

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA GERAL**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA  
HISTOCOMPATIBILIDADE DE EXTRATOS DE *Syzygium  
cumini* (L.) Skeels**

**ANTÔNIO ANDRÉ LIMA DA SILVA**

RECIFE, 2009.

ANTONIO ANDRÉ LIMA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA  
HISTOCOMPATIBILIDADE DE EXTRATOS DE *Syzygium  
cumini* (L.) Skeels**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-  
Graduação do Departamento de Patologia, do  
Centro de Ciências da Saúde, da Universidade  
Federal de Pernambuco, como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de mestre  
em Patologia Geral.**

Orientadoras: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eulália de Azevedo Ximenes  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karina Perrelli Randau

RECIFE, 2009.

Catálogo na fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586a Silva, Antônio André Lima da.  
Avaliação da atividade antimicrobiana e da histocompatibilidade de extratos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels / Antônio André Lima da Silva. – 2009.  
100 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientadora: Eulália de Azevedo Ximenes.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2009.  
Inclui referências e apêndices.

1. Myrtaceae. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Plantas medicinais. 4. Biocompatibilidade. 5. *Syzygium cumini*. I. Ximenes, Eulália de Azevedo (Orientadora). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-235)

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**Centro de Ciências da Saúde – UFPE**

**Av. Prof.Moraes Rego**

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
PATOLOGIA**

**AUTOR: ANTÔNIO ANDRÉ LIMA DA SILVA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA**

**NOME DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
DA HISTOCOMPATIBILIDADE DE EXTRATOS DE *Syzygium cumini* (L.) Skeels**

**ORIENTADORA: PROF DRA EULÁLIA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO XIMENES**

**DATA DA DEFESA: 04 DE SETEMBRO DE 2009.**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Bernadete de Souza Maia**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liriane Baratella Evencio**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque**

*Dedico à minha inesquecível tia,  
Maria das Graças Lima, in memoriam, com carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Ao criador, meu **Deus** agradeço... entre tudo: minha existência;

À minha mãe **Nadja** e irmã **Kaliny** que sempre me apoiaram em cada etapa da minha vida, me ajudando, me incentivando em tudo, pelo amor incondicional expresso em incentivo, preocupação, pelo exemplo de integridade, dedicação, e família, amo vocês;

Às minhas orientadoras **Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes** e pela **Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Karina Perrelli Randau**, pela confiança e apoio sempre depositados, pelo exemplo de profissionalismo e retidão pessoal, bem como pela presença amiga, e acima de tudo por desempenhar com precisão o papel de orientadora, sempre agradecido;

À **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Teresinha Gonçalves** por toda a ajuda no estudo de Biocompatibilidade parte fundamental e inédita do trabalho, meus agradecimentos;

Meus agradecimentos pelo apoio da **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marlene Barbosa** do Departamento de Botânica pela identificação botânica, ao **Prof<sup>o</sup> Dr. Carlos Eduardo Queiroz de Lima**, a **Alex Benício** e ao **Prof<sup>o</sup> Dr. Diógenes Luís da Mota** do Departamento de Farmácia, pela ajuda e dedicação na realização da preparação das lâminas e ao **Prof<sup>o</sup> Samuel Daniel** do Departamento de Farmácia, pela paciência na realização das fotos, sou-lhes muito grato;

A todos os funcionários que fazem parte do programa de mestrado em Patologia, em especial a toda equipe de professores, pelo empenho e dedicação envolvidos neste programa e contribuição no meu aprendizado, serei sempre grato;

Agradeço a todos vocês pela participação na concretização deste sonho, hoje realidade, vivida, glorificada e festejada por todos, minha eterna gratidão.

Que a ciência possa gerar  
cada vez mais  
dúvidas e incertezas,  
para que a cada trabalho,  
tenhamos novas perguntas  
e que a cada pergunta  
possamos ter nova resposta.

André Lima

## RESUMO

*Syzygium cumini* (L.) Skeels é uma planta nativa da Índia, pertencente à família das Myrtaceae. É reconhecida popularmente como jambolão, azeitona preta e usada no tratamento de inflamações, disenterias, úlceras digestivas e diabetes. Entretanto, sua atividade antimicrobiana foi menos investigada. Os objetivos deste estudo foram analisar qualitativamente e semi-quantitativamente a composição química de quatro diferentes extratos brutos (éter de petróleo, acetato de etila, metanol e aquoso) obtidos das folhas de *S. cumini*, determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* frente bactérias e leveduras e, além disso, verificar se existe compatibilidade biológica do extrato aquoso de *S. cumini* com o tecido subcutâneo de ratos Wistar. Estudos fitoquímicos realizados nas folhas de *S. cumini* determinaram vários metabólitos secundários, em especial os taninos hidrolizáveis de reconhecida atividade antimicrobiana. Os extratos foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana usando o método da microdiluição preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Foram utilizados 36 cepas de bactérias dos gêneros *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica* e 8 cepas de leveduras do gênero *Candida albicans*, multirresistentes a diversos antimicrobianos utilizados na clínica médica e do American Type Culture Collection (ATCC). Os resultados obtidos da CIM foram tratados estatisticamente através da Análise de Variância *one-way* (ANOVA). O extrato aquoso extraído das folhas de *S. cumini* foi o mais ativo obtendo uma CIM média de 0,46 mg mL<sup>-1</sup>. Os extratos obtidos demonstraram as maiores atividades contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, particularmente o extrato aquoso mostrou-se ser mais ativos com uma CIM de desvio padrão de 0.41 mg mL<sup>-1</sup> frente às linhagens. A Biocompatibilidade do extrato aquoso mostrou-se sem nenhuma alteração significativa nos elementos estruturais presentes no tecido subcutâneo. Os resultados obtidos aumentam o potencial da planta em aplicações fitoterápicas, sendo promissor o desenvolvimento de medicamentos inovadores baseado nas pesquisas com *S. cumini*.

**Palavras-chaves:** Myrtaceae. Atividade antimicrobiana. Plantas medicinais. Biocompatibilidade. *Syzygium cumini*.

## ABSTRACT

*Syzygium cumini* (L.) Skeels is a native plant of India, belonging to the family of Myrtaceae . It is popularly recognized as jambolan, black olive and used in the treatment of inflammations, dysentery, digestive ulcers and diabetes. However, its antimicrobial activity was less investigated. The objectives of this study were to analyze qualitatively and semi - quantitatively the chemical composition of four different crude extracts (petroleum ether, ethyl acetate, methanol and aqueous) obtained from the leaves of *S. cumini*, determine the in vitro antimicrobial activity ahead bacteria and yeasts and, in addition , check for biological compatibility of the aqueous extract of *S. cumini* with the subcutaneous tissue of rats Wistar. Estudies phytochemicals performed on leaves of *S. cumini* determined several secondary metabolites, especially hydrolyzable tannins recognized antimicrobial activity. The extracts were evaluated for antimicrobial activity using the microdilution method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), 36 strains of the bacteria *Enterococcus faecalis* , *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica* and 8 yeast strains of *Candida albicans* , multidrug resistant to several antimicrobials used in medicine and the American Type Culture Collection (ATCC) were used . The results of MIC were statistically analyzed by one-way (ANOVA) analysis of variance. The aqueous extract extracted from the leaves of *S. cumini* was the most active obtaining an average MIC of 0.46 mg mL<sup>-1</sup>.The extracts showed the highest activities against gram positive bacterium *Staphylococcus aureus*, particularly aqueous extract proved be more active with a standard 0.41 mg mL<sup>-1</sup> strains facing the CIM deviation . The biocompatibility of the aqueous extract was found to be no significant change in the structural elements present in the subcutaneous tissue. The results increase the potential of the plant in herbal applications, and promising the development of innovative medicines based on research with *S. cumini*.

**Keywords:** Myrtaceae. Antimicrobial activity. Medicinal plants. Biocompatibility. *Syzygium cumini*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels (A) Árvore de <i>S.cumini</i> ; (Fonte: www.tropicamente.it) (B) Flores; (Fonte: representação fotográfica) (C) Folhas e Frutos; (Fonte: www.tropicamente.it).....	17
FIGURA 2- Representação fotográfica da folha e da flor de <i>S.cumini</i> (L.) Skeels; .....	19
(Fonte: Representação fotográfica) .....	19
FIGURA 3-Representação da estrutura química do tanino ácido gálico e elágico, respectivamente. ....	20
FIGURA 4. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. FONTE: Simões et al.1999.....	22
FIGURA 5- Exsicata depositada no Herbário UFP- Geraldo Mariz sob número 52.301. ....	28
FIGURA 6- Preparação dos extratos éter de petróleo, acetato de etila, metanólico e aquoso. ....	30
FIGURA 7- Esquema para pesquisa de metabólitos secundários dos extratos de <i>S. cumini</i> por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. ....	31
FIGURA 8- Preparação das soluções padronizadas dos extratos de <i>S. cumini</i> (L.) Skeels .....	38
FIGURA 9- Preparação do inóculo microbiano e da suspensão microbiana. ....	38
FIGURA 10- Esquema para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	40
pelo método de microdiluição em meio líquido. ....	40
FIGURA 11- Esquema realizado para o ensaio de biocompatibilidade do extrato aquoso de <i>S. cumini</i> (L) Skeels com o tecido subcutâneo de ratos albinos Wistar ( <i>Rattus novergicus</i> ) (Antônio André L.Silva, 2008).....	43
FIGURA 12- Metabólitos secundários presente nas folhas de <i>S. cumini</i> (L.) Skeels por Cromatografia de Camada Delgada Analítica. A. Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. ....	45
FIGURA 13- Fotomicrografias do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos albinos. (A, B, C e D) Grupo Controle e (A', B', C' e D') Grupo Tratado, após 7, 14, 28 e 32 dias da injeção com o extrato aquoso de <i>S. cumini</i> (L.) Skeels Aumento (200x) Coloração (HE). (Antônio André L.Silva, 2009).....	57

