em câmara climática.....	67
5.3.5 Perfil cromatográfico.....	68
5.3.6 Contagem microbiana.....	70
5.4 Teste de cicatrização.....	70
5.4.1 Avaliação macroscópica.....	70
5.4.2 Avaliação histológica	74
5.5 Teste atividade antimicrobiana.....	81
5.5.1 Método microdiluição (ELISA).....	81
5.5.2 Método Difusão em placas.....	85
5.5.2.1 Técnica “templates”.....	85
5.5.2.2 Técnica em discos.....	87
5.5.3 Método de macrodiluição (diluição em tubos).....	89

5.1 Caracterização *farmacobotânica da folha*

5.1.1 *Descrição macroscópica*

As folhas da espécie arbustiva (Fig.1A) mostraram-se geralmente papiráceas a coriáceas, inteiras, oblongo-elípticas a ovaladas, de ápice obtuso, base obtusa, margem inteira e pecíolo de 0,5 a 1,0 cm de comprimento por 0,3 a 0,4 cm de diâmetro (Fig.1B). A lâmina, de 12 a 13 cm de comprimento por 7 a 8 cm de largura, apresentou-se discolor, com a face adaxial de coloração castanho esverdeado e a abaxial verde-pálido. A venação constatada foi do tipo camptódroma-broquidódroma (Fig.1B, E). Os tricomas tectores simples foram observados em toda a face abaxial, mas se destacaram na nervura central (Fig.1C, E, F). A face adaxial mostrou-se glabra (Fig.1D). Pontos translúcidos foram observados na lâmina (Fig.1E, F).

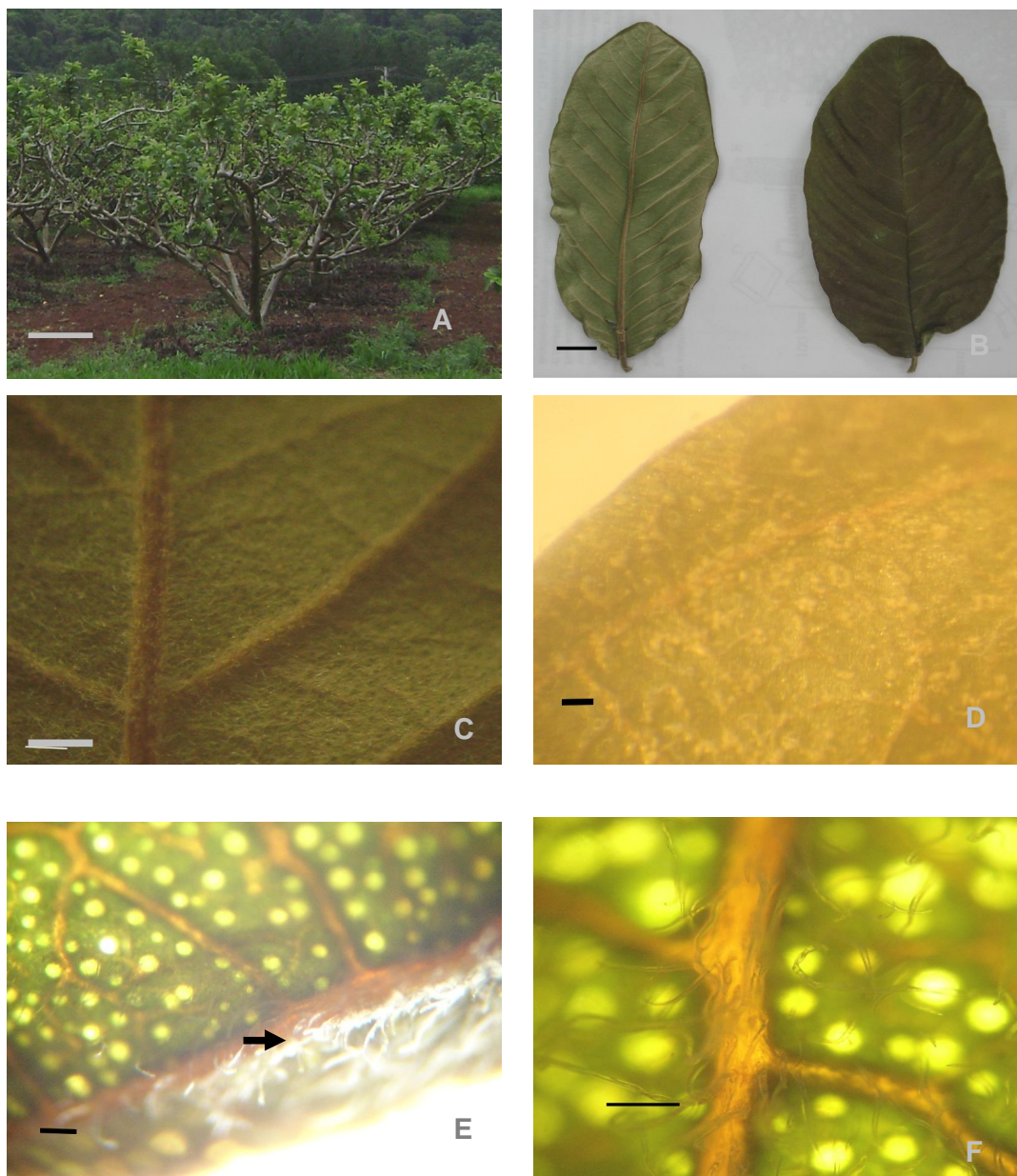


Figura 1 - *Psidium guajava* L. A. arbusto. B. Droga vegetal. C. Detalhe da face abaxial, com destaque aos tricomas tectores. D. Detalhe da face adaxial. E. Destaque aos pontos translúcidos e à nervura marginal (seta). F. Detalhe da nervura mediana e face abaxial recoberta por tricomas tectores. Escalas: barra corresponde a A = 1 m; B = 1 cm; C, D, E, F = 0,3 cm.

5.1.2 *Descrição microscópica*

O pecíolo apresentou-se com colênquima angular, cavidades secretoras próximas à epiderme e feixe vascular bicolateral em arco aberto nas 3 regiões analisadas (Fig. 2A, B).

O mesofilo dorsiventral mostrou-se constituído, por vezes, de 2 a 3 camadas de células cilíndricas, seguidas de 3 a 4 camadas de células menores e irregulares, cujo comprimento reduziu-se gradativamente em direção à face abaxial (Fig. 2C, D).

A epiderme voltada para a face adaxial mostrou-se unisseriada, sendo observadas três camadas subepidérmicas, algumas das quais contendo drusas de oxalato de cálcio (Fig. 2 E).

As células epidérmicas, em vista frontal, apresentaram paredes espessas, de contorno retilíneo-poligonal (Fig. 2F). Nas folhas hipostomáticas foram observados estômatos circundados por 2 a 5 células (Fig. 2G).

A nervura mediana evidenciou-se bem desenvolvida, com feixe bicolateral, em arco aberto. Cavidades secretoras foram observadas principalmente próximas à epiderme (Fig. 2H). O parênquima fundamental mostrou espaços intercelulares reduzidos, idioblastos cristalíferos (drusas, prismas, cristais romboédricos, pequenos cristais, areia cristalina), células com conteúdo lipofílico e compostos fenólicos. Grande número de cristais de forma variada foi observado na região floemática (Fig. 3A, B, C, D, E).

Tricomas tectores simples e de diferentes tamanhos foram encontrados com frequência na face abaxial (Fig. 3F, G, H, I).

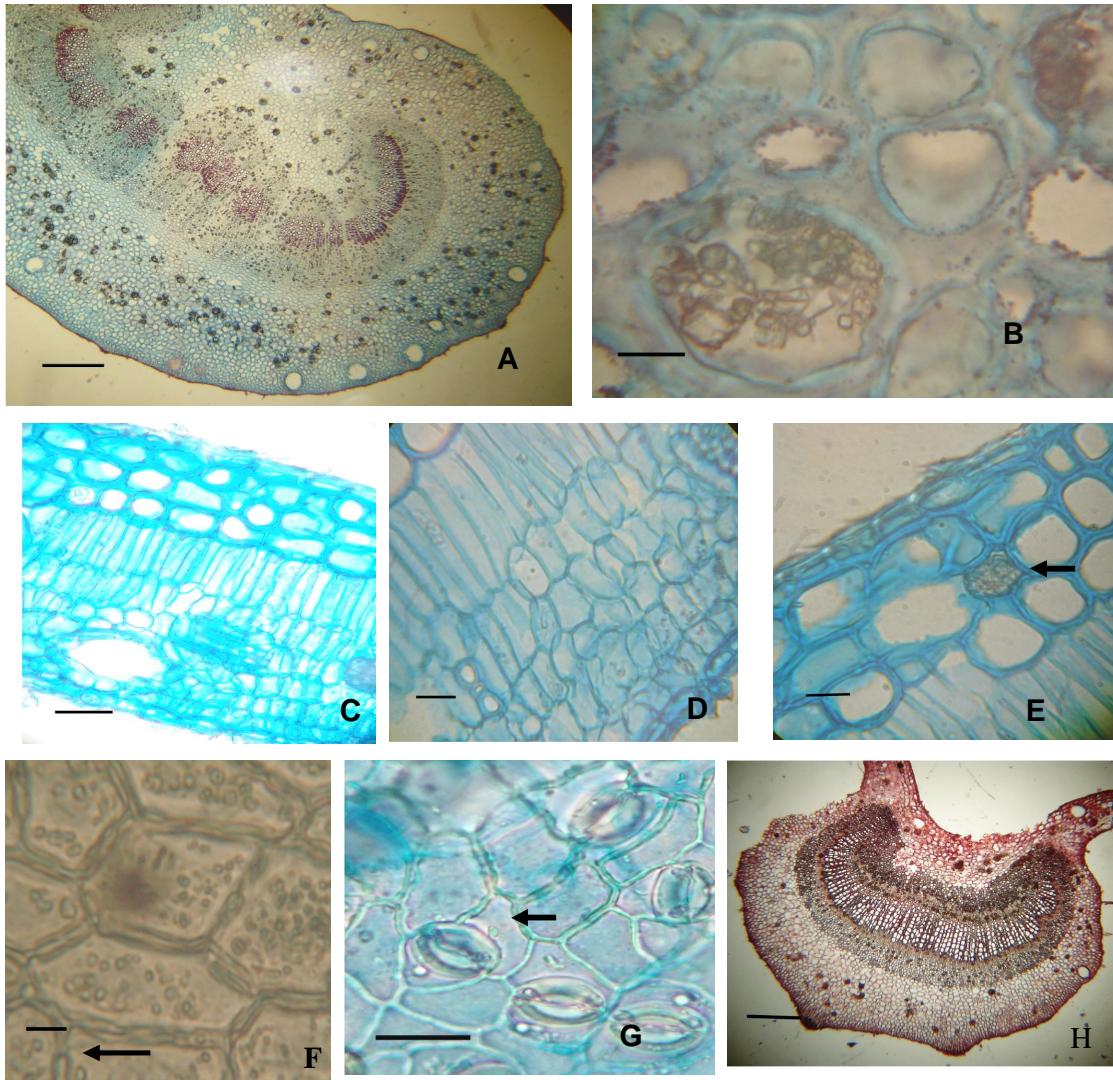


Figura 2 - *Psidium guajava* L. Folha. A, C, D, E, H. Seções transversais. B, F, G. Vista frontal. A. Feixe vascular em arco aberto no pecíolo. B. Detalhe de cristais de formas variadas no colênquima. C, D. Detalhe do mesofilo. E. Drusa (seta) na camada subepidérmica. F. Detalhe dos campos de pontuação na face adaxial. G. Estômatos na face abaxial. H. Nervura mediana com feixe vascular em arco aberto. Escalas. B, E, F. = 5 μ m. C = 50 μ m. D, G = 12 μ m. A, H = 100 μ m.

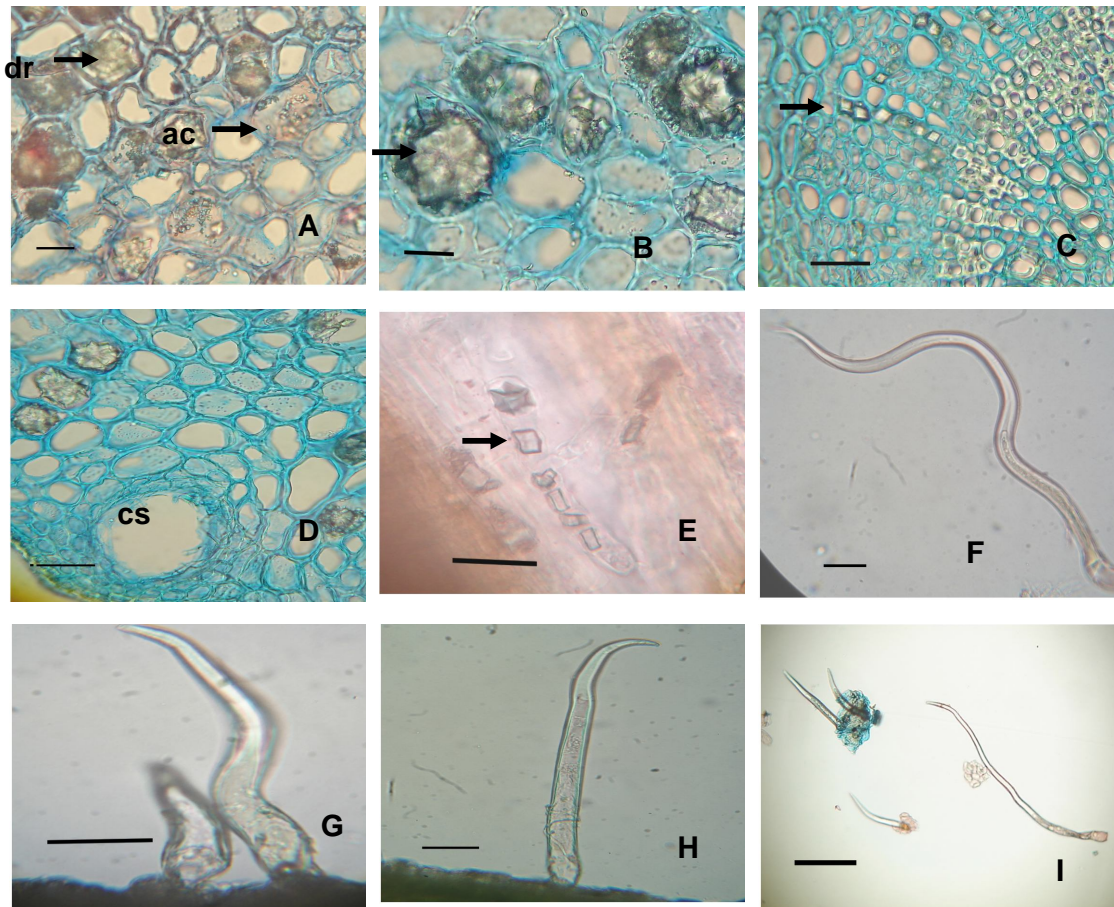


Figura 3 - *Psidium guajava* L. Folha. A. Drusas (dr) e areia cristalina (ac). B. Drusas (seta). C. Cristais prismáticos (seta) na região floemática. D. Drusas próximas à cavidade secretora (cs). E. Cristais prismáticos (seta). F, G, H, I Tricomas tectores. Escalas: barra correspondente a A, B, E, G, H = 12 μ m. D, C, F = 50 μ m. I = 100 μ m.

5.2 Triagem fitoquímica

Tabela 1 - Resultado da triagem fitoquímica da folha e do extrato glicólico de *Psidium guajava* L.

Teste	Folha	Extrato glicólico
Taninos		
a) cloreto férrico a 2 %	+++	+++
b) acetato de chumbo a 10%	+++	+++
c) solução aquosa de gelatina a 2,5%	+	+
d) solução aquosa de acetato de cobre 3%	+++	+++
Flavonóides		
a) Reação com cloreto de alumínio	+++	+++
b) Reação de Shinoda (magnésio + ácido clorídrico concentrado)	+++	+++
c) Reação com hidróxido alcalino	+++	+++
Saponinas		
Espuma persistente	+	+
Óleos essenciais		
Clevenger	++ (*)	++
(+) fraca intensidade	(+++) forte intensidade	
(++) média intensidade	(*) = 0,23% de óleo essencial	

5.3 Teste de estabilidade acelerada do gel de *Psidium guajava* L.

5.3.1 Teor de flavonóides

Tabela 2 - Teor de flavonóides totais de *Psidium guajava* L., após reação com cloreto de alumínio a 2% (p/V) em metanol e leitura a 425 nm.

