

1 INTRODUÇÃO

O emprego dos vegetais como medicamento se confunde na história humana. O hábito de recorrer às virtudes curativas de certas plantas foi uma das primeiras manifestações do esforço de compreender e utilizar a natureza. Com a evolução da ciência, intensificaram-se os estudos das plantas medicinais, relacionando a composição química destas com os seus efeitos, confirmando, muitas vezes, a sua utilização popular.

Muitos poderes são atribuídos às plantas aromáticas, e estas têm sido usadas ao longo da história na busca pela felicidade e saúde, na medicina, religião, magia e cosmética. Nas civilizações primitivas, queimavam-se madeiras e óleos perfumados para a comunicação com os deuses ou o exorcismo de demônios. Os egípcios também usavam plantas e óleos aromáticos para embalsamar os mortos, demonstrando, assim, um conhecimento sofisticado de suas propriedades antissépticas.

O uso de extratos de plantas com propriedades antimicrobianas tem importante significado em tratamentos terapêuticos, uma vez que o uso indevido de antibióticos sintéticos acarretou resistência de muitos microrganismos a terapia convencional.

Em diversas partes do mundo, várias espécies de *Eucalyptus* vêm sendo cultivadas e exploradas há muitos anos. Originário da Austrália, o eucalipto é um vegetal que se destaca tanto por seu valor econômico como do ponto de vista de suas virtudes medicinais. Este gênero apresenta as seguintes propriedades terapêuticas: antifúngica, antisséptica, adstringente, antiinflamatória, antibacteriana, cicatrizante e desinfetante (ESTANISLAU et al., 2001).

O principal componente encontrado nas folhas de eucalipto é o 1,8-cineol, presente no óleo essencial extraído desta planta, sendo um dos grandes responsáveis pelas propriedades terapêuticas. Além deste terpenóide, encontram-se também taninos, ácidos, princípios amargos e compostos flavônicos, dentre outros.

A espécie *Eucalyptus cinerea*, é empregada para fins ornamentais, apresenta um rendimento de óleo essencial superior às demais espécies de eucalipto (MOREIRA et al., 1980). Esta espécie apresenta uma carência de estudo e, conseqüentemente, referências bibliográficas, justificando assim, a realização de

pesquisas a seu respeito. Assim sendo, a presente dissertação engloba e propõe a prospecção fitoquímica e análise das propriedades antimicrobiana e físico-química do óleo essencial extraído das folhas e extrato hidroalcoólico de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex. Benth., Myrtaceae, proporcionando conhecimento acerca de suas características químicas e biológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral a prospecção fitoquímica e análise do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex. Benth., Myrtaceae.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração e fracionamento do óleo essencial de folhas de *E. cinerea*;
- Identificação dos compostos presentes no óleo essencial e suas frações por meio de análises cromatográficas;
- Prospecção fitoquímica preliminar dos metabólitos das folhas da referida espécie;
- Determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e de suas frações frente a microorganismos padrão;
- Determinação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. cinerea* a microorganismos padrão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE

A Família Myrtaceae, que concentra os elementos voláteis nas folhas, contém cerca de 100 gêneros e dentro destes, 3.000 a 3.500 espécies distribuídas por todo os continentes, com exceção da Antártida e com predominância nas regiões tropicais e subtropicais da América e Austrália (JOLY, 1979 citado por SIANI et al., 2000; FABROWSKI, 2002).

Os principais gêneros pertencentes a família Myrtaceae são: *Eucalyptus*; *Melaleuca*; *Eugenea* e *Psidium* (exemplos: eucalipto; “tea tree”; azeitona e goiaba, respectivamente). São cultivados no Brasil devido a várias finalidades, principalmente por apresentarem frutos comestíveis, serem fonte de madeira e lenha, conterem óleos essenciais e pela aparência de algumas espécies, são utilizadas como ornamentais (SIANI et al., 2000).

3.2 GÊNERO *Eucalyptus*

O gênero foi denominado *Eucalyptus* por L’Heritier em 1788. Esta palavra deriva do grego *eu* (=bem) e *kalypto* (=cobrir) em alusão ao opérculo que cobre as sementes até que estejam totalmente desenvolvidas (GUENTHER, 1977b).

Eucalyptus é um importante gênero pertencente à família Myrtaceae, composto por aproximadamente 600 a 700 espécies, sendo a maioria nativa do continente australiano e de algumas ilhas ao norte, tendo sido introduzidas espécies em mais de 90 países desde 1850. Devido ao grande número de espécies, este gênero foi dividido em subgêneros, sendo os principais: *Corymbia* (30 espécies); *Monocalyptus* (80 espécies) e *Symphomyrtus* (250 espécies) (HÄNSEL et al., 1992; AMEN-CHEN et al., 1997; FABROWSKI, 2002; MONTAGU et al., 2003).

O gênero *Eucalyptus* foi introduzido no Brasil em 1865, inicialmente com a espécie *Eucalyptus globulus* Labillardiere, da qual utilizam-se as folhas pecioladas e lanceoladas para extração de óleo essencial (GUENTHER, 1977b; COSTA, 1986).

Dentre as espécies de eucaliptos conhecidas, destaca-se a produção de óleo essencial, sua principal fonte de estudos (MOREIRA et al., 1980). A maioria das

farmacopéias descreve espécies de *Eucalyptus* produtoras de óleo essencial, constituído de uma mistura de terpenos com 70 a 80% de 1,8-cineol, e baixo teor de felandreno (abaixo de 5%), podendo a composição e o rendimento variar de acordo com a genética, idade das folhas e ambiente (MOREIRA et al., 1978; SILVESTRE et al., 1997; SIMÕES et al., 2000).

Por não apresentar 1,8-cineol como componente principal em seu óleo essencial e sim o composto citronelal, em concentração média de 70%, a espécie *Eucalyptus citriodora* foi reclassificada para o gênero *Corymbia*, recebendo a denominação de *Corymbia citriodora* (FABROWSKI, 2002).

Além de óleo essencial, as folhas de eucalipto contêm outros compostos, tais como: taninos, ácidos gálico, glicólico e glicérico, princípios amargos, compostos flavônicos, derivados da cumarina, cera e resina. Por apresentar esta diversidade de componentes químicos, pode ser utilizado na área farmacêutica pelas seguintes propriedades: antifúngica, anti-séptica, adstringente, antiinflamatória, antibacteriana, cicatrizante, desinfetante, expectorante e carminativa (COSTA, 1986; ESTANISLAU et al., 2001).

NAVARRO et al. (1996) citam alguns usos populares no México para a espécie *E. globulus*, tais como: para afecções brônquicas, tosse, asma, faringite, bronquite, resfriados, afonia, febre e alguns ferimentos. GRAY et al. (1998) atribuem ao extrato aquoso da mesma espécie ação anti-hiperglicêmica associada à estimulação de secreção de insulina e intensificação da captação e metabolismo de glucose pela célula. Esta ação foi verificada em camundongos, confirmando o uso tradicional do chá feito com as folhas no tratamento do *diabetes mellitus* na América do Sul e África, concluindo ser uma potencial fonte para a descoberta de novos agentes orais para terapia desta doença.

Atualmente, para a produção de madeira, os eucaliptos mais utilizados no Brasil são: *E. glandis*, *E. saligna* e *E. urophylla*. Sua madeira pode ser usada para fabricação de celulose e papel e estruturas para a construção civil, além de ser utilizada como combustível. Para a extração de óleo essencial das folhas, utilizam-se as espécies: *E. globulus*, *E. citriodora* e *E. smithii*. Com isso, este gênero tem importante utilidade em várias áreas, tais como: ambiental, econômica, medicinal e farmacêutica (ESTANISLAU et al., 2001; FABROWSKI, 2002).

3.3 *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. Ex. BENTH., MYRTACEAE

Eucalyptus cinerea F. Muell ex. Benth., Myrtaceae é originário da Austrália e apresenta produtividade de óleo essencial relativamente superior às demais espécies do gênero. É uma espécie utilizada para fins ornamentais por apresentar rápido crescimento e resistência ao ataque de parasitas aliados ao formato de suas folhas (MOREIRA et al., 1980).

É conhecido popularmente como “silver dollar tree”, “silver dollar gum”, “argyle apple” e também, como eucalipto. Os primeiros nomes referem-se a coloração das folhas, que são prateadas, lembrando assim, uma nota de dólar americano. As folhas jovens apresentam esta coloração mais evidente, sendo muito utilizada em arranjos florais (WIRTHENSOHN e SEDGLEY, 1998; CAMPBEL et al., 2000; ROD, 2004).

São árvores de pequeno a médio porte quando comparadas a outras espécies do gênero, como por exemplo, *E. globulus* atinge 70 metros de altura, segundo CORRÊA (1984). São formadas de eixo vertical com altura entre 4,5 a 18 metros, com ramos laterais que tangem de 3 a 4,5 metros de largura. As folhas apresentam fragrância característica, com pó fino que as recobrem, gerando aparência de neve e as flores são raras e de coloração branca. Esta espécie ocorre freqüentemente em locais com muita Grama, em solos rasos, relativamente inférteis, geralmente como abrigo de outras espécies. Seu crescimento é favorecido em ambientes úmidos, muito embora tolera a falta de umidade (Eucalink, 2004; RELF, 2004; EVANS, 2004; KOPP, 2004).

MOREIRA et al. (1980) verificaram a concentração de óleo essencial de *E. cinerea* durante o período de um ano e determinaram que a concentração do óleo essencial nos meses de junho a dezembro apresentou rendimento médio de 7,92%, e pela análise físico-química, determinaram os principais componentes deste óleo e sua respectiva concentração: 1,8-cineol (65%), α -pineno (5,41%), β -pineno (3,42%), diterpeno (3,40%), limoneno (2,75%), α -terpinol (2,18%) e α -terpineno (0,71%). IGLESIAS et al. (1980) também obtiveram os seguintes compostos no óleo essencial: α -pineno, 1,8-cineol, p -cimeno, terpin-4-ol, acetato de citronelila, α -terpineol e acetato de α -terpinila. GUENTHER (1977) descreve a presença de 1,8-cineol (54%), α -pineno, butiraldeído e valeraldeído no óleo essencial desta espécie e

rendimento de 1,20% (v/m). RUMYANTSEVA (1958) considera a espécie *E. cinerea* tão valiosa quanto a espécie *E. globulus* quanto a produção de 1,8-cineol, sendo mais resistente ao tempo frio que a última. O rendimento de óleo essencial, segundo este mesmo autor, varia de 3,0 a 5,0% (v/m de folhas secas), sendo as folhas imaturas que concentram maior conteúdo de óleo.

A preservação de folhagem jovem de *E. cinerea* após ser coletada foi medida utilizando soluções de glicerol, e os resultados identificaram que esta solução, na concentração de 20% (v/v), mantém características das folhas da espécie. Para as folhas maduras a absorção de glicerol passou a diminuir a partir de 2 dias após o tratamento, sendo que a maioria das funções metabólicas cessou após 1,5 a 2 dias (CAMPBELL et al., 2000).

Em estudo anatômico dos nodos dos cotilédones desta espécie, verificou-se que o desenvolvimento do lignotubo é acompanhado de estruturas acessórias que se desenvolvem adjacentes ao córtex e com crescimento de forma radial a região central do tecido parenquimático (GRAHAM et al., 1998).

MANGIERI et al. (1958), citados por MOREIRA et al. (1980), descrevem a espécie *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex. Benth., Myrtaceae da seguinte maneira:

“Árvore de pequeno e médio porte, casca fibrosa e persistente, exteriormente pardacenta e de coloração marrom-clara internamente. As folhas são ovaladas, cordiformes na base, sésseis, opostas, com forte odor de cineol. De 4 a 8 cm de comprimento, apresentando uma coloração verde levemente prateada. As nervuras da página superior são bastante salientes; as secundárias divergem em ângulo de 45° ou pouco menos, em relação à nervura central; as terciárias estão anastomosadas. As flores são subssésseis ou ligeiramente pediceladas, estão dispostas em um umbelas axiais triflorais, tendo como base um pedúnculo suavemente comprido. Os frutos turbinados, medem 8 mm de diâmetro, possuindo 3 ou 4 valvas triangulares. As sementes são escuras e rugosas.”

3.3.1 Enquadramento taxonômico

O enquadramento taxonômico de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex. Benth., Myrtaceae está demonstrado na TABELA 1:

TABELA 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO SEGUNDO CRONQUIST (1981) E SEGUNDO ENGLER (1964).

Táxon	CRONQUIST (1981)	ENGLER (1964)
Divisão	Magnoliophyta	Gymnospermae
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledoneae
Subclasse	Rosidae	Archichlamydeae
Ordem	Myrtales	Myrtiflorae
Família	Myrtaceae	Myrtaceae
Gênero	<i>Eucalyptus</i>	<i>Eucalyptus</i>
Espécie	<i>Eucalyptus cinerea</i>	<i>Eucalyptus cinerea</i>

FIGURA 1 - ASPECTO DA FOLHA DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. EX. BENTH., MYRTACEAE



Fonte: Tomoe Nakashima

FIGURA 2 - ASPECTO DA FLOR DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. EX. BENTH., MYRTACEAE



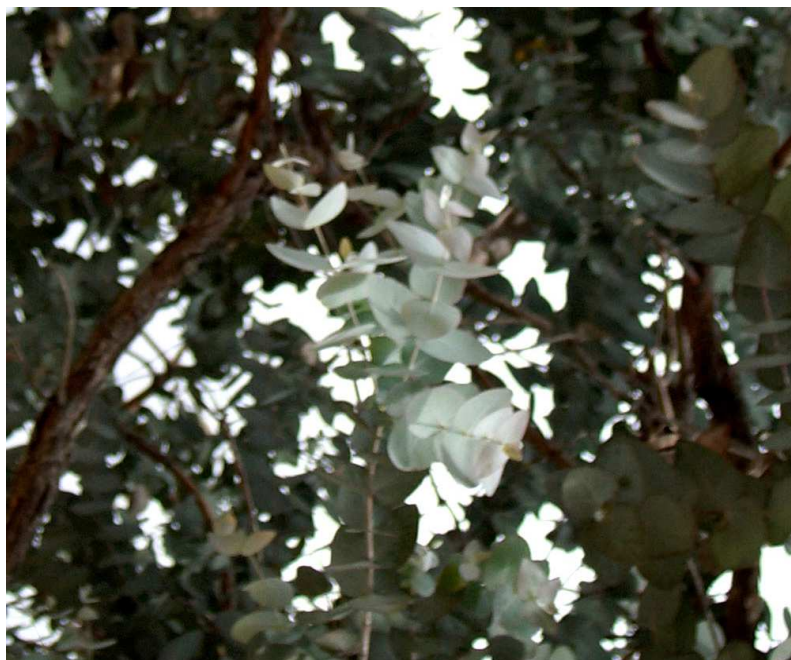
Fonte: Tomoe Nakashima

FIGURA 3 - ASPECTO DA ARVORE DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. EX. BENTH., MYRTACEAE



Fonte: Tomoe Nakashima

FIGURA 4 - ASPECTO DA FOLHA DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. EX. BENTH., MYRTACEAE



Fonte: Tomoe Nakashima

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são os princípios odoríferos encontrados em várias partes da planta e desempenham a função de adaptação do organismo vegetal ao meio. As denominações atribuídas a este óleo devem-se às suas características físico-químicas. Como evaporam quando expostos ao ar em temperaturas comuns, sua principal característica, são chamados óleos voláteis; por apresentarem aroma intenso e agradável constituindo verdadeiras “essências”, óleos essenciais; e por serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter por exemplo, poder ser denominados de óleos etéreos (ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2000; VITTI e BRITO., 2003).

A maior parte dos óleos essenciais consiste na mistura de hidrocarbonetos (terpenos, sesquiterpenos, entre outros) e de compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, éteres fenólicos, entre outros). Quimicamente, estes compostos derivam de terpenóides, originados a partir do ácido mevalônico, ou de fenilpropanóides, provindos do ácido chiquímico (GUENTHER, 1977; SIMÕES et al., 2000).

As características físicas dos óleos voláteis são comuns, apesar de apresentarem constituições químicas diferentes. São geralmente insolúveis, ou muito pouco solúveis em água, solubilizando-se em álcool, éter e em muitos solventes orgânicos. Apresentam odores característicos, alto índice de refração e são opticamente ativos (ROBBERS et al., 1997; TYLER et al., 1988).

De acordo com a família a que pertencem, as espécies, os elementos voláteis podem estar concentrados em órgãos anatômicos específicos. Os óleos essenciais localizam-se em estruturas especiais de secreção, como cavidades, canais (bolsas) esquizógenos ou lisígenos, canais oleíferos, pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas. Podem ser estocados nas flores, folhas, casca do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes, podendo variar na sua composição de acordo com a localização em uma mesma espécie. (GOTTLIEB, 1987 citado por FABROWSKI, 2002; SIANI et al., 2000; SIMÕES et al., 2000).

Além da variação de acordo com o órgão de localização, outros fatores podem interferir na composição do óleo essencial de uma mesma espécie vegetal, tais como: a época de coleta; condições climáticas e de solo, localização geográfica;

ciclo vegetativo da espécie e o processo de obtenção (MOREIRA et al., 1980; ROBBERS, 1997; MEIJDOUB et al., 1998; WIRTHENSOHN et al., 1998; SIMÕES et al., 2000; SIANI et al., 2000).

Diversas funções biológicas são atribuídas a essas substâncias odoríferas. Considerados como desperdício fisiológico ou produtos de desintoxicação, sabe-se que desempenham a adaptação do organismo ao meio. Atuam na defesa contra o ataque de predadores, na atração de polinizadores, proteção contra perda de água e aumento de temperatura e como inibidores de germinação (SIMÕES et al., 2000; FABROWSKI, 2002).

