



## Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*

Mariângela T. AURICCHIO<sup>1</sup>, Adriana BUGNO<sup>2</sup>, Silvia B. M. BARROS<sup>1</sup> & Elfriede M. BACCHI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil.

**RESUMO.** A espécie *Eugenia uniflora* L., planta arbustiva da família Myrtaceae, ocorre em todo o Brasil e na América Latina, desde o México até a Argentina. No extrato hidroalcoólico foi verificada a presença de flavonóides e taninos (20,06%). O extrato demonstrou atividade antimicrobiana mais expressiva frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*, com CIM de 80 µg/mL; 100 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente. Frente a *Candida albicans* o extrato exibiu CIM de 500 µg/mL. A atividade antioxidante *in vitro* do extrato hidroetanólico de folhas de *Eugenia uniflora* foi determinada pela inibição da autooxidação espontânea em homogenato de cérebro, medida pela técnica do malonildialdeído (MDA), sendo o Q<sub>1/2</sub> de 34,6 µg/mL. A DL<sub>50</sub> do extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia uniflora* foi de 5,93 g/kg em camundongos, após administração por via oral.

**SUMMARY.** "Antimicrobial and Antioxidant Activities and Toxicity of *Eugenia uniflora*". *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) is a shrub, which grows all over Latin America from Mexico to Argentina. The extract of *Eugenia uniflora* leaves showed positive reaction for flavonoids and tannins. Concerning antimicrobial activity, the most susceptible bacteria to *Eugenia uniflora* leaf extract were *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* and *Pseudomonas aeruginosa*, with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 80, 100 and 400 µg/mL, respectively. The MIC against *Candida albicans* was 400 µg/mL. The *in vitro* antioxidant activity of the hydroalcoholic extract from *Eugenia uniflora* was based on the inhibition of spontaneous lipid peroxidation of rats brain homogenates. Malonyldialdehyde (MDA) was employed as parameter for lipid peroxidation evaluation. Q<sub>1/2</sub> was calculated as 34.6 µg/mL. The LD<sub>50</sub> of *E. uniflora* hydroalcoholic extract, orally administered, was 5.93 g/kg.

### INTRODUÇÃO

*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) pode ser encontrada desde o Estado do Amazonas até o Rio Grande do Sul<sup>1</sup>. Weyerstahl *et al.*<sup>2</sup> mencionam as denominações populares Ibitanga, Pitangatuba e Pitanga, para os frutos de *Eugenia uniflora* L. no Brasil, e Brazil Cherry, Surinam Cherry na América de língua inglesa.

A família Myrtaceae apresenta espécies com atividades antioxidante, hipoglicemiante, anti-reumática, sendo utilizadas em distúrbios estomacais e como anti-hipertensivas<sup>3</sup>. O emprego das folhas de *Eugenia uniflora* L.<sup>4</sup>, cuja infusão tem sido utilizada na medicina popular como anti-hipertensiva e anti-reumática, é bem conhecido no Brasil. As folhas e frutos são empregados na medicina caseira em várias regiões do

país, por serem considerados excitantes, febrífugos, aromáticos, antireumáticos e antidiarreicos. O extrato alcoólico é utilizado em bronquites, tosses, febres, ansiedade, hipertensão arterial e verminoses<sup>5</sup>.

Em 1977, Rücker *et al.*<sup>6</sup> isolaram vários componentes do óleo essencial de frutos de *E. uniflora*, principalmente sesquiterpenos, como furanoelemento, germacreno, γ-elemento e selina-4(14),7(11)-dieno. Maia *et al.*<sup>7</sup> estudaram o óleo essencial de folhas e ramos de *E. uniflora*, colhidos na cidade de Belém, no Pará, tendo sido obtido 1,8% em óleo essencial, do qual germacreno (32,8%), germacreno B (15,6%) e curzereno (30,0%) foram isolados como componentes mais abundantes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antimicrobiano, Antioxidante, *Eugenia uniflora*, Toxicidade.

**KEY WORDS:** Antimicrobial, Antioxidant, *Eugenia uniflora*, Toxicity.

\* Autor to whom correspondence should be addressed. E-mail: elfriede@usp.br

Schmeda-Hirschmann <sup>8</sup> verificou a presença dos flavonóides quercetina e miricetina em folhas de *Eugenia uniflora* coletadas no leste do Paraguai.