Amostra	absorbância	% de flavonóides totais	média
Folha	0,82	2,13	1,97 ± 0,31
	0,85	2,17	
	0,64	1,62	
Extrato glicólico	0,55	1,40	1,23 ± 0,15
	0,48	1,20	
	0,43	1,10	
Gel t = 0	0,06	0,15	0,16 ± 0,02
	0,08	0,19	
	0,06	0,15	
Gel t = 30	0,05	0,13	0,13 ± 0,01
	0,05	0,12	
	0,05	0,13	
Gel t = 60	0,06	0,14	0,13 ± 0,01
	0,05	0,12	
	0,05	0,12	
Gel t = 90	0,05	0,13	0,13 ± 0,01
	0,05	0,13	
	0,06	0,14	

5.3.2 Teor de taninos totais

Tabela 3 - Teor de taninos totais de *Psidium guajava* L., determinado por reação com reagente de Folin-Denis e solução de carbonato de sódio e leitura da absorbância a 715 nm.

Amostra	Absorbância		% de taninos totais	média
	Polifenóis totais	Polifenóis não adsorvidos		
Folha	0,32	0,07	10,90	11,90 ± 0,87
	0,35	0,07	12,40	
	0,35	0,07	12,40	
Extrato glicólico	0,22	0,05	7,73	8,40 ± 0,66
	0,25	0,04	9,00	
	0,24	0,05	8,50	
Gel t = 0	0,05	0,03	0,70	0,79 ± 0,12
	0,05	0,03	0,92	
	0,05	0,03	0,74	
Gel t = 30	0,03	0,02	0,57	0,50 ± 0,13
	0,03	0,02	0,57	
	0,03	0,02	0,35	
Gel t = 60	0,05	0,04	0,17	0,20 ± 0,03
	0,04	0,04	0,22	
	0,05	0,04	0,22	
Gel t = 90	0,05	0,04	0,17	0,16 ± 0,03
	0,04	0,04	0,13	
	0,05	0,04	0,17	

Estadística feita somente com o gel, não havendo diferenças significativas entre os 3 tempos

5.3.3 Análise da viscosidade do gel de *Psidium guajava* L. durante o teste de estabilidade acelerada

Tabela 4 - Viscosidade do gel de *Psidium guajava* L., medido no viscosímetro ViscoStar (R) com agulha (spindle) TR 11 e velocidade de agitação 200 rpm.

Amostras	Nº de pontos	média ± desvio padrão
Gel t = 0	03	2933,30 ± 115,47
Gel t = 30	03	3600,00 ± 0,00 ***
Gel t = 60	03	3766,70 ± 115,75 ***
Gel t = 90	03	4300,00 ± 100,00 ***

(***) muito significativo, comparado ao t=0

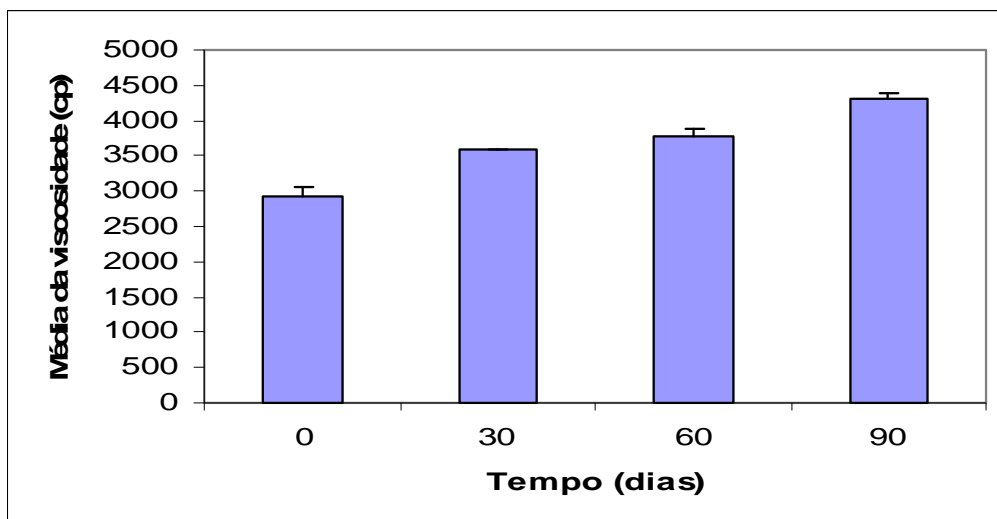


Figura 4 - Variação da viscosidade durante o teste de estabilidade acelerada do gel de *Psidium guajava* L.

5.3.4 Resultados da avaliação do gel de *Psidium guajava* L. submetido à temperatura de 40 ± 2 °C e umidade relativa (UR) de $75 \pm 5\%$ em câmara climática

Tabela 5 - Resultados da avaliação do gel de *Psidium guajava* L. submetido à temperatura de 40 ± 2 °C e umidade relativa (UR) de $75 \pm 5\%$ em câmara climática.

Características avaliadas	0 dia	30 dias	60 dias	90 dias
Aspecto	GC	GC	GC	GC
Cor	M	M	M	M
Odor	C	C	C	C
pH	5,50	5,50	5,50	$5,30 \pm 0,3$
Centrifugação	SSF	SSF	SSF	SSF
Viscosidade (cp)	$2933,30 \pm 115,50$	3600,00	$3766,70 \pm 115,70$	$4300,00 \pm 100,00$
Teor flavonóides totais (%)	$0,16 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$
Teor taninos totais (%)	$0,79 \pm 0,12$	$0,50 \pm 0,13$	$0,20 \pm 0,03\%$	$0,16 \pm 0,02$

GC=gel creme; M=marrom; C=característico; SSF=sem separação de fases; cp=centipoise
Testes realizados em triplicatas.

5.3.5 Perfil cromatográfico

A) Polifenóis

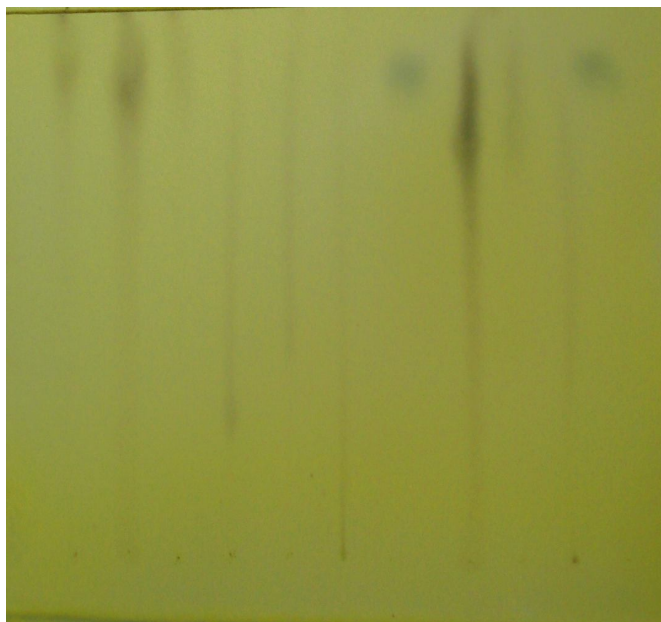
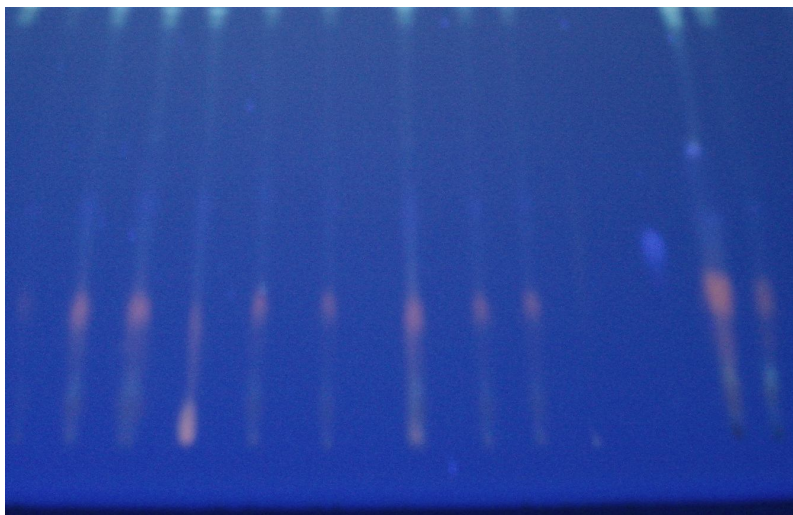


Figura 5 - Cromatografia de camada delgada de *Psidium guajava* L., fase móvel: ácido acético glacial: água: ácido clorídrico: metanol (45:15:4,5:19,3); suporte: celulose sobre placa de vidro; revelador: cloreto férrico 5 % em metanol; percurso de 10 cm; 1- Folha *Psidium guajava* L. extraída com álcool (7 toques capilares); 2- Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. (7 toques capilares); 3- Gel de *Psidium guajava* L. T = 0 dia (25 toques capilares); 4- Gel de *Psidium guajava* L. T = 30 dias (25 toques capilares); 5- Gel de *Psidium guajava* L. T = 60 dias (25 toques capilares); 6- Gel de *Psidium guajava* L. T = 90 dias (25 toques capilares); 7- Padrão ácido gálico 1mg/mL metanol (2 toques capilares); 8- Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. (9 toques capilares); 9- Gel de *Psidium guajava* L. T = 0 dia (30 toques capilares); 10- Gel de *Psidium guajava* L. T = 0 dia (25 toques capilares); 11- Padrão ácido gálico 1mg/mL metanol (2 toques capilares)

B) Flavonóides



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
Figura 6 - Cromatografia de camada delgada de *Psidium guajava* L.; fase móvel: clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (60:32:12:8); suporte: sílica gel 60 F₂₅₄ nm sobre placa de vidro; revelador: NP – “Natural products reagent” – difenilboriloxietilamina a 1% em metanol; percurso de 10 cm; 1- Gel de *Psidium guajava* L. T = 0 dias (20 toques capilares); 2- Gel de *Psidium guajava* L. T = 30 dias (20 toques capilares); 3- Gel de *Psidium guajava* L. T = 60 dias (20 toques capilares); 4-5-6 (triplicata) Gel de *Psidium guajava* L. T = 90 dias (20 toques capilares); 7- Gel de *Psidium guajava* L. T = 90 dias (25 toques capilares); 8-9(duplicata) Gel de *Psidium guajava* L. T = 90 dias (25 toques capilares); 10- Padrão quercetina (2 toques capilares); 11- Padrão ácido gálico (2 toques capilares); 12- Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. (5 toques capilares); 13- Folha *Psidium guajava* L. extraída com álcool (5 toques capilares)

5.3.6 Contagem microbiana

Tabela 6 - Contagem microbiana do gel do extrato glicólico de *Psidium guajava* L.

Gel (dias)	Bactérias (UFC)	Fungos e leveduras (UFC)
1	Ausente	Ausente
30	Ausente	Ausente
60	Ausente	Ausente
90	Ausente	Ausente

UFC = unidade formadora de colônia

5.4 Teste de cicatrização

5.4.1 Avaliação macroscópica

Tabela 7 - Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e 24 horas de tratamento com solução fisiológica, Dersani®, extrato glicólico de *Psidium guajava* L. e gel do extrato glicólico de *Psidium guajava* L.

Amostras	Nº de amostras	média (mm ²) ± desvio padrão
Solução fisiológica (controle negativo)	12	35,11 ± 6,38
Dersani® (controle positivo)	12	44,38 ± 5,95 **
Extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.	12	34,12 ± 7,42
Gel do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.	12	39,30 ± 5,15

(**) = muito significativo comparado ao controle negativo

Tabela 8 - Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e 48 horas de tratamento com solução fisiológica, Dersani®, extrato glicólico de *Psidium guajava* L. e gel do extrato glicólico de *Psidium guajava* L.

Amostras	Nº de amostras	média (mm ²) ± desvio padrão
Solução fisiológica (controle negativo)	10	27,08 ± 5,36
Dersani® (controle positivo)	10	38,84 ± 6,67 **
Extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.	10	32,75 ± 6,31
Gel do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.	10	31,97 ± 7,64

(**) = muito significativo comparado em relação ao controle negativo.

Tabela 9 - Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e 72 horas de tratamento com solução fisiológica, Dersani®, extrato glicólico de *Psidium guajava* L. e gel do extrato glicólico de *Psidium guajava* L.

Amostras	Nº de amostras	média (mm ²) ± desvio padrão
Solução fisiológica (controle negativo)	07	23,71 ± 3,98
Dersani® (controle positivo)	07	29,32 ± 6,66
Extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.	07	32,39 ± 5,16 *
Gel do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.	07	24,95 ± 4,04

(*)= significativo comparado em relação ao controle negativo.

Tabela 10 - Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e 7 dias de tratamento com solução fisiológica, Dersani®, extrato glicólico de *Psidium guajava* L. e gel do extrato glicólico de *Psidium guajava* L.

Amostras	Nº de amostras	média (mm ²) ± desvio padrão
Solução fisiológica (controle negativo)	04	7,53 ± 1,65
Dersani® (controle positivo)	04	8,36 ± 2,52
Extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.	04	7,66 ± 2,64
Gel do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.	04	7,92 ± 1,25

Estatística não significativa comparado em relação ao controle negativo.

Tabela 11 - Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e 14 dias de tratamento com solução fisiológica, Dersani®, extrato glicólico de *Psidium guajava* L. e gel do extrato glicólico de *Psidium guajava* L.

Amostras	Nº de amostras	média (mm ²) ± desvio padrão
Solução fisiológica (controle negativo)	03	2,15 ± 0,87
Dersani® (controle positivo)	03	2,50 ± 0,86
Extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.	03	1,69 ± 0,95
Gel do extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L.	03	3,25 ± 1,50

Estatística não significativa comparado em relação ao controle negativo.