Os processos de obtenção de óleos essenciais variam conforme a localização do óleo na planta. Os métodos mais comuns são: enfloração; arraste direta por vapor d'água; extração com solventes orgânicos; prensagem e extração com CO₂ supercrítico (GUENTHER, 1977; ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2000).

Os óleos essenciais são empregados para diversas finalidades: como medicinais, devido a algumas propriedades terapêuticas, na indústria de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas), perfumes e cosméticos, bem como na fabricação de produtos de limpeza. Apesar de apresentar várias características benéficas, não podem ser descartados os efeitos tóxicos acarretados por estas substâncias, que podem acarretar desde uma simples reação cutânea a efeitos convulsivantes e psicotrópicos (ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2000; FABROWSKI, 2002).

3.4.1 Óleos essenciais de eucaliptos

O óleo essencial das folhas de eucalipto é um líquido incolor ou amarelado, por vezes acastanhado ou esverdeado, fluido, com cheiro forte, aromático e de sabor picante e apresentam como principal composto isolado 1,8-cineol (eucaliptol), piperitona, felandreno e aldeídos voláteis. A presença de felandreno é imprópria para o uso do óleo de eucalipto devido à sua atividade tóxica (COSTA, 1986; GUENTHER, 1977). São compostos de misturas complexas de compostos orgânicos voláteis, de hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, entre outros, sendo constituídos principalmente de monoterpenos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅) (FABROWSKI, 2002).

A produção destes óleos essenciais se dá em pequenas cavidades globulares, as glândulas, distribuídas pelo parênquima foliar da maioria das espécies. Produto originário do metabolismo secundário são responsáveis pela manutenção da vida do organismo, conferindo também, capacidade de adaptação às condições do meio, na defesa da planta contra insetos, resistência ao frio e redução da perda de água (DORAN citado por VITTI e BRITO, 2003).

Segundo a FARMACOPEIA Brasileira (1988) o eucalipto é uma droga constituída pelas folhas, contendo no mínimo 0,8% de óleo essencial, constituído por no mínimo 70% de 1,8-cineol. A PHARMACOPÉE Europée (1997) e a British Pharmacopeia estabelecem um teor máximo de felandreno de 5%, que deve estar em baixo teor devido a sua ação cardíaca indesejável.

As principais espécies de eucalipto produtoras de óleo essencial são: *E. globulus*, *E. fruticetorum* e *E. smithii*. Outras espécies são permitidas a extração de óleo essencial, desde que atendam os teores de 1,8-cineol e felandreno desejados (SIMÕES et al., 2000). De acordo com BALACS (1997) a espécie *Eucalyptus citriodora* apresenta maior proporção de citronela na constituição do óleo essencial, acarretando em odor diferente das demais espécies do gênero.

ROBBERS et al. (1997) classificam como principais áreas de produção de óleo essencial de eucalipto: Austrália, Brasil, Espanha, Portugal, Angola, África do Sul, China e Índia.

Os óleos essenciais de eucalipto explorados comercialmente são divididos de acordo com seu uso em três grupos principais: óleos medicinais, óleos industriais e óleos para perfumaria (VITTI e BRITO, 2003). Os óleos medicinais apresentam de 70% de 1,8-cineol e destinam-se a fabricação de produtos farmacêuticos. Os óleos industriais têm como componente principal o felandreno, utilizado como solvente e matéria prima na produção de desinfetantes e desodorizantes. E na perfumaria, são componentes de perfumes para diversos fins, sendo mais usados nos produtos de limpeza como sabões e desinfetantes (MOREIRA et al., 1978; ROBBERS et al., 1997; ESTANISLAU et al., 2001; VITTI e BRITO, 2003).

SILVA et al. (2003) propõem o desenvolvimento de novas classes de drogas analgésicas e antiinflamatórias com componentes do óleo essencial de espécies de eucaliptos, comprovando o uso popular deste gênero no Brasil. Os dados deste estudo, realizado em camundongos, indicam que óleos essenciais extraídos de *E.*

citriodora, *E. tereticornis* e *E. globulus* possuem efeitos analgésicos central e periférico.

De acordo com JASSIM et al. (2003), os óleo essenciais de eucalipto e de *Melaleuca alternifolia* exibiram um alto grau de atividade antiviral *in vitro* frente a suspensões de HSV-1 (vírus herpes simples 1) e HSV-2 (vírus herpes simples 2). Este trabalho também atribui a atividade anti-herpes ao terpinen-4-ol, presente no óleo essencial de eucalipto.

3.4.1.1 Eucaliptol (1,8-cineol)

O eucaliptol, 1,8-epóxi-p-mentano ou 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]-octano, também conhecido como 1,8-cineol ou cajeputol, apresenta a fórmula molecular $C_{10}H_{18}O$ e peso molecular igual a 154,24. É o principal componente do óleo essencial de eucalipto e obtido também de outras fontes. É um monoterpene, ou seja, um composto isoprenóide (C_5) constituído de 2 sub-unidades isopreno (C_{10}). Apresenta-se na forma de um líquido límpido, incolor, de odor aromático, canforáceo característico, de sabor picante seguido da sensação de frescor (FARMACOPÉIA Brasileira, 1959; THE MERCK INDEX, 1989).

O composto 1,8-cineol pode ser obtido por destilação fracionada e subsequente congelamento do produto destilado, por tratamento do óleo essencial com ácido fosfórico, decompondo-se a seguir o ácido fosfórico-cineol com água ou a partir do hidrato de terpina, como um dos produtos da desidratação durante o tratamento com ácidos (ROBBERS et al., 1997).

Por apresentar propriedades semelhantes às do seu óleo essencial original, o 1,8-cineol é empregado em vários produtos, tais como inalantes nasais e aerossóis com ação anti-séptica e ligeiramente anestésica no nariz e garganta. É também utilizado em preparações farmacêuticas de uso interno e externo, como estimulante da expectoração nos casos de bronquite, quando inalados na forma de vapor. Pode ser utilizado na forma de vaporizadores para ambientes e em cosméticos, loções e outras preparações técnicas (GUENTHER, 1963; ROBBERS et al., 1997).

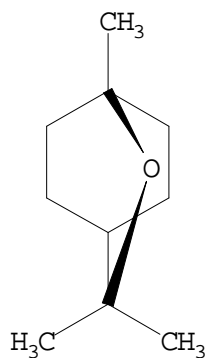
Os efeitos farmacológicos do 1,8-cineol foram estudados por SANTOS (1999 citado por FABROWSKI, 2002) em camundongos e concluiu que esta substância apresenta baixo potencial tóxico, redução dos danos gástricos, possui propriedades sedativa, anticonvulsivante e antiinflamatória, não demonstrando efeitos adversos na

reprodução das cobaias. SOUTHWELL et al. (1997) citado por BALACS (1997) afirmam que o 1,8-cineol não tem efeito irritante ou alergênico na pele, sendo que na concentração de 28,1% não foi observada irritação.

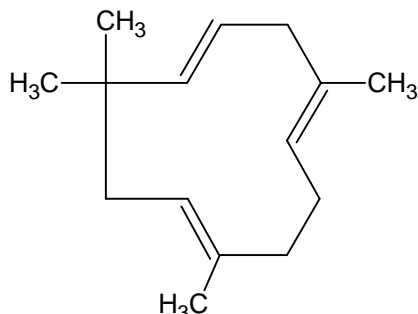
Acredita-se que o efeito antiinflamatório verificado no óleo de eucalipto seja, em parte, devido à presença do eucaliptol, atuando de forma a interagir com radicais livres contendo radical hidroxila, inibindo a produção de substâncias oxigenadas reativas (GRASSMANN et al., 2000).

Por inibir o metabolismo do ácido araquidônico e a produção de citocinas por monócitos, e havendo evidência sugestiva de atividade antiinflamatória do monoterpeneo 1,8-cineol na asma, JUERGENS et al. (2003) propoem o uso como agente mucolítico em doenças respiratórias crônicas e agudas.

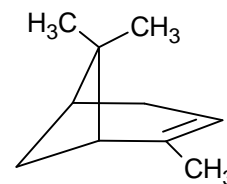
Principais compostos encontrados no óleo essencial de *Eucalyptus* spp.



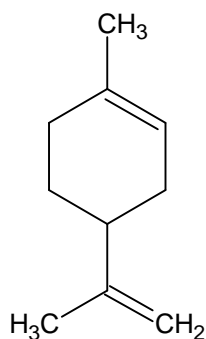
1,8-cineol



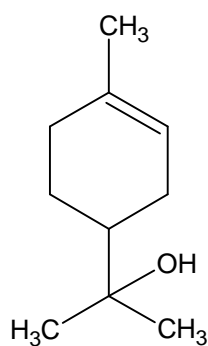
cariofileno



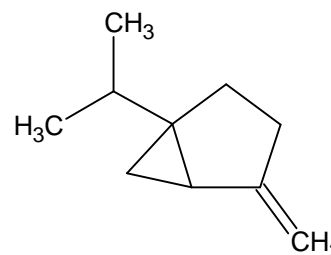
alfa-pineno



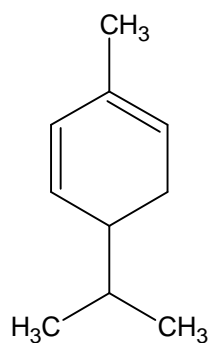
limoneno



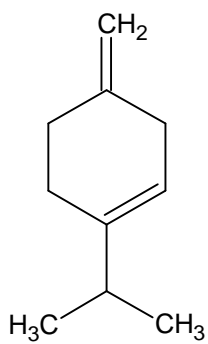
alfa-terpineol



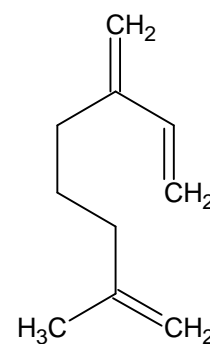
sabineno



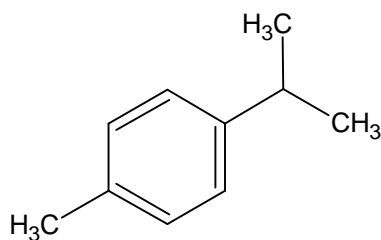
alfa-felandreno



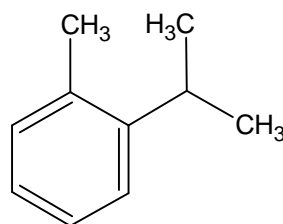
alfa-terpineno



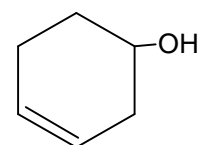
mirceno



para-cimeno



orto-cimeno



3-ciclohexen-1-ol

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os fármacos usados no tratamento de doenças infecciosas são denominados agentes antimicrobianos. Este termo teve início com a descoberta da penicilina por Fleming em 1929, primeiro antibiótico a ser produzido em escala industrial (ANDREAZZA, 2000; FRANCO, 2003; SOUZA et al., 2003).

O termo antibiótico pode ser definido amplamente como substância biossintetizada por um ser vivo com capacidade de inibir microorganismos e/ou bloquear o crescimento e replicação celulares, em concentrações relativamente pequenas. Do mesmo modo, a denominação quimioterápico caracteriza o tratamento de doenças por meio de substâncias químicas obtidas sinteticamente. Portanto, o que diferencia os dois termos acima citados, utilizados muitas vezes como sinônimos, é a origem dos mesmos (SILVA, 1998).

Algumas classificações são propostas para os antibióticos, de acordo com diferentes critérios. SILVA (1998) classifica-os de acordo com sua química, origem, farmacocinética e farmacodinâmica. SOUZA et al. (2003) divide os antimicrobianos como específicos, os quais atuam sobre o organismo invasor, sem afetar o hospedeiro; e os inespecíficos, que são compostos capazes de matar ou inibir o crescimento microbiano *in vitro*, sendo considerados como desinfetantes, anti-sépticos, germicidas, biocidas, esterilizantes e desinfetantes. Estes não são chamados de quimioterápicos e são de uso exclusivamente tópico.

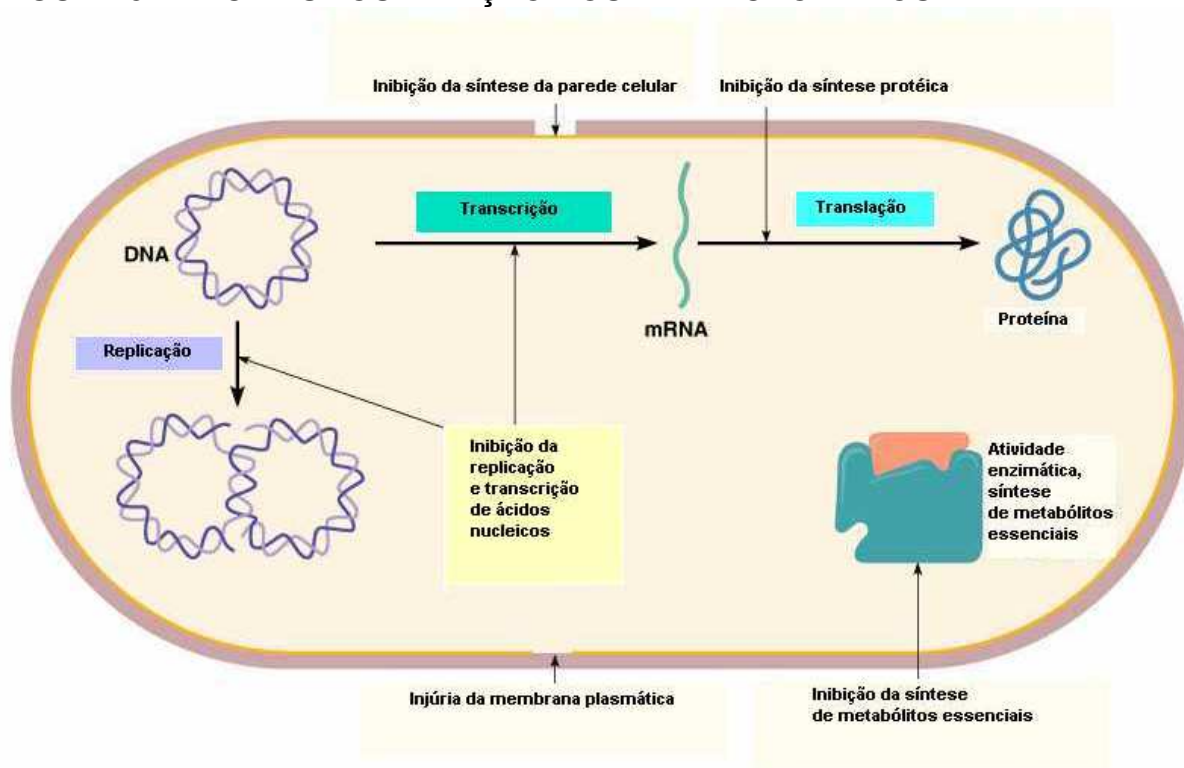
Outra classificação baseia-se nos testes *in vitro* da atividade dos agentes antimicrobianos. Nesta, são classificados como agentes bactericidas, matando os microorganismos durante a fase de crescimento logarítmico, onde há aumento da susceptibilidade devido ao aumento da atividade metabólica; ou bacteriostáticos, que atuam apenas prevenindo o crescimento microbiano (SILVA, 1998; SOUZA et al., 2003).

Os mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos incluem os principais pontos: inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana; lesão da membrana citoplasmática, interferindo nas funções desta; interferência na síntese de ácido nucléico e proteínas quer seja na interferência da síntese e replicação de DNA, ou na inibição da RNA-polimerase dependente de DNA; e inibição competitiva da síntese de metabólitos essenciais (PELCZAR et al., 1996; KONEMAN et al.,

1997; SILVA, 1998; TORTORA et al., 2001). A FIGURA 5 ilustra alguns mecanismos de ação antimicrobiana e a TABELA 2 mostra alguns antibióticos utilizados na quimioterapia de infecções bacterianas e fúngicas, suas atividade e efeito.

Alguns microorganismos desenvolvem resistência aos antimicrobianos utilizados. Os principais mecanismos desta resistência são realizados através de: inativação enzimática, como penicilinases, cefalosporinases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; receptores alterados, expressas por alterações ribossômicas, alterações de DNA girase, enzimas bacterianas alteradas; e transporte alterado do antibiótico, por alterações nas proteínas da membrana externa, força protônica reduzida e transporte ativo a partir da célula bacteriana (KONEMAN et al., 1997).