Lee *et al.* <sup>9</sup>, investigando os constituintes fenólicos de folhas de *E. uniflora*, relatam a presença de eugeniflorina D1 (C<sub>75</sub>H<sub>52</sub>O<sub>48</sub>) e eugeniflorina D2 (C<sub>68</sub>H<sub>48</sub>O<sub>45</sub>), dois taninos macrocíclicos hidrolisáveis, obtidos do extrato metanólico das folhas.

Duve & White <sup>10</sup> detectaram substâncias antioxidantes e polifenólicas na família, por meio de cromatografia em camada delgada, utilizando o β-caroteno como revelador. Velásquez *et al.* <sup>11</sup> verificaram a atividade antioxidante de extrato metanólico de *E. uniflora*, através de ensaio com microsossomos hepáticos, peroxidação lipídica induzida por Fe<sup>2+</sup>/ascorbato e por CCl<sub>4</sub>/NADPH, por redução de radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil e por geração de radical superóxido.

A partir da presença de substâncias polifenólicas, procurou-se estudar os efeitos ligados à atividade antioxidante e atividade antimicrobiana. Schapoval *et al.* <sup>12</sup> verificaram efeito antiinflamatório com a infusão de folhas frescas; os infusos e decoctos apresentaram ação analgésica. Tanto os infusos como os decoctos, na concentração de 5% (p/v), não exibiram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10321). *Eugenia uniflora* apresentou atividade moderada contra *S. aureus* e *E. Coli* <sup>13</sup>.

Adebajo *et al.* <sup>14</sup> avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas e frutos de *E. uniflora*, colhidos em diferentes estágios de maturação. A atividade foi testada pelo método de difusão em placa. Os resultados obtidos para *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Trichophyton menthagrophytes* foram diversos para amostras colhidas em diferentes períodos do dia e em diferentes épocas do ano, indicando uma variação na composição do óleo das diferentes amostras. A maioria das amostras foi inativa contra *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* e *Yersinia enterocolitica*. *Pseudomonas aeruginosa* foi a bactéria mais sensível, enquanto *T. menthagrophytes* foi o fungo mais sensível. O extrato metanólico de *Eugenia uniflora* foi positivo contra *Aspergillus flavus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Mycobacterium phlei*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina lutea*, *Serratia marcescens*,

*Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* e *Trichophyton menthagrophytes* <sup>15</sup>.

O óleo essencial isolado de folhas de *Eugenia uniflora* revelou a presença de curzereno (19,7%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17,8%), atractilona (16,9%) e furanodieno (9,6%), e dos frutos, de germacrona (27,5%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (19,2%), curzereno (11,3%) e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (11,0%). Os óleos de ambas origens exibiram potente atividade citotóxica e efeito antibacteriano variado <sup>16</sup>.

Schmeda-Hirschmann *et al.* <sup>17</sup>, trabalhando com folhas de *E. uniflora*, não verificaram toxicidade em doses de até 4,2 g do extrato hidroalcoólico por kg de peso, administradas em camundongos, por via oral. A DL50, por via intraperitoneal, obtida pelos autores, foi de 220 mg/kg, em camundongos.

Schapoval *et al.* <sup>12</sup> não observaram toxicidade aguda, trabalhando com preparações extrativas de folhas de *E. uniflora* L. dez vezes mais diluídas do que as empregadas no presente estudo.

## MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de *Eugenia uniflora* L. foram coletadas no Estado de São Paulo, Brasil, latitude - 22,72528°, longitude - 47,64917° e altitude de 548 metros, no cultivo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Brasil. A espécie foi identificada por Maria Lucia Kawasaki, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brasil, estando a exsiccata depositada na mesma instituição, sob a designação SP329658. As folhas secas de *E. uniflora* L. foram pulverizadas em moinho de martelos tipo Wiley, e o pó obtido foi classificado através de passagem por tamis de mesh 20 <sup>18</sup>.

Os extratos foram obtidos pelo processo de percolação, com mistura hidroetanólica a 70%. O etanol foi eliminado em concentrador a vácuo, à temperatura de 45 °C. A água residual foi retirada em liofilizador, usando como temperatura de congelamento -40 °C e pressão reduzida de 0,1 mbar, por 24 h.

## Triagem fitoquímica e doseamento de taninos

A triagem fitoquímica foi realizada de acordo com Farnsworth <sup>19</sup> e Costa <sup>18</sup>. A partir do extrato liofilizado foram realizadas reações para verificação da presença de mucilagens, flavonóides, taninos, antraquinonas, alcalóides, glicosídeos cardiotônicos, saponinas e óleo essencial.