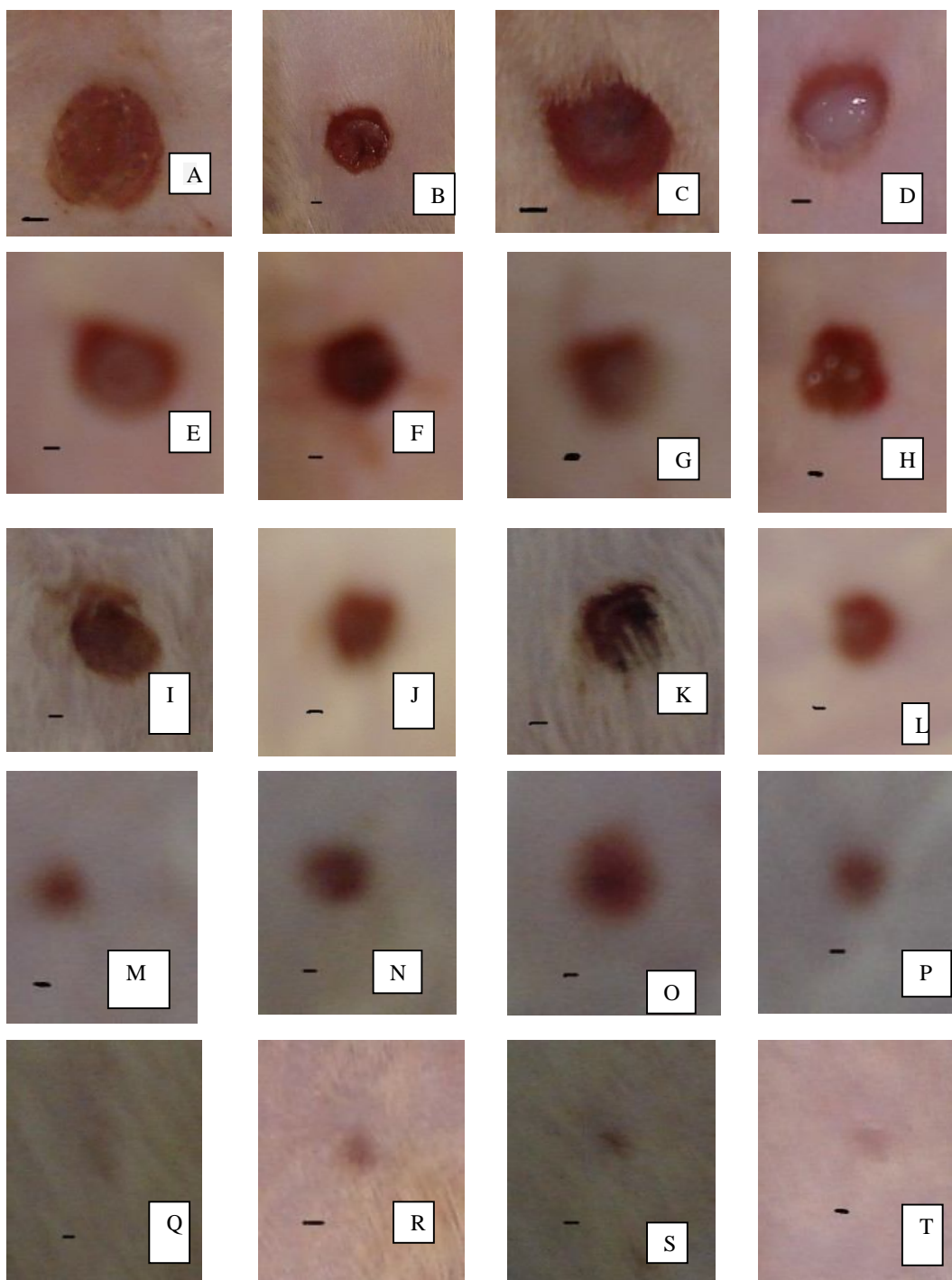


Figura 7 - Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e tratamento. A, E, I, M, Q. Tamanho da lesão após tratamento com Dersani® durante 24 hs., 48 hs., 72 hs., 7 dias e 14 dias respectivamente. B, F, J, N, R. Tamanho da lesão após tratamento com Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. durante 24 hs., 48 hs., 72 hs., 7 dias e 14 dias respectivamente. C, G, K, O, S. Tamanho da lesão após tratamento com gel de *Psidium guajava* L. durante 24 hs., 48 hs., 72 hs., 7 dias e 14 dias respectivamente. D, H, L, P, T. Tamanho da lesão após tratamento com solução fisiológica durante 24 hs., 48 hs., 72 hs., 7 dias e 14 dias respectivamente. Escala 1,0 mm.

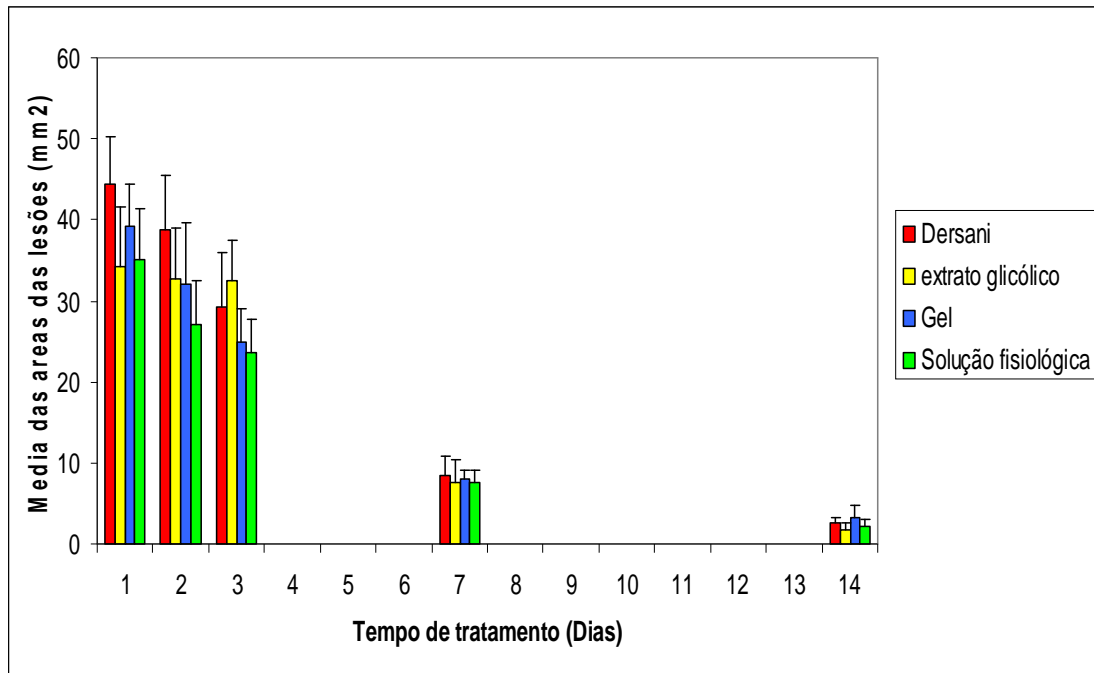


Figura 8 - Efeito da administração tópica do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. na cicatrização de lesões em ratos

5.4.2 Avaliação histológica

Tabela 12 -. Avaliação histológica comparativa do efeito cicatrizante do extrato glicólico e gel de *Psidium guajava* L., em feridas cutâneas em ratos – Aspecto qualitativo

Morte	Sol.fisiológica ou Controle	Dersani®	Extrato de glicólico <i>Psidium guajava</i> L.	Gel de <i>Psidium guajava</i> L.
24h/1d	<ul style="list-style-type: none"> ▪ edema + ▪ infiltrado inflamatório mononuclear ++ ▪ proliferação vascular – ▪ necrose + (Fig. 9A) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ edema ++ ▪ infiltrado inflamatório mononuclear + ▪ proliferação vascular – ▪ necrose + (Fig. 9B) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ edema ++ ▪ infiltrado inflamatório mononuclear +++ ▪ proliferação vascular – ▪ necrose + (Fig. 9C) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ edema ++ ▪ infiltrado inflamatório mononuclear +++ ▪ proliferação vascular – ▪ necrose - (Fig. 9D)
48h/2d	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↑ edema ++ ▪ ↑ infiltrado inflamatório mononuclear +++ ▪ proliferação vascular + ▪ necrose + (Fig. 10A) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↑ edema +++ ▪ infiltrado inflamatório mononuclear + ▪ proliferação vascular- ▪ ↑ necrose ++ (Fig. 10B) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ edema ++ ▪ infiltrado inflamatório mononuclear +++ ▪ proliferação vascular + ▪ necrose + ▪ áreas de cicatrização + (Fig. 10C) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ edema ++ ▪ ↓ infiltrado inflamatório mononuclear ++ ▪ infiltrado inflamatório polimorfonuclear + ▪ proliferação vascular+ ▪ necrose + ▪ áreas de cicatrização + (Fig. 10D)
72h/3d	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↓ edema – ▪ ↓ infiltrado mononuclear++ ▪ infiltrado inflamatório polimorfonuclear + ▪ proliferação vascular + ▪ ↑ necrose ++ (Fig. 11 A) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↓ edema ++ ▪ infiltrado inflamatório mononuclear ++ ▪ proliferação vascular+ ▪ ↑ necrose +++ (Fig. 11B) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↓ edema + ▪ ↓ infiltrado mononuclear++ ▪ infiltrado inflamatório polimorfonuclear + ▪ ↑ proliferação vascular++ ▪ necrose + ▪ áreas de cicatrização c/ fibras ++ (Fig. 11C) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↓ edema + ▪ ↓ infiltrado mononuclear + ▪ infiltrado inflamatório polimorfonuclear ++ ▪ ↑ proliferação vascular++ ▪ ↓ necrose ▪ áreas de cicatrização c/fibras ++ (Fig. 11D)
7 d	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↓ edema + ▪ ↓ infiltrado mononuclear + ▪ proliferação vascular ++ ▪ ↓ necrose + ▪ áreas de cicatrização ++ (Fig. 12A) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↓ edema + ▪ infiltrado inflamatório polimorfonuclear + ▪ proliferação vascular + ▪ ↓ necrose ++ ▪ áreas de cicatrização + (Fig. 12B) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↓ edema - ▪ ↓ infiltrado mononuclear+ ▪ infiltrado inflamatório polimorfonuclear + ▪ proliferação vascular ++ ▪ necrose + ▪ ↑ áreas de cicatrização c/ fibras +++(Fig. 12C) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ infiltrado inflamatório mononuclear + ▪ ↓ infiltrado inflamatório polimorfonuclear + ▪ proliferação vascular ++ ▪ muitas áreas c/ cicatrização (Fig. 12D) <p style="text-align: right;">continua</p>

Continuação

Morte	Sol. Fisiológica ou Controle	Dersani [®]	Extrato de glicólico <i>Psidium guajava</i> L.	Gel de <i>Psidium guajava</i> L.
14 d	<ul style="list-style-type: none"> ▪ infiltrado inflamatório mononuclear + ▪ proliferação vascular ++ ▪ necrose - ▪ consolidação cicatricial em algumas áreas do corte histológico (Fig. 13A) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ presença de resposta inflamatória crônica + ▪ necrose ++ ▪ áreas de cicatrização ++ ▪ proliferação vascular + ▪ consolidação cicatricial em algumas áreas do corte histológico (Fig. 13B) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ infiltrado inflamatório mononuclear - ▪ infiltrado inflamatório polimorfonuclear - ▪ proliferação vascular ++ ▪ consolidação cicatricial em todo corte histológico (Fig. 13C) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ infiltrado inflamatório mononuclear - ▪ infiltrado inflamatório polimorfonuclear - ▪ proliferação vascular ++ ▪ consolidação cicatricial em todo corte histológico (Fig. 13D)

- Infiltrado inflamatório mononuclear:
 - (ausente → não evidente no corte histológico)
 - + (discreta → evidenciado de forma isolada)
 - ++ (moderada → maior freqüência de evidenciação, porém c/ áreas livres de infiltrado)
 - +++ (acentuada → células evidenciadas c/ grande freqüência, sem áreas livres de infiltrado)
- Infiltrado inflamatório polimorfonuclear:
 - (ausente → não evidente no corte histológico)
 - + (discreta → evidenciado de forma isolada)
 - ++ (moderada → maior freqüência de evidenciação, porém c/ áreas livres de infiltrado)
 - +++ (acentuada → céls evidenciadas c/ grande freqüência, sem áreas livres de infiltrado)
- Proliferação vascular:
 - (ausente → não evidente no corte histológico)
 - + (discreta → evidência de poucos vasos esparsamente isolados)
 - ++ (moderada → maior freqüência de evidenciação e dispersos no corte histológico)
 - +++ (acentuada → evidenciados c/ grande freqüência, em todo o corte histológico)

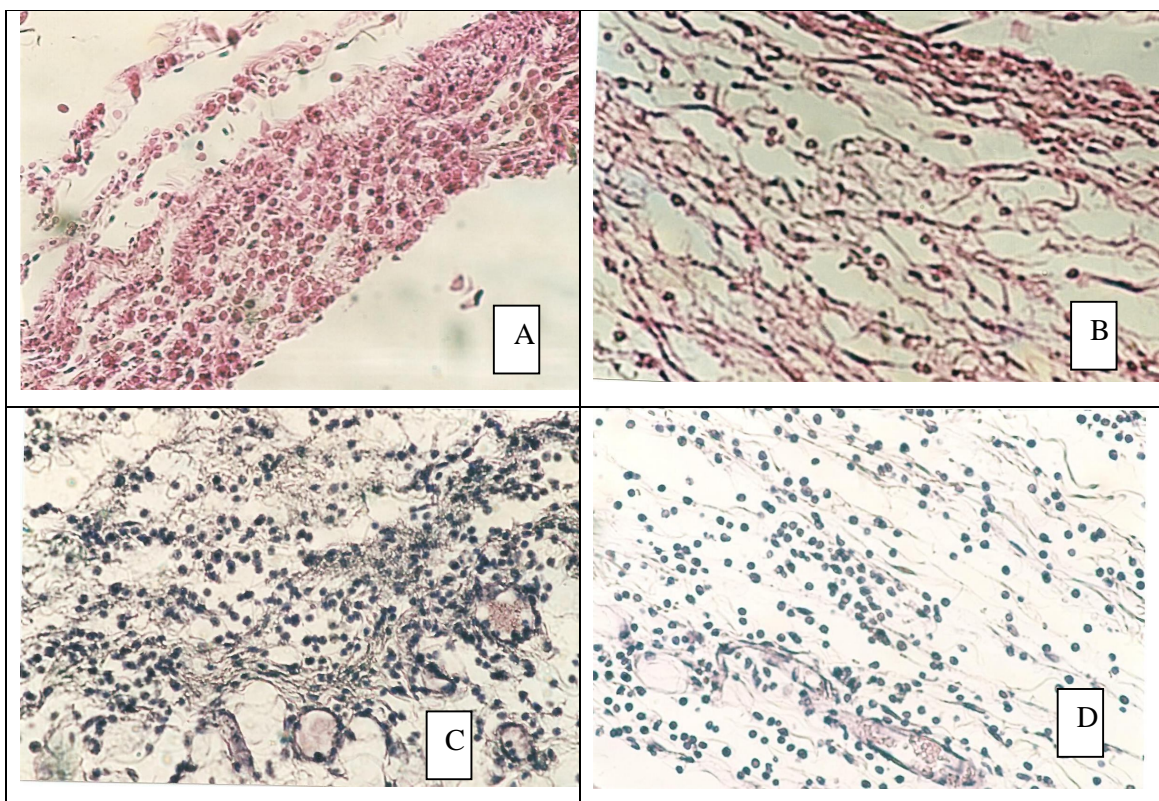


Figura 9 - Efeito cicatrizante da lesão em ratos, após incisão dorsal e 24 horas de tratamento com A. Solução fisiológica. B. Dersani®. C. Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. e D. Gel de *Psidium guajava* L.

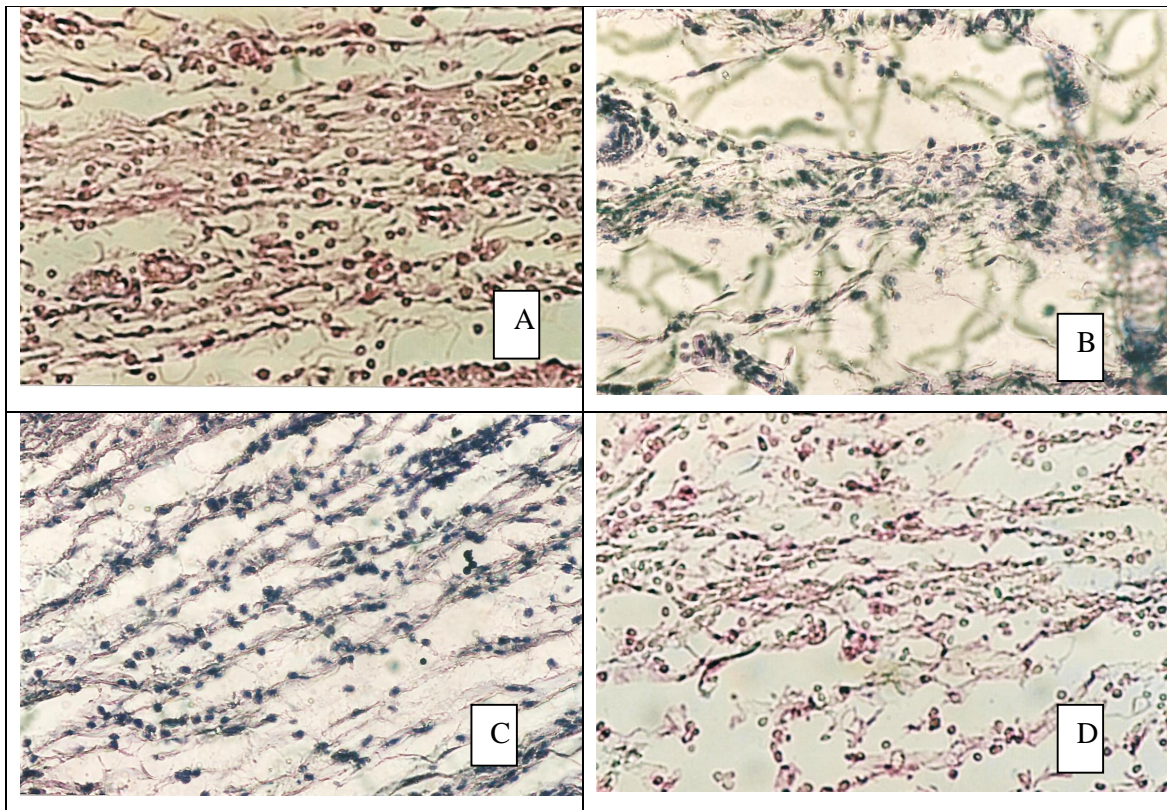


Figura 10 - Efeito cicatrizante da lesão em ratos, após incisão dorsal e 48 horas de tratamento com A. Solução fisiológica. B. Dersani®. C. Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. e D. Gel de *Psidium guajava* L.