FIGURA 5 - MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS



(FONTE: CUMMINGS, 2004)

TABELA 2 - ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NA QUIMIOTERAPIA DE INFECÇÕES BACTERIANAS E FÚNGICAS

Antibiótico	Atividade	Efeito
Inibidores da Síntese da parede celular		
β-lactâmicos		
Penicilinas naturais		
Penicilina G	Bactérias Gram-positivas, administração injetável	Bactericida
Penicilina V	Bactérias Gram-positivas, administração oral	Bactericida
Penicilinas sintéticas		
Ampicilina	Amplo espectro de ação	Bactericida
Meticilina	Resistente a penicilinase	Bactericida
Monobactâmicos		
Aztreonam	Bactérias Gram-negativas incluindo <i>Pseudomonas</i> spp.	Bactericida
Cefalosporinas	Resistente a penicilinase, bactérias Gram-negativas com amplo espectro de ação	Bactericida
Carbapenens		
Imipenem	Espectro de ação muito amplo	Bactericida
Bacitracina	Bactérias Gram-negativas, administração tópica	Bactericida
Vancomicina	Bactérias Gram-positivas resistentes a penicilina, incluindo estafilococos produtores de penicilinase e enterococos	Bactericida
Isoniazida	Micobactérias (tuberculose), inibe a síntese de ácido mucolítico componente da parede celular	Bacteriostático
Etambutol	Micobactérias (tuberculose), inibe a incorporação de ácido mucolítico na parede celular	Bacteriostático
Inibidores da síntese protéica		
Aminoglicosídeos		
Estreptomina	Micobactérias (tuberculose), amplo espectro de ação	Bactericida
Espectinomicina	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente à penicilina	Bactericida
Neomicina	Inibe bactérias intestinais, amplo espectro de ação, de uso tópico	Bactericida
Canamicina	Maioria das bactérias Gram-negativas, incluindo <i>Pseudomonas</i> .	Bactericida
Gentamicina	Ativo contra uma variedade de bactérias Gram-negativas, incluindo <i>Pseudomonas</i> spp.; Também organismos como <i>Mycoplasma</i> , <i>Rickettsia</i> e <i>Chlamydia</i> .	Bactericida
Tetraciclina	Largo espectro – muitas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; também organismos como <i>Mycoplasma</i> , <i>rickettsia</i> e <i>Chlamydia</i> .	Bacteriostático
Macrolídeos		
Eritromicina	Bactérias Gram-positivas comuns, alternativa a penicilina	Bacteriostático
Lincomicina	Bactérias Gram-positivas	Bacteriostático
Cloranfenicol	Largo espectro; infecções graves por Gram-negativas	Bacteriostático
Streptograminas		
Quinuprestina e dalfopristina	Inibe a síntese protéica atacando os ribossomos	
Lesão da membrana plasmática		
Polipeptídeos		
Colistina (polimixina E)	Maioria das bactérias Gram-negativas, incluindo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Bactericida
Polimixina B	Bactérias Gram-negativas, incluindo <i>Pseudomonas</i> spp.; menos efetivo do que colistina	Bactericida

Antibiótico	Atividade	Efeito
Inibidores da síntese de ácido nucléico		
Rifampina	Inibe a síntese de mRNA, uso no tratamento de tuberculose	bactericida
Quinolonas e fluoroquinolonas		
Ácido nalidíxico, norfloxacin, ciprofloxacn	Inibe a síntese de DNA, amplo espectro de ação, tratamento de infecções urinárias	bactericida
Inibidores competitivos da síntese de metabólitos essenciais		
Sulfonamidas		
Sulfametaxazol trimetopim	- Ampla espectro, uso combinado	bacteriostático
Antifúngicos		
Polienos		fungicida
Nistatina	Infecções fúngicas, particularmente lesões da boca, pele, do intestino e da vagina por Cándida	Fungicida
Anfotericina B	Infecções micóticas sistêmicas, promove injúria da membrana plasmática	Fungicida
Griseofulvina	Infecções fúngicas da pele, promove inibição dos microtúbulos mitóticos	Fungistático
Azols		
Miconazol	Inibição da síntese da membrana plasmática. Utilizado em infecções fúngicas da pele e mucosas	Fungicida
Cetoconazol	Inibição da síntese da membrana plasmática. Uso tópico em infecções fúngicas da pele e oral para infecções fúngicas sistêmicas	Fungistático
Flucitosina	Inibe a síntese de RNA e DNA. Uso em infecções fúngicas sistêmicas	Fungicida

(PELCZAR et al., 1996; TORTORA et al., 2001)

3.5.1 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios para verificação da atividade antimicrobiana *in vitro* seguem diferentes técnicas e métodos, como por exemplo (HAMBURGER et al., 1987; JANSSEN, 1989; ISENBERG, 1992; ELLOF, 1998; KONEMAN et al., 1997; COWAN, 1999; SOUZA et al., 2003):

Métodos de difusão em ágar: a substância pesquisada é colocada em um reservatório, podendo este ser disco de papel, cavidade no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície, em contato com meio de cultura sólido previamente inoculado com o microorganismo teste. A leitura, que é qualitativa, é realizada após o período de incubação, medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento microbiano formado.

Métodos de diluição: uma quantidade de amostra é dissolvida homogeneamente em um meio sólido ou líquido. São feitas diluições da amostra original, inoculando-se o microorganismo teste. A leitura é realizada pós o período de incubação considerando a primeira diluição em que não se observa turvação. Através deste método, que é qualitativo, pode-se determinar a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano.

Métodos de bioautografia: a amostra complexa é eluída em cromatografia em camada delgada e posteriormente imersa em um meio de cultura sólido fundido previamente inoculado com o microorganismo teste. Após o período de incubação verifica-se a formação do halo de inibição no composto com atividade antimicrobiana presente na amostra.

Os microorganismos testados são preferencialmente cepas padronizadas, podendo ser utilizados microorganismos isolados de materiais biológicos. Geralmente são selecionados gêneros e espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungos (JANSSEN, 1989; SOUZA et al., 2003).

3.6 PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DE EUCALIPTOS

O impacto da crescente resistência dos microrganismos a medicamentos e substâncias específicas intensificou a pesquisa para o desenvolvimento de novas drogas que sejam capazes de combater as estratégias de adaptação que esses organismos elaboram (PRATES et al., 2000).

Por um longo período de tempo as plantas foram utilizadas para a pesquisa de produtos naturais para a manutenção da saúde humana, especialmente na última década em que se observou um intenso estudo acerca de terapias naturais. O uso de extratos e componentes químicos vegetais, ambos com propriedade antimicrobiana, vem contribuindo para um resultado satisfatório em tratamentos terapêuticos (NASCIMENTO et al., 2000).

Os vegetais possuem várias vias metabólicas secundárias que originam compostos, como, por exemplo, os óleos essenciais, que exercem funções de defesa contra predadores. Outros bioativos fitoquímicos podem ser citados com atividade antimicrobiana, tais como: compostos fenólicos e fenóis ácidos, quinonas, flavonóides, taninos, terpenóides e óleos essenciais (COWAN, 1999).

Os óleos essenciais, por serem uma mistura complexa de compostos, não apresentam um mecanismo de ação antimicrobiana exatamente definido. Existem alguns mecanismos propostos, como desnaturação protéica, inibição enzimática e desintegração da membrana; ocorrendo uma provável interação entre os componentes do óleo, acarretando em sinergismo e/ou antagonismo (JANSSEN, 1989).

JANSSEN (1989) ainda comenta que os ensaios antimicrobianos em óleos essenciais seguem objetivos específicos, tais como: a verificação de atividade antimicrobiana de um determinado óleo ou de seus constituintes; a determinação de atividade anti-séptica ou desinfetante e de propriedades conservantes de alimentos; o estudo do possível papel dos óleos essenciais em interações biológicas e suas ações terapêuticas.

Alguns trabalhos têm demonstrado a atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes espécies de *Eucalyptus* frente a vários microorganismos (NASCIMENTO et al., 2000; FERESIN et al., 2002).

Na espécie *E. dives*, foi observado que o teste frente a alguns microorganismos individualmente, do óleo essencial total e fracionado mostrou sinergismo e/ou antagonismo, promovendo maior e/ou menos atividade antimicrobiana (DELASQUIS et al., 2002).

ESTANISLAU et al., 2001 verificaram que o óleo essencial das espécies *E. saligna*, *E. glandis*, *E. citriodora* apresentaram atividade frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O:158 e *Salmonella choleraesuis*, fato não observado com o óleo essencial *E. microcorys*, que não apresentou atividade frente a *Staphylococcus aureus* e *E. cloeziana*, inativo frente a *Escherichia coli* O:158 e *Salmonella choleraesuis*.

Os óleos essenciais de várias espécies de *Eucalyptus* provenientes da República do Congo foram avaliados frente a microorganismos de origem patológica por CIMANGA et al. (2002), sendo as espécies *E. camaldulensis* e *E. teriticornis* mais ativas, principalmente frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Este estudo ainda atribui a atividade observada a componentes presentes em menor concentração no óleo essencial.

Extratos de *Eucalyptus* spp apresentaram atividade frente a fungos do solo brasileiro (NASCIMENTO et al., 2000). Também foi verificada a atividade antimicrobiana de 5 espécies de *Eucalyptus* da Nigéria comprovando o uso tradicional do óleo essencial (OYEDEJI et al., 1999).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

As folhas e flores de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex. Benth., Myrtaceae foram coletadas de planta adulta localizada no Centro Politécnico, Campus da Universidade Federal do Paraná (UFPR), município de Curitiba. Foi depositada excicata sob o número 47.741 no Herbário do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

O material coletado foi mantido à temperatura ambiente e em local seco para que se proceda a secura do mesmo.

4.2 PESQUISA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE

4.2.1 Extração do óleo essencial

Foram utilizados dois métodos de extração de óleo essencial para efeito comparativo: hidrodestilação e extração em solvente orgânico.

4.2.1.1 Extração por hidrodestilação direta por arraste de vapor

O óleo essencial obtido por hidrodestilação direta por arraste de vapor das folhas secas foi obtido em aparelho de Clevenger (USP XXII, 1990). Foram coletadas amostras de óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* em diferentes tempos de extração visando acompanhar a variação da composição, das características físico-químicas e da atividade antimicrobiana do mesmo.

Para tanto, foram utilizados 200 g de folhas secas a temperatura ambiente e fragmentadas, das quais foram extraídas quatro frações distintas no período de 3 horas (FRANCO, 2003):

F 1: fração de 0 a 15 minutos;

F 2: fração de 15 minutos à 1 hora;

F 3: fração de 1 a 2 horas;

F 4: fração de 2 a 3 horas.

Além das frações do óleo acima citadas, procedeu-se também a coleta do óleo essencial total após três horas de hidrodestilação, ao qual denominou-se óleo essencial total (T).

4.2.1.2 Extração por solvente orgânico (GUENTHER, 1977b)

Foram macerados 600 g de folhas secas e fragmentadas de *E. cinerea* em solvente n-hexano durante sete dias à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido por três vezes, sendo o solvente evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, e o resíduo final foi denominado de concreto (S).

A partir do concreto, foi obtido o óleo essencial por hidrodestilação em aparelho de Clevenger (USP XXII, 1990) durante 3 horas. Este foi denominado óleo essencial do concreto (S), sendo posteriormente armazenado para determinação da composição e características físico-químicas.

4.2.2 Determinação do rendimento do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial foi dado em % volume/massa, ou seja, volume (mL) de óleo essencial por massa (g) de material vegetal (FARMACOPEIA Brasileira, 1988; FABROWSKI, 2002).

4.2.3 Análises físico-químicas do óleo essencial

Foram realizadas no óleo essencial T e nas suas frações (F1, F2, F3 e F4) as análises das seguintes constantes físico-químicas: densidade relativa, índice de refração e solubilidade em etanol.

4.2.3.1 Determinação da densidade relativa d_{20}^{20}

A densidade relativa (d_{20}^{20}) foi determinada conforme FARMACOPÉIA Brasileira (1988), que se refere ao quociente entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C. Foram utilizados picnômetros conforme a quantidade de óleo essencial disponível. Para amostras obtidas com menos de 1 mL na destilação, utilizou-se tubo capilar previamente calibrado, repetindo o mesmo procedimento utilizado para o picnômetro. Durante o teste as amostras foram mantidas a temperatura de 20 °C.

4.2.3.2 Determinação do índice de refração

Segundo a FARMACOPÉIA Brasileira (1988) o índice de refração de uma substância é a relação entre a velocidade da luz no ar e a sua velocidade nesta substância. Esta determinação foi efetuada em refratômetro modelo ausJENA em função da luz de sódio no comprimento de onda 589,3 nm (raia D), que foi ajustado com água destilada (com índice de refração de 1,3330), sendo as amostras mantidas a 20 °C.

4.2.3.3 Determinação da solubilidade em etanol

A solubilidade do óleo essencial foi realizada em etanol 70%, 80%, 90% e 96,5%, conforme PHARMACOPEA Hevetica (1993). Esta solubilidade consiste no volume de Etanol necessário para solubilizar 1 volume de óleo essencial (v/v).

4.2.4 Análises cromatográficas do óleo essencial

4.2.4.1 Cromatografia em camada delgada

A técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) foi aplicada no óleo essencial (T e S) e nas frações do óleo essencial (F1 – F4), com diferentes fases móveis para óleos essenciais.

Foram utilizadas placas preparadas em vidro com sílica gel G e cromatoplasmas de sílica GF₂₅₄, 0,2 mm (MERCK®). Como substância de referência foi utilizado padrão de 1,8-cineol. Foram selecionadas algumas fases móveis, descritas na TABELA 3 segundo GUENTHER (1977), MOREIRA et al. (1980) e WAGNER (1983).

TABELA 3 - FASES E REVELADORES UTILIZADOS PARA CCD DO ÓLEO ESSENCIAL

FASE FIXA	FASE MÓVEL	REVELADOR
-Sílica G -Sílica (MERCK®).	n-hexano/acetato de etila (85:15)	
	n-hexano/acetato de etila (90:10)	
	n-hexano/acetato de etila (93:7)	-vanilina sulfúrica*
	n-hexano/Acetato de etila/éter etílico (85:15:0,5)	-anisaldeído sulfúrico*
	n-hexano/éter etílico/acetato de etila (80:20:5)	-ácido sulfúrico a 5% em etanol*
	GF ₂₅₄	-vanilina fosfórica*
	tolueno/acetato de etila (85:15)	
	tolueno/acetato de etila (90:10)	* 120°, 10 minutos.
	tolueno/acetato de etila (93:7)	

4.2.4.2 Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Massa

As amostras de óleo essencial obtido das folhas de *E. cinerea* foram injetadas para Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Massa nas seguintes condições:

Cromatógrafo a gás 6890 Agilent e Espectrofotômetro de Massa 5973 Agilent, com biblioteca NIST 98;

Coluna: HP5;

Gás de arraste: Hélio;

Fluxo: 0,8 mL/minuto;

Temperatura do injetor: 250 °C;

Temperatura inicial: 40 °C;

Rampa de Aquecimento; 2 °C/minuto;

Temperatura final: 250 °C;

Temperatura do auxiliar: 280 °C;

Amostras diluídas em 1 mL de etanol e volume injetado 20 µl na razão de Split 100:1;

Tempo total de análise foi de 58 minutos.

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DE *Eucalyptus cinerea*, F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE.

4.3.1 Extração por maceração do material vegetal

Foram submetidas à extração por maceração 150 g de material vegetal seco e fracionado com etanol 96% por 72 horas, e sucessivamente com etanol 70% por 72 horas e etanol 50% por 72 horas. Procedido o esgotamento total, o marco foi desprezado e o extrato hidroalcoólico bruto foi separado para o ensaio de atividade antimicrobiana (NAKASHIMA, 1993).

4.4 ENSAIOS FITOQUÍMICOS DAS FOLHAS DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE (MOREIRA, 1979; NAKASHIMA, 1993)

4.4.1 Extrato aquoso a 20% (m/v)

O extrato aquoso a 20% foi preparado pelo método de maceração em banho-maria a 60 °C utilizando como líquido extrator água destilada. O extrato foi filtrado em papel de filtro. Preparado o extrato, foram determinados o resíduo seco, pH e as seguintes características organolépticas: cor, odor e sabor.

4.4.1.1 Teor de sólido

Foram adicionados 10 mL do extrato aquoso a uma cápsula de porcelana previamente seca e pesada e levou-se à secura em banho-maria a 60°C. Em seguida a cápsula foi colocada em estufa por 10 minutos, transferida para um dessecador e anotado o peso. Procedeu-se o cálculo, o resultado é dado em percentagem de peso de extrato seco em relação à amostra do vegetal.

4.4.1.2 Abordagem fitoquímica sistemática

4.4.1.2.1 Pesquisa de glicosídeos antociânicos

Foram separadas três porções de 5 mL do extrato aquoso em três tubos de ensaio. O primeiro foi acidificado com ácido sulfúrico *N* até pH 1; o segundo foi

alcalinizado com hidróxido de sódio *N* até pH 10 e o terceiro foi neutralizado (pH 7). A presença de glicosídeos antociânicos foi determinada de acordo com o aparecimento de colorações, que podem variar de acordo com o pH (ácido, básico ou neutro).

4.4.1.2.2 Pesquisa de glicosídeos saponínicos

Este ensaio baseia-se na propriedade emulsiva das saponinas em soluções aquosas, nas quais a tensão superficial é elevada. Os tubos utilizados na pesquisa de glicosídeos antociânicos foram agitados energeticamente por 5 minutos. Em seguida os tubos foram deixados em repouso por 30 minutos, medindo-se a altura de espuma formada em cada um dos tubos agitado antes e após este período. A presença de espuma persistente indica a presença de glicosídeos saponínicos.

4.4.1.2.3 Pesquisa de aminogrupos

Foram concentrados 5 mL de extrato aquoso até 1 mL em banho-maria a 60 °C. Foram depositadas em cromatoplaça de CCD (sílica gel G MERCK®), em dois pontos previamente determinados, 3 gotas do extrato concentrado cada. Deixou-se secar e colocou-se uma gota do reativo de Ninhidrina sobre uma das manchas e outra gota em outro ponto que não continha o extrato. Aqueceu-se em estufa a 90-100°C, durante 15 minutos. O desenvolvimento de coloração azul-violácea no ponto contendo o extrato e o reativo de Ninhidrina indica presença de aminogrupos, com exceção de prolina e hidroxiprolina que desenvolvem cor amarela.