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

QUADRO 1- Sistemas de solventes e reveladores em cromatografia de camada delgada para a caracterização de metabólicos secundários dos extratos de <i>S. cumini</i> .....	32
TABELA 1- Origem e perfil de suscetibilidade dos microrganismos utilizados nos testes antimicrobianos .....	35
TABELA 2- Análise Qualitativa dos Metabólitos Secundários da folha de <i>Syzygium cumini</i> . .....	45
TABELA 3- Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos diferentes extratos de <i>S. cumini</i> (L.) Skeels frente as cepas estudadas .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância  
ATCC: American Type Culture Collection  
CCB: Centro de Ciências Biológicas  
CCDA: Cromatografia de Camada Delgada Analítica  
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
EAcEt: Extrato Acetato de Etila  
EAQ: Extrato Aquoso  
EEP: Extrato Eter de Petróleo  
EMT: Extrato Metanólico  
EN: União Comitê de Normalização  
FIOCRUZ-RJ: Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro  
HE: Hematoxilina Eosina  
HIV: Human Immunodeficiency Virus (Virus da Imunodeficiência Humana)  
IC: Isolado Clínico  
LACEN-PE: Laboratório Central do Estado de Pernambuco  
pH : Potencial Hidrogeniônico  
SNC: Sistema Nervoso Central  
TCC: Cloreto de Trifeniltetrazólico  
UFC: Unidade Formadora de Colônia  
UFPE: Universidade Federal de Pernambuco  
UFPEDA: Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco  
mg: miligrama  
mL: mililitro  
cm: centímetro  
g : grama  
°C: grau Celsius  
 $\alpha$  : Alfa  
 $\beta$  : Beta  
 $\gamma$  : Gama  
 $\mu\text{L}$  : microlitro  
 $\delta$  : Desvio Padrão

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO .....	12
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Família Myrtaceae e Subfamília Myrtoideae .....	15
2.2 Espécie <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	17
2.2.1 Características botânicas .....	19
2.2.2 Composição Química .....	20
2.2.2 Atividade biológica .....	24
3.OBJETIVOS .....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos .....	27
4.MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
4.1 Material Botânico.....	28
4.2 Estudo Farmacognóstico .....	29
4.2.1 Obtenção dos extratos .....	29
4.2.2 Determinação do perfil fitoquímico dos extratos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	31
4.2 Determinação da atividade antimicrobiana .....	34
4.2.1 Microrganismos.....	34
4.3.2 Obtenção das soluções padronizadas dos extratos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels .....	37
4.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	39
4.3.4 Análise Estatística .....	40
4.4 Avaliação da histocompatibilidade do extrato aquoso de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	40
4.4.1 Animais .....	40
4.4.2 Metodologia aplicada ao estudo da histocompatibilidade de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	41
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
5.1 Perfil fitoquímico .....	44
5.2 Atividade antimicrobiana .....	47
5.3 Histocompatibilidade do extrato aquoso de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	53
6.CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS .....	59
APÊNDICE (ARTIGO) .....	80

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas representaram, durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. No início do século XIX, com o desenvolvimento da química, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; ZARONI et al., 2004; HOSTETTMANN et al., 2003).

A Medicina tradicional é usado em todas as partes do mundo e tem uma importância econômica crescente, principalmente pelo uso de plantas medicinais que têm uma posição respeitável hoje, especialmente nos países em desenvolvimento (AGRA et al., 2007a), onde a saúde do moderno serviço é limitada e representam um tratamento acessível.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a estimativa atual sugere que muitos países desenvolvidos têm uma grande proporção da população fazendo uso da prática tradicional de saúde, especialmente o uso das plantas medicinais. Embora o acesso à medicina moderna esteja disponível nestes países, o uso de ervas medicinais manteve a sua popularidade por razões históricas e culturais. Por outro lado, nos países em desenvolvimento, 65-80% da população depende exclusivamente das plantas medicinais para cuidados básicos de saúde (WHO, 1999).

Plantas medicinais representam importância na saúde e é componente econômico da biodiversidade e também de conservação e uso sustentável, de acordo com (RHAMAN et al., 2004). Informações sobre os conhecimentos tradicionais de plantas medicinais e seus usos representaria um papel vital na descoberta de novos produtos farmacêuticos a partir de plantas como agentes quimioterápicos (ALMEIDA et al., 2001; SILVA et al., 2003; ROCHA et al., 2005; BARBOSA-FILHO et al., 2006, 2007, 2008). As plantas são parte integrante da cultura destes povos e as informações sobre as plantas é passado de geração em geração (AGRA et al., 2007a, b). Um estudo detalhado da botânica e da ação farmacológica das plantas é necessário para a criação de uma base científica que facilitará sua inclusão na prática médica.

A extensão continental do Brasil expressa seu patrimônio natural e genético, pela diversidade das espécies biológicas, bem como pela variedade ecossistêmica dos biomas, e apresenta grande relevância mundial. O uso de plantas medicinais pela população tem

contribuído para exploração desses recursos naturais e sua comprovação científica (MENDONÇA et al., 1998).

No Brasil, apesar de sua rica flora representar 20% das espécies de plantas conhecidas no mundo, somente cerca de 5% destas tem sido estudadas fitoquimicamente, mostrando-se como um campo praticamente inexplorado. Quando se considera o número de plantas submetidas a ensaios biológicos esse percentual é ainda menor (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; OLIVEIRA; BRAGA, 2003); entretanto a comunidade científica já tem demonstrado grande interesse em validar as plantas utilizadas na medicina popular, principalmente quando se refere ao desenvolvimento e produção de novos fitoterápicos e fitofármacos, os quais beneficiariam as indústrias brasileiras e a população (CECHINEL FILHO, 1995; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001; SANT'ANA ; ASSAD, 2004).

A resistência aos antimicrobianos contribui para um perigo acrescido, sofrimento prolongado dos pacientes assim como elevados custos dos cuidados de saúde (CORREIA, 2009). A OMS reconhece que a resistência aos antimicrobianos é um problema grave a nível mundial, afetando os países desenvolvidos e em desenvolvimento (PÁDUA, 2009). O controle de resistência aos antimicrobianos poderá desenvolver-se em torno de três aspectos essenciais: utilização eficaz de antibióticos, programas eficazes de controle da infecção e vigilância epidemiológica (CORREIA, 2009).

O aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos tem aumentado o interesse pela descoberta de novos antibióticos (PÁDUA, 2009). Porém este processo é longo e dispendioso, sendo em média necessários dez anos e investimentos avultados para se colocar um novo antibiótico no mercado (LOPES, 2009).

Atualmente estão a serem desenvolvidas novas alternativas aos antibióticos de modo a combater a crescente resistência dos microrganismos aos antimicrobianos. Como exemplos de grupos antimicrobianos naturais utilizados como alternativas inovadoras ao uso de antibióticos temos, as hidrolases da parede celular bacteriana, os péptidos antimicrobianos e os fagos (ANISIMOV; AMOAKO, 2006; PARISIEN et al, 2008).

O crescimento na procura de medicamentos de origem vegetal relaciona-se a vários fatores, sejam de ordem médica, social, cultural, econômica ou filosófica e mostra que as

plantas medicinais tem sido a opção terapêutica para uma parcela crescente da população brasileira (SANT'ANA; ASSAD, 2004).

Diante do exposto, e dando continuidade aos projetos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Departamento de Antibióticos coordenado pela professora Eulália Ximenes, que tem alcançado expressivos resultados pesquisando plantas medicinais, selecionou-se para o presente trabalho a planta *Syzygium cumini*, a qual a poucos relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana das folhas, assim como sua biocompatibilidade.

Segundo Estrela (2005), biocompatibilidade é a capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem, contudo, causar danos ou prejuízo ao mesmo.

Os estudos *in vivo* permitem uma análise mais detalhada das reações adversas causadas pelas plantas sobre o organismo, uma vez que, as células e os tecidos não existem isoladamente, mas interligados com células e tecidos vizinhos (SAAD *et al.*, 2006). Por este motivo uma análise da ação do extrato aquoso do *S. cumini* frente ao tecido subcutâneo torna-se relevante.

O estudo inédito deste trabalho foi a biocompatibilidade, onde se verifica que o tecido em análise depende de diversos fatores inerentes ao organismo, como a espécie, a herança genética e o local de implantação ou ação, e ao tecido em si; e inerentes ao extrato que são a composição química, polaridade, duração do contato com o organismo (SCHELLINI *et al.*, 1999). A histocompatibilidade está inserida dentro do conceito da biocompatibilidade, no entanto se torna mais particular por se referir a compatibilidade do extrato a ser analisado a um tecido estudado.

Na presente pesquisa, testes de histocompatibilidade foram feitos para tentar avaliar a indução de reações por extratos brutos da espécie *S. cumini*, verificado pela simples aplicação de extratos brutos em tecido subcutâneo de ratos da raça Wistar.

Como forma de complementar o presente estudo, uma análise fitoquímica das folhas de *Syzygium cumini*, que serviu para mostrar o perfil qualitativo dos metabólitos secundários presentes, assim como avaliar se estes apresentam atividade antimicrobiana.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Família Myrtaceae e Subfamília Myrtoideae

Myrtaceae é uma família monofilética pertencente à ordem Myrtales, e conta com aproximadamente 132 gêneros e mais de 5600 espécies (GOVAERTS *et al.* 2008). No Brasil, é constituída por cerca de 24 gêneros e 927 espécies (SOBRAL *et al.* 2010). Tradicionalmente, a família era dividida nas subfamílias Leptospermoideae, com distribuição na Oceania, e Myrtoideae, com distribuição pantropical e centro de irradiação na América do Sul, caracterizadas principalmente pelos frutos secos e carnosos, respectivamente (LEGRAND; KLEIN 1978; SOBRAL, 2003).

Estudos recentes com dados moleculares (WILSON *et al.* 2001, 2005) demonstram que o grupo representado pelos frutos carnosos não é monofilético, pois a evolução desse tipo de fruto ocorreu diversas vezes na família. Assim, Wilson *et al.* (2005) sugeriram uma nova organização da família, separando-a nas subfamílias Psiloxylloideae e Myrtoideae. A primeira é caracterizada principalmente pelas flores unissexuadas e número cromossômico  $n=12$ , e é representada pelos gêneros *Psiloxylon* Thouars ex Tul. e *Heteropyxis* Harv., ambos ocorrentes na África. A segunda tem flores bissexuadas e número cromossômico  $n=11$ , incluindo todas as outras Myrtaceae.