O doseamento de taninos foi realizado de

acordo com European Pharmacopoeia 1997<sup>20</sup>, através da reação de polifenóis adsorvidos e não adsorvidos pelo pó de pele com ácido fosfotúngstico e medida da absorvância a 715 nm.

#### **Determinação da atividade antimicrobiana. Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A atividade antimicrobiana do extrato de folhas de *Eugenia uniflora* L. foi avaliada através da CIM (Concentração Inibitória Mínima), pelo método da diluição em meio de cultura líquido<sup>21</sup>. As cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC16404) foram fornecidas pela Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz-SP. Os meios de cultura caldo e agar caseína de soja, para as bactérias e caldo e agar sabouraud dextrose, para os fungos, foram preparados a partir de meio desidratado, conforme as instruções do fabricante (DIFCO).

A Concentração Inibitória Mínima foi estabelecida para os antibióticos Ampicilina e Nistatina, empregando-se a mesma metodologia utilizada para os extratos.

#### **Atividade antioxidante**

O extrato hidroalcoólico de folhas de *E. uniflora* L. (EHA) foi analisado quanto à sua capacidade antioxidante, segundo método proposto por Stocks *et al.*<sup>22</sup>. A autoxidação espontânea de homogenato de cérebro de ratos foi medida pela reação do malonildialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA). A medida da inibição do processo da autoxidação espontânea é realizada após adição de diferentes concentrações do extrato no qual se pretende avaliar a atividade antioxidante.

Para o ensaio foram empregados ratos adultos, machos, da linhagem Wistar, pesando aproximadamente 250 gramas, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo. O cérebro do animal foi perfundido em salina, retirado e mantido em banho de gelo. Foi obtido o homogenato de cérebro, o qual sofreu peroxidação espontânea. Diferentes concentrações de extrato foram adicionadas, com o objetivo de verificar a inibição da peroxidação.

A reação de peroxidação espontânea foi realizada à temperatura de 37 °C, durante 1 hora. A reação foi terminada com a adição de ácido tricloroacético a 5%. A leitura das absorvâncias foi

realizada a 532 nm, após adição do ácido tiobarbitúrico, de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{CAOx (\%)} = 100 [1 - (A_1 - A_0) \text{ amostra} / (A_1 - A_0) \text{ controle}]$$

Onde: CAOx = capacidade antioxidante do extrato de *E. uniflora*, A<sub>1</sub> = absorvância após 1 hora de incubação e A<sub>0</sub> = absorvância antes da incubação.

A partir dos dados obtidos, foi construída a curva da capacidade antioxidante, relacionando-se a variação da porcentagem de inibição da autoxidação do homogenato de cérebro (%CAOx), com a concentração de extrato de folhas de *E. uniflora* L. Localizando-se no gráfico a concentração correspondente a 50% do efeito inibitório medido, estabelece-se o índice Q<sub>1/2</sub>.

#### **Avaliação da DL50 do extrato hidroalcoólico de folhas de Eugenia uniflora L.**

Camundongos Swiss, machos e fêmeas com, aproximadamente, 30 g, foram previamente mantidos por período de dez dias em aclimação no laboratório, no qual foram realizados os ensaios. Os animais foram alimentados com ração marca PURINA-LABINA, e mantidos com água *ad libitum*. Foram colocados em jejum por cerca de dez horas antes da administração das doses, porém com água fornecida *ad libitum*.

A DL 50 foi estimada pelo método de Trimmed Spearman - Karber<sup>24</sup>.

Para determinação da DOSE LETAL 50% (DL<sub>50</sub>), o extrato liofilizado de folhas de *E. uniflora* L., suspenso em água, foi administrado por gavagem, nas doses de 3,0; 3,6; 4,3; 5,2 e 6,1 g/kg, por via oral. Cada dose, bem como o controle, foram administrados a grupos de cinco machos e cinco fêmeas. O grupo controle (macho e fêmea) recebeu volume equivalente de água destilada. Na análise estatística dos dados aplicou-se o teste "F" de Snedecor, para comparação das variâncias, com limite de confiança de 95%

Após administração, todos os grupos foram deixados sem ração e água nas primeiras quatro horas, e observados ao longo deste período e a cada 24 h, durante 14 dias, verificando-se o comportamento (agitação, piloereção, irritabilidade, resposta ao toque, aperto de cauda, contorção, força de agarrar, tremores, respiração, número de mortos). Foram anotados peso corpóreo individual e consumo de água e ração, para cada grupo de 5 animais, a cada 48 h<sup>23</sup>.