4.4.1.2.4 Pesquisa de ácidos fixos

Em um balão foram adicionados 20 mL do extrato aquoso e 2 mL hidróxido de sódio *N*, acoplou-se ao condensador e deixou-se por 30 minutos em aquecimento sob refluxo. Esfriou-se e acidificou-se com ácido sulfúrico *2N*. Em seguida, extraiu-se com 10 mL de éter etílico por três vezes. O extrato etéreo foi reunido, tratado com carvão ativo, filtrado e evaporado em banho-maria a 60 °C. O resíduo foi deixado na estufa por 10 minutos. Posteriormente esfriou-se e adicionou-se 5 mL de solução aquosa hidróxido de amônio *N*. Utilizando uma tira de papel filtro, concentrou-se duas manchas (3 gotas em cada mancha), secando-se em estufa a 90-100 °C por 10

minutos. Foi gotejado sobre uma das manchas o reativo de NESSLER (que identifica a amônia associada em forma de sal amoniacal). A formação de coloração marrom indica presença de ácidos fixos, com exceção de ácido fórmico, propiônico e aminoacético que não formam manchas, pois não fixam a amônia.

4.4.1.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis

Foram transferidos para um tubo de ensaio 5 mL do extrato aquoso e 1 mL de ácido sulfúrico *N*. Suspendeu-se uma tira de papel universal para pH com o auxílio de uma rolha e deixou-se em banho-maria por 30 minutos a 60 °C. Após este período, verificou-se a mudança de pH, o que indica a presença de ácidos voláteis.

4.4.1.2.6 Pesquisa de taninos

4.4.1.2.6.1 Reações com sais de ferro III

a) Reação com FeCl₃ a 1% (m/v)

A 2 mL do extrato aquoso foram adicionadas 3 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1% (m/v). O desenvolvimento de coloração verde a marrom ou formação de precipitado indicam a presença de compostos tanóides.

b) Reação com sulfato de ferro e amônio a 1% (m/v)

A 2 mL do extrato aquoso foram adicionadas 3 gotas de solução aquosa de sulfato de ferro de amônio a 1% (m/v). O desenvolvimento de coloração verde a marrom ou formação de precipitado indicam a presença de compostos tanóides.

4.4.1.2.6.2 Reação com gelatina a 2,5% em cloreto de sódio a 0,9%

Foram transferidos para três tubos de ensaio, respectivamente: 0,5; 1 e 2 mL do extrato aquoso. Foram adicionados 2 mL de solução de gelatina a 2,5% em cloreto de sódio a 0,9% em cada tubo de ensaio. A formação de precipitado nos tubos acima mencionados indica a presença de taninos.

4.4.1.2.6.3 Reação com cloridrato de emetina a 1% (m/v)

Foram adicionadas a 1 mL do extrato aquoso 4 mL de água destilada e duas gotas da solução aquosa de cloridrato de emetina a 1%. O desenvolvimento de precipitado indica a reação positiva.

4.4.1.2.6.4 Reação com cianeto de potássio a 10% (m/v)

Foi adicionada a 3 mL de extrato aquoso uma gota de ácido acético a 10% em 1 mL da solução aquosa de cianeto de potássio a 10%. O desenvolvimento de coloração com tonalidade rósea indica a presença de taninos.

4.4.1.2.6.5 Reação com ácido nitroso

Foram transferidas para uma cápsula de porcelana 5 mL de extrato aquoso juntamente com alguns cristais de nitrito de potássio e 5 gotas de solução aquosa de ácido sulfúrico a 0,5%. O desenvolvimento de coloração rósea que passa à púrpura a índigo indica a presença de ácido elágico.

4.4.1.2.6.6 Reação de formol-clorídrico

Foram transferidos para um balão de refluxo de 100 mL de capacidade, 30 mL de extrato aquoso, 6 mL de formaldeído e 4 mL de ácido clorídrico 37% fumegante. Acoplou-se o balão ao condensador e deixou-se em aquecimento sob refluxo por 1 hora. O resíduo foi filtrado e lavado em etanol a 70 °GL para retirar o excesso de formaldeído e ácido clorídrico.

- Pesquisa de taninos condensados: ao resíduo (isento de formol-clorídrico) foram adicionadas gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio a 5%. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos condensados.

- Pesquisa de taninos hidrolisáveis: ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio e gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. O desenvolvimento de coloração azul indica presença de taninos hidrolisáveis.

4.4.1.2.7 Pesquisa de alcalóides

A determinação qualitativa de alcalóides do extrato é realizada com a utilização de reativos considerados gerais para alcalóides: mercúrio tetraiodeto de

potássio (Reativo de Mayer); tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff); (Reativo de Bouchardat) e ácido sílico túngico (Reativo de Bertrand).

Foram evaporados 25 mL do extrato aquoso até *secura* em banho-maria a 60 °C, sendo o resíduo dissolvido em 1 mL de etanol absoluto e adicionados 10 mL de ácido clorídrico a 1%. Este extrato hidrocloreídrico foi distribuído em 5 tubos de ensaio em alíquotas de 0,5 mL, efetuando-se a pesquisa de alcalóides com os reativos gerais: Reativo de Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand. A formação de precipitados de colorações: branco, tijolo, alaranjado e branco, respectivamente, aos reativos gerais anteriormente citados indicam a presença de alcalóides.

4.4.1.2.8 Pesquisa de glicosídeos flavônicos

4.4.1.2.8.1 Reação de Shinoda, cianidina ou redução

Uma alíquota de 1 mL do extrato aquoso foi transferida para tubo de ensaio e adicionados 50 mg de limalha de magnésio e 0,5 mL de ácido clorídrico fumegante. O desenvolvimento de coloração rósea a vermelha indica presença de glicosídeos flavônicos.

4.4.1.2.9 Pesquisa de glicosídeos antraquinônicos

Foram transferidos 20 mL do extrato aquoso para um balão e adicionados de 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. Acoplado um condensador, o líquido foi deixado uma hora em refluxo e posteriormente filtrado, adicionando 30 mL de água destilada. Transferiu-se para um funil de separação, extraído com 10 mL de éter etílico por duas vezes. A fase orgânica foi separada e concentrada em banho-maria a 60 °C até 5 mL e transferida para um tubo de ensaio, em que foram adicionados 5 mL de solução de hidróxido de amônio N, sendo agitada lentamente. O desenvolvimento de coloração rósea revela a presença de antraquinonas (formação de fenolatos hidrossolúveis).

4.4.2 Extrato hidroalcoólico a 20% (m/v)

O extrato hidroalcoólico a 20% (m/v) foi preparado pelo método de maceração em banho-maria a 60 °C utilizando como líquido extrator solução etanol 70 °GL. O

extrato foi filtrado em papel de filtro. Preparado o extrato, foram determinados o teor de sólidos, pH e as seguintes características organolépticas: cor, odor e sabor.

4.4.2.1 Teor de sólido

Foram adicionados 10 mL do extrato hidroalcoólico a uma cápsula de porcelana previamente seca e pesada e levou-se à secura em banho-maria a 60 °C. Em seguida a cápsula foi colocada em estufa por 10 minutos, transferida para um dessecador e anotado o peso. Procedeu-se o cálculo, o resultado é dado em percentagem de peso de extrato seco em relação à amostra do vegetal.

4.4.2.2 Abordagem fitoquímica sistemática

4.4.2.2.1 Pesquisa de glicosídeos antociânicos

Realizado de acordo com a metodologia descrita em 4.4.1.2.1.

4.4.2.2.2 Pesquisa de glicosídeos saponínicos

Realizado de acordo com a metodologia descrita em 4.4.1.2.2.

4.4.2.2.3 Pesquisa de aminogrupos

Realizado de acordo com a metodologia descrita em 4.4.1.2.3.

4.4.2.2.4 Pesquisa de taninos

4.4.2.2.4.1 Reações com sais de ferro III

a) Reação com FeCl_3 a 1% (m/v)

A 2 mL do extrato hidroalcoólico foram adicionadas 3 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1% (m/v). O desenvolvimento de coloração verde a marrom ou formação de precipitado indicam a presença de compostos tanóides.

b) Reação com sulfato de ferro e amônio a 1% (m/v)

A 2 mL do extrato hidroalcoólico foram adicionadas 3 gotas de solução aquosa de sulfato de ferro de amônio a 1% (m/v). O desenvolvimento de coloração

verde a marrom ou formação de precipitado indicam a presença de compostos tanóides.

4.4.2.2.4.2 Reação com gelatina a 2,5% em cloreto de sódio a 0,9%

Foram transferidos para três tubos de ensaio, respectivamente: 0,5; 1 e 2 mL do extrato hidroalcoólico. Foram adicionados 2 mL de solução de gelatina a 2,5% em cloreto de sódio a 0,9% em cada tubo de ensaio. A formação de precipitado nos tubos acima mencionados indica a presença de taninos.

4.4.2.2.4.3 Reação com cloridrato de emetina a 1% (m/v)

Foram adicionadas a 1 mL do extrato hidroalcoólico 4 mL de água destilada e duas gotas da solução aquosa de cloridrato de emetina a 1%. O desenvolvimento de precipitado indica a reação positiva.

4.4.2.2.4.4 Reação com cianeto de potássio a 10% (m/v)

Foi adicionada a 3 mL de extrato hidroalcoólico uma gota de ácido acético a 10% em 1 mL da solução aquosa de cianeto de potássio a 10%. O desenvolvimento de coloração com tonalidade rósea indica a presença de taninos.

4.4.2.2.4.5 Reação com ácido nitroso

Foram transferidas para uma cápsula de porcelana 5 mL de extrato hidroalcoólico juntamente com alguns cristais de nitrito de potássio e 5 gotas de solução aquosa de ácido sulfúrico a 0,5%. O desenvolvimento de coloração rósea que passa à púrpura a índigo indica a presença de ácido elágico.

4.4.2.2.4.6 Reação de formol-clorídrico

Foram transferidos para um balão de refluxo de 100 mL de capacidade, 30 mL de extrato hidroalcoólico, 6 mL de formaldeído e 4 mL de ácido clorídrico 37% fumegante. Acoplou-se o balão ao condensador e deixou-se em aquecimento sob refluxo por 1 hora. O resíduo foi filtrado e lavado em etanol a 70 °GL para retirar o excesso de formaldeído e ácido clorídrico.

- Pesquisa de taninos condensados: ao resíduo (isento de formol-clorídrico) foram adicionadas gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio a 5%. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos condensados.

- Pesquisa de taninos hidrolisáveis: ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio e gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. O desenvolvimento de coloração azul indica presença de taninos hidrolisáveis.

4.4.2.2.5 Pesquisa de alcalóides

A determinação qualitativa de alcalóides do extrato é feita com a utilização de reativos considerados gerais para alcalóides: mercúrio tetraiodeto de potássio (Reativo de Mayer); tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff); (Reativo de Bouchardat) e ácido sílico túngico (Reativo de Bertrand).

Foram evaporados 25 mL do extrato hidroalcoólico até *secura* em banho-maria a 60 °C, sendo o resíduo dissolvido em 1 mL de etanol absoluto e adicionados 10 mL de ácido clorídrico a 1%. Este extrato hidrocloreídrico foi distribuído em 5 tubos de ensaio em alíquotas de 0,5 mL, efetuando-se a pesquisa de alcalóides com os reativos gerais: Reativo de Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand. A formação de precipitados de colorações: branco, tijolo, alaranjado e branco, respectivamente, aos reativos gerais anteriormente citados indicam a presença de alcalóides.

4.4.2.2.6 Pesquisa de glicosídeos flavônicos

4.4.2.2.6.1 Reação de Shinoda, cianidina ou redução

Uma alíquota de 1 mL do extrato hidroalcoólico foi transferida para tubo de ensaio e adicionados 50 mg de limalha de magnésio e 0,5 mL de ácido clorídrico fumegante. O desenvolvimento de coloração rósea a vermelha indica presença de glicosídeos flavônicos.

4.4.2.2.6.2 Reação oxalo-bórica

Foram evaporados 2 mL do extrato hidroalcoólico à *secura* em tubo de ensaio, sendo adicionado ao resíduo 5 gotas de acetona, 30 mg de ácido

bórico:ácido oxálico (1:1) e então, agitado. Esta mistura foi evaporada à secura e ao resíduo foram adicionados 5 mL de éter etílico e novamente agitado. A solução etérea foi examinada sob luz ultravioleta (365 nm) e apresentando fluorescência indica a presença de glicosídeos flavônicos.

4.4.2.2.7 Pesquisa de cumarinas

Foram transferidos 20 mL de extrato hidroalcoólico e 5 mL de ácido clorídrico *N* concentrados em banho-maria até 5 mL. Este resíduo foi submetido à extração líquido-líquido com éter etílico (3 x 5 mL). O extrato etéreo foi reduzido em banho-maria até 5 mL. Uma alíquota de 3 mL desse extrato foi transferida para um tubo de ensaio e adicionado 2 mL de hidróxido de amônio concentrado. Depois de agitado, o tubo de ensaio foi examinado sob ultravioleta (365 nm) por 15 minutos. O desenvolvimento de fluorescência azul ou amarela em exposição à luz ultravioleta indica a presença de cumarinas.

Paralelamente, foram marcados com o resto do extrato etéreo, 3 pontos concentrados com manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro em papel de filtro. As manchas 1 e 2 foram tratadas com hidróxido de sódio *N* e sobre a 1 ainda foi colocada uma moeda e examinada na câmara de ultravioleta (365 nm), novamente deixando em exposição por 15 minutos. O desenvolvimento de fluorescência com coloração azul ou verde amarelada na mancha dois demonstra a presença de cumarinas.

4.4.2.2.8 Pesquisa de glicosídeos antraquinônicos

Foram transferidos 20 mL do extrato hidroalcoólico para um balão e adicionados de 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. Acoplado um condensador, o líquido foi deixado uma hora em refluxo e posteriormente filtrado, adicionando 30 mL de água destilada. Transferiu-se para um funil de separação, extraído com 10 mL de éter etílico por duas vezes. A fase orgânica foi separada e concentrada em banho-maria a 60 °C até 5 mL e transferida para um tubo de ensaio, em que foram adicionados 5 mL de solução de hidróxido de amônio *N*, sendo agitada lentamente. O desenvolvimento de coloração rósea revela a presença de antraquinonas (formação de fenolatos hidrossolúveis).

4.4.2.2.9 Pesquisa de esteróides e triterpenos

Foram evaporados 30 mL do extrato hidroalcoólico até a secura em banho-maria a 60 °C. O resíduo foi dissolvido com 5 mL de clorofórmio filtrado. Foram aliqotados 0,1; 0,5; 1,0 mL do extrato clorofórmico para 3 tubos de ensaio e o volume em todos os tubos foi completado para 2 mL com clorofórmio.

4.4.2.2.9.1 Reação de Liberman-Bouchard

Para essa reação, foi adicionado aos tubos de ensaio anteriores 1 mL de anidrido acético e lentamente 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A coloração rósea ou azul esverdeada indica a presença de núcleo esteroidal e o aparecimento de coloração vermelha, púrpura ou violácea indicam a presença de policíclicos triterpênicos.

4.4.2.2.9.2 Reação de Keller Kelliani

Foram levados à secura 2 mL do extrato clorofórmico preparado anteriormente. O resíduo foi dissolvido com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. A mistura foi transferida para tubo de ensaio contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Observa-se coloração na zona de contato azul ou verde (desoxiaçúcar), sendo que a cor azul indica presença de esteróide e verde, triterpenos.

4.4.3 Pesquisa de glicosídios cianogenênicos

Foram transferidos para um tubo de ensaio 1 g de folhas secas e fragmentadas e 1 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico *N*, sem umedecer as paredes do tubo. Foi suspensa uma tira de papel picrossódico com auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que o papel não tocasse o líquido no interior do tubo de ensaio. A solução permaneceu em banho-maria a 60 °C por 30 minutos. A mudança de coloração do papel picrossódico para vermelho indica presença de heterosídeos cianogênicos (formação de isopurpurato de sódio).

4.4.4 Pesquisa de ácidos voláteis

Foram transferidos para um tubo de ensaio 1 g de folhas secas e fragmentadas e 1 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico *N*, sem umedecer as paredes do tubo. Foi suspensa uma tira de papel indicador de pH com auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que o papel não tocasse o líquido no interior do tubo de ensaio. A solução permaneceu em banho-maria a 60 °C por 30 minutos. A verificação de pH ácido indica presença de ácidos voláteis.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.5.1 Prova de sensibilidade por difusão em disco (Bauer-Kirby)

O método utilizado foi baseado na técnica de difusão em disco. O princípio deste método baseia-se na inoculação em superfície de um ágar de solução padronizada de microrganismo específico. Sobre este são colocados discos de papéis impregnados previamente com soluções das amostras que se deseja investigar a atividade antimicrobiana. As substâncias impregnadas nos discos de papel difundem-se no meio de cultura e, se a amostra em questão apresentar atividade inibitória sobre o microrganismo testado, forma-se um halo de não-crescimento ao redor do disco impregnado. Após o período de incubações, respeitadas as condições específicas para o microrganismo, as zonas de inibição são medidas em volta de cada disco (ISENBERG, 1992; KONEMAN et al., 1997).

4.5.1.1 Preparo da amostra

Foram utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana o óleo essencial *Eucalyptus cinerea* e as seguintes frações: F1, F2, F3, F4 (página 24) e, também, foi utilizado o extrato hidroalcoólico bruto (página 28) seco em evaporador rotatório sob pressão reduzida e dissolvido em solução de etanol a 70% de maneira a serem obtidas soluções nas concentrações 1000 mg/mL, 500 mg/mL, 250 mg/mL e 125 mg/mL.

Após preparadas, as amostras foram esterilizadas em membrana de 0,22 µm (MILLEX®).