Myrtoideae é composta por 15 tribos, sendo que destas, Myrteae é a mais rica (WILSON, 2005; LUCAS, 2007). É encontrada em regiões tropicais, subtropicais e marítimas, e compreende todas as mirtáceas americanas, com exceção do gênero andino *Tepualia* Griseb. (LANDRUM, 1986; LANDRUM; KAWASAKI, 1997). Apresentam folhas simples e opostas, broquidódromas, com numerosos canais oleíferos presentes na forma de glândulas translúcidas. As inflorescências podem ser de diversos tipos, ou reduzidas a uma única flor. As flores são (3-4-5-6)-meras, actinomorfas, com o cálice variando desde aberto até completamente fechado, abrindo-se por caliptra ou irregularmente. Os estames são numerosos e livres entre si, o ovário é sempre ínfero e o fruto é do tipo baga (BARROSO 1991; LANDRUM; KAWASAKI, 1997; JUDD *et al.*, 2009).

Na tribo Myrteae, três subtribos podem ser separadas de acordo com a morfologia do embrião: Myrtinae, Eugeniinae e Myrciinae. Myrtinae apresenta hipocótilo desenvolvido e

cotilédones pequenos ou vestigiais; Eugeniinae é caracterizada pelo hipocótilo vestigial ou ausente e pelos cotilédones carnosos; e Myrciinae tem o hipocótilo desenvolvido e os cotilédones foliáceos (MCVAUGH, 1968).

Estudos recentes com dados moleculares (LUCAS *et al.*, 2005, 2007) mostram que Myrtinae e Eugeniinae não são monofiléticos, e propõem uma classificação baseada em grupos informais. Dentre as Myrteae americanas, estão os grupos de espécies em torno dos gêneros *Plinia* L., *Myrcia* DC., *Myrceugenia* O.Berg, *Myrteola* O.Berg, *Pimenta* Lindl. e *Eugenia* L.

No Brasil, a família está entre as mais importantes na maioria das formações vegetacionais (SOUZA; LORENZI, 2008), sendo frequentemente a família dominante dentre as espécies arbustivas-arbóreas na Floresta Ombrófila Densa (ASSIS, 2004; MORI *et al.*, 1983; REITZ *et al.*, 1978). Diversos estudos de florística realizados por (BLUM, 2006; DIAS *et al.*, 1998; REGINATO; GOLDENBERG, 2007; SILVA, 1994) também apontam Myrtaceae como a família de plantas lenhosas mais significante.

Esta família é uma das mais importantes da mata Atlântica brasileira. O uso medicinal de muitas de suas espécies tem sido comprovado, como a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e atividade antiviral, hipoglicemiante, antioxidante e anticancerígena (SILVA *et al.*, 2000; APEL *et al.*, 1998). Popularmente, o decocto das folhas de espécies da família tem sido utilizados para mais variadas finalidades medicinais, como antirreumáticos, antidiabéticos, hipoglicemiantes, diuréticos e reguladores do aparelho digestivo (BRITO *et al.*, 1998; BNOUHOM *et al.*, 2006). Entre os exemplos mais frequentes podemos citar a goiabeira, araçá, jabuticaba, ponhema, sabará, pitanga, uvária, cabeludinha, quimixama, guabiroba, cambuci (CERQUEIRA *et al.*, 2000).

## 2.2 Espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels



**FIGURA 1-** *Syzygium cumini* (L.) Skeels (A) Árvore de *S. cumini*; (Fonte: [www.tropicamente.it](http://www.tropicamente.it)) (B) Flores; (Fonte: representação fotográfica) (C) Folhas e Frutos; (Fonte: [www.tropicamente.it](http://www.tropicamente.it))

O *Syzygium* gênero é um dos gêneros da família Myrtaceae que é nativa dos trópicos, particularmente para a América tropical e Austrália. Tem um nível mundial, embora altamente irregular, distribuição em regiões tropicais e subtropicais. O gênero compreende cerca de 1 100 espécies, e tem uma variedade nativa, que se estende da África e Madagascar através do sul da Ásia para o leste através do Pacífico. Seus mais altos níveis de diversidade ocorrer da Malásia para nordeste da Austrália, onde muitas espécies são pouco conhecidos e muitos mais não tenham sido descritas taxonomicamente. As plantas desta família são

conhecidos por serem ricos em óleos voláteis que são relatados para seus usos na medicina (MAHMOUD *et al.*, 2001) e muitas frutas da família têm uma rica história de uso tanto como comestíveis, como os medicamentos tradicionais em práticas etnobotânicas divergentes em todo o tropical e subtropical mundo (REYNERTSON *et al.*, 2005). Algumas das espécies comestíveis de *Syzygium* são plantadas ao longo dos trópicos em todo o mundo.

Jambolão (*S. cumini*) é uma das espécies mais conhecidas e é muito frequentemente cultivada. Os sinônimos de *S. cumini* são *Eugenia jambolana* Lam., *Myrtus cumini* Linn., *Syzygium jambolana* DC., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC., *Eugenia djouant* Perr., *Calyptranthes jambolana* Willd., *Eugenia cumini* (Linn.) Druce. e *Eugenia caryophyllifolia* Lam. (MAHMOUD *et al.*, 2001; MIGLIATO, 2005). É comumente conhecido como jambolão, ameixa preta, jamun, java ameixa, amora indiana, português ameixa, Malabar ameixa, ameixa roxa, Jamaica e ameixa ameixa. (CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004; LORENZI, 2006; JAMELÃO, 2008)

Por muito tempo, no período da história registrada, a árvore é conhecida por ter crescido no sub-continente indiano, e muitas outras contíguas regiões do Sul da Ásia, como a Índia, Bangladesh, Birmânia, Nepal, Paquistão, Sri Lanka e Indonésia. Foi há muito tempo introduzida e tornou-se naturalizada na Malásia. No sul da Ásia, a árvore é venerada pelos budistas, e é comumente plantada perto dos templos hindus, pois é considerado sagrado para o Senhor Krishna (MORTON, 1987). A planta também foi introduzida em muitos locais diferentes em que foi utilizada como um produtor de frutas, como ornamentais e também para a sua madeira. Na Índia, a planta está disponível em toda a planície do Himalaia ao sul da Índia. No Brasil, ela é cultivada em diversos estados das regiões sudeste, nordeste, norte e sul (MIGLIATO *et al.*, 2006). Segundo Sobral *et al.* (2010), Roraima, Amazonas, Pernambuco, e da Bahia ao Rio Grande do Sul.

### 2.2.1 Características botânicas



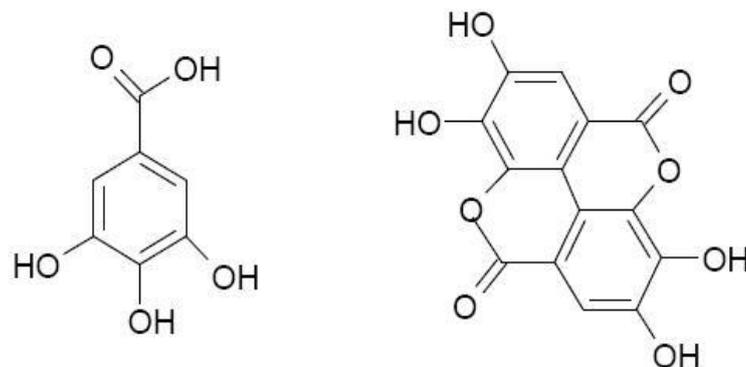
**FIGURA 2-** Representação fotográfica da folha e da flor de *S.cumini* (L.) Skeels;  
(Fonte: Representação fotográfica)

Jambolão é uma árvore de grande porte foliáceo e densamente com casca espessa marrom-acinzentada, esfoliante de escamas lenhosas. A madeira é esbranquiçada, cerca de granulação e durável, oferece corantes marrons e uma espécie de goma. As folhas são coriáceas, oblongo-ovaladas a elípticas ou ovaladas-elíptica com 6 a 12 centímetros de comprimento (extremamente variável em forma, liso e brilhante com vários nervos que unem dentro da margem), a ponto de ser ampla e menos acuminado. As panículas são suportados principalmente abaixo das folhas, sendo muitas vezes axilar ou terminal, e são de 4 a 6 centímetros de comprimento. As flores são perfumadas, branco-esverdeada, em grupos de apenas alguns ou de 10 a 40 e são redondas ou forma oblonga. O cálice é em forma de funil, cerca de 4 milímetros de comprimento e dentes. As pétalas coerentes e caem todos juntos como um pequeno disco. Os estames são numerosos e cerca de tão longa como o cálice. Vários tipos, que diferem na cor e tamanho dos frutos, incluindo algumas raças melhoradas tendo roxo ao violeta ou cor de carne branca e frutas sem sementes foram desenvolvidas. Os frutos são bagas e muitas vezes são, obviamente, oblongo, 1,5 a 3,5 centímetros de comprimento, roxo-escuro ou quase preto, gostoso, carnuda e comestível, que contém uma única semente grande (GAMBLE, 1935; HOOKER, 1879). A planta produz pequenas ameixas roxas, que têm um sabor muito doce, transformando adstringente ligeiramente sobre

as bordas da celulose como o fruto torna-se madura. Os frutos maduros de cor violeta escuro dar a impressão do fruto da oliveira, tanto em peso e da forma e tem um sabor adstringente (CRAVEIRO *et al.*, 1983). A fruta tem uma combinação de doce, levemente amargo e sabor adstringente e tende a cor roxa da língua. No Brasil, as flores de jambolão são encontradas nos intervalos dos meses de setembro a novembro e o fruto, encontrado nos meses de dezembro a fevereiro. (ROSS, 1999; DANADIO, 1998; MORTON, 1987; ALBERTON *et al.*, 2001; MIGLIATO, 2006; THE BRITISH HERBAL PHARMACOPEIA, 1983; OLIVEIRA, 2000)