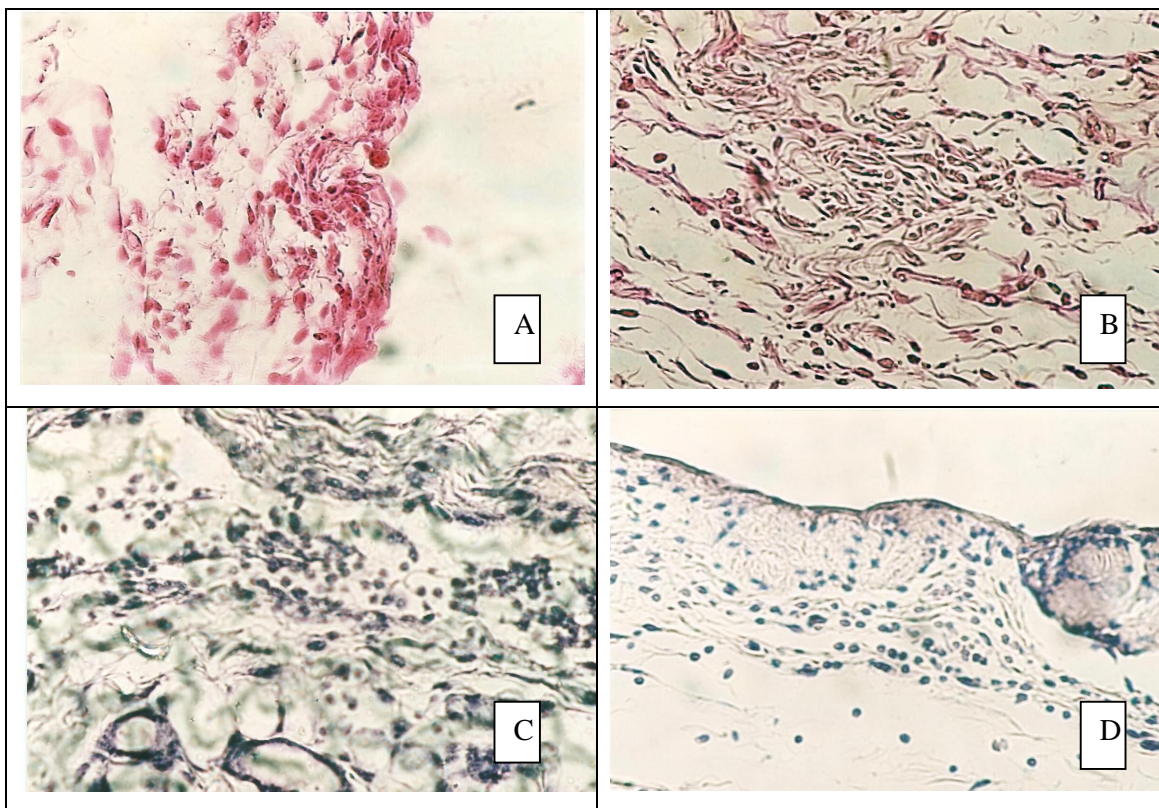


Figura 11 - Efeito cicatrizante da lesão em ratos, após incisão dorsal e 72 horas de tratamento com A. Solução fisiológica. B. Dersani®. C. Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. e D. Gel de *Psidium guajava* L.

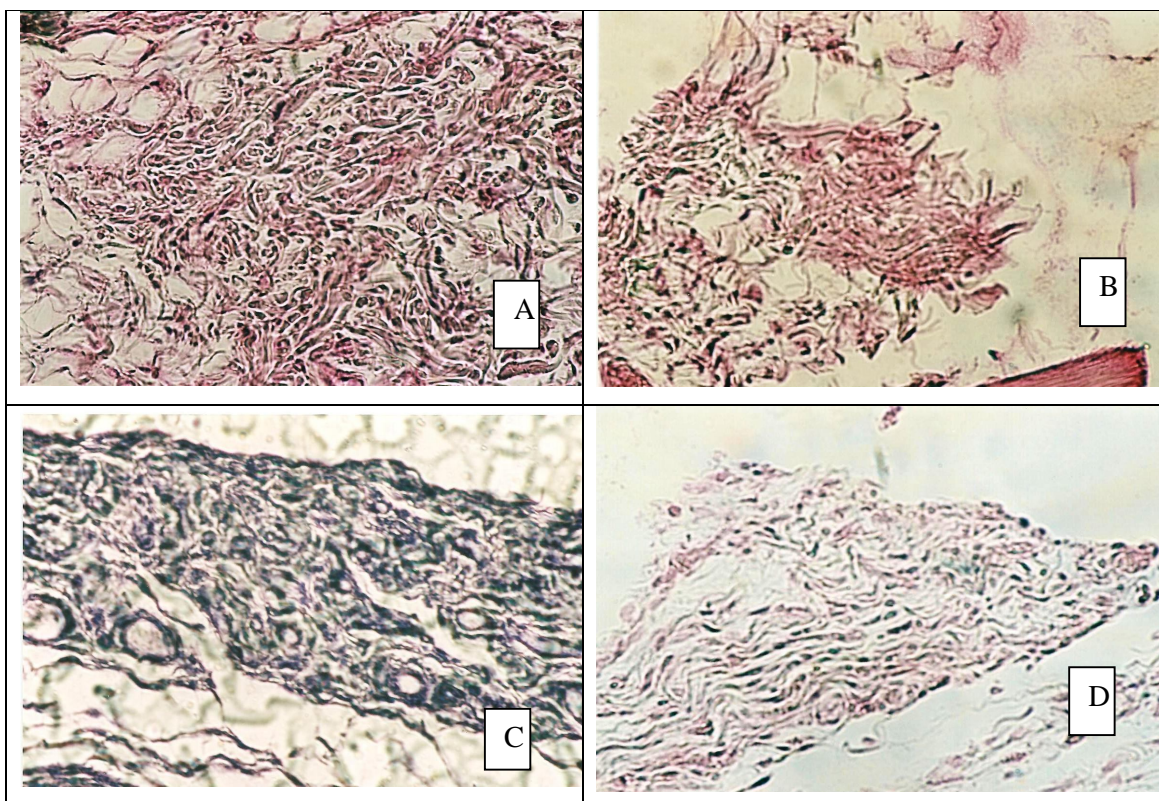


Figura 12 - Efeito cicatrizante da lesão em ratos, após incisão dorsal e 7 dias de tratamento com A. Solução fisiológica. B. Dersani®. C. Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. e D. Gel de *Psidium guajava* L.

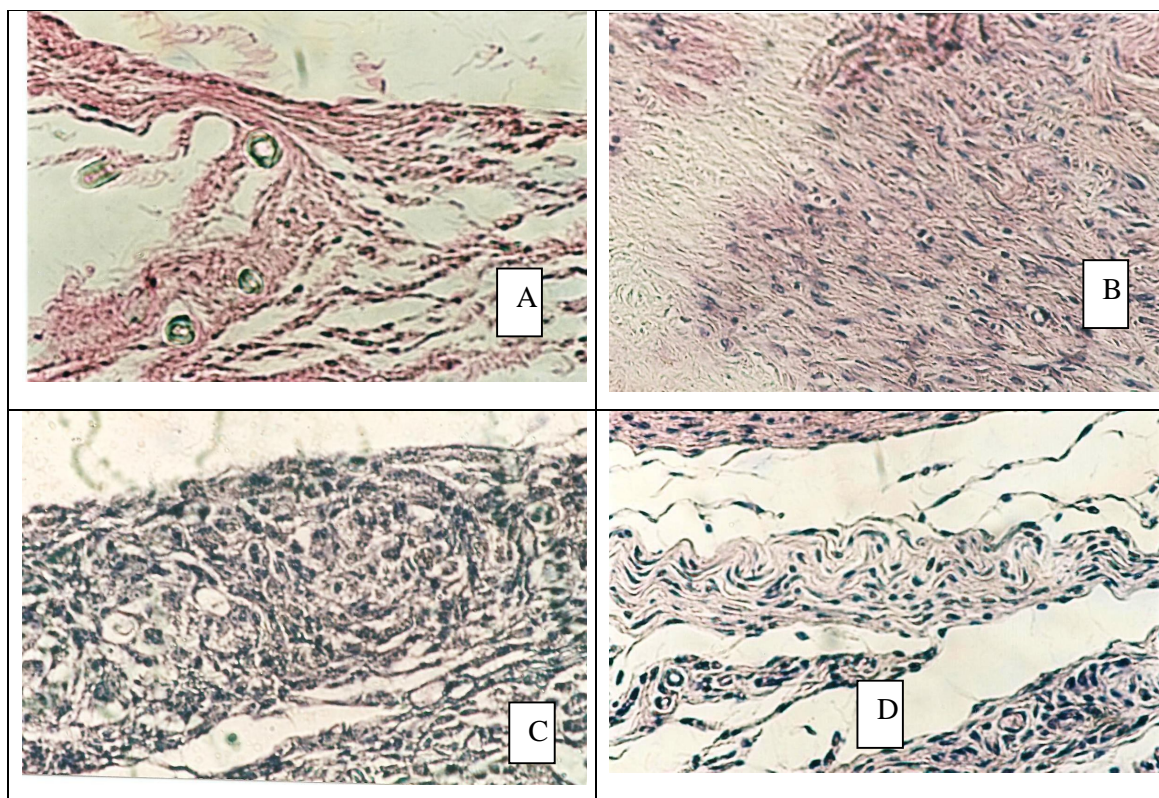


Figura 13 - Efeito cicatrizante da lesão em ratos, após incisão dorsal e 14 dias de tratamento com A. Solução fisiológica. B. Dersani®. C. Extrato glicólico de *Psidium guajava* L. e D. Gel de *Psidium guajava* L.

5.5 Atividade antimicrobiana

5.5.1 Método microdiluição (ELISA)

Tabela 13 - Porcentagem de inibição do micro-organismo *E. coli* (10^4 UFC/mL), frente ao extrato e ao gel de *Psidium guajava* L., através do método de microdiluição.

Amostras	% de inibição \pm Desvio padrão
Cloranfenicol (1 mg/mL)	102,32 \pm 2,96
Gel (200 mg/mL)	11,92 \pm 5,81
Gel (500 mg/mL)	0,00 \pm 8,38
Extrato glicólico (200 μ L/mL)	20,17 \pm 3,58
Extrato glicólico (500 μ L/mL)	28,87 \pm 6,75
Solvente do extrato glicólico (200 μ L/mL)	3,26 \pm 8,21
solvente do extrato glicólico (500 μ L/mL)	5,60 \pm 7,63
Base do gel (200 mg/mL)	6,24 \pm 14,30
DMSO:MeOH (1:1)	0,00 \pm 1,44

Tabela 14 - Porcentagem de inibição do micro-organismo *P.aeruginosa* (10^4 UFC/mL), frente ao extrato e ao gel de *Psidium guajava* L., através do método de microdiluição.

Amostras	% de inibição \pm Desvio padrão
Amicacina (1 mg/mL)	100,00 \pm 3,34
Gel (200 mg/mL)	50,37 \pm 6,46
Gel (500 mg/mL)	49,38 \pm 8,35
Extrato glicólico (200 μ L/mL)	8,32 \pm 6,85
Extrato glicólico (500 μ L/mL)	55,81 \pm 2,47
Solvente do extrato glicólico (200 μ L/mL)	24,12 \pm 5,55
solvente do extrato glicólico (500 μ L/mL)	38,67 \pm 2,47
Base do gel (200 mg/mL)	32,56 \pm 1,95
DMSO:MeOH (1:1)	16,48 \pm 2,75

Tabela 15 - Porcentagem de inibição do micro-organismo *S.aureus* (10^4 UFC/mL), frente ao extrato e ao gel de *Psidium guajava* L., através do método de microdiluição.

Amostras	% de inibição \pm Desvio padrão
Cloranfenicol (1 mg/mL)	100,00 \pm 2,91
Gel (200 mg/mL)	37,12 \pm 2,33
Gel (500 mg/mL)	50,97 \pm 5,00
Extrato glicólico (200 μ L/mL)	0,00 \pm 17,36
Extrato glicólico (500 μ L/mL)	51,16 \pm 3,50
Solvente do extrato glicólico (200 μ L/mL)	5,91 \pm 5,78
Base do gel (200 mg/mL)	15,03 1,95
DMSO:MeOH (1:1)	0,00 4,10

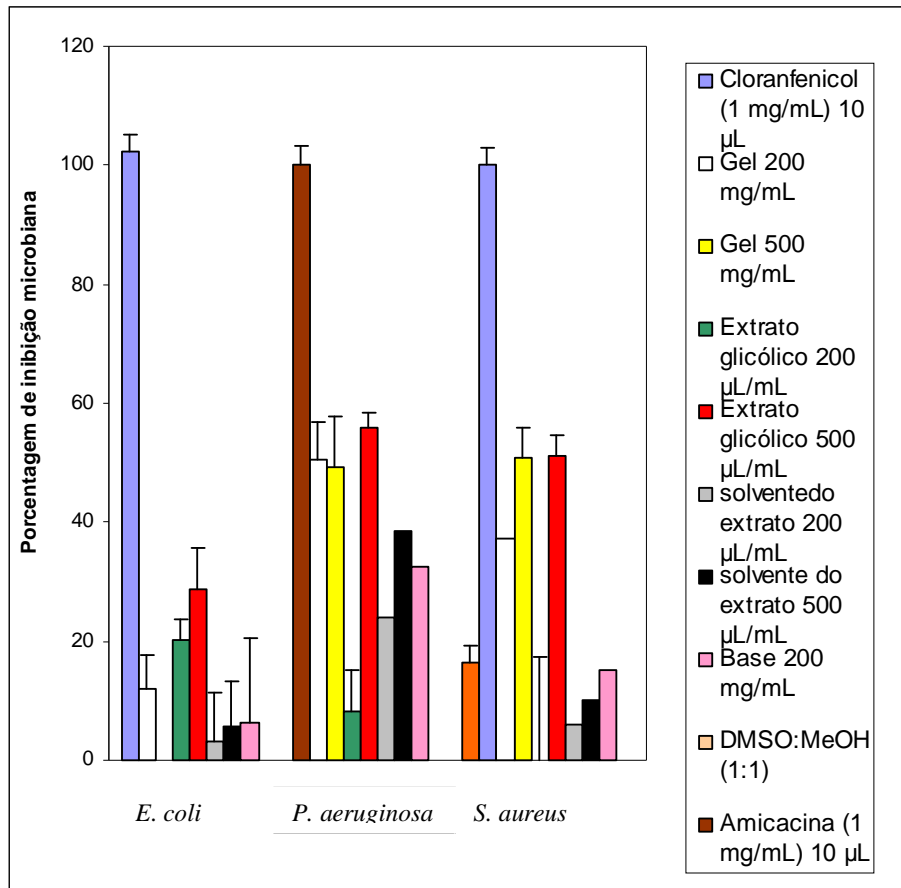


Figura 14 - Porcentagem de inibição microbiana do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. através do método de microdiluição.

Tabela 16 - Porcentagem de inibição do micro-organismo *C. albicans* (10^4 UFC/mL), frente ao extrato e ao gel de *Psidium guajava* L., através do método de microdiluição.