4.5.1.2 Preparo dos discos de papel

O óleo essencial de *E. cinerea*, bem como suas frações (10 µl) foram impregnados em discos de papel (6 mm de diâmetro). Igualmente foi impregnado o extrato hidroalcoólico bruto de forma a obter as concentrações: 125, 250, 500 e 1000µl de extrato por disco. os discos foram secos à temperatura ambiente. Do mesmo modo, discos contendo somente o solvente utilizado foram preparados para servir como controle.

4.5.1.3 Preparo do meio de cultura

Os meios de cultura utilizados para o teste de atividade antimicrobiana foram o ágar Mueller-Hinton (DIFCO®) - preparado a partir do meio desidratado de acordo com a recomendação do fabricante - e placas ágar Sabouraud (NEWPROV®) pronto para o uso.

4.5.1.4 Preparo do inóculo

Foram utilizados os seguintes microrganismos

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Escherichia coli* ATCC 8.739
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12.228
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9.027
- *Candida albicans* ATCC 10.231

As cepas acima citadas foram reconstituídas de acordo com a indicação do fornecedor (NEWPROV®). As culturas microbianas foram padronizadas em 10⁸ células/mL, estimadas por comparação ao tubo 0,5 da escala de MacFarland (0,05 mL de cloreto de bário diidratado a 1,175% em 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1%).

4.5.1.5 Ensaio de difusão em disco

As suspensões bacterianas foram inoculadas em placas contendo ágar Mueller-Hinton e/ou ágar Sabouraud com o auxílio de um swab estéril (NEWPROV®). Após este procedimento, os discos previamente preparados foram

transferidos para meios contendo os inóculos. As placas foram incubadas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 24 horas para bactérias e $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 5 dias para levedura. Passado este período, as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de inibição (medidos em mm). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e tiveram como controle positivo os antibióticos gentamicina $10\text{ }\mu\text{g}/\text{disco}$ (NEWPROV[®]) para bactérias, e anfotericina B $12,5\text{ }\mu\text{g}/\text{disco}$ (CRISTÁLIA[®]) para levedura.

4.5.2 Prova de sensibilidade por diluição em caldo

O teste de diluição em caldo é o método padrão para a determinação de níveis de resistência a antimicrobianos. Diluições seriadas de produtos antimicrobianos são feitas em meios líquidos nos quais são inoculadas quantidades padronizadas de microorganismos e incubadas por um tempo determinado. A menor concentração (maior diluição) do antimicrobiano que impede a turvação é considerada a concentração inibitória mínima (CIM). Nesta diluição, o antimicrobiano é bacteriostático (ISENBERG, 1992; KONEMAN et al.,1997; TAKAHASHI et al., 2004; ROLLINS, 2004).

Adicionalmente, a concentração bactericida mínima (CBM) pode ser determinada por uma subcultura do conteúdo dos tubos em um meio sólido livre de antibiótico e posteriormente examinando o crescimento microbiano.

Embora o teste de diluição em tubo seja satisfatoriamente preciso, o teste é trabalhoso porque diluições seriadas de antibiótico devem ser feitas e, somente um isolado pode ser testado em cada uma destas diluições.

4.5.2.1 Preparo da amostra

Para a prova de sensibilidade por diluição em caldo foram utilizadas as frações F1, F2, F3 e F4 (página 24) do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* e também o óleo essencial T (página 25) da mesma espécie. Foram realizadas nove diluições seriadas em cada amostra em solvente dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a obter as seguintes concentrações: $100\text{ }\mu\text{l}/\text{mL}$; $50\text{ }\mu\text{l}/\text{mL}$; $25\text{ }\mu\text{l}/\text{mL}$; $12,5\text{ }\mu\text{l}/\text{mL}$; $6,25\text{ }\mu\text{l}/\text{mL}$; $3,125\text{ }\mu\text{l}/\text{mL}$; $1,5625\text{ }\mu\text{l}/\text{mL}$; $0,78125\text{ }\mu\text{l}/\text{mL}$ e $0,390625\text{ }\mu\text{l}/\text{mL}$.

Após preparadas, as amostras foram esterilizadas em membrana de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (MILLEX[®]).

4.5.2.2 Preparo do meio de cultura

Foram utilizados para este teste o caldo nutriente (DIFCO®) para bactérias e o caldo Sabouraud (DIFCO®) para a levedura. Estes foram preparados a partir do meio desidratado, de acordo com a recomendação do fabricante e depositados em tubos de ensaio.

4.5.2.3 Preparo do inóculo

Do mesmo modo do teste de difusão em disco, foram utilizados os seguintes microrganismos:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Escherichia coli* ATCC 8.739
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12.228
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9.027
- *Candida albicans* ATCC 10.231

As cepas acima citadas foram reconstituídas de acordo com a indicação do fornecedor (NEWPROV®). As culturas microbianas foram padronizadas em 10^8 células/mL, de solução salina estéril, estimadas por comparação ao tubo 0,5 da escala de MacFarland (0,05 mL de cloreto de bário diidratado a 1,175% em 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1%).

4.5.2.4 Ensaio de diluição em caldo

Foram adicionados ao teste 100 µl de cada amostra previamente preparada, 940 µl de meio de cultura e posteriormente 10 µl da suspensão microbiana. Cada amostra foi incubada a temperatura e tempo apropriados (bactérias: $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1/ 18\text{-}24$ horas e levedura: $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1/ 7$ dias). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração das amostras testadas que inibiu visivelmente o crescimento do microorganismo testado, ou seja, a não verificação da turvação do conteúdo do tubo.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e tiveram como controle positivo os antibióticos gentamicina para bactérias, e anfotericina B (CRISTÁLIA®) para levedura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

5.1.1 Determinação do rendimento do óleo essencial

A TABELA 4 indica o rendimento do óleo essencial de *E. cinerea* total coletado e também as percentagens colhidas nos tempos pré-estabelecidos (F1: 0-15 minutos; F2: 15 minutos – 1 hora; F3: 1 – 2 horas; e F4: 2-3 horas). Foi observado através desta metodologia que grande parte do óleo essencial é extraída no início da destilação, mantendo os níveis de rendimento satisfatório na primeira hora de extração, diminuindo-se consideravelmente até a última fração F4 (3 horas de hidrodestila). MEJDOUB et al. (1998) indicaram três horas como o período ideal para destilação de óleo essencial de *E. citriodora*. FABROWSKI (2002) também observou que há maior rendimento de óleo essencial no início da extração para a espécie de *E. smithii*.

A hidrodestilação do concreto (S), que durou três horas, rendeu 9,2 mL de óleo essencial, ou seja, o rendimento foi de 1,54 mL/100 g de folhas secas de *E. cinerea*. Esta metodologia, quando comparada com a de hidrodestilação, mostrou-se inviável economicamente, uma vez que o conteúdo de solvente orgânico gasto é elevado, promovendo maior custo para extração, não obtendo rendimento de óleo essencial compatível com a hidrodestilação direta por arraste de vapor.

TABELA 4 - RENDIMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE.

AMOSTRAS	Rendimento de óleo essencial (mL/100 g)	Rendimento de óleo essencial de cada fração (%)
F1	3,02 ± 0,0837	49,75
F2	2,19 ± 0,3647	36,08
F3	0,58 ± 0,057	9,56
F4	0,28 ± 0,1255	4,61
T	6,07 ± 0,2636	100

Os valores de F1, F2, F3 e F4 indicam a percentagem de óleo essencial extraídos nos tempos pré-determinados em relação a T.

5.1.2 Análises físico-químicas do óleo essencial

De acordo com os resultados obtidos nas avaliações físico-químicas observadas na TABELA 5 pode-se conhecer algumas características do óleo essencial e comparar as diferenças entre as frações obtidas nas primeiras coletas de óleo essencial e a última a ser coletada. Também, observa-se que o óleo essencial colhido após 3 horas de hidrodestilação ininterruptas (T) apresenta características intermediárias em relação às frações.

Foi observada a tendência à diminuição da densidade relativa do óleo essencial com o tempo de extração e a semelhança dos valores de T em relação a F1 e F2. A amostra S apresentou características semelhantes a T.

O índice de refração revelou não haver variação significativa entre F1, F2 e F3, ocorrendo valor superior deste parâmetro para F4. As amostras T e S apresentaram valores significativamente iguais.

Para a análise do poder rotatório não houve a possibilidade da verificação para F4 e S por não apresentarem quantidade suficiente necessária para realização deste teste (10 mL). Os resultados obtidos com as amostras testadas indicam que estas são dextróginas (desviam o plano da luz polarizada para a direita), sendo a amostra F1 com maior ângulo de desvio em relação às demais amostras.

Quanto à solubilidade em etanol foi necessária maior quantidade de etanol a 70% para solubilizar todas as amostras de óleo essencial, principalmente nas frações com tempo mais prolongado de extração, na qual a amostra F4 foi mais insolúvel. Nas amostras analisadas com as concentrações de etanol a 80%, 90% e 96,5% a proporção foi de 1:1 (óleo essencial/etanol) para solubilidade total (TABELA 6). Em geral, os óleos essenciais ricos em constituintes oxigenados são mais solúveis em álcool diluído do que os óleos essenciais ricos em terpenos (FABROWSKI, 2002).

Comparando os dados obtidos acima se observa que o rendimento citado por GUENTHER (1977a) é inferior ao rendimento do óleo essencial obtido neste estudo. A densidade específica das amostras T, S, F1 e F2 estão dentro do valor estabelecido por este autor, e F3 e F4 são inferiores. A rotação óptica (poder

rotatório) de todas as amostras testadas apresentou poder dextrógiro com angulação inferior a da mesma literatura, o índice de refração que mais se aproximou do especificado foi o de F4, sendo os demais próximos também, porém, inferiores. MOREIRA et al. (1980) encontrou resultados para as análises físico-químicas do óleo essencial de *E. cinerea* semelhantes ao citado por GUENTHER (1977a).

TABELA 5 - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus cinerea*, F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE

AMOSTRAS	DENSIDADE RELATIVA (d_{20}^{20})	ÍNDICE DE REFRAÇÃO	PODER ROTATÓRIO
T	0,9151 ± 0,0021	1,4593 ± 0,0005	+1,99 ± 0,06
S	0,9147 ± 0,0006	1,4602 ± 0,0015	
F1	0,9160 ± 0,0024	1,4575 ± 0,004	+2,18 ± 0,10
F2	0,9111 ± 0,0014	1,4580 ± 0,006	+1,87 ± 0,11
F3	0,9016 ± 0,0052	1,4574 ± 0,0014	+1,78 ± 0,03
F4	0,8970 ± 0,0020	1,4714 ± 0, 0018	
GUENTHER, 1977a	0,9113 a 0,995	1,4649	+2,50 a +4,10
MOREIRA et al, 1980	0,9163 a 0,9184	1,4620 a 1,4666	+2,40 a 2,50

TABELA 6 - SOLUBILIDADE EM ETANOL DO ÓLEO ESSENCIAL E FRAÇÕES DE *Eucalyptus cinerea*, F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE.

Amostras	Etanol a 70%	Etanol a 80%	Etanol a 90%	Etanol a 96,5%
T	3	1	1	1
S	3	1	1	1
F1	3	1	1	1
F2	3	1	1	1
F3	4	1	1	1
F4	10	1	1	1
GUENTHER, 1977a	1,5	-	-	-
MOREIRA et al, 1980	2	-	-	QP

Solubilidade: volume de Etanol para solubilizar 1 volume de óleo essencial (v/v)

QP: solúvel em qualquer proporção

5.1.3 Análises cromatográficas do óleo essencial

5.1.3.1 Cromatografias em camada delgada

O óleo essencial total (T) e cada fração foram monitorados através de cromatografia em camada delgada (CCD) com fases móveis, fases fixas e reveladores específicos dentre os quais o que demonstrou melhor separação das frações do óleo essencial foi:

- Fase móvel: n-hexano: acetato de etila (93:7);
- Fase fixa: cromatoplaça de sílica G e GF₂₅₄ (MERCK®);
- Reveladores: - vanilina sulfúrica;
 - anisaldeído sulfúrico;
- Estufa a 120 °C, 5 a 10 minutos.

Substância de referência: 1,8-cineol.

A análise por (CCD) apresentou melhor desempenho do óleo essencial e de suas frações. Foi observada separação de alguns constituintes químicos do óleo essencial, evidenciada pelas manchas de diferentes intensidades e valores de R_f, coincidindo o composto com maior intensidade no óleo essencial (T e S) e nas frações F1 e F2, com o padrão utilizado.

As frações isoladas foram comparadas através da CCD com o padrão de 1,8-cineol, confirmando a presença deste composto em todas as amostras testadas, verificando haver um declínio da intensidade da mancha com o passar do tempo de extração e intensidade iguais em T e S.

MOREIRA et al. (1980) obtiveram separação satisfatória do óleo essencial de *E. cinerea* utilizando a fase móvel n-hexano: éter etílico: acetato de etila (80:20:5) e revelador vanilina sulfúrica e ácido forfomolíbico. A separação observada com fase móvel utilizada por MOREIRA et al. (1980), no presente estudo, apresentou qualidade inferior a fase móvel n:hexano:acetato de etila (93:7), citada acima.

5.1.3.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa

A TABELA 7 apresenta a composição do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* total (T) e frações (F1-F4) e também o óleo essencial extraído por solvente (S). Foram identificados majoritariamente por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, os compostos 1,8-cineol nas frações F1-F3, seguidos por α -pineno em F1 (15 minutos de extração) e α -terpineol em F2 e F3 (1 hora e 2 horas de extração, respectivamente). Em F4 houve a predominância de α -terpineol, seguido por limoneno e α -pineno. A maior concentração de 1,8-cineol no início da extração é devido a maior rapidez de extração de compostos oxigenados (PRINS et al., 2003).

TABELA 7 - COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL., MYRTACEAE

Prováveis Compostos	T		S		F1		F2		F3		F4	
	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%
α -Pineno	8,73	6,21	8,77	6,78	8,79	2,69	8,79	3,63	8,79	6,34	8,79	9,96
m-cimeno	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	12,57	1,35
Limoneno	***	***	12,72	2,79	12,70	0,63	12,70	0,78	12,68	1,19	12,82	10,98
1,8-cineol	13,01	175,70	13,15	55,32	12,98	93,30	12,97	84,04	12,93	52,71	12,90	6,18
3-Ciclohexen-1-ol	***	***	***	***	***	***	***	***	19,80	0,84	***	***
α -Terpineol	20,28	9,67	20,44	11,66	20,54	1,15	20,53	4,59	20,53	15,44	20,53	20,40
linanol	***	***	26,21	1,81	***	***	***	***	***	***	***	***
Não identificado	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	22,35	3,07
4-careno	***	***	***	***	27,43	2,23	***	***	***	***	***	***
ocimeno	27,25	8,42	27,39	14,15	***	***	27,63	6,96	27,44	23,74	27,45	34,28
cariofileno	***	***	30,12	3,38	***	***	***	***	***	***	30,27	3,26
canfeno	***	***	33,26	2,22	***	***	***	***	***	***	***	***
ledol	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	37,03	2,42
1,3,5-Trimetyladamantane	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	37,39	1,89
Não identificado	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	38,34	2,31
Não identificado	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	38,66	3,90

*** Composto não presente na amostra

RT: tempo de retenção

Amostras: T (óleo essencial total); S (óleo essencial do concreto); F1 (fração coletada no intervalo de 0 a 15 minutos de hidrodestilação); F2 (fração coletada no intervalo de 15 minutos a 1 hora de hidrodestilação); F3 (fração coletada no intervalo de 1 a 2 horas de hidrodestilação) e F4 (fração coletada no intervalo de 2 a 3 horas de hidrodestilação).