Decorridos 14 dias, os animais foram mortos, sendo realizadas análise macroscópica (aspecto, cor e tamanho) e pesagem dos seguintes órgãos: fígado, rins, coração/pulmão.

## RESULTADOS

### Triagem fitoquímica

Na triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *E. uniflora* foi verificada a presença de flavonóides e taninos.

### Teor de taninos

A porcentagem de taninos no extrato hidroetanólico liofilizado foi de 20,06%, o que corresponde a 2,96% de taninos na droga, considerando que o rendimento foi 14,75% do extrato em relação à droga.

### Atividade antioxidante

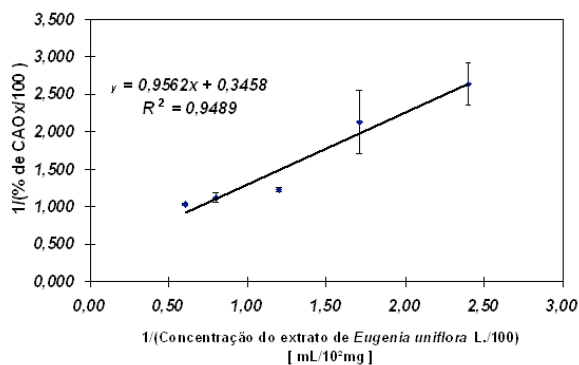
A concentração de 34,6 µg/mL do extrato hidroetanólico promoveu a inibição de 50% da lipoperoxidação em homogenato de cérebro de ratos, de acordo com a equação da reta da Figura 1.

### Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana de extrato de folhas de *Eugenia uniflora* L. estão sumarizados na Tabela 1.

### Determinação da DL<sub>50</sub>

Foram administradas doses de 3,0, 3,6, 4,3, 5,2 e 6,2 g/kg por via oral. Os animais se recolheram para cada extremidade da gaiola, houve certo eriçamento dos pelos, ficaram com os olhos cerrados, e reagiram pouco aos estímulos, como sons ou mesmo quando eram tocados. Permaneceram assim, porém nas doses mais



**Figura 1.** % de CAOx em função da concentração do extrato hidroalcoólico de folhas de *E. uniflora* L.

| Microorganismo         | Concentração inibitória mínima |                    |                   |
|------------------------|--------------------------------|--------------------|-------------------|
|                        | Extrato hidroalcoólico (mg/mL) | Ampicilina (mg/mL) | Nistatina (mg/mL) |
| <i>A. niger</i>        | 900                            |                    | 27                |
| <i>C. albicans</i>     | 500                            |                    | 11                |
| <i>P. aeruginosa</i>   | 400                            | 80                 |                   |
| <i>S. choleraesuis</i> | 100                            | 50                 |                   |
| <i>S. aureus</i>       | 80                             | 10                 |                   |

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* L. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), em comparação com os antibióticos Ampicilina e Nistatina. (NCCLS, M7 - A5, 2000).

baixas, após as primeiras duas horas, o pelo voltou ao normal.

Após, aproximadamente, 3 h, os animais que receberam doses de 3,0, 3,6 e 4,3 g/kg voltaram a se agrupar, mas permaneceram bem quietos. Os grupos controle também foram para os cantos da gaiola logo após a administração, mas depois de 45 min voltaram ao comportamento normal, diferentemente dos grupos tratados.

Decorridas as 4 h iniciais, os animais do grupo controle prontamente acorreram para os alimentos, enquanto nos grupos tratados, a reação foi mais lenta, e nas doses mais altas, houve mesmo desinteresse por água e ração.

Os primeiros óbitos ocorreram nas primeiras 24 h, para dose de 6,2 g/kg. De um modo geral, os animais foram se recuperando até o sexto dia de observação, quando não se notou diferença de comportamento dos grupos tratados em relação aos grupos controle; apenas nas duas doses mais altas ocorreram os óbitos, até o quarto dia após a administração do extrato. Ao final do ensaio, não foram observadas diferenças no aspecto geral (cor, tamanho) de coração, pulmão, fígado e rins, nem nas massas relativas dos órgãos, em comparação ao controle. A DL<sub>50</sub> foi calculada em 5,93 g/kg de peso do animal.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A triagem fitoquímica do extrato liofilizado de folhas de *E. uniflora* revelou a presença de flavonóides e taninos. O teor de taninos foi de 20,06% no extrato de folhas, correspondente a 2,96% na droga vegetal.