Amostras	% de inibição \pm Desvio padrão
Nistatina (1 mg/mL) 10 μ L	95,83 \pm 2,52
Gel (200 mg/mL)	0,00 \pm 11,96
Gel (500 mg/mL)	0,00 \pm 7,40
Extrato glicólico (200 μ L/mL)	0,00 \pm 5,60
Extrato glicólico (500 μ L/mL)	0,00 \pm 4,50
Solvente do extrato glicólico (200 μ L/mL)	23,43 \pm 17,33
Base do gel (200 mg/mL)	0,00 \pm 15,42
DMSO:MeOH (1:1)	2,83 \pm 5,88

5.5.2 Método Difusão em placas

5.5.2.1 Técnica “templates”

Tabela 17 - Medida do halo de inibição (mm) das amostras de *Psidium guajava* L. (50 µL) frente ao micro-organismo *E. coli* (10⁴UFC/mL), inoculado em “templates”.

Amostras	Nº de amostras	Média (mm) ± Desvio padrão
Gel (200 mg/mL)	03	7,04 ± 0,06
Gel (500 mg/mL)	03	7,07 ± 0,12
Extrato glicólico (200 µL/mL)	03	7,04 ± 0,06
Extrato glicólico (500 µL/mL)	03	7,00 ± 0,00
Base do gel (200 mg/mL)	03	7,00 ± 0,00
Cloranfenicol (1mg/mL)	03	22,00 ± 0,00***

(***) = muito significativo comparado em relação ao solvente do extrato.

Tabela 18 - Medida do halo de inibição (mm) das amostras de *Psidium guajava* L. (50 µL) frente ao micro-organismo *P. aeruginosa* (10⁴UFC/mL), inoculado em “templates”

Amostras	Nº de amostras	Média (mm) ± Desvio padrão
Solvente do extrato (500 µL/mL)	03	7,00 ± 0,00
Gel (200 mg/mL)	03	7,00 ± 0,00
Gel (500 mg/mL)	03	7,00 ± 0,00
Extrato glicólico (200 µL/mL)	03	10,00 ± 3,61
Extrato glicólico (500 µL/mL)	03	9,34 ± 2,08
Base do gel (200mg/mL)	03	7,00 ± 0,00
Amicacina (1mg/mL)	03	24,00 ± 0,00***

(***) = muito significativo comparado em relação ao solvente do extrato.

Tabela 19 - Medida do halo de inibição (mm) das amostras de *Psidium guajava* L. (50 μ L) frente ao micro-organismo *S. aureus* (10^4 UFC/mL), inoculado em “templates”

Amostras	Nº de amostras	Média (mm) \pm Desvio padrão
Solvente do extrato (500 μ L/mL)	03	7,00 \pm 0,00
Gel (200 mg/mL)	03	7,50 \pm 0,50
Gel (500 mg/mL)	03	7,50 \pm 0,50
Extrato glicólico (200 μ L/mL)	03	10,00 \pm 0,00***
Extrato glicólico (500 μ L/mL)	03	12,00 \pm 0,00***
Base do gel (200mg/mL)	03	7,00 \pm 0,00
Cloranfenicol (1mg/mL)	03	22,00 \pm 0,00***

(***) = muito significativo comparado em relação ao solvente do extrato.

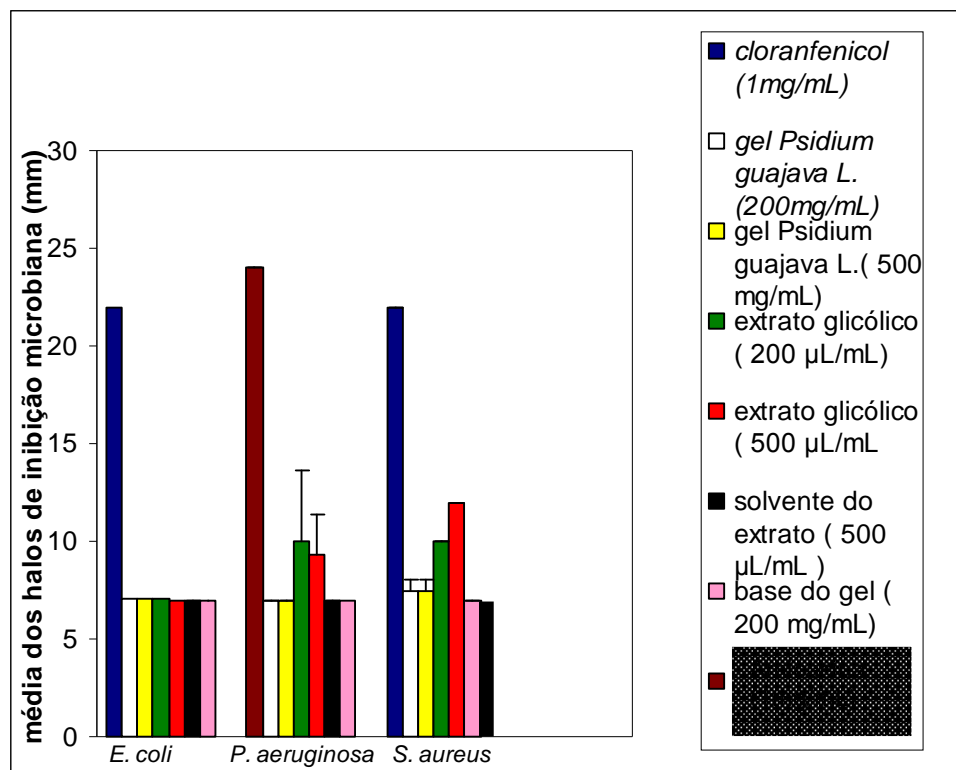


Figura 15 - Efeito da atividade antimicrobiana do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*, através do método de difusão em “templates”

5.5.2.2 Técnica em discos

Tabela 20 - Medida do halo de inibição (mm) das amostras de *Psidium guajava* L. frente ao micro-organismo *S. aureus* (10^4 UFC/mL), em discos de papel de filtro

Amostras	Média dos halos (mm) \pm Desvio padrão
Gel <i>Psidium guajava</i> L. 200mg/mL (5 μ L)	0,00 \pm 0,00
Gel <i>Psidium guajava</i> L. 200mg/mL (10 μ L)	0,00 \pm 0,00
Gel <i>Psidium guajava</i> L. 500 mg/mL(5 μ L)	0,00 \pm 0,00
Gel <i>Psidium guajava</i> L. 500 mg/mL(10 μ L)	0,00 \pm 0,00
extrato glicólico 200 μ L/mL(5 μ L)	6,50 \pm 0,71 ***
extrato glicólico 200 μ L/mL(10 μ L)	9,00 \pm 1,41 ***
extrato glicólico 500 μ L/mL (5 μ L)	8,50 \pm 0,71 ***
extrato glicólico 500 μ L/mL (10 μ L)	10,50 \pm 0,71 ***
extrato glicólico puro (10 μ L)	16,67 \pm 1,53 ***
solvente do extrato 200 μ L/mL (5 μ L)	0,00 \pm 0,00
solvente do extrato 200 μ L/mL (10 μ L)	0,00 \pm 0,00
solvente do extrato 500 μ L/mL (5 μ L)	0,00 \pm 0,00
solvente do extrato 500 μ L/mL (10 μ L)	0,00 \pm 0,00
solvente do extrato puro (10 μ L)	0,00 \pm 0,00
base do gel 200 mg/mL (5 μ L)	0,00 \pm 0,00
base do gel 200 mg/mL (10 μ L)	0,00 \pm 0,00
DMSO/MeOH (5 μ L)	0,00 \pm 0,00
DMSO/MeOH (10 μ L)	0,00 \pm 0,00
Cefoxitina (halo menor)	17,3 \pm 1,35***
Cefoxitina (halo maior)	37,79 \pm 1,55***
Bacitracina	24,33 \pm 1,86***

(***) = muito significativo comparado em relação gel *Psidium guajava* L. 200mg/mL

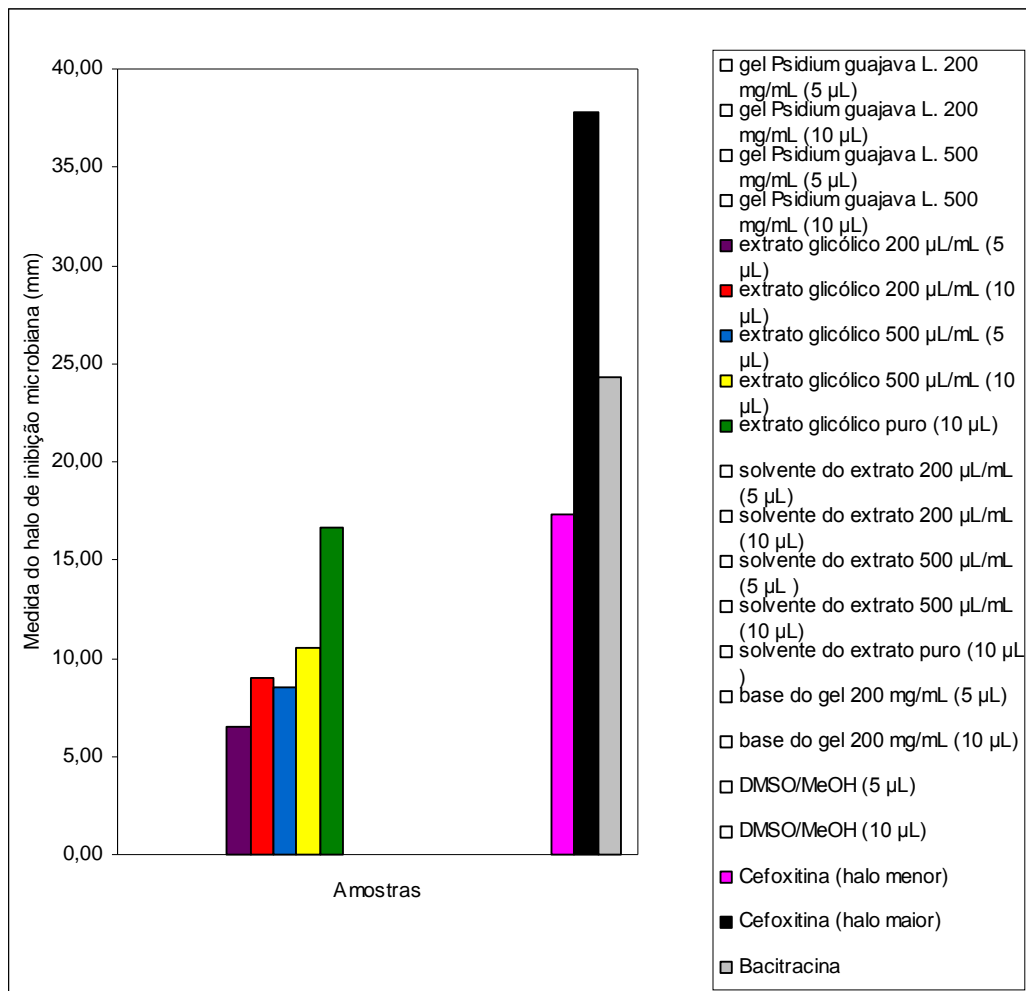


Figura 16 - Efeito da atividade antimicrobiana do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. frente a *S. aureus*, através do método de difusão em disco.

O extrato glicólico e o gel de *Psidium guajava* L. não apresentaram halo de inibição frente a *P. aeruginosa* (10^4 UFC/mL), através do método de difusão em disco.

5.5.3 Método de macrodiluição (diluição em tubos)

Tabela 21 - Verificação da turbidez dos tubos (crescimento microbiano) do extrato e gel de *Psidium guajava* L. frente a *P.aeruginosa* (10^4 UFC/mL), *S. aureus* (10^4 UFC/mL), *C. albicans*(10^2 UFC/mL)

Amostra	<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	(1 ^o , 2 ^o , 3 ^o tubo)		(1 ^o , 2 ^o , 3 ^o tubo)		(1 ^o , 2 ^o , 3 ^o tubo)	
Solução fisiológica	+++		+++		+++	
Base do gel	+++		+++		+++	
Gel 200 mg/mL	+++		+++		+++	
Solvente do extrato glicólico	+++		+++		+++	
Extrato glicólico (200 µL/mL)	+++	(^a +++)	+++	(^a +++)	+++	(^a +++)
Extrato glicólico (500 µL/mL)	+++	(^a +++)	+++	(^a +-)	+++	(^a +++)

(+) = presença de turvação; (^a) = após subcultura; (-) ausência de turvação

CAPÍTULO 6

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nas análises das folhas de *Psidium guajava* L. foram confirmadas as presenças de tricomas tectores simples e a nervura central com feixe vascular bicolateral, comuns na família (METCALFE; CHALK, 1950). A ocorrência dos tricomas apenas na face abaxial, observada neste trabalho, foi coincidente à descrita na Farmacopéia Brasileira IV, porém difere da descrição de Duarte e Paula (2005), que indica a presença destes em ambas as superfícies foliares. As cavidades secretoras encontradas nas proximidades da epiderme (METCALFE; CHALK, 1950) foram adicionalmente observadas afastadas da epiderme neste trabalho, corroborando com os estudos da Farmacopéia Brasileira (2002), Rivera-Arce, Gattuso e Lozoya (2003), Duarte e Paula (2005).

A região subepidérmica aclorofilada não foi estudada sob o aspecto ontogenético neste trabalho. Essa mesma região também foi denominada de camada subepidérmica por Duarte e Paula (2005), enquanto Metcalfe e Chalk (1950) denominaram-na de hipoderme. A Farmacopéia Brasileira (2002) e Tantawy (2004) denominaram essa região de epiderme multisseriada, não mencionando o estudo de ontogênese.

Segundo Fahn (1990), folhas contendo parênquima paliçádico em ambas as faces da epiderme são denominadas de isolaterais ou isobilaterais, enquanto a folhas contendo parênquima paliçádico apenas em uma das faces e parênquima esponjoso em outra face recebem a denominação de dorsiventral ou bifacial. Assim, neste estudo foi verificada a presença de mesofilo dorsiventral ou bifacial, concordando com a Farmacopéia Brasileira (2002), Tantawy (2004), Duarte e Paula (2005), mas diferindo de Metcalfe e Chalk (1950), Rivera-Arce, Gattuso e Lozoya (2003), que denominaram-no de isolateral. Por outro lado, a presença de feixes vasculares bicolaterais em arco aberto na nervura mediana, encontrados neste trabalho, confere com a descrição relatada pela Farmacopéia Brasileira IV, Metcalfe e Chalk (1950), distinguindo-se da forma “praticamente de arco fechado” mencionada por Duarte e Paula (2005).

Foram observados estômatos paracíticos, anomocíticos e anisocíticos em suas folhas, conforme relatado por Rivera-Arce, Gattuso e Lozoya (2003), embora Metcalfe e Chalk (1950) relatem a presença de estômatos anomocíticos e mais

raramente de estômatos paracíticos em Myrtaceae; para *P. guajava* L. esses mesmos autores descrevem estômatos paracíticos, encontrados exclusivamente na superfície abaxial, assim como Duarte e Paula (2005). Nossos resultados diferem parcialmente da Farmacopéia Brasileira (2002) e Tantawy (2004), que verificaram a presença apenas de estômatos anomocíticos.

O pecíolo apresentou colênquima angular com várias formas de cristais e feixe vascular em arco aberto. Drusas, cristais prismáticos e areia cristalina de oxalato de cálcio foram observados tanto nesta região quanto na lâmina foliar. Na região floemática foram encontrados cristais prismáticos, cavidades secretoras e compostos fenólicos. Estes dados foram concordantes com Metcalfe e Chalk (1950), Farmacopéia Brasileira (2002), Rivera-Arce, Gattuso e Lozoya (2003) e Duarte e Paula (2005).

Através da triagem fitoquímica foi possível verificar a qualidade da parte utilizada (folha) para a produção do extrato glicólico de *Psidium guajava* L.; foram confirmadas as presenças de taninos, flavonóides, óleos essenciais e saponinas estando as características físico-químicas observadas de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2002). O teste de estabilidade acelerada permitiu observar que o gel de *Psidium guajava* L. não sofreu alteração quanto à cor, odor, aspecto, pH. Somente após 90 dias o pH reduziu de 5,5 para $5,3 \pm 0,3$ não afetando outras características. Não ocorreu separação de fases, indicando boa estabilidade física.