### 2.2.2 Composição Química

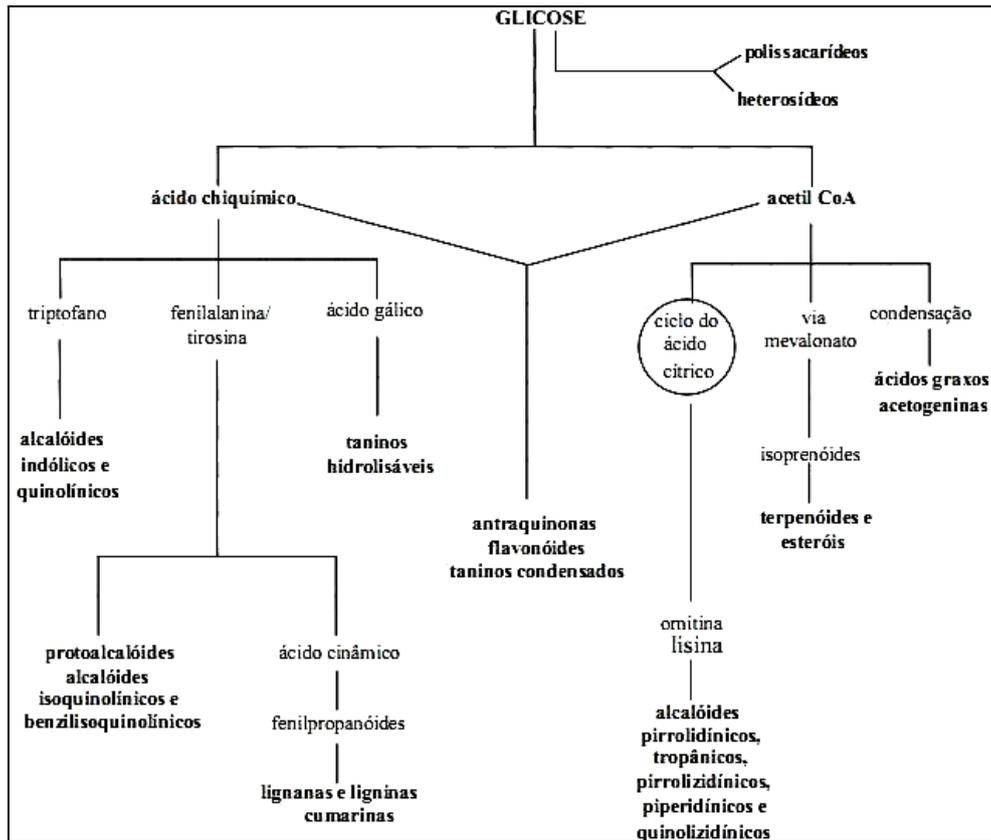
Vários componentes fazem parte da composição química de frutas e hortaliças, os quais conferem as características de cor, de sabor e de flavor, além dos efeitos nutricionais e nutracêuticos. Centenas de componentes podem estar presentes nos tecidos vegetais, mas a grande maioria se apresenta em quantidades muito pequenas quando expressos em peso. Dentre os componentes mais importantes presentes nos vegetais, incluem-se a água, carboidratos, lipídeos, proteínas, enzimas, pigmentos, vitaminas, taninos e minerais. No entanto, muitos destes componentes resultantes do metabolismo secundário, desempenham grande importância. Os vegetais possuem diferentes proporções desses componentes; no entanto, vegetais de uma mesma espécie possuem uma composição definida, a qual é característica da planta (HARBONE, 1998; WILLIAMS, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2007).



**FIGURA 3**-Representação da estrutura química do tanino ácido gálico e elágico, respectivamente.

As substâncias químicas consideradas como princípios ativos encontrados nos vegetais são, na maioria, provenientes do metabolismo secundário tendo uma função ligada ao relacionamento da planta com o ambiente que a envolve (MAIA, 2008). Os compostos oriundos do metabolismo secundário são os responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas e apresentam grande importância ecológica, pois representam uma defesa química contra insetos e micro-organismos ou podem interferir em processos simbióticos (MAZID *et al.*, 2011; VERPOORTE; MEMELINK, 2002). A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, através de dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (FIGURA 4). Alguns metabólitos derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação destas vias, como é o caso dos flavonóides e taninos hidrolisáveis (SIMÕES *et al.*, 1999b).

A maior parte da diversidade estrutural dos metabólitos secundários é gerada por modificações na cadeia carbônica principal da estrutura. Essas modificações podem alterar a atividade biológica do composto derivado em relação à estrutura inicial (KLIEBENSTEIN, 2004). Os metabólitos secundários são classificados de acordo com as suas rotas biossintéticas. Três famílias de metabólitos geralmente são utilizadas para a classificação: fenólicos, terpenos/esteróides e alcalóides (BOURGAUD *et al.*, 2001).



**FIGURA 4.** Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. FONTE: Simões *et al.* 1999.

Para se proceder a caracterização de um determinado grupo de substâncias presentes em um vegetal, deve-se primeiramente, extrair compostos com um solvente adequado, para depois caracterizá-los no extrato. Essa caracterização tem sido investigada por meio de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico (SIMÕES *et al.*, 1998).

*Syzygium cumini* apresenta constituintes químicos diversos e, por meio da triagem fitoquímica, os compostos apresentam variabilidade nas diferentes estruturas de sua anatomia, sendo nas sementes encontrados taninos hidrolisáveis (ácido gálico e elágico) ver figura 3 acima, quercetina, antimelina, óleo essencial ( $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, *cis*-ocineno, *trans*-ocineno,  $\gamma$ -terpineno, acetato de bornila,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -humuleno e candineno), materiais resinosos e glicose, nas cascas foram encontrados ácido acetil oleanólico, triterpenóides, ácido elágico, isoquercetina, quercetina, canferol e miricetina, nas folhas foram encontrados ácido gálico, metilgalato, canferol, miricetina, ácido elágico, quercetina e nilocitina, nos frutos foram encontradas antocianidinas e nas flores foi encontrado ácido

oleanólico (ROSS,1999; MAHMOUD *et al.*, 2001; ALBERTON *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2003, BHATIA; BAJAJ, 1975; AHMAD; BEG, 2001).

A adstringência da polpa de jambolão deve-se à presença de taninos, compostos fenólicos de alto peso molecular, que também estão presentes em frutas como o caju (*Anacardium sp.*) e a banana (*Musa sp.*) verde. À medida que as frutas amadurecem, geralmente ocorre uma redução da adstringência, que é atribuída à perda de solubilidade do tanino. Porém, em pequenas proporções ou em combinação com outros componentes do alimento, a adstringência pode contribuir para um sabor desejável, como em vinhos feitos com cultivares de uvas pigmentadas. Os taninos, quando ingeridos em grande quantidade, podem precipitar proteínas, inibir enzimas digestivas e afetar a absorção de vitaminas e minerais; por isso, ainda podem ser considerados nutricionalmente indesejáveis. Entretanto, atualmente, os resultados negativos envolvendo esta classe de compostos fenólicos na alimentação têm sido revistos (VIEGAS *et al.*, 2007; LAGO *et al.*, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Viegas *et al* (2007), confirmam a presença de três antocianinas principais, identificadas como glucoglicosídeos, delphinidina, petunidina e malvidina. Segundo o artigo, os elevados teores de antocianinas encontrados no jambolão (230 mg/100 g em base seca) são equivalentes aos teores encontrados nos “blueberries”, recentemente classificados como a primeira comodite nutracêutica de grande valor comercial. Os resultados apresentados sugerem que a elevada atividade antioxidante do extrato de jambolão, aliado ao forte potencial corante do mesmo, com características desejáveis de solubilidade e estabilidade, poderiam estimular a incorporação do extrato como aditivo natural para ser empregado em alimentos e em formulações farmacêuticas. O valor medicinal das plantas encontra-se em alguns produtos químicos que produzem uma ação fisiológica definida sobre o corpo humano. O mais importante destes compostos bioativos de plantas são alcalóides , flavonoides, taninos e compostos fenólicos (EDEOGA *et al.*, 2005).

### 2.2.2 Atividade biológica

O intenso emprego desta planta na medicina popular estimulou a pesquisa científica, identificando indicações terapêuticas devido às inúmeras ações farmacológicas do *S. cumini*.

O *S. cumini* se destaca pela riqueza em vários constituintes. A literatura relata sua ação hipoglicemiante, antimicrobiana, hipotensiva, diurética, cardiotônica, antiinflamatória, estimulante do sistema nervoso central, anticonvulsivante, antihemorrágica e antiescorbútica. Devido a essas atribuições, tem se popularizado o emprego de suas folhas no tratamento de constipação, úlcera venérea, purificação de sangue, interrupção de hemorragia nas fezes, disenteria, asma, bronquite, gengivite, estomatite, queimaduras, retenção urinária e descamações do couro cabeludo (MIGLIATO *et al.*, 2007).

A *S. cumini* tem sido intensamente estudada como um agente antidiabético e é frequentemente recomendada como um auxílio no tratamento do diabetes tipo 2 (BONA *et al.*, 2010). No Brasil, a maioria das pessoas utiliza uma infusão ou uma decocção das folhas secas em uma diluição média de 2,5 g/L (TEIXEIRA; FUCHS, 2006). A inibição da  $\alpha$ -glicosidase, normalmente associado ao tratamento da diabetes tipo 2, tem sido apontado como um dos possíveis mecanismos de ação para a atividade antidiabética de *S. cumini* extrato de semente (SHINDE *et al.*, 2008).

Vários estudos foram realizados com folha, semente e casca de extratos de *S. cumini* nesta ordem para demonstrar a atividade antidiabética *in vivo*. Esta atividade tem sido demonstrada por vários grupos de pesquisa e atribuídos a diferentes produtos naturais, tais como flavonóides (SHARMA *et al.*, 2008), ácido ferúlico (MANDAL *et al.*, 2008), derivados androstane (SHANKAR *et al.*, 2007), e saponinas (DAMASCENO *et al.*, 2002).

As folhas apresentam atividades biológicas e além de usadas em diabetes, têm também ação hipotensiva, diurética, adstringente, contra obstipação, leucorréia e prurido, e são usadas em cataplasmas para doenças de pele (ROSS, 1999; MORTON, 1987; ALBERTON *et al.*, 2001; ZANOELLO *et al.*, 2002; SCHAPOVAL *et al.*, 1988). Possuem outras ações farmacológicas como atividade anti-inflamatória (LIMA *et al.*, 2007) e boa atividade antibacteriana contra *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* (SHAFI *et al.*, 2002). Ácido ferúlico e catequinas também têm sido considerados como responsáveis pela atividade antioxidante do extrato de folha (RUAN *et al.*, 2008).