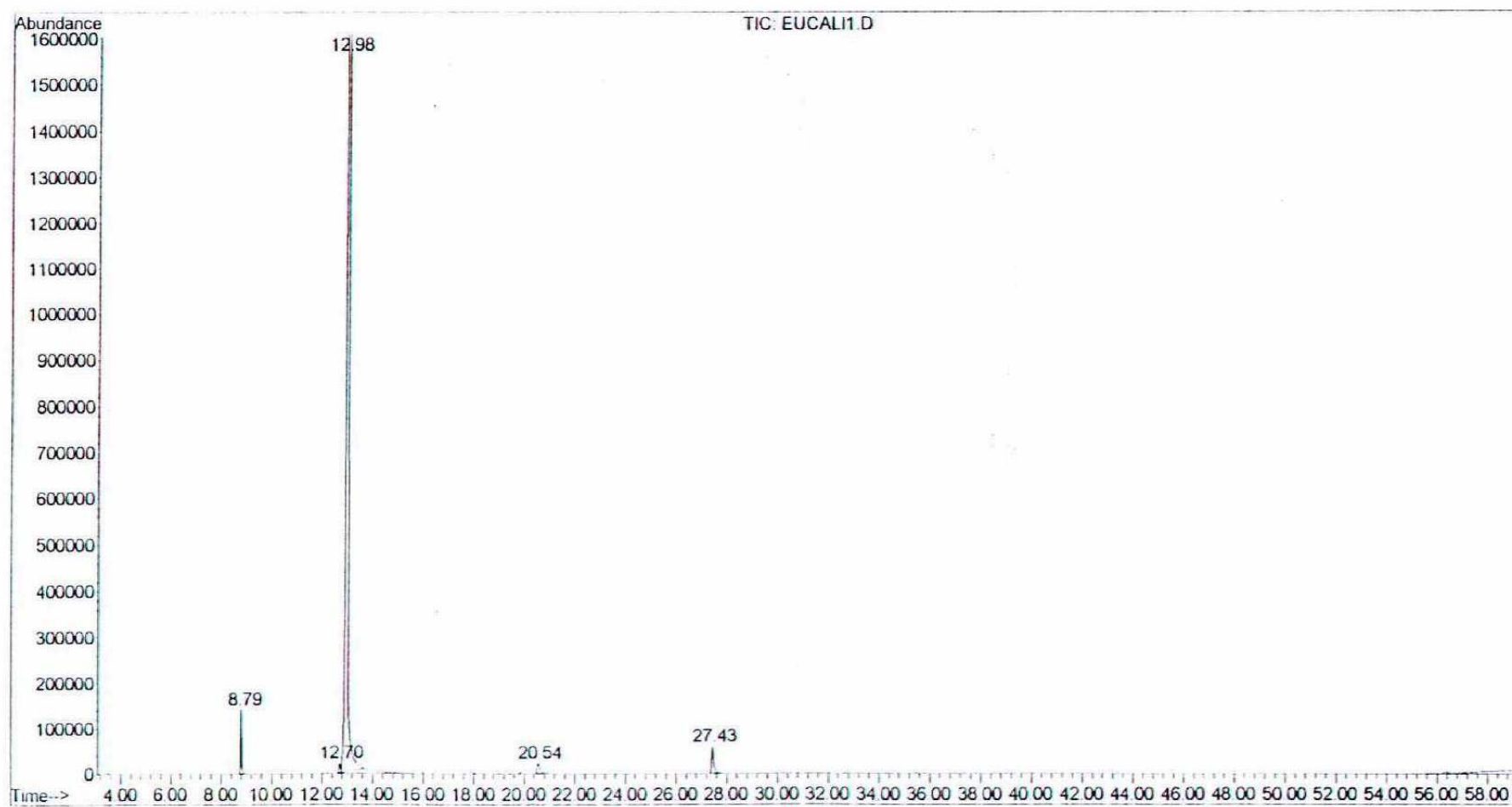


FIGURA 6 - CROMATOGRAMA EM CG/EM DE F1

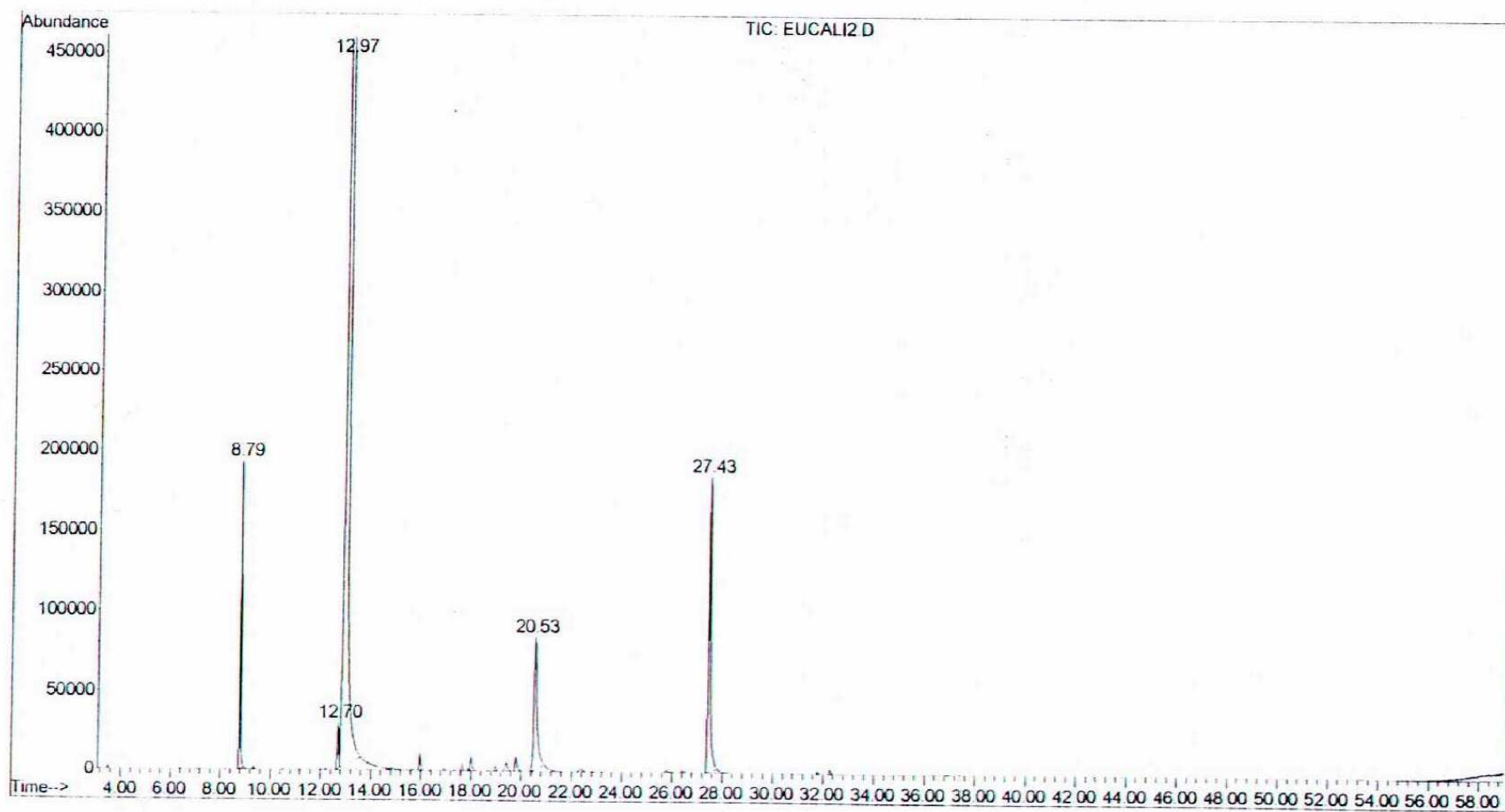


FIGURA 7 - CROMATOGRAMA EM CG/EM DE F2

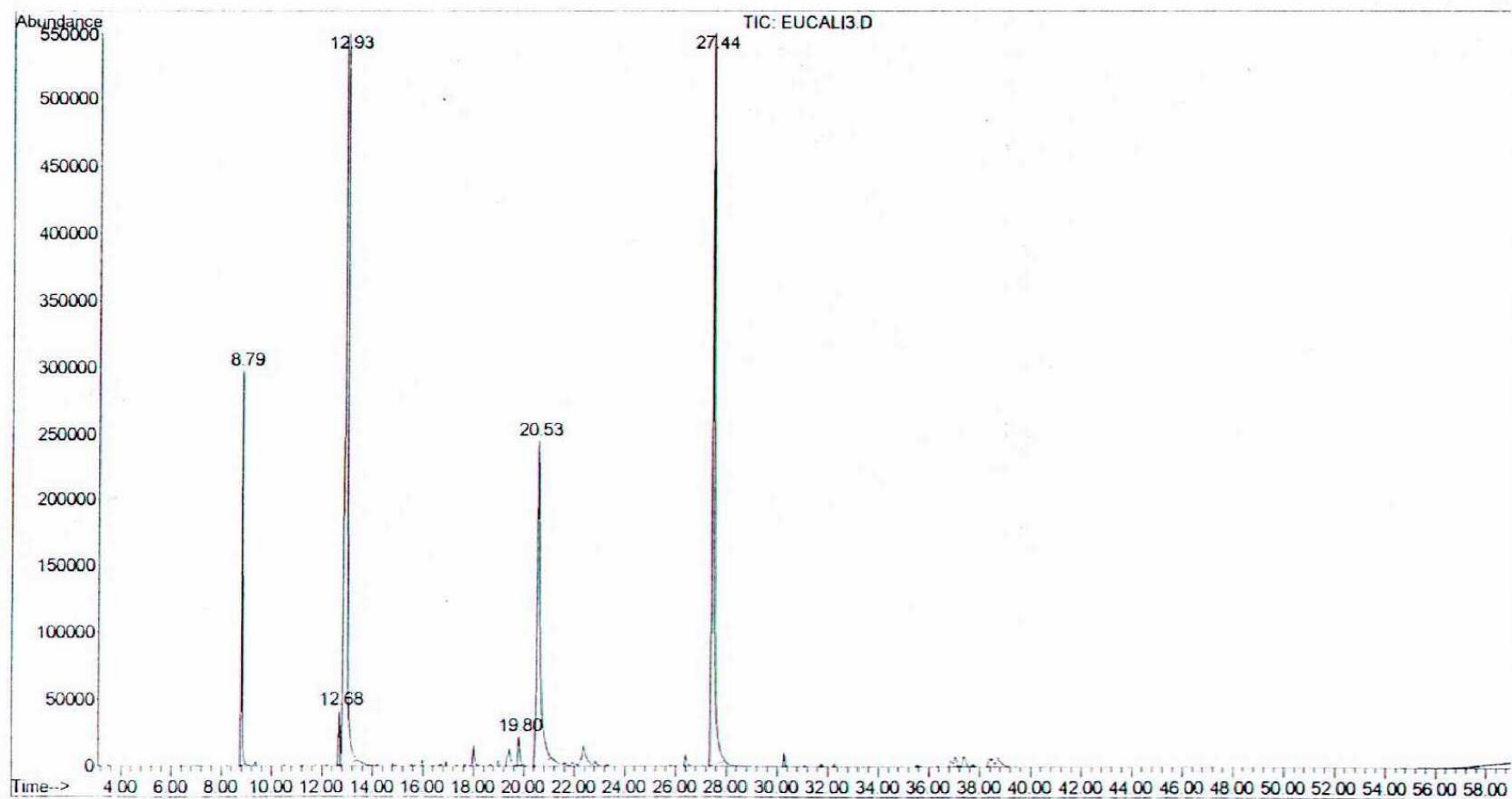


FIGURA 8 - CROMATOGRAMA EM CG/EM DE F3

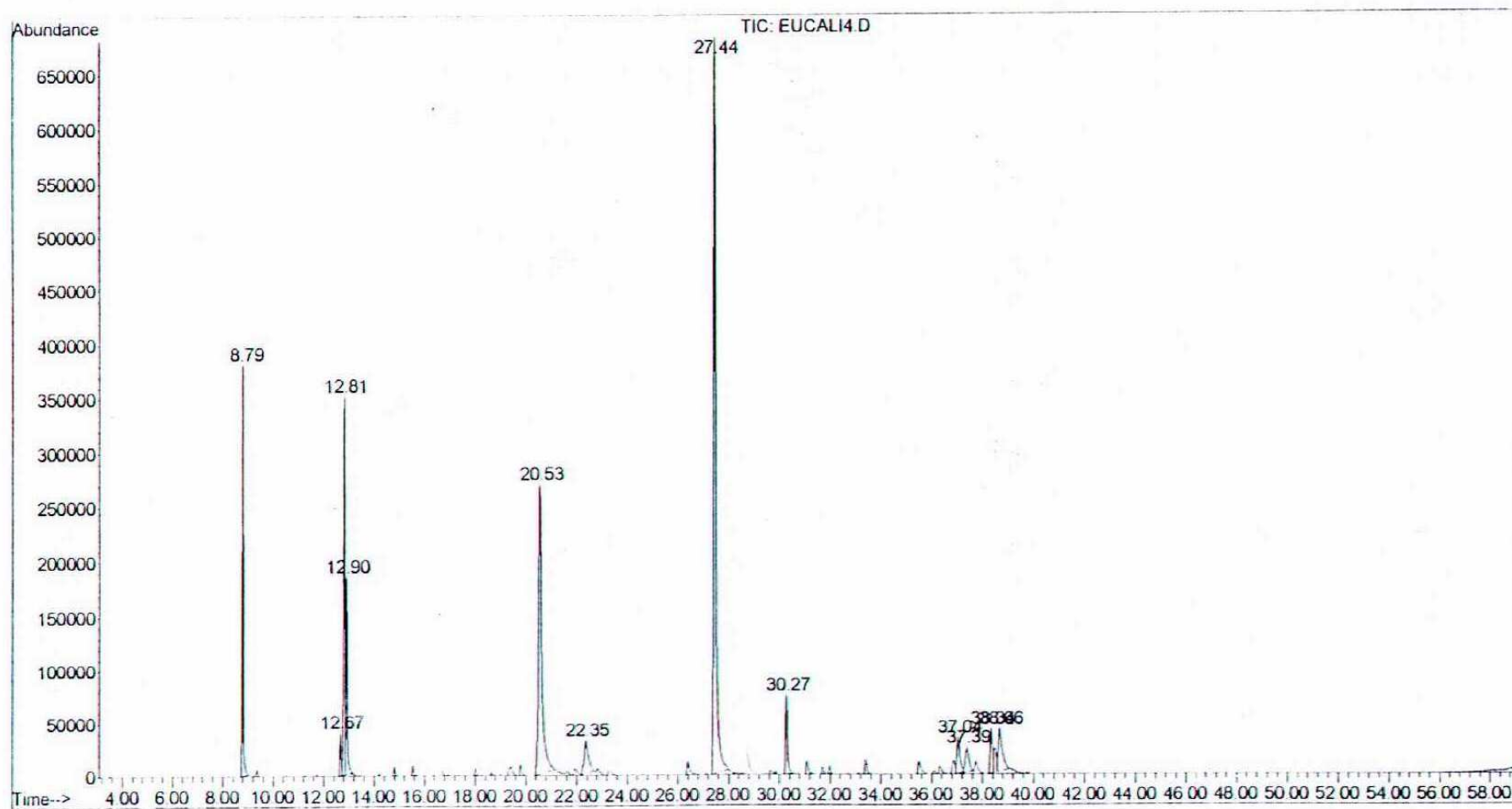


FIGURA 9 - CROMATOGRAMA EM CG/EM DE F4

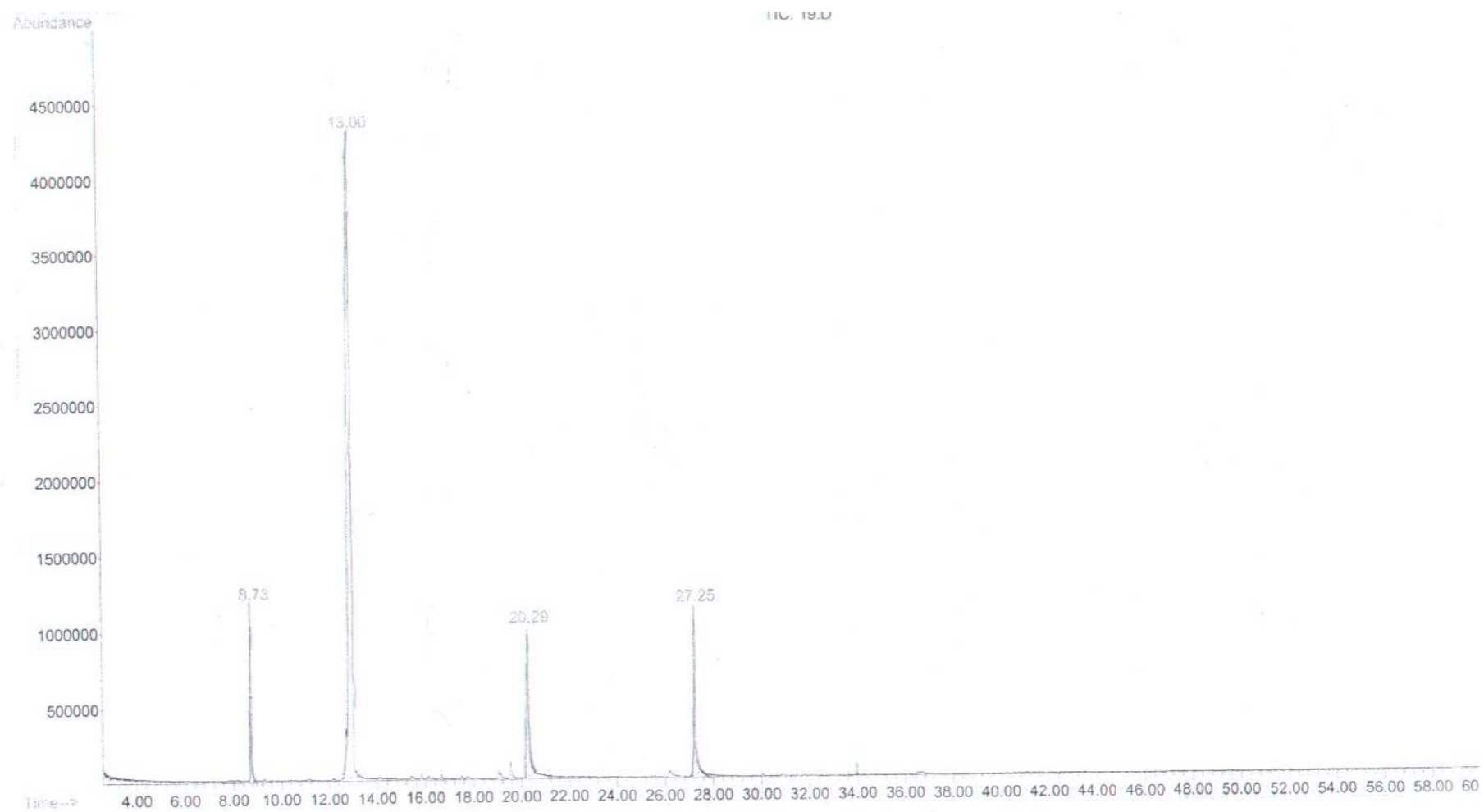


FIGURA 10 - CROMATOGRAMA EM CG/EM DE T

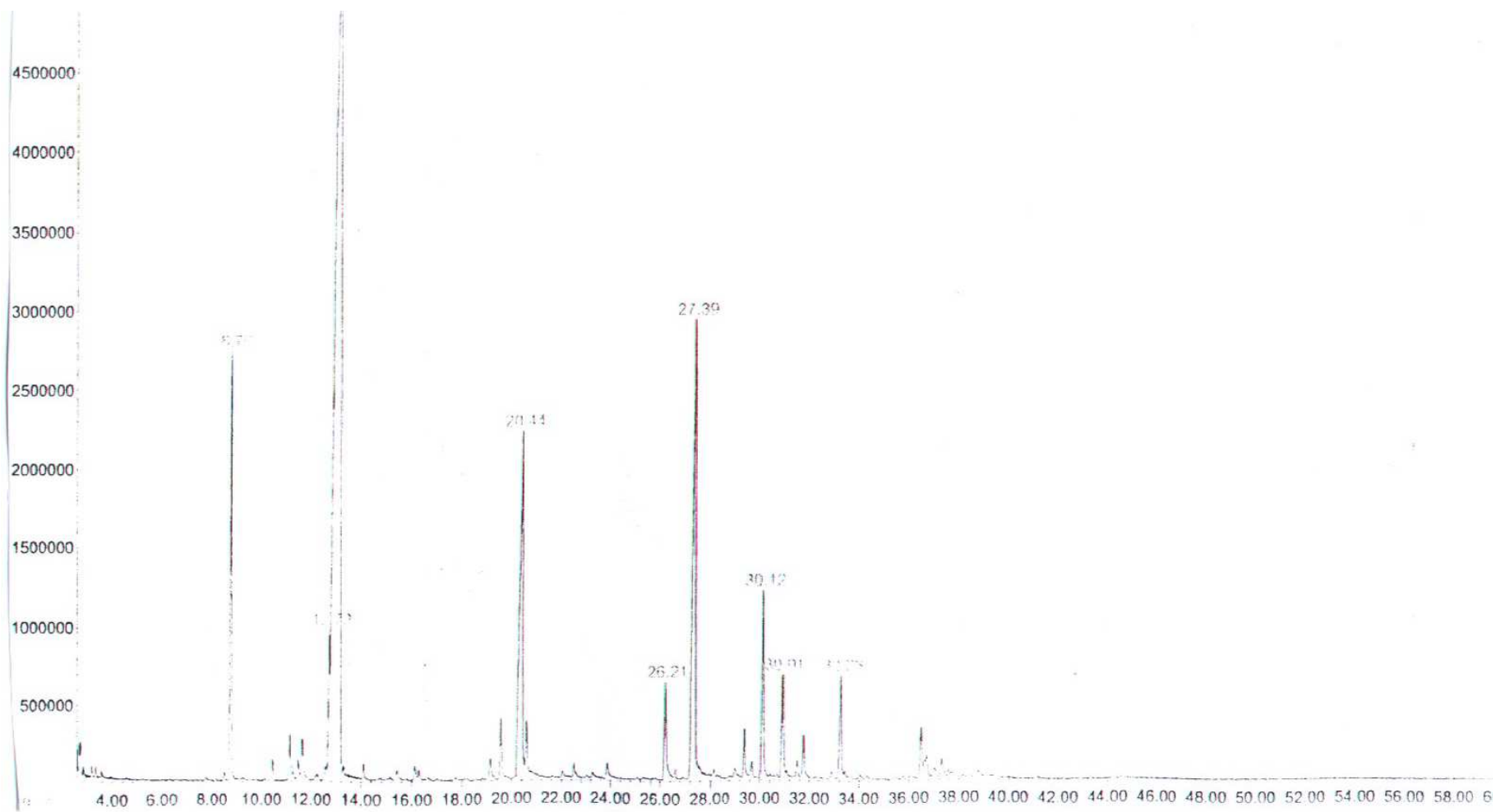


FIGURA 11 - CROMATOGRAMA EM CG/EM DE S

5.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS DAS FOLHAS DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE (MOREIRA, 1979; NAKASHIMA, 1993)

O conhecimento prévio dos componentes químicos encontrados nos vegetais é necessário, pois fornece a relação dos seus principais metabólitos. Uma vez detectada a presença de determinados grupos químicos, direciona-se para futuras análises.

As TABELAS 8 e 9 relatam, respectivamente, os resultados referentes às características organolépticas e pesquisa de metabólitos secundários no extrato aquoso 20% (m/v) e extrato hidroalcoólico a 20% (m/v).

Os extratos aquoso a 20% (m/v) e hidroalcoólico 20% (m/v) das folhas de *Eucalyptus cinerea* revelaram odor cineólico, característicos de folhas de eucalipto, pH levemente ácido (entre 5 - 5,5) e apresentaram, respectivamente, coloração castanha clara e verde-musgo e sabor adocicado e pouco amargo. Em relação aos metabólitos secundários, foi verificada a presença de glicosídeos saponínicos, taninos hidrolisáveis e condensados, aminogrupos, ácidos fixos e voláteis, glicosídeos flavônicos e esteróides e triterpenos.

COSTA (1986) relata ser comum a presença de taninos, compostos flavônicos, resina e essência característica em eucaliptos. BALACS (1997) afirma que os principais constituintes químicos de eucaliptos são taninos, cineol e α -pineno, encontrados em *E. globulus*. FABROWSKY (2002) verificou nas folhas de *Eucalyptus smithii* a presença de glicosídios flavônicos e saponínicos, esteróides e/ou triterpenos, taninos e ácidos fixos. ALONSO (1998) citado por JARDIM et al. (2004) relata que a família Myrtaceae, representada pela espécie *E. globulus* a presença de uma resina rica em taninos, e de ceras. Ainda relata a presença de monoterpenos, flavonóides, taninos e ácidos associados, sesquiterpenos, cineol ou eucaliptol (óxido terpênico); α -pineno, β -pineno, δ -limoneno, p -cumeno, α -felandreno, canfeno e γ -terpineno; eucaliptrina, hiperósido, quercetina, quercitrina, rutina; ácido gálico e ácido protocatéquico; ácidos polifenólicos (ferúlico, caféico e gentísico); aromadendreno, aloaromadendreno, globulol, epiglobulol, eucaliptona, ledol e piridiflorol, ácido ursólico e derivados.

A presença de taninos, glicosídeos saponínicos e flavônicos pode direcionar o estudo de *Eucalyptus cinerea* para aplicações industriais e farmacêuticas, como composição de fármacos, indústria alimentícia, de curtimento de couro, entre outras (COSTA, 1986; ROBBERS et al., 1997; FABROWSKI, 2002).

As folhas fragmentadas apresentaram em sua composição ácidos fixos, não apresentando heterosídeos cianogenênicos.

TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E PESQUISA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO EXTRATO AQUOSO 20% (M/V).

EXTRATO AQUOSO	RESULTADOS
Características organolépticas	
Cor	Castanha clara
Odor	Cineólico
Sabor	Pouco amargo
pH da mistura aquosa	5,6
Resíduo seco	9,98 g/%
Metabólitos secundários	
Glicosídeos antociânicos	Negativo (pH 1, 7 e 10)
Glicosídeos saponínicos	Positivo
Taninos :	
- Reação com sais de Ferro III	Positivo
- Reação com Cloridrato de Emetina	Positivo
-Reação com Cianeto de Potássio	Positivo
-Reação com Ácido Nitroso	Positivo
-Reação com Gelatina a 2,5%	Positivo
-Reação com Formol Clorídrico:	
- Taninos Hidrolisáveis	Positivo
- Taninos Condensados	Positivo
Aminogrupos	Positivo
Ácidos Fixos	Positivo
Ácidos Voláteis	Positivo (pH 4)
Glicosídeos Flavônicos	
- Reação de Shinoda	Positivo
- Reação Oxalo-Bórica	Positivo
Glicosídeos Antraquinônicos	Negativo
Alcalóides (todas as reações)	Negativo

TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E PESQUISA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A 20% (M/V).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO A 20%	RESULTADOS
Características Organolépticas	
Cor	Verde musgo
Odor	cinéolico
Sabor	adocicado
pH da mistura hidroalcoólica	5,0
Resíduo Seco	15,68 g/%
Metabólitos Secundários	
Glicosídeos antociânicos	Negativo (pH 1, 7, e 10)
Glicosídeos saponínicos	Negativo
Taninos :	
- Reação com sais de Ferro III	Positivo
- Reação com Cloridrato de Emetina	Positivo
-Reação com Cianeto de Potássio	Positivo
-Reação com Ácido Nitroso	Positivo
-Reação com Gelatina a 2,5%	Positivo
-Reação com Formol Clorídrico:	
- Taninos Hidrolisáveis	positivo
- Taninos Condensados	negativo
Aminogrupos	Positivo
Glicosídeos Flavônicos	
- Reação de Shinoda	Positiva
- Reação Oxalo-Bórica	Negativo
Glicosídeos Antraquinônicos	Negativo
Esteróides e/ou Triterpenos	
- Reação de Liberman-Bouchard	Positivo (verde)
- Reação de Keller Kelliani	Positivo (verde)
Cumarinas	Negativo
Alcalóides (todas as reações)	negativo

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.3.1 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex. Benth., Myrtaceae

A TABELA 10 corresponde a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. cinerea* total coletado (T) e das frações (F1, F2, F3 e F4). O controle de qualidade do método em detectar a inibição bacteriana e fúngica foi avaliado utilizando-se antibióticos com diâmetros de halo conhecidos. Os valores especificados na tabela estão de acordo com o preconizado para cada espécie (ISENBERG, 1992).

Observa-se atividade em todas as amostras testadas, sendo que o óleo essencial obtido na última coleta apresenta maior halo de inibição frente aos microrganismos testados, não necessariamente condizendo com maior atividade antibiótica deste. Esta observação é explicada pelo fato de que propriedades físico-químicas dos componentes de cada amostras podem influenciar na melhor difusão no meio de cultura (JANSSEN et al., 1987; KONEMAN et al., 1997; ANDREAZZA, 2000). Através desta técnica, pode-se comparar resultados somente de mesma amostra (WILLIAMS, 1996).

ESTANISLAU et al. (2001) verificaram que as espécies *E. citriodora* e *E. grandis* apresentaram efeito inibitório contra bactérias Gram-negativas. Este mesmo estudo observou o predomínio de citronelal na primeira e em *E. grandis* a maior concentração de γ -terpineno. O *E. cloeziana* apresentou maior concentração em mirceno na constituição do óleo essencial, não apresentando atividade inibitória frente a *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*.

A atividade antimicrobiana de cinco óleos essenciais de eucaliptos provenientes da Nigéria realizada por OYEDEJI et al. (1999), exceto o óleo essencial de *E. alba*, resultou em um amplo espectro de ação para tais, englobando bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. As espécies que forneceram o óleo essencial para este teste foram as seguintes, seguidas pelo componente majoritário: *E. alba* (α -tujano); *E. deglupta* (β -nerolidol), *E. saligna* (α -tujano), *E. camaldulensis* var. *catharine* e *E. camaldulensis* var. *mysore* (1,8-cineol).