A variação da viscosidade do gel foi de 22,7%, 28,4% e 46,6%, após 30, 60 e 90 dias, respectivamente, sendo estatisticamente muito significativa, em relação ao gel inicial. Essas variações não alteraram as características organolépticas; mesmo assim a viscosidade deverá ser revista, caso haja a proposta da produção de um fitoterápico (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

O gel sofreu uma diminuição do teor de flavonóides totais de $0,16 \pm 0,02\%$ ($t=0$) para $0,13 \pm 0,01\%$ após 30 dias na câmara climática, teor que se manteve até mesmo após 90 dias. O teor de flavonóides totais da folha de *Psidium guajava* L. foi de $1,97 \pm 0,31\%$, e no extrato glicólico, de $1,23 \pm 0,15\%$. Essa redução foi devida provavelmente ao não esgotamento total do princípio ativo da droga vegetal durante a extração fracionada (percolação método C). A formulação, entretanto, pode ser considerada adequada, pois no gel verificou-se uma estabilidade destes constituintes, que são importantes para a ação anti-inflamatória e cicatrizante (SILVA et al, 2002; MILTERSTEINER et al., 2003). Referente ao teor de taninos totais do

gel, não houve uma redução significativa durante o tempo ensaiado, apesar de, aparentemente, ter ocorrido uma diminuição ($t_0 = 0,79 \pm 0,12\%$, $t_{30} = 0,50 \pm 0,13\%$, $t_{60} = 0,20 \pm 0,03\%$ e $t_{90} = 0,16 \pm 0,02\%$).

Referente ao perfil cromatográfico, se verifica que o de flavonóides se manteve, o que não pode ser observado no perfil cromatográfico de compostos fenólicos.

O teste de estabilidade do gel pôde ser completado com as análises microbiológicas. O gel apresentou-se isento de contaminação por bactérias, fungos e leveduras, assim como o extrato glicólico previamente analisado, podendo ser utilizado com maior segurança.

Referente à cicatrização, no primeiro dia não foram observadas variações significativas entre as médias das áreas das lesões tratadas com extrato glicólico ($34,12 \pm 7,42$) e com gel ($39,29 \pm 5,15$) em relação à solução fisiológica, demonstrando estatisticamente que nesta fase inicial foi indiferente usar o gel, o extrato glicólico ou a solução fisiológica.

No 2º dia de tratamento, os resultados permaneceram semelhantes.

Já no 3º dia foi observado somente resultado significativo ($P < 0,05$) das médias das áreas tratadas com extrato glicólico ($32,39 \pm 5,16$) em relação à solução fisiológica ($23,71 \pm 3,97$), sendo a ferida maior após tratamento com extrato glicólico.

No 7º dia de tratamento não ocorreu variação significativa ($P > 0,05$) quando comparados com o controle negativo, conforme verificado na tabela 11. Somente no 14º dia o extrato glicólico apresentou menor área da lesão, média de ($1,69 \pm 0,95 \text{ mm}^2$), mas estatisticamente não significativo ($P > 0,05$) em relação ao controle negativo.

Referente à avaliação do efeito da administração tópica do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. em ratos, para complementação da análise dos resultados foi considerado o primeiro dia como 100% de lesão para cada grupo, separadamente, conforme Tabela 23.

Tabela 22 - Porcentagem da lesão dos ratos tratados com solução fisiológica, Dersani®, extrato glicólico e gel de *Psidium guajava* L., considerando o primeiro dia como 100% de lesão para cada grupo.

Tempo de tratamento	solução fisiológica (controle negativo) (% da lesão)	Dersani® (controle positivo) (% da lesão)	Extrato glicólico de <i>Psidium guajava</i> L. (% da lesão)	Gel de <i>Psidium guajava</i> L. (% da lesão)
48 horas	77,13	87,52	95,98	81,35
72 horas	67,53	66,07	94,93	63,49
7 dias	21,45	18,84	22,45	20,15
14 dias	6,12	5,56	4,95	8,27

Esse cálculo foi realizado, pois se verificou que o tamanho inicial das feridas não era exatamente igual para todos os grupos, podendo esta variação causar pequena diferença nos resultados. Através dessa comparação, a porcentagem de diminuição da ferida foi próxima entre os grupos, apresentando o extrato glicólico aparentemente o melhor resultado.

O controle positivo Dersani® é uma loção à base de AGE (ácidos graxos essenciais) com vitaminas A e E, que revitaliza e mantém o equilíbrio hídrico da pele, melhorando sua elasticidade; possui uma fórmula rica em ácido linoleico, que auxilia na prevenção da formação de escaras e contribui para o restabelecimento da integridade da pele (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Neste teste, Dersani® parece apresentar melhor efeito cicatrizante a partir de 72 horas de tratamento e não sendo tão eficaz nas 48 horas iniciais de tratamento.

O processo de cicatrização das lesões é complexo (BLANES. In: Baptista-Silva, 2004), envolve uma resposta inflamatória aguda, manifestada por edema e formação de exsudato seroso, migração das células epidérmicas para a ferida, ocluindo a sua superfície. Do ponto de vista morfológico, o processo de cicatrização de feridas consiste de três fases consecutivas: a) fase inflamatória – inicialmente vasoconstrição reflexa com fechamento dos vasos lesados, seguida por vasodilatação com formação de exsudato, sendo os neutrófilos importantes nesta fase por digerir bactérias e tecidos desvitalizados e os monócitos transformados em macrófagos auxiliam na fagocitose de bactérias e restos celulares; b) fase de fibroplasia ou proliferativa - ocorrem reparação do tecido conjuntivo (formação do tecido de granulação, com proliferação endotelial e fibroblastos) e do epitélio; c) fase de maturação – ocorrem deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e

regressão endotelial (ABLA. In: Ferreira, 1995; SABISTON; DAVID; LYERLY, 1996; GARROS et al., 2006).

Após a análise histológica tivemos uma visão mais ampla de como ocorreu efetivamente a cicatrização durante os diferentes tempos de tratamento.

1- Qualitativamente pode ser considerada a presença de efeito cicatrizante nos grupos tratados com gel e extrato glicólico de *Psidium guajava* L., devido às seguintes observações:

- a) proliferação vascular aumentada a partir do 3d/72h após o tratamento, enquanto que nos demais grupos só foi visualizada após esse tempo.
- b) presença de aumento de infiltrado inflamatório mononuclear precocemente: 1d/24h.
- c) presença de infiltrado inflamatório com polimorfonucleares nos grupos controle (solução fisiológica) e extrato glicólico a partir do 3d/72h após tratamento. No grupo com gel a visualização foi mais precoce, 2d/48h, enquanto no grupo tratado com Dersani[®] estas células somente foram observadas após 3d/72h.
- d) aparecimento precoce de necrose (1d/24h) nos grupos controle, tratado com Dersani[®] e extrato glicólico; enquanto que no grupo tratado com gel a necrose somente foi visualizada 2d/48h, após o tratamento.

2- Não foi evidenciada presença de tecido de granulação visível durante o período de avaliação do trabalho (14 d) em nenhum dos grupos. No entanto há evidências histológicas de fibroplasia e proliferação vascular, características de fase granulatória, nos grupos tratados com extrato glicólico e gel de *Psidium guajava* L. a partir do 3d/72h. Fato não observado nos demais grupos.

Através da técnica de microdiluição (ELISA), os extratos glicólicos de *Psidium guajava* L. (200 µL/mL e 500 µL/mL) apresentaram inibição de 20,17% e 28,87% para *E. coli* respectivamente. Resultado semelhante foi observado nos estudos dos extratos aquosos das folhas, raízes e casca do caule de Deeni e Sadiq (2002) e diferindo dos nossos resultados obtidos pela técnica de difusão em placas (templates), que não apresentou halo de inibição, e do estudo de Sanches et al. (2005) que não observaram uma atividade efetiva contra bactéria gram-negativa *E. coli*. Ainda pela técnica de ELISA o gel 200 mg/mL apresentou 11,92% de inibição

para *E. coli*, sendo que a base do gel apresentou 6,24% de inibição. O gel de 500 mg/mL não apresentou nenhuma inibição, não sendo possível, até o momento justificar este resultado.

Em relação à determinação da inibição do crescimento de *P. aeruginosa* através da técnica de ELISA, os géis 200 mg/mL e 500 mg/mL apresentaram 50,37 e 49,38% de inibição respectivamente; devendo considerar que o solvente (DMSO:MeOH 1:1) utilizado para as diluições apresentou 16,48% de inibição. O extrato glicólico 200 µL/mL apresentou apenas 8,32% de inibição, fato ainda não justificável até o momento; o extrato glicólico 500 µL/mL apresentou inibição de 55,81%, indicando que o gel e o extrato mostram atividade antimicrobiana em relação a este micro-organismo. Pela técnica de difusão em placas (“templates”) os extratos glicólicos 200 µL/mL e 500 µL/mL apresentaram halos de inibição para *P. aeruginosa* (10,0 e 9,33 mm respectivamente), corroborando com os trabalhos de Deeni e Sadiq (2002), Chah et al. (2006).

Nenhuma amostra apresentou halo de inibição para *P. aeruginosa* na técnica de difusão em discos, corroborando com Sanches et al. (2005) que também não obtiveram atividade inibitória para esse micro-organismo, mas diferindo dos resultados dos testes anteriores.

Quanto a *S. aureus* os géis 200 mg/mL e 500 mg/mL apresentaram inibição de 37,12% e 50,97%, respectivamente; os extratos glicólicos 200 µL/mL e 500 µL/mL apresentaram 0 e 51,16% de inibição, respectivamente, pela técnica de microdiluição (ELISA). Provavelmente ocorreu uma interferência na leitura para o extrato glicólico de 200 µL/mL.

Os resultados obtidos pela técnica em discos para extrato glicólico nas diluições de 200 µL/mL e 500 µL/mL são as médias dos halos de inibição. Foram muito significativas em relação ao gel *P. guajava* L. 200 mg/mL - 5µL de aplicação; conforme esperado, o extrato mais concentrado teve maior inibição frente a *S. aureus*. O gel não apresentou halo de inibição para *S. aureus*, provavelmente pela baixa concentração dos princípios ativos na formulação. Pela técnica em “templates” foram obtidos resultados muito significativos $p < 0,001$ para os extratos glicólicos e dados não significativos $p > 0,05$ para o gel de *Psidium guajava* L.

E finalmente, na técnica de diluição em tubos, somente o extrato glicólico 500 µL/mL apresentou ausência de turvação nos tubos de ensaio contendo *S. aureus*, indicando inibição do crescimento desta bactéria.

Devemos levar em consideração as diferentes técnicas utilizadas, para algumas divergências de resultados (VALGAS et al., 2007).

Apesar de Sato et al. (2000) confirmarem a atividade antifúngica de extratos aquosos e metanólicos de *P. guajava* L., os resultados pela técnica de microdiluição (ELISA) mostraram que o extrato glicólico e o gel de *P. guajava* L. nas diluições do experimento não inibiram o crescimento de *C. albicans*. O solvente do extrato apresentou 23,43% de inibição, resultado decorrente da presença de propilenoglicol e álcool que tem também ação antimicrobiana. Essa não inibição do crescimento de *C. albicans* foi observada na técnica de difusão em placas (“templates”), pela ausência do halo de inibição e na técnica de macrodiluição (diluição em tubos), pela turvação do meio.

Através dos resultados de todos os ensaios têm-se a indicação de que provavelmente ocorreu influência da formulação e da técnica antimicrobiana.

Valgas et al. (2007) compararam algumas das técnicas e concluíram que o método de difusão variante poço foi mais sensível do que a variante disco.

Outro trabalho, de Ostrosky et al. (2008) também confirma que o método de microdiluição é mais sensível que as outras técnicas.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- As características morfoanatômicas de *Psidium guajava* L. foram concordantes, por vezes, com as encontradas na literatura. Os resultados encontrados neste trabalho facilitam o controle de qualidade da matéria-prima vegetal desidratada ou mesmo pulverizada.

- Vários métodos são utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana, porém o método da microdiluição (ELISA) apresentou melhor sensibilidade e economia, pois requer quantidade mínima de reagentes. Possibilitou, juntamente com outros testes, verificar que o gel de *Psidium guajava* L. apresentou inibição de crescimento de *E. coli*, com 200 mg/mL e apresentou inibição do crescimento de *P. aeruginosa*, *S. aureus* na diluição de 200 mg/mL e 500 mg/mL, porém não apresentou atividade antifúngica. O extrato glicólico de *Psidium guajava* L., por sua vez, tanto em 200 µL/mL como em 500 µL/mL apresentou atividade antimicrobiana para *E. coli*. Referente a *P. aeruginosa* e *S. aureus*, o extrato (500 µL/mL) apresentou atividade, porém não apresentou atividade antifúngica na duas diluições ensaiadas.

O teste de estabilidade acelerada do gel de *Psidium guajava* L. mostrou estabilidade dos teores de flavonóides e de taninos, que são constituintes importantes para a ação anti-inflamatória e cicatrizante.

No teste de cicatrização das lesões, em análise macroscópica do gel e do extrato glicólico de *Psidium guajava* L. foi verificada cicatrização, porém não houve diferença significativa quando comparado com a solução fisiológica. No entanto, em análise microscópica (histológica) das lesões, foram observadas diferenças qualitativas, evidências de fibroplasia e proliferação vascular, características de fase granulatória, nos grupos tratados com extrato glicólico e gel de *Psidium guajava* L. a partir de 72 horas, o que não foi observado nos demais grupos. Verifica-se, desta maneira, a eficácia do gel de extrato glicólico de *Psidium guajava* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos; sendo uma possível opção de medicamento para pacientes que dependam do Sistema Único de Saúde (SUS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABLA, L.E.F.; ISHIZUKA M.M.A. Fisiopatologia das feridas. In: FERREIRA, L.M.; CARRAMASHI, F.R.; BONAMICHI, G.T.; CAMARGO, C.P.; TUMA Jr., P. *Manual de cirurgia plástica*. São Paulo: Atheneu, 1995. p.5-11.
2. ABREU, P.R.; ALMEIDA, M.C.; BERNARDO, R.M.; BERNARDO, L.C.; BRITO, L.C.; GARCIA, E.A.; FONSECA, A.S.; BERNARDO-FILHO, M. Guava extract (*Psidium guajava*) alters the labelling of blood constituents with technetium-99m. *Journal of Zhejiang University, Science, B*, v.7, n.6, p.429-435, 2006.
3. ALI, M.A.; SHAMSUZZAMAN, M.; RAHMAN, M.H.; HOQUE, M.M. *In vitro* determination of minimum inhibitory and bactericidal concentration of the extracts of the bark of *Psidium guajava* for antibacterial activity. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v.32, n.1, p.115-123, 1997.
4. ALMEIDA, C.E.; KARNIKOWSKI, M.G.O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Revista de Saúde Pública*, v.29, n.6, p.428-433, 1995.
5. ALMEIDA, K.C.; BARBOSA, T.R.; SILVA, N.R.; JACQUES, D.S.; FREIRE, R.B. Efeito citotóxico do infuso aquoso de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmácia*, v.87, n.2, p.60-62, 2006.
6. AMORIM, E.; MATIAS, J.E.F.; COELHO, J.C.U.; CAMPOS, A.C.L.; STAHLKE Jr., H.J.; TIMI, J.R.R.; ROCHA, L.C.A.; MOREIRA, A.T.R.; RISPOLI, D.Z.; FERREIRA, L.M. Efeito do uso tópico do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu) na cicatrização de feridas cutâneas: estudo controlado em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.21, supl.2, p.67-76, 2006.
7. ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE FARMACÊUTICOS MAGISTRAIS. *Fitoterapia magistral: um guia prático para a manipulação de fitoterápicos*. São Paulo: ANFARMAG, 2005. 194p.
8. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Guia de estabilidade de produtos cosméticos*. Brasília: ANVISA, 2004. v.1, 52p.