Algumas outras atividades têm sido relatadas para extratos de *S. cumini*, como larvicida contra *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles stephensi* (PUSHPALATHA; MUTHUKRISHNAN, 1995), as atividades antileishmanial e antifúngicos (BRAGA *et al.*, 2007), como o aumento da fosfatase alcalina uterina em camundongos induzida pelo extrato de folhas (SANWAL *et al.*, 1973), e o efeito anti-histamínico do extrato de folha de aquoso (BRITO *et al.*, 2007).

Nas sementes estão presentes os taninos hidrolisáveis responsáveis pela atividade anticonvulsivante, eupéptica, antiinflamatória, bactericida, hipoglicemiante, adstringente, contra obstipação, anti-hemorrágica para alterações no estômago, antidiarréica e hipotensiva. Fração de flavonóide no extrato da semente, mostrou eficácia *in vitro* contra multi-drogas resistentes a bactérias entéricas. (ROSS, 1999; MORTON, 1987; ALBERTON *et al.*, 2001; DAMASCENO *et al.*, 2002; PEPATO *et al.*, 2001).

A casca da árvore é outra parte do jambolão que também é aproveitada para fins terapêuticos. Ela é utilizada no tratamento de bronquite, inflamação na garganta e asma (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012; SULTANA *et al.*, 2007). Sutana *et al.*, (2007) analisaram a atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos de extratos preparados a partir da casca de três árvores diferentes, entre elas a árvore do jambolão. Outro estudo mostrou que o extrato etanólico da casca do jambolão possui significativa atividade anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais (MURUGANANDAN *et al.*, 2001).

Os frutos do jambolão além de possuir atividade antioxidante *in vitro* (FARIA *et al.*, 2011) e atividade anti-hiperglicêmica (SHARMA *et al.*, 2006), extratos preparados a partir dos frutos demonstraram ter efeitos anti-proliferativo e pró-apoptótico contra células cancerígenas de mama, mas não contra células normais de mama (LI *et al.*, 2009).

Depois de comprovada atividade terapêutica da planta, são requeridos estudos complementares que garantam segurança em relação à toxicidade. Estes testes incluem citotoxicidade, hepatotoxicidade e biocompatibilidade. Geralmente, os testes de citotoxicidade e hepatotoxicidade avaliam os efeitos tóxicos *in vitro*, enquanto que os testes de biocompatibilidade avaliam *in vivo*.

Assim sendo, este trabalho, que tem como um dos objetivos testar a biocompatibilidade do extrato aquoso de *S. cumini* em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos,

como forma de adicionar novos conhecimentos a respeito do uso de plantas locais como possíveis agentes terapêuticos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Determinar o perfil fitoquímico, a atividade antimicrobiana e histocompatibilidade de extratos obtidos das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels.

#### 3.2 Específicos

- Obter a partir das folhas de *S. cumini* os extratos de éter de petróleo, acetato de etila, metanólico e aquoso;
- Determinar o perfil fitoquímico de *S. cumini* através da pesquisa dos metabólitos secundários: alcalóides, monoterpenóides e sesquiterpenóides, triterpenóides e esteróides, iridóides, açúcares redutores, flavonóides, derivados cinâmicos, fenilpropanóides, cumarinas, proantocianidinas e leucoantocianidinas, saponinas, antraquinonas e taninos hidrolisáveis;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de éter de petróleo, acetato de etila, metanólico e aquoso de *S. cumini*, frente a 36 bactérias e 8 leveduras;
- Avaliar a histocompatibilidade do extrato aquoso das folhas de *S. cumini* com o tecido subcutâneo de ratos albinos Wistar.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material Botânico

As folhas de *Syzygium cumini* foram coletadas em dezembro de 2007 no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), estado de Pernambuco, Brasil (8° 03' 16,26" S e 34° 56' 49,72" W) e 12,8 m acima do nível do mar.

A coleta foi realizada dos indivíduos adultos, antes do período de floração a qual ocorre de janeiro a março. Com este material foi efetuada a secagem e acondicionamento entre folhas de jornais prensado. A identificação foi realizada pela bióloga Marlene Barbosa do Departamento de Botânica da UFPE, onde encontra-se a exsicata (FIGURA 5) depositada sob o número 52.301 no Herbário do Centro de Ciências Biológicas (CCB).

As amostras destinadas ao protocolo fitoquímico foram acondicionadas em sacos de “nylon” e encaminhadas ao Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE para as operações que precedem a obtenção dos extratos propriamente dita.



**FIGURA 5-** Exsicata depositada no Herbário UFP- Geraldo Mariz sob número 52.301.

## 4.2 Estudo Farmacognóstico

### 4.2.1 Obtenção dos extratos

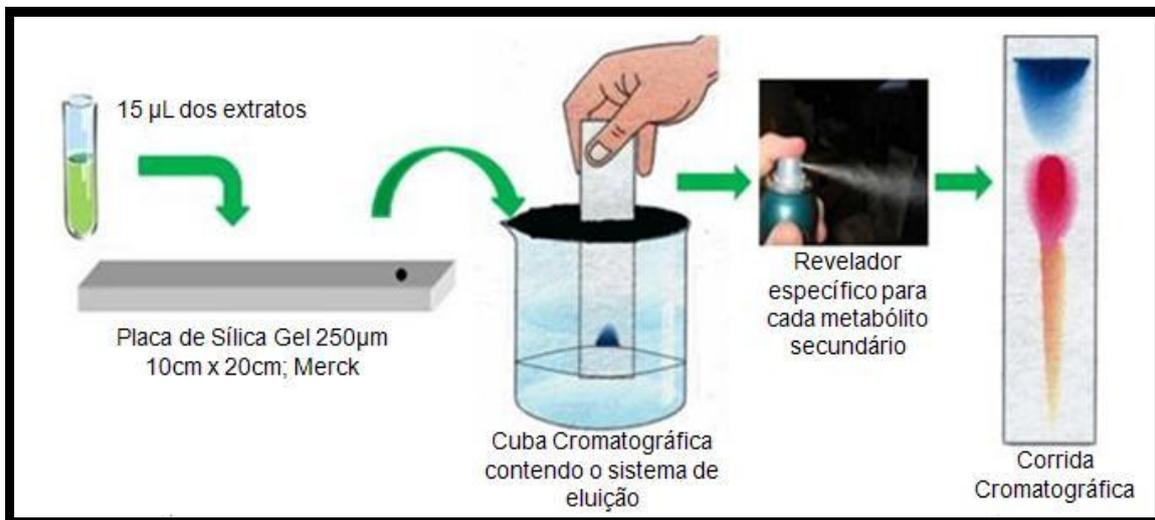
As folhas de *S. cumini* foram secas à temperatura ambiente e em seguida trituradas em moinho elétrico (Primotécnica Mod. P2003). Os extratos das folhas (50 g) de *S. cumini* foram obtidos por esgotamento (maceração) com os seguintes solventes em polaridade crescente: éter de petróleo (EEP), acetato de etila (EAcEt), metanólico (EMT) e aquoso (EAQ). A maceração foi preparada utilizando 300 mL de solventes a quente em torno de 50 °C para reduzir o tempo de maceração que durou 3 horas. Cada extrato foi filtrado e os solventes eliminados com o auxílio de evaporador rotatório (Modelo Q344B) sob pressão reduzida. Os extratos foram acondicionados em frasco âmbar e mantidos sob refrigeração, exceto para o extrato aquoso que foi liofilizado (FIGURA 6). O rendimento para cada extrato foi calculado a partir de 50 g das folhas estudada. Esta etapa experimental foi realizada no Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE sob a orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dra. Karina Perrelli Randau.



FIGURA 6- Preparação dos extratos éter de petróleo, acetato de etila, metanólico e aquoso.

#### 4.2.2 Determinação do perfil fitoquímico dos extratos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Dos extratos foram retirados uma alíquota de 15µL e submetidos à Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) em placas de gel de sílica com camada de 250 µm e de 20 cm x 20 cm de tamanho (MERK-Germany, 15553), (FIGURA 7) empregando-se diversos sistemas de solventes: **A-** [EtOAc-HCOOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (100 : 11: 11: 27 v/v)]; **B-** [Benzeno-EtOAc (97 : 3 v/v)]; **C-** [EtOAc-HCOOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (100 : 0,5 : 0,5 : 0,5 v/v)]; **D-** [n-BuOH-Me<sub>2</sub>CO-tampão fosfato pH = 5,0 (40 : 50 : 10 v/v)], **E-** [Éter-tolueno-AcOH 10% (50 : 50 : 50 v/v)] (QUADRO 1), bem como reveladores específicos para a pesquisa de metabólitos secundários dos extratos das folhas de *S. cumini* a saber: Alcalóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos, cumarinas, flavonóides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas, taninos hidrolisáveis, mono e sesquiterpenóides, triterpenóides e esteróides, iridóides, saponinas e açúcares redutores onde foram identificados pela cor, sempre comparado ao padrão utilizado para cada metabólito (MARKHAM, 1982; HARBORNE, 1998; WAGNER, 1996; RANDAU *et al*, 2004). A determinação de antraquinonas foi realizada pela metodologia de Borntträger em tubos de ensaio (COSTA, 2002).



**FIGURA 7-** Esquema para pesquisa de metabólitos secundários dos extratos de *S. cumini* por Cromatografia em Camada Delgada Analítica.