A TABELA 11 mostra as CIMs do óleo essencial (T) de *Eucalyptus cinerea* e suas frações (F1 – F4) realizados pelo método de diluição em caldo. Todas as bactérias e a levedura foram sensíveis às amostras testadas por esta metodologia, o mesmo não foi observado pelo método de diluição em disco.

Observa-se nos resultados apresentados nesta tabela, assim como nas análises físico-químicas, que há diferenças entre as frações e o óleo essencial (T). O óleo essencial T demonstrou resultados semelhantes à fração F1, a fração F2 inibiu o crescimento microbiano em concentrações intermediárias e as frações F3 e F4 foram ativas em concentrações menores. Comparando os resultados obtidos frente a *Pseudomonas aeruginosa*, verifica-se que F4 inibiu a turvação do meio a uma concentração 16 vezes menor que a observada em F1 e T, 8 vezes menor que F2 e 2 vezes menor que F3. Este efeito pronunciado frente a *P. aeruginosa* foi verificado por CIMANGA et al. (2002) no óleo essencial de *Eucalyptus camadulensis* e *E. tertiornis*, demonstrando significado importante devido a elevada resistência clínica atribuída a esta bactéria. WILLIANS (1996) relaciona este microorganismo como principal causador de infecções em queimaduras, de difícil controle, sendo um dos principais problemas na regeneração da pele.

As CIMs de F3 e F4 frente a bactéria *Escherichia coli* foram superiores aos demais microorganismos testados, demonstrando menor sensibilidade desta. Em relação às bactérias Gram-positivas e a levedura *Candida albicans*, observa-se CIMs com diferença significativa entre as amostras T e F1 em relação a F3 e F4. Esta diferença é mais pronunciada para *Staphylococcus aureus*, e que a concentração necessária para inibir a turvação do tubo teste para F3 e F4 foi oito vezes menor que F1 e quatro vezes menor em relação a T. No que diz respeito a *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans* observou-se concentração quatro vezes inferior de F4 com atividade antimicrobiana comparando-se com T e F1.

Os resultados observados neste teste sugerem que os componentes presentes nas frações do óleo essencial de *E. cinerea* F3 e F4 apresentam maior atividade antimicrobiana que os componentes presentes em F1 e F2. O fato de T apresentar em sua constituição os componentes verificados em F3 e F4 e não apresentar atividade antimicrobiana tão intensificada quanto à observada para estas frações justifica-se na diferença entre suas composições químicas. F1 e F2

apresentam como componentes maior concentração, 1,8-cineol e α -pineno, fato não observado nas frações F3 e F4.

Correlacionando-se a atividade antimicrobiana com a composição do óleo essencial T e de cada fração, observa-se que as amostras em que o componente majoritário é o 1,8-cineol tendem a ser menos ativas em comparação aquelas amostras em que este composto está em menor quantidade. Este fato é observado na fração F3 e F4. F3 apresenta ainda uma elevada concentração de 1,8-cineol, inferior as demais frações, sendo em F4, o componente encontrado em maior concentração é o α -terpineol. DELASQUIS et al. (2002) investigaram frações do óleo essencial de eucalipto e verificaram que a última fração, também considerada a mais “pesada” foi a única a inibir o crescimento de todos os microorganismos testados.

WILLIAMS et al. (1998) atribuíram maior atividade ao terpinen-4-ol, presente no “tea tree”, frente a *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* seguido pelo α -terpineol e 1,8-cineol, respectivamente. Estes mesmos autores relataram a atividade antimicrobiana e óleo essencial de eucalipto, do 1,8-cineol e terpinen-4-ol frente a *Propionibacterium acnes*, *Ptoisporum ovale* e *Trichophyton mentagrophytes*, microorganismos responsáveis pela acne, dermatite seborréica e *Tinea pedis*, respectivamente. CIMANGA et al. (2002) admitiram não haver correlação entre a concentração dos componentes majoritários como 1,8-cineol, α -pineno, ρ -cimeno, entre outros com a atividade antibacteriana observada no estudo de algumas espécies de eucalipto, sugerindo que esta atividade está relacionada a presença de algumas classes favoráveis como álcoois, aldeídos, alcenos, ésteres e éteres. Neste mesmo estudo cita que o envolvimento de constituintes em menor quantidade, ou mesmo o sinergismo entre os constituintes do óleo essencial, deve ser considerado.

Segundo COWAN (1999), os principais compostos presentes no eucalipto são taninos, pertencente à classe dos polifenóis e também a classe dos terpenóides, presentes no óleo essencial. Afirma ainda que o mecanismo de ação antimicrobiano dos compostos terpênicos ainda não está completamente elucidado, mas acredita-se promover rompimento da membrana plasmática. Os compostos terpênicos ou terpenóides são ativos frente a bactérias, fungos, vírus e protozoários. WILLIAMS

(1996) atribuiu ao terpinen-4-ol presente no óleo essencial de “tea tree” a atividade frente a *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo esta maior que a atividade verificada no óleo essencial de eucalipto, no qual o maior componente é o 1,8-cineol. O componente terpinen-4-ol apresenta considerável atividade antimicrobiana (BALACS, 1997), apresentando maior potencia que citronela e cariofileno, presentes no óleo essencial de *E. citriodora*.

TABELA 10 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus cinerea*, F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

AMOSTRAS	MICROORGANISMOS TESTADOS				
10 µL	Staphylococcus aureus ATCC 6538	Staphylococcus epidermidis ATCC12.228	Escherichia coli ATCC8739	Pseudomonas aeruginosa ATCC9.027	Candida albicans ATCC 10231
T	15	16	8	9	8
F1	8	9	7	10	7
F2	9	14	10	11	9
F3	19	21	11	14	15
F4	17	20	10	13	14
G 10 µg	23	27	26	26	-
AnB 12,5µg	-	-	-	-	15

Os resultados representam a média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

G.: gentamicina

AnB: anfotericina B

TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE E SUAS FRAÇÕES (µl/mL) FRENTE A DIFERENTES MICROORGANISMOS

Amostras	MICROORGANISMOS TESTADOS				
	Staphylococcus aureus ATCC 6538	Staphylococcus epidermidis ATCC12.228	Escherichia coli ATCC8739	Pseudomonas aeruginosa ATCC9.027	Cândida albicans ATCC10231
T	12,5	6,25	25	25	6,25
F1	25	6,25	25	25	6,25
F2	12,5	3,125	25	12,5	3,125
F3	3,125	3,125	12,5	3,125	1,5625
F4	3,125	1,5625	12,5	1,5625	1,5625

Os resultados representam a menor concentração em que não houve turvação do meio

5.3.2 Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto de folhas de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex. Benth., Myrtaceae

A TABELA 12 corresponde à atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto de folhas de *E. cinerea*. Assim como procedido para o óleo essencial, o controle de qualidade do método em detectar a inibição antimicrobiana foi avaliado utilizando-se antibióticos com diâmetros de halo conhecidos. Os valores especificados na tabela estão de acordo com o preconizado para cada espécie (ISENBERG, 1992).

Neste teste, pode-se verificar atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para a bactéria *Escherichia coli* e a levedura *Candida albicans*, o extrato bruto nas concentrações utilizadas não promoveram inibição do crescimento.