*Staphylococcus aureus*, *Salmonella cholerae* - *suis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* mostraram-se sensíveis à ação do extrato. Os maiores níveis de atividade antimicrobiana foram observados frente a *S. aureus* e *S. choleraesuis*.

O extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* exibiu Concentração Inibitória Mínima de 100 µg/mL frente a *S. choleraesuis* e de 80 µg/mL frente a *S. aureus*, valores altos se comparados às Concentrações Inibitórias Mínimas dos antibióticos de referência, 50 µg/mL para ampicilina, frente a *S. choleraesuis*, e 10 µg/mL, frente a *S. aureus*. Deve ser lembrado, entretanto, que a atividade é devida a uma fração do extrato, que contém as substâncias ativas. Os valores da CIM para as substâncias de referência, estão de acordo com NCCLS, M-7<sup>21</sup>.

Nenhum dos extratos foi ativo frente a *Escherichia coli*, fato também relatado por Limberger *et al.*<sup>26</sup>, estudando o óleo essencial de outras espécies de *Eugenia* (*E. bacopari*, *E. pluriflora* e *E. uruguayensis*), pelo método de difusão em ágar.

Schapoval *et al.*<sup>12</sup>, em estudos com preparações indicadas na medicina popular, não observaram atividade antimicrobiana em infusos e decoctos de folhas de *E. uniflora*, talvez porque estas preparações estivessem em níveis de diluição abaixo da concentração mínima inibitória.

No material testado neste estudo os componentes voláteis podem ter sido eliminados pelo tratamento ao qual foi submetido o extrato, fato que explicaria as reações negativas a óleos essenciais na triagem fitoquímica. A atividade antimicrobiana parece depender de substâncias não voláteis, já que estas não estão presentes no extrato. Componentes do extrato responsáveis pela atividade antimicrobiana podem ser os polifenóis, particularmente os taninos. Nos relatos de Haslam<sup>27</sup>, a atividade antimicrobiana exibida por taninos é explicada pela habilidade que apresentam em complexar-se com macromoléculas, tais como polissacarídeos e proteínas.

As bactérias testadas foram mais sensíveis ao extrato hidroalcoólico de folhas de *E. uniflora* do que os fungos, o que pode ser verificado pela CIM para fungos e bactérias.

A DL50 de 5,93 g/kg confirma observações de Schmeda-Hirschmann *et al.*<sup>17</sup> e de Schapoval *et al.*<sup>12</sup>, em relação ao baixo risco de toxicidade por via oral para o extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora*.

No estudo da avaliação da toxicidade realizado verificou-se que os animais tratados com doses de 3,0 g/kg e 3,6 g/kg não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no ganho de peso quando comparados com o ganho de peso do grupo controle. Os animais se mantiveram ativos, normais no comportamento e reação a estímulos, indicando ausência de sinais de to-

xicidade nestes níveis de doses, o que também foi relatado por Schmeda-Hirschmann *et al.*<sup>17</sup>, em doses até 4,2 g/kg, em camundongos da linhagem BALB C.

O extrato de folhas de *E. uniflora* apresentou Q<sub>1/2</sub> de 34,6 µg/mL, o que o coloca em uma posição intermediária em relação ao potencial para atividade antioxidante, quando comparado com outras espécies vegetais estudadas por Barros *et al.*<sup>28</sup>, com o emprego desta técnica.

Taninos e flavonóides estão presentes no extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora*, sendo a porcentagem de taninos de 20,06%, correspondendo a 2,96% na droga. A presença de flavonóides e taninos, cujas propriedades como supressores de radicais peroxila são bem conhecidas, devem ter contribuído para a atividade antioxidante observada.

Taninos são estruturas polares, de alto peso molecular, cuja absorção pelo trato digestivo provavelmente é dificultada. Um ensaio *in vivo* complementar o estudo da eficácia do extrato de folha de *Eugenia uniflora* L. quanto à ação antioxidante.