**QUADRO 1-** Sistemas de solventes e reveladores em cromatografia de camada delgada para a caracterização de metabólicos secundários dos extratos de *S. cumini*

<b>METABÓLITOS</b>	<b>SISTEMAS DE ELUIÇÃO</b>	<b>REVELADOR</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
Alcalóides	(A) Acetato de etila - Ácido fórmico - Ácido acético e Água (100:11:11:27v/v)	Dragendorff	(WAGNER, 1996)
Monoterpenóides, Sesquiterpenóides	(B) Benzeno- Acetato de etila (97:3v/v)	Vanilina sulfúrica	(WAGNER, 1996)
Triterpenóides e Esteróides	(C) Acetato de etila - Ácido fórmico - Ácido acético e Água (100:0,5:0,5:0,5v/v)	Lieberman/Burchard	(HARBORNE, 1998)
Iridóides	(A) Acetato de etila - Ácido fórmico - Ácido acético e Água (100:11:11:27v/v)	Vanilina sulfúrica	(WAGNER, 1996)
Saponinas	(A) Acetato de etila - Ácido fórmico - Ácido acético e Água (100:11:11:27v/v)	Vanilina sulfúrica	(WAGNER, 1996)
Açúcares redutores	(D) n-Butanol- Acetona- Tampão fosfato pH= 5,0 (40:50:10v/v)	Trifeniltetrazólio	(METZ, 1961)

Cumarinas	(E) Éter-tolueno- Ácido acético 10% (50:50:50v/v)	Ultra Violeta (U. V)	(WAGNER, 1996)
Derivados Cinâmicos	(A) Acetato de etila - Ácido fórmico - Ácido acético e Água (100:11:11:27v/v)	Difenilboriloxietilamina	(MARKHAM, 1982) (NEU, 1956)
Flavonóides	(A) Acetato de etila - Ácido fórmico - Ácido acético e Água (100:11:11:27v/v)	Difenilboriloxietilamina	(WAGNER, 1996) (MARKHAN, 1982)
Fenilpropanoglicosídeos	(A) Acetato de etila - Ácido fórmico - Ácido acético e Água (100:11:11:27v/v)	Difenilboriloxietilamina	(WAGNER, 1996)
Proantocianidinas Condensadas e Leucoantocianidinas	(A) Acetato de etila - Ácido fórmico - Ácido acético e Água (100:11:11:27v/v)	Vanilina clorídrica	(ROBERTS, 1956)
Taninos hidrolisáveis	(D) n-Butanol- Acetona -Tampão fosfato pH= 5,0 (40:50:10v/v)	Alumem de ferro Difenilboriloxietilamina	(STIASNY, 1912)

## 4.2 Determinação da atividade antimicrobiana

### 4.2.1 Microrganismos

A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e leveduras do gênero *Candida*.

Neste experimento foram utilizados 44 microrganismos alguns deles obtidos a partir de espécimes de pacientes acometidos por infecções e com um fenótipo de resistência para diversos agentes antimicrobianos, a saber: *Enterococcus faecalis* IC 068, IC 144, IC 55245, IC 55295, IC 56288, IC 56354, IC 55671, IC 55915, IC 55995; *Escherichia coli* IC 18; *Staphylococcus aureus* IC 138, IC 311, IC 155, IC 247 e *Pseudomonas aeruginosa* IC 01, IC 02, IC 03, IC 05, IC 06, IC 10, IC 12, IC 13, IC 16. Também foram utilizadas oito cepas de *Candida albicans* isoladas de diferentes espécimes clínicos IC 09, IC 11, IC 12, IC 16, IC 17, IC 19, IC 25, IC 26. *Escherichia coli* O157:H7 foi proveniente da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro FIOCRUZ-RJ; *Escherichia coli* 1 QC e *Staphylococcus aureus* 13 QC, isoladas do queijo coalho, e quatro sorotipos de *Salmonella enterica* Rubislaw, Saintpaul, Anatum P-58 e Anatum 873 que foram provenientes do Laboratório Central do Estado de Pernambuco LACEN-PE.

Seis microrganismos de coleção representantes de cada gênero bacteriano estudado: *Enterococcus faecalis* ATCC 27212 ATCC-American Type Culture Collection; *Escherichia coli* ATCC 8739; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028, e *Salmonella enterica* DAUFPE 415 DAUFPE-microrganismo pertencente à Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Estes microrganismos estão listados na TABELA 1.

As bactérias e leveduras foram mantidas em agar inclinado de Müller-Hinton ou de Sabouraud respectivamente e foram mantidas sob refrigeração a 4 °C. Esta etapa experimental foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

TABELA 1: Origem e perfil de suscetibilidade dos microrganismos utilizados nos testes antimicrobianos

<b>Microrganismos</b>	<b>Origem</b>	<b>Resistência</b>	<b>Sensibilidade</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 068	Urina	CLO; ERI; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 144	Urina	CLO; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 55245	Urina	ND	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 55295	Urina	ND	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 56288	Urina	CLO; GEN; TET; ATM; AMP	TEIC; VAN
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 56354	Urina	CLO; ERI; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 55671	Urina	CLO; GEN; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 55915	Urina	ND	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 55995	Urina	CLO; ERI; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 27212	ATCC	ND	Sensível a NIT, LMX, VAN, NET, RIF, AZI, SUTe OFX
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	ATCC	ND	CLO; AMP; CFL; CTX; MER; SZT; AMI; GEN; CIP; TET; IMP; CPM; TOB; NIT; ATM
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 INCQS 0071	FIOCRUZ-RJ	ND	CLO; AMP; CFL; CTX; MER; SZT; AMI; GEN; CIP; TET; IMP; CPM; TOB; NIT; ATM
<i>Escherichia coli</i> 1 QC	Queijo de coalho	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> IC 18	Urina	AMP; CFO	CTX
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	ATCC	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> UFPEDA 415	Coleção de microrganism os da UFPEDA	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> Rubislaw	IC 3373	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> Saintpaul	IC 391	ND	ND

<i>Salmonella enterica</i> Anatum P-58	Isolado do molusco <i>B.</i> <i>glabrata</i>	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> Anatum	IC 873	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	ATCC 6538	American type culture collection	Sensível a NIT, LMX, VAN, NET, RIF, AZI, SUTe OFX
<i>Staphylococcus aureus</i> 13 QC	Queijo de coalho	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 138	IC 138	Secreção vaginal	Resistente: AMI, GEN, Sulfonamida, CTX, ERI, CLO
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 311	Ferida do dedo	GEN; AMI; CFO; CTX;CLO; SZT;ERI;TET; PEN	CIP
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 155	Ferida do dedo	GEN; AMI; CFO; CTX;CLO; SZT;ERI;TET; PEN	CIP
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 247	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	ATCC	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 01	Hemocultura	CIP;GAT;GEN;AMI,CFL ,CFO; CTX;CPM;CL;IMP;MER	ATM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 02	Secreção hepática	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; COM; CLO; IMP; MER; SZT	ATM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 03	Secreção traqueal	CIP;GAT;GEN;AMI,CFL ,CFO; CTX; CPM;CL;IMP;MER	ATM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 10	Secreção abdominal	CIP; GEN; AMI, CFL; 8CFO; CTX; CPM;TOB;ATM; IMP;MER	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 12	Urina	AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CIP; GENT; TOB; ATM; IMP; MER; SZT; NIT; NAL; CLO; TET	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 13	Urina	CFL; CFO; CTX; CIP; GEN; TOB; SZT; NIT; NAL; CLO; TET; NOR	MER
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 05	ND	ND	ND

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 16	Hemocultura	GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; COM; CLO; IMP; MER; SZT; AMP- SUB; ATM	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 06	IC 06	ND	ND
<i>Candida albicans</i> IC 25	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 26	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 09	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 11	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 12	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 16	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 17	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 19	Cavidade oral	ND	Miconazol

**AMI:** Amicacina 30 µg; **AMOX:** Amoxicilina 10 µg; **AMP:** Ampicilina 10 µg; **AMP-SUB:** Ampicilina/Subetam 10 µg/10 µg; **ATM:** Aztreonam 30 µg; **AZI:** Azitromicina 15 µg; **CFL:** Cefalotina 30 µg; **CFO:** Cefoxitina 30 µg; **CIP:** Ciprofloxacino 5 µg; **CLO:** Cloranfenicol 30 µg; **CPM:** Cefepime 30 µg; **CTX:** Cefotaxima 30 µg; **ERI:** Eritromicina 15 µg; **GAT:** Gatifloxacina 10 µg; **GEN:** Gentamicina 10 µg; **NAL:** Ácido Nalidíxico 30 µg; **NIT:** Nitrofurantoina 30 µg; **NOR:** Norfloxacinina 10 µg; **IPM:** Imipenem 10 µg; **MER:** Meropenem 10 µg; **TEIC:** Teicoplanina 30 µg; **TET:** Tetraciclina 30 µg; **TOB:** Tobramicina 10 µg; **SZT:** Sulfazotrim 25 µg; **VAN:** Vancomicina 30 µg;  
**ATCC:** American Type Culture Collection  
**IC:** Isolado clínico  
**ND:** Não determinado

#### 4.3.2 Obtenção das soluções padronizadas dos extratos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Numa etapa anterior à determinação da CIM propriamente dita, os extratos secos de *S. cumini* de éter de petróleo (EEP), acetato de etila (EAcEt) e metanólico (EMT) foram obtidas soluções padronizadas de concentração equivalente a 2 mg/mL, através de pesagem analítica e dissolução em um sistema composto por dimetilsulfóxido (DMSO)/Tween/H<sub>2</sub>O (1,5:1,0:17,5) v/v/v. Os extratos apresentaram colorações diferentes de acordo com o solvente utilizado. Para o (EEP); coloração amarelada, para o (EAcEt); coloração verde, para o (EMT); verde claro e o (EAQ) foi submetido à uma liofilização resultando em um pó fino de coloração marrom, pesado e solubilizado em água destilada de modo a obter uma solução de igual

concentração. Estes extratos foram esterilizados por filtração sob membrana millipore de 0,45  $\mu\text{m}$ ), FIGURA 8.



**FIGURA 8-** Preparação das soluções padronizadas dos extratos de *S. cumini* (L.) Skeels

Os inóculos bacterianos foram obtidos a partir das culturas de 18 horas de incubação a 37 °C em meio líquido de Müller-Hinton. Para as leveduras os inóculos foram obtidos a partir das culturas de 48 horas de incubação a 37 °C em meio líquido de Sabouraud. Com essas culturas foram realizadas as suspensões em água destilada, cuja diluição foi ajustada à turbidez segundo o tubo padrão 0,5 da escala de MacFarland, o que equivale a  $10^8$  UFC/mL (FIGURA 9).