NAVARRO et al. (1996) observaram que o extrato metanólico de folhas de *Eucalyptus globulus* apresentou atividade antimicrobiana com CIM para bactérias Gram-negativas de 10 µg/mL, e para bactérias Gram-positivas de 5 µg/mL e para levedura 1,25 µg/mL, resultado este que indicou a existência de compostos com atividade antimicrobiana neste extrato.

TAKAHASHI et al. (2004) também em estudo com extrato metanol-diclorometano de *E. globulus*, *E. maculata* e *E. viminalis*, verificaram a inibição significativa de seis bactérias Gram-positivas e do fungo *Tricophyton mentagrophytes*, resultado não observado frente a bactérias Gram-positivas.

TABELA 12 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DE *Eucalyptus cinerea*, F. MUELL. ex. BENTH., MYRTACEAE PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

AMOSTRAS	MICROORGANISMOS TESTADOS				
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12.228	<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9.027	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
1000 µg	11	10	NA	13	NA
500 µg	9	8	NA	11	NA
250 µg	NA	NA	NA	10	NA
125 µg	NA	NA	NA	9	NA
G 10 µg	27	25	26	26	-
AnB 12,5µg	-	-	-	-	15

Os resultados representam a média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

NA: não houve inibição de crescimento

G.: gentamicina

AnB: anfotericina B

6 CONCLUSÃO

A espécie em estudo apresentou rendimento de óleo essencial de 6,07% (v/m), do qual cerca de 80% deste volume são extraídos na primeira hora de hidrodestilação. No fracionamento do óleo essencial houve a predominância de 1,8-cineol nas frações F1 (93,30%), F2 (84,04%) e F3 (52,71%). O óleo essencial extraído por solvente orgânico (S) apresentou baixo rendimento, representando a inviabilidade para a sua utilização.

Os resultados das análises físico-químicas encontram-se nos padrões estabelecidos pela literatura para óleos essenciais do gênero.

Os principais componentes identificados no óleo essencial de *E. cinerea* por CG/EM foram: 1,8-cineol, α -pineno, limoneno e α -terpineol.

A prospecção fitoquímica revelou a presença de taninos, aminogrupos, ácidos voláteis, ácidos fixos, glicosídeos saponínicos, flavônicos, antraquinônicos e esteróides e/ou triterpenos

A avaliação de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco indicou qualitativamente o potencial antimicrobiano do óleo essencial da espécie em questão frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura. A pesquisa da CIM, por meio do teste de diluição em caldo, demonstrou que as frações coletadas em duas e três horas de extração apresentaram atividade antimicrobiana com concentrações inferiores as demais frações e ao óleo essencial total, em especial frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

7 RECOMENDAÇÕES

São recomendados estudos botânicos e farmacológicos de *Eucalyptus cinérea*, com o objetivo de expandir os conhecimentos acerca desta espécie.

Por apresentar rendimento de óleo essencial elevado em relação às demais espécies de eucaliptos, e concentração de 1,8-cineol dentro do recomendado pelas farmacopéias, recomenda-se a exploração comercial da espécie para extração de óleo essencial com período de hidrodestilação de uma hora (F1 e F2).

Proprõem-se também estudo posteriores mais aprofundados do extrato hidroalcoólico.

Tendo em vista a atividade antimicrobiana apresentada e a não observação de felandreno em sua composição, recomenda-se o estudo de formulação de preparação farmacêutica ou cosmética anti-séptica a base de óleo essencial de *E. cinerea*, com as frações que apresentaram maior atividade antimicrobiana (F3 e F4).

REFERÊNCIAS

ALONSO, J. R. Tratado de Fitomedicina: Bases Clínicas y Farmacológicas. In: JARDIM, M.G.; MENDONÇA, L.F.R.; FERREIRA, M.M.D.. **Os Produtos naturais para o desenvolvimento sustentável e biotecnológico: um estudo sobre plantas antimaláricas no estado do Pará.** Disponível em: http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futAmaDilOportunidades/rev20011213_02.pdf . Acessado em: 15/11/2004.

AMEN-CHEN, C; PAKDEL, H.; ROY, C.. Separation of phenols from *Eucalyptus* wood tar. **Biomass and Bioenergy**. v. 13, p. 25-37, 1997.

ANDREAZZA, R.C.S.. **Análise botânica, química e microbiológica de *Salvia aliciae* E. P. Santos, *S. lachnostachys* Benth., *S. microphylla* Kunth, *S. officinalis* L (Lamiaceae).** Curitiba, 2000, 125 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BALACS, T..Cineole-Rich Eucalyptus. **The International Journal or Aromatherapy**. V8, n.2, p.15-21, 1997.

BRITISH **Pharmacopeia**. London: General Medical Council, 1968.

CAMPBELI, S.J., OGLE, H.J., JOYCE, D.C.. Glycerol uptake preserves cut juvenile foliage of *Eucalyptus cinerea*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. V.40, p.483-492, 2000.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE,T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology** 79: 213-220, 2002.

CORNELL UNIVERSITY. Treating Livestock with Medicinal Plants: Beneficial or Toxic?: *Eucalyptus* spp.. Disponível em: <http://www.ansci.cornell.edu/plants/medicinal/eucalyp.html> Acessado em:17/10/2004.

CORRÊA, M.P.. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exótica cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v.2.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986. v.1.

COWAN ,M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiological Reviews**. v.12, p.564-582, 1999.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981, 1260p.

CUMMINGS, B.. **Modes of antimicrobial action**. Disponível em: <http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC205/Ch20Antimicrobials/Antibiotics.html>. Acessado em: 07/12/2004

DELASQUIS, P.J.; STANICH, K.; GIRARD, B. MAZZA, G.. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **Food Microbiology**. V.74, p.101-109, 2002.

DORAN, J.C. Comercial sources, formation and biology. In: VITTI, AM.S.; BRITO, J.O.; Universidade de São Paulo: Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo, 2003. 26f. (Documentos,17)

ELLOF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extracts for bacteria. **Planta Medica**. v.64, p. 711-713, 1998.

ENGLER, A. **Syllabus der pflanzenfamilien**, Berlin : Gebruder, 1964.

ESTANISLAU, A.A.; BARROS, F.A.S.; PEÑA, A.P.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H., PAULA, J.R.. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.11(2), p.95-100, 2001.

EVANS, E. *Eucalyptus cinerea*. Disponível em: http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/consumer/factsheets/trees-new/eucalyptus_cinerea.html Acessado em: 14/04/2004

EUCALINK. Disponível em: <http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgibin/eucatax.pl/PlantNet/Euc+&name=Eucalyptus+cinerea> Acessado em: 14/04/2004.

FABROWSKI, F.J.. ***Eucaliptus smithii* R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. Curitiba, 2002, 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

FARMACOPEIA **Brasileira** 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

FARMACOPÉIA **Brasileira**. 3.ed. São Paulo: Andrei, 1977.

FARMACOPÉIA **Brasileira**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERESIN, G.E.; TAPIA, A.; LOPÈZ, S.N.; ZACCHINO, S.A.. antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p.103-107, 2001.

FRANCO, J. **Determinação *in vitro* da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.v.M. Myrtaceae.** Curitiba, 2003, 13 f. Monografia (Especialização em Microbiologia) – entro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

GOTTLIEB, O.R.; SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. In: FABROWSKI, F.J.. ***Eucalyptus smithii* R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil.** Curitiba, 2002, 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

GRAHAM, A.W.; WALLWORK, M.A.; SEDGLEY, M.. Lignotuber bud development in *Eucalyptus cinerea* (F. Muell. Ex. Benth). **International Journal of Plant Sciences.** v.159 (6), p. 979-988, 1988.

GRASSMANN, J.; HIPPELI, S.; DORNISCH, K.; ROHNERT, U.; BEUSCHER, N.; ELSTNER, E.F. Antioxidant properties of essential oils. Possible explanations for their anti-inflammatory effects. **Arzneimittelforschung.** V.50, p. 135-139, 2000.

GRAY, A.M.; FLATT, P.R.. Antihyperglycemic Actions of *Eucalyptus globulus* (Eucalyptus) are associated with pancreatic and extra-pancreatic effects in mice. **Journal of Nutrition.** v.128, n.12, p.2319-2323, 1998.

GUENTHER, E.; ALTHAUSEN, D.. The constituents of essential oils. In: **The Essential Oils**, 4.ed. New York: Van Nostrand, 1963. v.2.

GUENTHER, E. History, Origin in Plants, Production and Analysis. In: **The Essential Oils**, 4.ed. New York: Van Nostrand, 1977. v.1.

GUENTHER, E. Individual Essential Oils of the plant Family Myrtaceae. In: **The Essential Oils**, 4.ed. New York: Van Nostrand, 1977. v.4.

HAMBURGER, M.O.; CORDELL, G.A.; A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. **Journal of Natural products.** v.50, n.1, p.19-22, 1987.

HÄNSEL, R. et al. **Hagers handbuch der pharmazeutischen praxis.** Berlin-Heidelberg: SpringerVerlag, 1992, v.4.

IGLESIAS, I.A.D.; CATALAN, A.N.C.; LASCANO, L.J.; RETAMAR, A.J.. Essential oil of *Eucalyptus cinerea*. **Rivista Italiana Essenze Profume Piante Officinali Aromi Saponi Cosmetici Aerosol.** V.62, p.113-115, 1980.

ISENBERG, H.D.. **Clinical microbiology Procedures Handbook.** Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1992. v.1.

JANSSEN, A.M.. **Antimicrobial Activities of Essential Oils – a Pharmacognostical Study.** Cidade, 1989, 181 f. Tese (Doctor aan de Rijksuniversiteit te Leiden). Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen.

JANSSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.C.; SWENDSEN, A.B.. Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976-1986 Literature Review. Aspects of the Tests Methods. **Planta Medica**, v.53, p.395-398, 1987.

JARDIM, M.G.; MENDONÇA, L.F.R.; FERREIRA, M.M.D.. Os Produtos naturais para o desenvolvimento sustentável e biotecnológico: um estudo sobre plantas antimaláricas no estado do Pará. Disponível em: http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futAmaDilOportunidades/rev20011213_02.pdf . Acessado em: 15/11/2004.

JASSIM, S.A.A.; NAJI, M.A.. A Review: Novel antiviral agents: a medicinal plant preservative. **Journal of Applied Microbiology**. V.95, p.412-427, 2003.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. In: SIANI, A.C; SAMPAIO, A.L.F.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S.. Óleos Essenciais: Potencial anti-inflamatório. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p.38-43, 2000.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998, V.4. 777p.

JUERGENS, U.R.; DETHLEFSEN, U.; STEINKAMP, G.; GILLISSEN, A.; REPGES, R.; VETTER, H.. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**. v. 97; p. 250-256, 2003.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.N.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr, W.C.. **Antimicrobial susceptibility testing**. In: **Color Atlas and text book of diagnostic microbiology**. 5.ed. Philadelphia- New York: Lippincott, 1997, 398-408p.

KOPP, G.E. *Eucalyptus cinerea*. Disponível em: <http://www.mobot.org/gardeninghelp/plantfinder/Plant.asp?code=A509> Acessado em 05/04/2004.

MANGIERI, H.R., DIMITRI, M.J. Los Eucalyptos em la Silvicultura. In: MOREIRA, E.A.; CECY, C.; NAKASHIMA, T.; FRANKE, T.A.; MIGUEL, O.G.. O óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.V.M. aclimatado no estado do Paraná-Brasil. **Tribuna Farmacêutica**, Curitiba, v.48, n.1-2, p.44-54, 1980.

MEJDOUB,R., KATSIOTIS, S.. Factors influencing the yield nad the quality of the obtaining essential oil from the leaves of *Eucalyptus citriodora* Hook. Growing in Crete. **Scientia Pharmaceutica**. V.66, p. 93-105, 1998.

MONTAGU, K.D.; KEARNEY, D.E.; SMITH, R.G.B.. The biology and silviculture of pruning planted eucalypts for clear wood production: a review. **Forest Ecology and Management**, v.179, p.1-13, 2003.

MOREIRA, E.A.; ARAÚJO, M.C.M.; CAVAZZANI, J.R.; NAKASHIMA, T.; KRAMBECK, R.; MIGUEL, O.G.. O óleo essencial de *Eucalyptus dwyeri* Maiden et Blakely. Paraná-Brasil. **Tribuna Farmacêutica**, v.45-46, n.1-2, p.18-25, 1978

MOREIRA, E.A.; CECY, C.; NAKASHIMA, T.; FRANKE, T.A.; MIGUEL, O.G.. O óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.V.M. aclimatado no estado do Paraná-Brasil. **Tribuna Farmacêutica**, Curitiba, v.48, n.1-2, p.44-54, 1980.

MOREIRA, E.A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**. V.47, n.1, p.1-19, 1979.

NAKASHIMA, T. **Manual prático de fitoquímica**. Curitiba: Departamento de Farmácia - UFPR, 1993. 25p.

NAKASHIMA, T. **Étude Phytochimique Évaluation dès Activités Antifongiques et antivirales de trois Verbenaceae: *Lippia alba* N. B. Brown, *Lippia multiflora* Mold., *Citharexylum myrianthum* Cham.** These de Docteur de INP, Toulouse, France, 198p., 1993.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L.. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Journal of Microbiology**., São Paulo-SP, v.31, n.4, 2000.

NAVARRO, V.; VILLARREAL, M.L.; ROJAS, G.; LOYOLA, X.. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**. v.53, n.3, p.143-147, 1996.

OYEDEJI, A.O.; EKUNDAYO, O.; OLAWORE, O.; ADENIYI, B.A.; KOENIG, W.A.. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. **Fitoterapia**, v.70, p.526-528, 1999.

PELCZAR Jr, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. p. 111-140.

PHARMACOPEA **Helvetica**. 7.ed. Berne: Département Fédéral de l'Intérieur, 1993.

PHARMACOPÉE **Européene**. 3.ed. Strasbourg: Conseil de l'Europe, 1997.

PRATES, M.V.; BOLCH J., C.; Peptídeos antimicrobianos: uma alternativa no combate a microrganismos resistentes. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**. v.17, p. 30-36, 2000.

PRINS, C.L.; LEMOS, G.C.S.; FREITAS, S.P.. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, Campinas. **Anais**. Campinas. 2003. p.99.

REL, D.. **Eucalyptus, silver money tree.** Disponível em: <http://www.ext.vt.edu/departments/envirohort/factsheets/cut/eucal.html/> Acessado em: 14/04/2004)

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiocologia.** São Paulo: Premier, 1997. 327p.

ROD, R..*Eucalyptus cinerea* . Disponível em: <http://www.hear.org/gcw/html/autogend/species/7782.HTM> Acessado em: 14/04/2004.

ROLLINS, D.M.; Broth Tube MIC. Disponível em: <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/LabMaterialsMethods/BrothTubeMIC.htm> Acessado em: 10/11/2004

RUMYANTSEVA, L.A.. *Eucalyptus cinerea* as a source of cineol. **Aptechnoe Delo.** v.7, n.5, p. 39-43, 1958.

SANTOS, F.A .; Estudo farmacológico de 1,8-cineol, um óxido terpênico presente em óleos essenciais de plantas. In: FABROWSKI, F.J.. ***Eucaliptus smithii* R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil.** Curitiba, 2002, 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

SIANI, A.C; SAMPAIO, A.L.F.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S.. Óleos Essenciais: Potencial anti-inflamatório. **Biocologia: Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p.38-43, 2000.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUZA, S.M.; DUARTE, V.G.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A.. analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology.** v.89, p. 277-283, 2003.

SILVA, P. **Princípios Farmacológicos da Antibioticoterapia.** In: SILVA, P.. **Farmacologia.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.931-948.

SILVESTRE, A.J.D.; CAVALEIRO, J.A.S.; DELMOND,B. FILLIATRE,C.; BOURGEOIS,G.. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globules* Labill. From Portugal using multivariate statistical analysis. **Industrial Crops and Products.** v.6, p. 27-33, 1997.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN,G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.A.; PETROVICK, P.R.. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2000.

SOUTHWELL et al.. Skin irritancy of tea tree oil. In: BALACS, T..Cineole-Rich *Eucalyptus*. **The nternational Journal or Aromatherapy.** V8, n.2, p.15-21, 1997.

SOUZA, M.M.; CRUZ, A.B.; SCHUHMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; CRUZ, R.C.B.. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos

naturais e sintéticos. In: **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M.. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**. V.39, p.60-64, 2004.

THE MERCK INDEX: **An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 11.ed. Rahway, 1989.

THE UNITED STATES **PHARMACOPEIA**. 22. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L.. **Microbiology: an introduction**. 17.ed. New York: Addison Wesley Longman, 2001. p.549-575.

TYLER, V.E.; BRADY, L.R.; ROBBERS, J.E.. **Pharmacognosy**. 9.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988.

VITTI, AM.S.; BRITO, J.O.; Universidade de São Paulo: Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo, 2003. 26f. (Documentos,17)

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M.; **Dragenanalyse: dunnschichtchromatographische analyse von arzneidrogen**. Berlin: Springer – Verlag, 1983.

WILLIAMS, L.. Ranking Antimicrobial Activity. **The International Journal of Aromatherapy**. v.7, n.4, p.32-35, 1996.

WILLIAMS, L.R.; STOGKLEY, J.K.; YAN, W.; HOME, V.N..Essential Oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. **The International Journal of Aromatherapy**. v.8, n.4, p.30-40, 1998.

WILHELM, D.F.; SILVA, E.L; BOVERIS; A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

WIRTHENSOHN, M.G.; SEDGLEY, M.. Effect of pruning on regrowth or cut foliage stems of seventeen *Eucalyptus* species. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. V.38, p.631-636, 1998.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.