9. ARIMA, H.; DANNO, G. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.66, n.8, p.1727-1730, 2002.
10. BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE Jr., C.R.; PINTO, C.A.S.O.; ZAGUE, V.; AREAS, E.P.G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.44, n.2, p.233-248, 2008.
11. BERLYN, G.P.; MIKSCHE, J.P. *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Ames: Iowa State University Press, 1976. p.121, 276.
12. BLANES, L. Tratamento de feridas. In: BAP BAPTISTA. Cirurgia vascular. *Feridas*. 2004. Disponível em: <http://www.bapbaptista.com/feridas_leila.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2008.
13. CARVALHO, A.A.T.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C.; MELO, A.F.M.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S. Estudos toxicológicos do extrato hidroalcolólico de *Psidium guajava* Linn/ Toxicological studies of the hidroalcoholic extract of *Psidium guajava* Linn. *Revista Brasileira Ciências da Saúde*, v.6, n.1, p.43-50, 2002.
14. CHAH, K.F.; EZE, C.A.; EMUELOSI, C.E.; ESIMONE C.O. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.104, n.1/2, p.164-167, 2006.
15. DECCACHE, D.S. *Formulação dermocosmética contendo DMAE glicolato e filtros solares: desenvolvimento de metodologia analítica, estudo de estabilidade e ensaio de biometria cutânea*. Rio de Janeiro, 2006. 152p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
16. DEENI, Y.Y.; SADIQ, N.M. Antimicrobial properties and phytochemical constituents of the leaves of African mistletoe (*Tapinanthus dodoneifolius* (DC) Danser) (Loranthaceae): an ethnomedicinal plant of Hausaland, Northern Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, v.83, n.3, p.235-240, 2002.

17. DEGUCHI, Y.; OSADA, K.; UCHIDA, K.; KIMURA, H.; YOSHIKAWA, M.; KUDO, T.; YASUI, H.; WATANUKI, M. Effects of extract of guava leaves on the development of diabetes in the db/db mouse and on the postprandial blood glucose of human subjects. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, v.72, n.8, p.923-931, 1998.
18. DEO, A.; SHASTRI, N.V. Purification and characterization of polygalacturonase inhibitory proteins from *Psidium guajava* Linn. (guava) fruit. *Plant Science*, v.164, n.2, p.147-156, 2003.
19. DOMINGOS DA SILVA, J.; LUZ, A.I.R.; SILVA, M.H.L.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B.; MAIA, J.G.S. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. *Flavour and Fragrance Journal*, v.18, n.3, p.240-243, 2003.
20. DUARTE, M.R.; PAULA, F.M. Morfodiagnose de *Psidium guajava* L. Myrtaceae. *Visão Acadêmica*, v.6, n.2, p.53-60, 2005.
21. EL-BADRAWY, E.E.Y. Hypoglycemic effect of the glycan isolated from guava fruit (*Psidium guajava*). *VDLUFA-Schriftenreihe*, v.52, p.203-206, 1999.
22. ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, v.64, p.711-713, 1998.
23. ESMERINO, L.A.; PEREIRA, A.V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D.M.; TALACIMON, E.A.; SCHELESKY, M.E. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. *Publicatio UEPG. Ciências Biológicas e da Saúde*, v.10, n.1, p.53-60, 2004.
24. FAHN, A. *Plant anatomy*. 4.ed. Oxford, New York: Pergamon Press, 1990. p.225-229.
25. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Nacional, 1926. p.385-387, 893-895.
26. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p.198.

27. FOSTER, A.S. *Practical plant anatomy*. 2.ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949. 218p.
38. FRANCO, D.; GONÇALVES, L.F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias*, v.35, n.3, p.203-206, 2008.
29. FURLAN, C.; SALATINO, A. Flavonóides de variedades comerciais de *Psidium guajava*. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE BOTÂNICA, 9, Santo Domingo, 2006. *Libro de resúmenes*. Santo Domingo, 2006. p.547.
30. GARROS, I.C.; CAMPOS, A.C.L.; TÂMBARA, E.M.; TENÓRIO, S.B.; TORRES, O.J.M.; AGULHAM, M.A.; ARAUJO, A.C.F.; SANTIS-ISOLAN, P.M.B.; OLIVEIRA, R.M.; ARRUDA, E.C.M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.21, supl.3, p.55-65, 2006.
31. GNAN, S.O.; DEMELLO, M.T. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v.68, n.1/3, p.103-108, 1999.
32. GONÇALVES, J.L.; LOPES, R.C.; OLIVEIRA, D.B.; COSTA, S.S.; MIRANDA, M.M.; ROMANOS M.T.; SANTOS, N.S.; WIGG, M.D. *In vitro* anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brasil against diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, n.3, p.403-707, 2005.
33. GONÇALVES, F.A.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J.N.S.; MACRAE, A.; SOUSA, O.V.; FONTELES-FILHO, A.A.; VIEIRA, R.H.S.F. Avaliação da atividade antibacteriana de extrato de folhas de goiabeira, *Psidium guajava* Linnaeus, sobre bactérias entéricas diarreio gênicas, isoladas de camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyei* (Heller). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.50, n.1, p.11-15, 2008.
34. GUTIÉRREZ, R.M.P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v.117, p.1-27, 2008.

35. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Flora. Plantas medicinais. Disponível em: <www.ibama.gov.br/flora/plantas_medicinais.htm>. Acesso em: 4 fev. 2008.
36. ISHIHARA, T.; ISHIHARA, T.; OKUDA, T. *Inhibitors for biosynthesis of lipid peroxides*. JP Pat. 11075770, 9 set 1999. 7p.
37. JAIARJ, P.; KHOOHASWAN, P.; WONGKRAJANG, T.; PEUNGVICHA, P.; SURIYAWONG, P.; SARAYA, M.L.; RUANGSOMBOON, O. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v.67, n.2, p.203-212, 1999.
38. JIMENEZ-ESCRIG, A.; RINCON, M.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.11, p.5489-5493, 2001.
39. JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book, 1940. p.41, 193. (McGraw-Hill publications in the botanical sciences).
40. KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GULLUCE, M.; OGUTÇU, H.; SENGUL, M.; ADIGUZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v.85, p.231-235, 2003.
41. KAVIMANI, S.; KARPAGAM, R.I.; JAYKAR, B. Anti-inflammatory activity of volatile oil of *Psidium guajava*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.59, n.3, p.142-144, 1997.
42. LEONG, L.P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, v.76, n.1, p.69-75, 2002.
43. LOZOYA, X.; REYES-MORALES, H.; CHAVES-SOTO, M.A.; MARTINEZ-GARCIA, M.D.E.L.C.; SOTO-GONZALES, Y.; DOUBOVA, S.V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *Journal of Ethnopharmacology*, v.83, n.1/2, p.19-24, 2002.

44. LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO, L.G.; MAZA, P.K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; GARCIA CORTEZ, D.A.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. Efeito de extratos de plantas medicinais no crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.1, p.85-94, 2005.
45. LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; CROZIER, A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.83, n.5, p.496-502, 2003.
46. MAHBOUBI, M.; HAGHI, G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.119, v.325-327, 2008.
47. MAKINO, T.; AIYAMA, R.; DEGUCHI, Y.; WATANUKI, M.; NAKAZAWA, M.; MIZUKOSHI, H.; NAGAOKA, M.; HARADA, K.; OSADA, K. *Polyphenols from guava as α -amylase inhibitors and use in diet food and drinks*. WO Pat. 0066714, 9 marc. 2001. 24p.
48. MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S.A. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v.78, n.5, p.525-542, 2003.
49. MANTOVANI, J.R.; CORREA, M.C.M.; CRUZ, M.C.P.; FERREIRA, M.E.; NATALE, W. Uso fertilizante de resíduo da indústria processadora de goiabas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.26, n.2, p.339-342, 2004.
50. MARUYAMA, M.; MURAKOSHI, T.; OTA, H. *Dentifrices containing plant extracts and basic peptides*. JP Pat. 0196756, 13 dez. 2004, 10p.
51. MASUDA, T.; INABA, Y.; MAEKAWA, T.; TAKEDA, Y.; YAMAGUCHI, H.; NAKAMOTO, K.; KUNINAGA, H.; NISHIZATO, S.; NONAKA, A. Simple detection method of powerful antiradical compounds in the raw extract of plants and its application for the identification of antiradical plant constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, n.7, p.1831-1838, 2003.

52. MATSUURA, K.; HIRATA, Y.; SAWADA, I.; IMAI, S.; FUKAYA, Y.; SAKURAGI, T.; ITO, H. *Lipase inhibitors containing pharmaceutical natural products*. JP Pat. 226274, 21 ago. 2001. 3p.
53. METCALFE, C.R.; CHALK, L. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press, 1950. v.1, p.620-631.
54. MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para cirurgião, enfermeira e citotécnico*. 3.ed. São Paulo: Michalany, 1998. 295p.
55. MILTERSTEINER, A.; MILTERSTEINER, D.; PEREIRA FILHO, N.; FROTA, A.R.; ELY, P.B.; ZETTLER, C.G.; MARRONI, C.A.; MARRONI, N.P. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.18, n.3, p.232-237, 2003.
56. MIRANDA, L.T.G.S. *Uso da tintura de Arnica em feridas cutâneas abertas em ratos*. São Paulo, 2001. 38p. Dissertação de Mestrado – Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo.
57. NATALE, W.; PRADO, R.M. Fertiirrigação em goiabeira. In: BOARETTO, A.E.; VILLAS BOAS, R.L.; SOUZA, W.F.; VIDAL, I.R., orgs. *Fertirrigação: teoria e prática*. Piracicaba: CENA/USP, 2006. v.1, p.494-535.
58. OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.2, p.301-307, 2008.
59. PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325p.
60. PINO, J.A.; AGUERO, J.; MARBOT, R.; FUENTES, V. *Leaf oil of Psidium guajava L. from Cuba*. *Journal of Essential Oil Research*, v.13, n.1, p.61-62, 2001.

61. PIO CORREA, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de desenvolvimento Florestal, 1984. v.3, p.429-432.
62. PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. *Técnica farmacêutica e farmácia galênica*. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. v.2, p.458-483.
63. QADAN, F.; THEWAINI, A.J.; ALI, D.A.; AFIFI, R.; EIKHAWAD, A.; MATAKA, K.Z. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. *American Journal of Chinese Medicine*, v.33, n.2, p.197-204, 2005.
64. QIAN, H.; NIHORIMBERE, V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *Journal of Zhejiang University, Science*, v.5, n.6, p.676-683, 2004.
65. RIVERA-ARCE, E.; GATTUSO, M.; LOZOYA, X. Anatomical identity parameters of the crude drug *Psidium guajavae* folium. *Pharmaceutical Biology*, v.41, n.7, p.516-521, 2003.
66. ROESER, K.R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. *Mikrokosmos*, v.61, p.33-36, 1962.
67. ROY, C.K.; KAMATH, J.V.; ASAD, M. Hepatoprotective activity of *Psidium guajava* Linn. Leaf extract. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.44, n.4, p.305-311, 2006.
68. SALIX, C.E.E.; RODRIGUEZ, F.J.M. Tintura de folhas de *Psidium guajava* L. em pacientes com diarreia aguda simple. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v.9, n.3, p.1-4, 2004. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1168-1.pdf>. Acesso em: 16 set. 2007.
69. SANCHES, N.R.; GARCIA CORTEZ, C.D.A.; SCHIAVINI, M.S.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* L. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.48, n.3, p.429-436, 2005.

70. SANTOS, S.C.; COSTA, W.F.; RIBEIRO, J.P.; GUIMARÃES, D.O.; FERRI, P.H.; FERREIRA, H.D.; SERAPHIN, J.C. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia*, v.73, p.292-299, 2002.
71. SATO, J.; GOTO, K.; NANJO, F.; KAWAI, S.; MURATA, K. Antifungal activity of plant extracts against *Arthrinium sacchari* and *Chaetomium funicola*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.90, n.4, p.442-446, 2000.
72. SCHOLZ, E. Pflanzliche gerbstoffe: pharmakologie und toxikologie. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v.134, n.34, p.3167-3179, 1994.
73. SCHIRATO, G.V.; MONTEIRO, F.M.F.; SILVA, F.O.; LIMA FILHO, J.L.; LEÃO, A.M.A.C.; PORTO, A.L.F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. *Ciência Rural*, v.36, n.1, p.149-154, 2006.
74. SILVA, R.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; LEÃO, M.A. Efeito de falvonóides no metabolismo do ácido araquidônico. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v.35, p.127-133, 2002.
75. SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., eds. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6.ed. Florianópolis: UFSC, Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1102p.
76. SOUZA JÚNIOR, E.E.; DUARTE, J.B.; CHAVES, L.J. Estabilidade fenotípica em goiabeira (*Psidium guajava* L.) com ênfase em peso de fruto, precocidade e período de colheita. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.32, n.2, p.97-103, 2002.
77. TACHAKITTIRUNGROAD, S.; OKONOJI, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, v.103, p.381-388, 2007.
78. TANTAWY, M.E. Morpho-anatomical study on certain taxa of Myrtaceae. *Asian Journal of Plant Sciences*, v.3, n.3, p.274-285, 2004.
79. TEWTRAKUL, S.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T.; YOSHINAGA, T.; FUJIWARA, T.; SUPAVITA, T.; YUENYONGSAWAD, S.; RATTANASUWON, P.; DEJ-ADISAI, S. HIV-1 integrase

inhibitory substances from *Coleus parvifolius*, Toyama. *Phytotherapy Research*, v.17, n.3, p.232-239, 2003.

80. TEIXEIRA, R.O.; CAMPAROTO, M.L.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achilea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. *Genetics and Molecular Biology*, v.26, n.4, p.551-555, 2003.

81. UNITED States Pharmacopoeia. 30.ed. Rochville: United States Pharmacopoeial Convention, 2007. v.1, p.79-97.

82. TONA, L. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.61, n.1, p.57-65, 1998.

83. TRÓPICOS. Missouri Botanical Garden. *Psidium guajava* L. Disponível em: <<http://www.Trópicos.org/name/22101794>>. Acesso em: 12 ago. 2008.

84. WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2.ed. Berlin: Springer, 1996. 384p.

85. WEI, L.; LI, Z.; CHEN, B. Clinical study on treatment of infantile rotaviral enteritis with *Psidium guajava* L. *Zhongguo Zhong xi yi jie he za zhi Zhongguo Zhongxiyi jiehe zazhi*, v.20, n.12, p.893-895, 2000.

86. WU, J.-W.; HSIEH, C.-L.; WANG, H.-Y.; CHEN, H.-Y. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. *Food Chemistry*, v.113, p.78-84, 2009.

87. VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA Jr., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p.369-380, 2007.

88. VELASCO-DE-PAULA, M.V.R.; RIBEIRO, M.E. *Guia didático de fórmulas cosméticas e cosmecêuticas*. 4.ed. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2001. 68p.

89. VIEIRA, R.H.; RODRIGUES, D.P.; GONÇALVES, F.A.; MENEZES, F.G.; ARAGAO, J.S.; SOUSA, O.V. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* Linn. And *Carica papaya* Linn.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.43, n.3, p.145-148, 2001.

90. YAMANUBE, Y.; HATTORI, F.; SHIMOMURA, K. *Extracts from Uncaria gambier, Psidium guajava, and Filipendula as lipase inhibitors*. JP Pat. 103741, 11 abr. 2000. 3p.

91. ZHANG, W.J.; CHEN, B.T.; WANG, C.Y.; ZHU, Q.H.; MO, Z.X. Mechanism of quercetin as an antidiarrheal agent. *Diyi Junyi Daxue Xuebao*, v.23, n.10, p.1029-1031, 2003.

ANEXO A

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA/FCF nº 187 /2008

São Paulo, 15 de julho de 2008.

Ilmo(a) Sr(a).
Marise Kiyoko Hasegawa Okamoto
Orientadora: Profa. Elfriede Marianne Bacchi
FBF

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP, em reunião realizada em 14 de julho de 2008, **APROVOU** o projeto “Estudo da atividade cicatrizante e estabilidade do gel de Psidium guajava L.” (Protocolo CEEA nº 187), apresentado por Vossa Senhoria.