**FIGURA 9-** Preparação do inóculo microbiano e da suspensão microbiana.

### 4.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

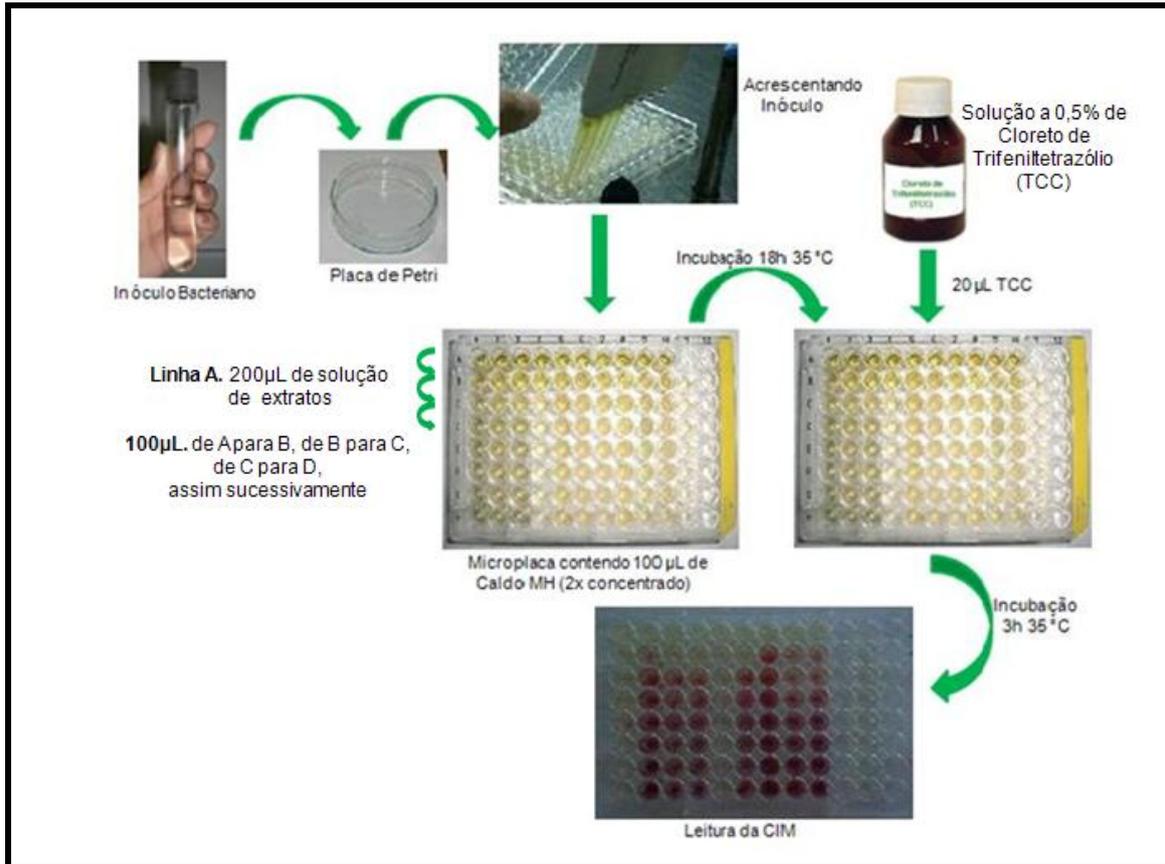
A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Para isso, foram utilizadas microplacas estéreis de 96 cavidades (INLAB) com fundo em “U”. Um volume de 200 µL das soluções padronizadas dos extratos foram depositadas nas colunas de 1 a 10 da linha A. Os demais orifícios foram preenchidos com 100 µL de caldo Müller-Hinton para bactérias e o meio RPMI 1640 para leveduras, ambos duas vezes concentrado. Em seguida, 100 µL das soluções dos extratos de cada orifício da linha A foram transferidos para os orifícios da linha B e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C. Este procedimento foi repetido até a linha H. Nos últimos orifícios da linha H o volume excedente foi desprezado. Desta forma foram obtidas concentrações decrescentes dos extratos (1 mg/mL – linha B; 0,5 mg/mL – linha C; 0,25 mg/mL – linha D, e assim por diante). Os inóculos microbianos padronizados  $10^8$  UFC/mL foram diluídos 1/10 em solução salina esterilizada (0,9%) e desta suspensão microbiana um volume de 5 µL ( $10^4$  UFC/mL) foram depositadas em todos os orifícios das linhas A-H.

Os orifícios da coluna 11 foram reservados para o controle de uma possível atividade intrínseca do DMSO, utilizado na preparação dos extratos. Nesta coluna, um volume de 200 µL de uma solução de DMSO a 10% foi depositado e posteriormente os inóculos, em seguida foram diluídos em caldo Müller-Hinton até a linha H. Os orifícios da coluna 12 receberam apenas caldo Müller-Hinton ou RPMI 1640 para verificação da esterilidade da placa.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 18 horas para bactérias e 28 °C por 48 horas para leveduras. Decorrido este intervalo de tempo foi depositado em cada um dos orifícios 20 µL de uma solução aquosa a 0,5% de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TCC) -VETEC e as microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C.

Após esta última incubação a presença de uma coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do extrato, enquanto a ausência de coloração vermelha foi considerada prova positiva da ação dos extratos (FIGURA 10).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do extrato em mg/mL capaz de impedir o crescimento microbiano, ou seja, o aparecimento da coloração vermelha.



**FIGURA 10-** Esquema para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em meio líquido.

#### 4.3.4 Análise Estatística

Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram submetidos à análise estatística por testes não paramétricos. Para comparação das médias da CIM dos diferentes extratos de *S. cumini*, foi utilizado o teste Análise de Variância (ANOVA)-GraphPad Prism 5.0 em todos microrganismos.

#### 4.4 Avaliação da histocompatibilidade do extrato aquoso de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

##### 4.4.1 Animais

O extrato aquoso de *S. cumini* foi o escolhido para dar o prosseguimento à pesquisa sobre biocompatibilidade com o tecido conjuntivo de ratos albinos. Esta escolha deve-se ao

fato deste extrato apresentar atividade antimicrobiana principalmente sobre *S. aureus*. Como vantagem, além do extrato apresentar maior atividade, o veículo é inócuo aos tecidos.

Para a avaliação da histocompatibilidade do extrato aquoso de *S. cumini* com tecido subcutâneo, foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus*, albino Wistar) machos e com 60 dias de vida, pesando em média  $275 \pm 25$  g, procedentes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Os animais foram divididos em gaiolas de polietileno, em número de 6 por gaiola, e mantidos à temperatura de  $22 \pm 2$  °C, sob condições padrão de iluminação (ciclo claro-escuro de 12/12 horas), tendo livre acesso à água e ração LABINA<sup>®</sup> (Agribands Purina do Brasil Ltda).

Os procedimentos adotados no manejo dos animais foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo “National Institute Guide for Care and Use of Laboratory Animals” e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE sob o número 23076.005814/2008-18.

Para a análise histológica do tecido subcutâneo, os animais foram divididos em quatro grupos, cada grupo com seis animais (n=24): grupo I (grupo eutanasiado após sete dias da injeção do extrato), grupo II (grupo eutanasiado após quatorze dias da injeção do extrato), grupo III (grupo eutanasiado após vinte e oito dias da injeção do extrato) e grupo IV (grupo eutanasiado após trinta e dois dias da injeção do extrato). Esta etapa experimental foi realizada no Departamento de Antibióticos CCB- UFPE, sob supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Terezinha Gonçalves da Silva.

#### **4.4.2 Metodologia aplicada ao estudo da histocompatibilidade de *Syzygium cumini* (L.) Skeels**

Em cada animal foi realizada uma tricotomia na região dorsal e a antissepsia do local com solução de polivinilpirrolidona a 10% (MERCK).

Duas aplicações simétricas utilizando seringa de 1mL e agulha 13 por 4,5 mm, foram efetuadas no tecido subcutâneo localizado na linha média, equidistante da inserção da cauda e da cabeça do animal. Uma do lado direito onde foi aplicado o extrato aquoso de *S. cumini* na

concentração inibitória mínima 0,4 mg/mL, equivalente a dose de 1,3mg/Kg e outra do lado esquerdo, onde foi aplicado a solução fisiológica 0,9% (controle).

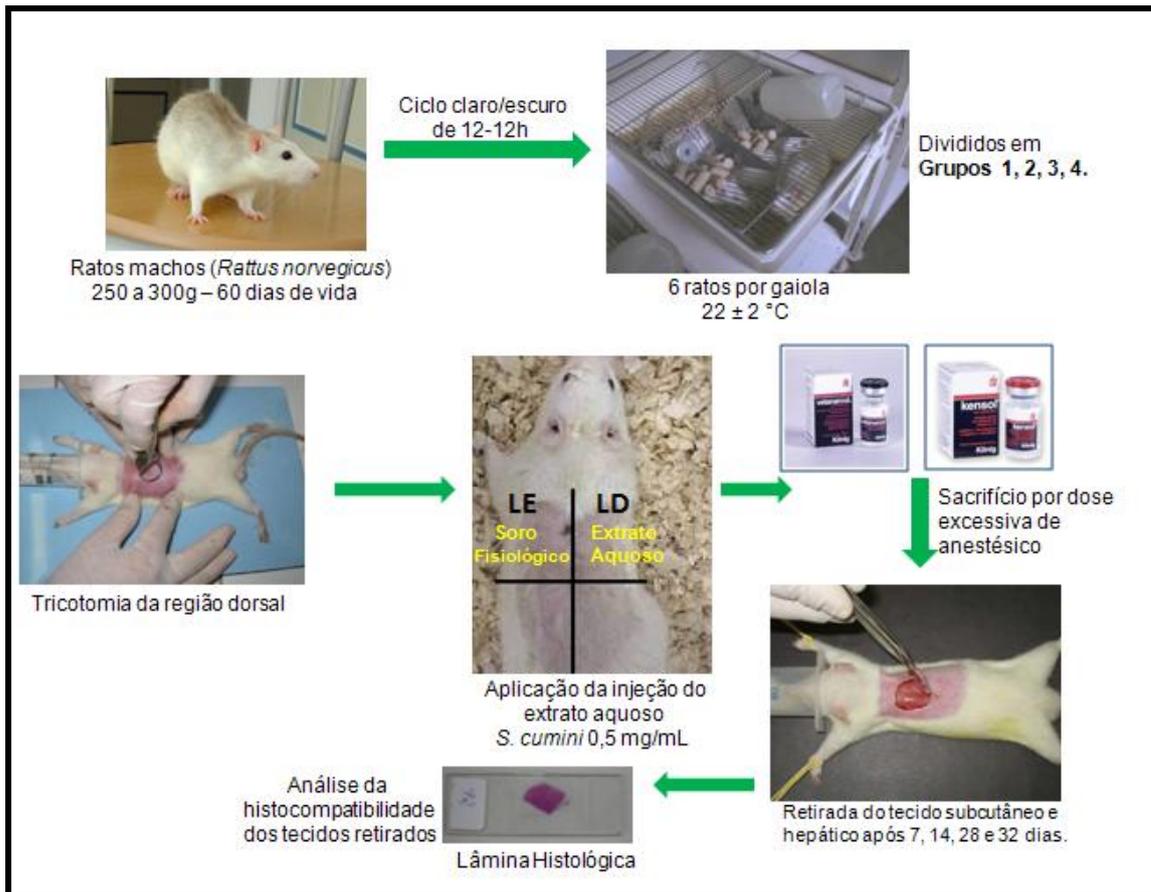
Após 7, 14, 28 e 32 dias desta administração, os animais de cada grupo foram eutanasiados submetidos à dose excessiva de anestésicos com cloridrato de quetamina à 5% (Vetanarcol, König) na dose 0,25 mL/100 g de peso do animal e cloridrato de xilazina à 2% (Kensol, König) na dose de 0,03 mL/100 g de peso do animal. O peso médio do animal de  $275 \pm 25$  g equivale a 0,68 mL de Vetanarcol e 0,08 mL de Kensol por animal.