Concluindo, pelo estudo realizado, pode-se verificar que o extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* apresenta atividades antimicrobiana e antioxidante *in vitro*, podendo os compostos fenólicos serem os responsáveis pelas atividades. Parece apresentar baixa toxicidade, como resultado do ensaio agudo em camundongos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Angely, J. (1965) "*Flora analítica do Paraná*", USP, São Paulo: USP, págs. 487-91.
2. Weyerstahl, P., H. Marshall-Weyerstahl, C. Christiansen, B.O. Oguntimein & A.O. Adeoye (1988) *Planta Med.* **6**: 546-9.
3. Almeida, E.C., M.G.O. Karnikowski, R. Foletto & B. Baldisserotto (1995) *Rev. Saúde Pública* **29**: 428-33.
4. Index kewensis plantarum phanerogamarum: Supplementarum quartum (1906-1910) Oxford University Press, London.
5. Lorenzi, H. & F.J. Abreu Matos, (2002) "*Plantas Mediciniais no Brasil*", Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., Nova Odessa, págs. 350-1.
6. Rücker, G., G. Assis Brasil e Silva, L. Bauer & M. Schikarski (1977) *Planta Med.* **31**: 305-40.
7. Maia, J.G.S., M.H.L. Andrade, M.H.L. Da Silva & M.G.B. Zoghbi (1999) *J. Essent. Oil Res.* **11**: 727-9.
8. Schmeda-Hirschmann, G. (1995) *Fitoterapia* **16**: 373-4.

9. Lee, M.I., S. Nishimoto, L.L. Yang, K.Y. Yen, T. Hatano, T. Yoshida & Y. Okuda (1997) *Phytochemistry*. **44**: 1343-9.
10. Duve, K.J. & P.J. White, (1991) *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**: 365-70.
11. Velásquez, E., H.A.Tournier, P. Mordujovich de Buschiazzo, G. Saavedra & G.R. Schinella (2003) *Fitoterapia* **74**: 91-7.
12. Schapoval, E.E.S., S.M. Silveira, C.B. Alice & A.T. Henriques (1994) *J. Ethnopharmacol.* **44**: 137-42.
13. Holetz, F.B., G.L. Pessini, N.R. Sanches, D.A. Garcia Cortez, C.V. Nakamura & B.P. Dias Filho (2002) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**: 1027-31.
14. Adebajo, A.C., K.J. Olorek & A.J. Aladesanmi (1989) *Fitoterapia* **15**: 451-5.
15. Coelho de Souza, G., A.P.S. Haas, G.L. von Poser, E.E.S. Schapoval & E. Elisabetsky (2003) *J. Ethnopharmacol.* **90**: 135-43.
16. Ogunwande, I.A., N.O. Olawore, O. Ekundayo, T.M. Walker, J.M. Schmidt & W.N. Setzer, (2005) *Int. J. Aromather.* **15**: 147-52.
17. Schmeda-Hirschmann, G., C. Theoduloz, L. Franco, E. Ferro & A. Rojas de Arias (1987) *J. Ethnopharmacol.* **21**: 183-6.
18. Costa, A.F. (1978) "Farmacognosia". 2.ed. Fundação Calouste Gulbenkian Lisboa. Vol. 2, pág. 1115.
19. Farnsworth, N.R. (1966) *J. Pharm. Sci.* **55**: 225-65.
20. European Pharmacopoeia 3 ed. (1997) Council of Europe, Strasbourg, p.1440.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution. Antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 5.ed. Wayne: NCCLS, 2000 (NCCLS document M7-A5).
22. Stocks, J., J.M. Gutteridge, R.J. Sharp & T.L. Dormandy (1974) *Clin. Sci. Mol. Med.* **47**: 215-22.
23. Brito, A.S. (1994) "Manual de ensaios toxicológicos in vivo". UNICAMP, Campinas, pág. 22.
24. Hamilton, M.A., R.C.Russo & R.V. Thurston (1977) *Environ. Sci. Technol.* **11**: 714-9.
25. Costa Neto, P.L.O. (1977) "Estatística". Edgard Blücher, São Paulo, págs. 115-7.
26. Limberger, R.P., M.A. Apel, M.Sobral, E.S. Schapoval, A. Henriques (1998) *Rev. Bras. Farm.* **79**: 49-52.
27. Haslam, E. (1996) *J. Nat. Prod.* **59**: 205-16.
28. Barros, S.B.M., D.S.Teixeira, A.E. Aznar, J.A. Moreira Jr., I. Ishi & P.C.D. Freitas (1996) *Free Radical Biol. Med.* **48**: 114-6.