A CEEA sugere, no entanto, a utilização de analgésico pós-operatório.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

ANEXO B



Morfoanatomia de folhas de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae)

Marise K.H. OKAMOTO *, Edna T.M. KATO * & Elfriede M. BACCHI

Depto. de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo,
Caixa Postal 68083, CEP 05315-970, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO. *Psidium guajava* L. é um arbusto perene, nativo da América tropical, cujas folhas são usadas na medicina tradicional latino-americana como antimicrobiano, antidiarreico, e auxiliar no tratamento de diabetes. As caracterizações morfoanatômica e histoquímica das folhas, realizadas neste trabalho, contribuem no controle de qualidade da matéria-prima vegetal desidratada, inteira ou em pó, empregada em formulações farmacêuticas. Os principais caracteres diagnósticos utilizados para a sua identificação neste trabalho foram: venação, tipo de tricomas, número de camadas de células epidérmicas, tipo de mesofilo e localização/tipo de cristais de oxalato de cálcio. A análise morfoanatômica mostra-se um método rápido para o controle de qualidade de drogas vegetais usadas na terapêutica.

SUMMARY. "Morphoanatomic aspects of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) leaves." *Psidium guajava* L. is a perennial shrub, native of tropical America used in Latin American traditional medicine as antimicrobial, antidiarrheic, and in the treatment of diabetes. The morphoanatomical characteristics and histochemistry of the crude drug, whole or powdered, used in pharmaceutical formulations were presented. The main diagnostic characters for the identification of its leaves in the present paper were: venation, trichomes type, number of layers of epidermal cells, mesophyll type and location/type of crystals of calcium oxalate. The morphoanatomical analysis has been proven to be a rapid method for quality control of the crude drug used for medicinal purposes.

INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae compreende cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies arbóreas e arbustivas, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais¹. Consta sua ocorrência no sul do México, na província de Buenos Aires (Argentina) e nos arquipélagos do Pacífico (Ilhas Galapagos e Ravillagedo)².

Psidium é um dos gêneros que se destaca na família por seus frutos cosméticos e usos na medicina tradicional^{2,3}, sendo encontrados em 3 centros de diversidade: (a) no oeste da Índia, Cuba e Espanha; (b) sul do Brasil e Paraguai; (c) norte da América do Sul (Peru, Venezuela e Guianas)².

Psidium guajava é conhecida no Brasil como goiaba, guayabo, guayabo blanco, araçá,

aráçá felpudo, dijamboé; na Colômbia, Costa Rica, Honduras e República Dominicana como guayaba; em Cuba como guayaba, guayabo, guayaba cotorrera, guayaba del Peru; em El Salvador como guayaba(o); em Guatemala como guayaba, Cak, Ch'amxuy, coloc, Pata, Posh; no México como guayaba colorada, guayaba china, guayaba de venado, guayaba peruana, guayaba perulera; na Nicarágua como guayaba, guayaba de gusano; no Panamá como guayabo agrio, guayaba, guayaba nulu, purijo⁴. Tem seus frutos utilizados *in natura* ou na forma de sucos concentrados e doces, razão pela qual é extensivamente cultivada no Brasil. Sua produção, em 2006, atingiu cerca de 328.255 toneladas em uma área de 14.982 ha, sendo o Brasil assim, considerado um dos principais produtores mun-

PALAVRAS-CHAVE: Histoquímica, Morfoanatomia, Myrtaceae, Planta medicinal, *Psidium guajava* L.

KEY WORDS: histochemistry, medicinal plant, morphoanatomy, Myrtaceae, *Psidium guajava* L.

* Autores a quem a correspondência deve ser enviada. E-mail: mariseki@usp.br, myiake@usp.br

diais de goiaba ⁵. A espécie é cultivada comercialmente no estado de São Paulo, representando 36% da produção nacional ⁵. Suas folhas são empregadas na medicina tradicional como anti-diabético ⁶, antioxidante ⁷⁻⁹, antimicrobiano ¹⁰ e anti-diarréico ¹¹.

Os estudos fitoquímicos das folhas mostram a predominância de taninos (5,5%), flavonóides calculados como quercetina (1%) e óleo essencial (0,2%, no mínimo) ¹². Os flavonóides derivados da quercetina encontrados na goiabeira ¹³ evidenciaram atividades marcantes na inibição dos movimentos intestinais, diminuindo a permeabilidade capilar na cavidade abdominal ¹⁴. Os taninos e os óleos voláteis são responsáveis principalmente pela eficácia como agentes anti-inflamatórios e antimicrobianos, efetivos no tratamento da diarreia ⁸.

O aumento do consumo de fitoterápicos ou formulações contendo extratos vegetais mostra a importância do controle de qualidade de matérias-primas vegetais para evitarem-se adultera-

ções que podem ocasionar falta de eficácia e segurança de uso ¹⁵. Assim, o objetivo deste trabalho é a caracterização morfoanatômica e histológica de suas folhas desidratadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas de *Psidium guajava* L. foram coletadas na pré-floração na Chácara Wadt, situada na cidade de Valinhos – São Paulo, cujas coordenadas são 22° 58' 14" S e 46° 59' 45" W e cuja altitude é de 660 m. A exsicata foi identificada por taxonomista e depositada sob registro M.K.H. Okamoto 001 no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

As folhas plenamente desenvolvidas, a partir do 4º nó, foram coletadas de três indivíduos. No estudo da morfologia e anatomia foram empregadas 10 unidades de cada indivíduo.

Amostras de folhas foram fixadas em etanol a 70% ¹⁶. O material foi seccionado à mão livre, nos sentidos transversais e longitudinais na região do terço mediano inferior; e posteriormen-

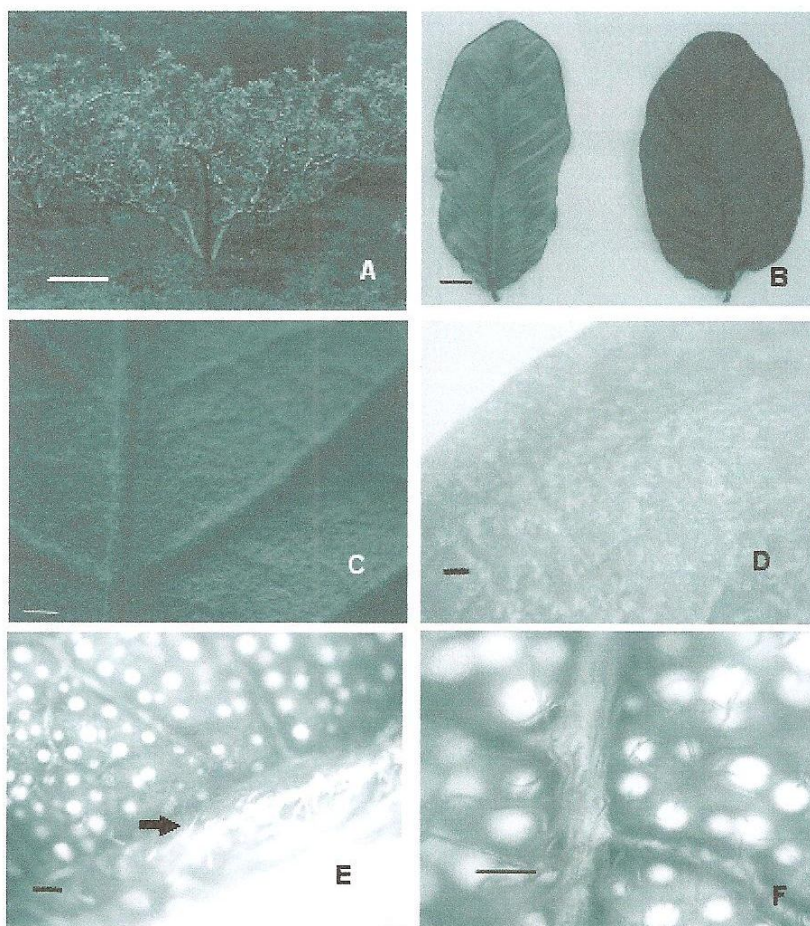


Figura 1. *Psidium guajava* L. **A.** arbusto. **B.** Droga vegetal. **C.** Detalhe da face abaxial, com destaque aos tricomas tectores. **D.** Detalhe da face adaxial. **E.** Destaque aos pontos translúcidos e à nervura marginal (seta). **F.** Detalhe da nervura mediana e face abaxial recoberta por tricomas tectores.

Escalas:
A = 1 m;
B = 1 cm;
C, D, E, F = 0,3 cm.

A epiderme voltada para a face adaxial mostrou-se unisseriada, sendo observadas três camadas subepidérmicas, algumas das quais contêm drusas de oxalato de cálcio (Fig. 2 C).

Em vista frontal do limbo, as células epidérmicas apresentam paredes espessas, de contorno retilíneo-polygonal (Fig. 2D). Nas folhas hipostomáticas foram observados estômatos envolvidos por 2 a 5 células (Fig. 2E).

A nervura mediana evidenciou-se bem desenvolvida, com feixe bicolateral, em arco aberto. Cavidades secretoras foram observadas principalmente próximo à epiderme (Fig. 2F). O parênquima fundamental possui espaços intercelulares do tipo meatos, idioblastos cristalíferos (drusas, prismas, cristais romboédricos, pequenos cristais, areia cristalina), células com gotas lipofílicas, compostos fenólicos. Grande número de cristais de forma variada foi observado na região floemática (Fig. 2G, H).

Os tricomas tectores simples, unicelulares e de diferentes tamanhos foram encontrados com maior frequência na face abaxial (Fig. 2I).

DISCUSSÃO

Nas análises das folhas de *Psidium guajava* L. foram confirmadas a presença de tricomas tectores simples e unicelulares, a nervura central com feixe vascular bicolateral conforme à família ²⁰. A localização dos tricomas encontrados apenas na face abaxial neste trabalho foi equivalente à da Farmacopéia Brasileira IV ¹², porém diferindo com a descrição de Duarte & Paula ²¹ que indica presença destes em ambas as superfícies foliares. As cavidades secretoras encontradas nas proximidades da epiderme ²⁰ foram adicionalmente observadas afastadas da epiderme neste trabalho, corroborando com os estudos da Farmacopéia Brasileira IV ¹²; Duarte & Paula ²¹ e Rivera-Arce, Gattuso & Lozoya ²².

A região subepidérmica aclorofilada não foi estudada sob o aspecto ontogenético por nós. Essa mesma região também foi denominada de camada subepidérmica por Duarte & Paula ²¹, enquanto Metcalfe & Chalk ²⁰ denominaram-na de hipoderme. A Farmacopéia Brasileira IV ¹² e Tantawy ²³ denominaram essa região de epiderme multisseriada, não mencionando o estudo de ontogênese.

Segundo Fahn ²⁴, folhas contendo parênquima paliçádico em ambas as faces da epiderme é denominada de isolateral ou isobilateral, enquanto a folha contendo parênquima paliçádico apenas em uma das faces e parênquima esponjoso em outra face, recebe a denominação de

dorsiventral ou bifacial; assim nesta investigação foi verificada a presença de um mesofilo dorsiventral ou bifacial concordando com Farmacopéia Brasileira IV ¹²; Tantawy ²³, Duarte & Paula ²¹ e diferindo de Rivera-Arce *et al.* ²²; Metcalfe & Chalk ²⁰ que denominaram-no de isolateral. Por outro lado, a presença de feixes vasculares bicolaterais em arco aberto na nervura mediana encontrado neste trabalho confere com a descrição relatada pela Farmacopéia Brasileira IV ¹²; Metcalfe & Chalk ²⁰ distinguindo da forma “praticamente de arco fechado” mencionada por Duarte & Paula ²¹.

Foram observados estômatos paracíticos, anomocíticos e anisocíticos em suas folhas conforme relatado por Rivera-Arce *et al.* ²², embora Metcalfe & Chalk ²⁰ relatem a presença de estômatos anomocíticos e mais raramente os estômatos paracíticos em Myrtaceae; para *P. guajava* L. esses mesmos autores descrevem estômatos paracíticos, encontrados exclusivamente na superfície abaxial, assim como Duarte & Paula ²¹. Nossos resultados diferem parcialmente da Farmacopéia brasileira IV ¹² e Tantawy ²³ que verificaram apenas estômatos anomocíticos.

O pecíolo apresentou colênquima angular com várias formas de cristais, feixe vascular em arco aberto; inclusive a presença de drusas, prismas, cristais de oxalato de cálcio e areia cristalina é uma característica tanto nesta região quanto na lâmina foliar. Foram encontrados muitos cristais na região floemática, assim como as glândulas secretoras e compostos fenólicos. Estes dados foram concordantes com a Farmacopéia Brasileira IV ¹², Metcalfe & Chalk ²⁰, Duarte & Paula e Rivera-Arce *et al.* ²².

CONCLUSÃO

As características morfoanatômicas de *Psidium guajava* L. foram compatíveis com às da família Myrtaceae e da espécie. Os resultados encontrados neste trabalho facilitam o controle de qualidade da matéria-prima vegetal desidratada ou mesmo pulverizada.

Agradecimentos. Ao Professor José Rubens Pirani pela identificação botânica da espécie e a Nilsa Sumie Wadt pelo fornecimento do material vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barroso, G.M. (1991) Myrtaceae In: “*Sistemática de Angiospermas do Brasil*”. Viçosa, Vol. 2, pp. 114-126.
2. Soares-Silva, L.H. & C.E B. Proença (2008) *Bot. J. Linn. Soc.* **158**: 51-4.

3. ITI tropicals < <http://www.guavapuree.com/index.php?MENU=1> > acessado em 12/08/2008.
4. CYTED - Programa Iberoamericano de Ciência y tecnología para el desarrollo. 270 plantas medicinais iberoamericanas. Colombia, 1995.
5. IBGE, 2008. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br> [Acesso em: 25 jun. 2008].
6. Shen S.C., F.C. Cheng & N.J. Wu (2008) *Phytother. Res.* **22**: 1458-64.
7. Wu, J.W., C.L. Hsieh, H.Y. Wang & H.Y. Chen (2009) *Food Chem.* **113**: 78-84.
8. Iha, S.M., K.F. Migliato, J.C.R. Velloso, L.V. Sacramento, R.C.L.R. Pietro, V.L.B. Isaac, I.L. Brunetti, M.A. Correa & H.R.N. Salgado (2008) *Rev. Bras. Farmacogn.* **18**: 387-93.
9. Tachakittirungroad, S., S. Okonogi & S. Chowwanapoonpohn (2007) *Food Chem.* **103**: 381-8.
10. Gonçalves, S.A., M.A. Neto, J.N.S. Bezerra, A. Macrae, O.V. Sousa, A.A. Fonteles-Filho & R.H.S.F. Vieira (2008) *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **50**: 1-6.
11. El Sohafy, S.M., A.M. Metwalli, F.M. Harraz & A.A. Omar (2009) *Phcog Mag.* **4**: 61-6.
12. Farmacopéia Brasileira (2002) 4. ed. São Paulo: Atheneu editora.
13. Furlan, C. & A. Salatino (2006) *Flavonóides de variedades comerciais de Psidium guajava. IX Congresso Latino Americano de Botânica* – Livro de resúmenes. **66**: 547.
14. Zhang, W.J., B.T. Chen, C.Y. Wang, Q.H. Zhu & Z.X. Mo (2003) *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* **23**: 1029-31.
15. Melo, J.G., J.D.G.R. Martins, E.L.C. Amorim & U.P. Albuquerque (2007) *Acta Bot. Bras.* **21**: 27-36.
16. Berlyn, G.P. & J.P. Miksche (1976) *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Ames: Iowa State University, pp. 121, 276.
17. Roeser, K.R. (1962) Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. *Mikrokosmos*, Stuttgart. **61**: 33-6.
18. Johansen, D.A. (1940) *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book, pp. 41, 193.
19. Foster, A. S. (1949) *Practical plant anatomy*. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand.
20. Metcalfe, C.R. & L. Chalk (1950) *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon, 1: 620-31.
21. Duarte, M. Do R. & F.M. Paula (2005) *Visão Acadêmica*, Curitiba **6**: 53-60.
22. Rivera-Arce, E., M. Gattuso & X. Lozoya (2003) *Pharm. Biol.* **41**: 516-21.
23. Tantawy, M. E. (2004) *Asian J. Plant Sci.* **3**: 274-85.
24. Fahn, A. (1990) *Plant anatomy*. 4. ed. Oxford: New York., pp. 225-9.