A primeira etapa de todo o processo de preparação de uma lâmina histológica consiste em coletar a amostra, ou seja, obtê-la a partir de um ser vivo, que neste caso foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, albino Wistar).

Os animais foram tricotomizados e o tecido conjuntivo subcutâneo juntamente com a área circunjacente à injeção do extrato foram retirados (FIGURA 11). O material recolhido foi imediatamente imerso em solução fisiológica e cortes transversais foram realizados de modo a facilitar a penetração da substância fixadora de Boiun (750 mL de solução saturada de ácido pícrico, 250 mL de formol a 40%, ácido acético glacial 50 mL). Em seguida foram realizados vários procedimentos histológicos para observação em microscopia óptica (XAVIER *et al*, 1973; COUTO *et al*, 2000).

Cortes laterais foram obtidos com micrótomo ERMA (Tokyo-Japan), utilizando navalha ajustada para 6µm cada. Os cortes foram estirados em banho-maria histológico, dispostos em lâminas untadas com albumina de Mayer, colocadas em estufas por aproximadamente 30 min a 37°C para secagem do material. Os espécimes receberam o tratamento de coloração pela hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram montadas em Entellan e finalizadas para observação e fotomicrografadas em Microscópio Óptico Olympus Modelo BX50, Video Câmera Samsung Modelo SHC 410NAD, Software: TV Tuner Application. Para cada animal foram feitas duas lâminas.

Toda esta técnica histológica foi realizada no departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, sob supervisão do Prof<sup>o</sup> Dr. Diógenes Luís da Mota.



**FIGURA 11-** Esquema realizado para o ensaio de biocompatibilidade do extrato aquoso de *S. cumini* (L) Skeels com o tecido subcutâneo de ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*) (Antônio André L.Silva, 2008).

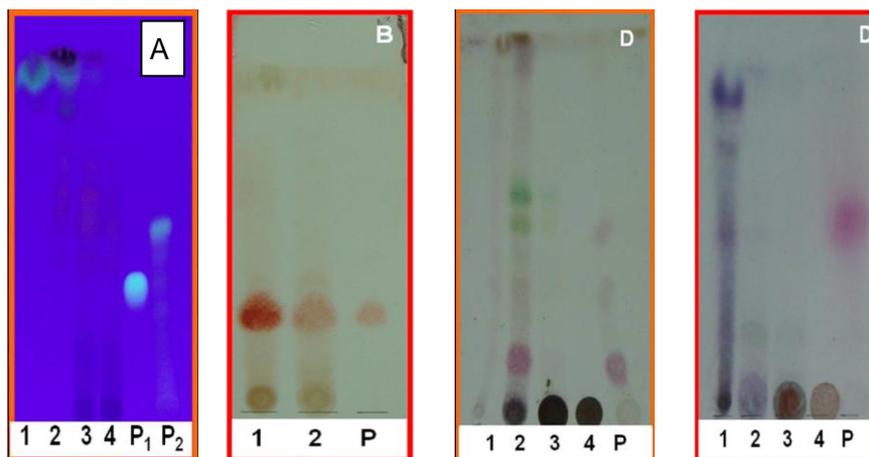
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Perfil fitoquímico

O cálculo do rendimento da extração das folhas de *S. cumini* foi de 3.20%, 7.12%, 10.38%, 12.08% (p/p) para os extratos (EEP), (EAcEt), (EMT) e (EAQ) respectivamente. Ficou observado que cresce acompanhando a polaridade dos mesmos, isso permite afirmar que o extrato aquoso consegue extrair das folhas o maior número de compostos químicos. Os (EEP) e (EAcEt) apresentaram menor rendimento de extração, em comparação com (EAQ) e (EMT). Entre os solventes utilizados o rendimento máximo foi em (EAQ) e rendimento mínimo foi em (EEP) de *S. cumini*.

O sistema DMSO/Tween80/H<sub>2</sub>O (1,5: 1,0: 17,5), serviu para solubilizar os extratos das folhas de *S. cumini* que apresentaram diversas colorações: o (EEP) coloração amarelada, (EAcEt), verde escuro; (EMT); verde claro e o (EAQ) submetido à liofilização resultando em um pó fino de coloração marrom.

Todos os extratos obtidos das folhas da planta em estudo foram submetidos a análise fitoquímica preliminar e os resultados são apresentados na TABELA 2 . A análise revelou a presença de monoterpenóides e sesquiterpenóides nos (EEP) e (EAcEt); triterpenóides e esteróides nos (EEP), (EAcEt) e (EMT); açúcares redutores nos (EMT) e (EAQ); flavonóides nos (EAcEt), (EMT) e (EAQ); proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas nos (EMT) e (EAQ); e taninos hidrolisáveis no (EAQ). Não foi observada a presença de alcalóides, iridóides, derivados cinâmicos, fenilpropanóides, cumarinas, saponinas e antraquinonas em nenhum dos extratos estudados (FIGURA 12).



**FIGURA 12-** Metabólitos secundários presente nas folhas de *S. cumini* (L.) Skeels por Cromatografia de Camada Delgada Analítica. A. Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. (1) Extrato éter de petróleo; (2) Extrato acetato de etila; (3) Extrato metanólico; (4) Extrato aquoso. (P1) Padrão Verbacosídeo; (P2) Padrão Ácido Clorogênico. B. Açúcares Redutores. (1) Extrato metanólico; (2) Extrato aquoso; (P) Glicose. C. Triterpenos e Esteróides. (1) Extrato éter de petróleo; (2) Extrato acetato de etila; (3) Extrato metanólico; (4) Extrato aquoso; (P) Padrão  $\beta$ -sitosterol D. Monoterpenos e sesquiterpenos. (1) Extrato éter de petróleo; (2) Extrato acetato de etila; (3) Extrato metanólico; (4) Extrato aquoso; (P) Timol; Fotos: (Karina P. Randau, 2008; Antônio André L.Silva, 2008).

**TABELA 2–** Análise Qualitativa dos Metabólitos Secundários da folha de *Syzygium cumini*.

Metabólitos Secundários	Éter	Acetato Etila	Metanólico	Aquoso
Alcalóides	-	-	-	-
Monoterpenóides e Sesquiterpenóides	+++	++	-	-
Triterpenóides e Esteróides	+	+++	+	-
Iridóides	-	-	-	-
Açúcares Redutores	-	-	+	+
Flavonóides	-	++	+++	+++
Derivados Cinâmicos	-	-	-	-
Fenilpropanóides	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-
Proantocianidinas condensadas e Leucoantocianidinas	-	-	++	+
Saponinas	-	-	-	-

Antraquinonas	-	-	-	-
Taninos Hidrolisáveis	-	-	-	+

(-) Ausência no extrato de *S. cumini* – Cromatoplasmas sem banda; (+) Fracamente presente no extrato de *S. cumini* – Cromatoplasmas com 1 banda; (++) Presente no extrato de *S. cumini* – Cromatoplasmas de 2 a 5 bandas; (++++) Fortemente presente no extrato de *S. cumini* – Cromatoplasmas com mais de 5 bandas.

A investigação pela análise fitoquímica pode ser notado a importância dos metabólitos na atividade antimicrobiana, especialmente dos flavonóides, terpenóides e esteróides presentes em quase todos os extratos e dos taninos hidrolisáveis presentes apenas no extrato aquoso, mas de grande importância como antimicrobiano. Segundo Nino *et al.* (2006) é possível que estes metabólitos secundários possam ser responsáveis pela bioatividade dos extratos desta planta. Os microrganismos selecionados são patógenos multiresistente, mesmo assim os extratos apresentaram atividades importantes contra tais microrganismos.

A grande diversidade de classes de metabólitos secundários corrobora para possibilidade de encontrar efeito antimicrobiano nos extratos estudados, pois este efeito pode ser resultado do sinergismo dos grupos químicos presentes. Assim como, é possível um grupo químico isolado ou apenas um metabólito específico apresentar atividade antimicrobiana. Como o extrato aquoso é de maior polaridade, concentra maior número de grupos químicos polares comparado com os outros extratos de solventes orgânicos utilizados, tais como polifenóis dentre eles flavonóides, proantocianidinas e leucoantocianidinas condensadas, taninos hidrolisáveis.

Dos compostos presente nos extratos de *S. cumini*, os taninos e outros compostos fenólicos são os mais estudados devido a sua atividade antibacteriana relevante. Como afirma (BROWN; RICE-EVANS, 1998; WANG *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos constituem um dos principais grupos que possuem um largo espectro de atividades biológicas e químicas incluindo as propriedades de eliminação de radicais. A presença dos taninos hidrolisáveis no extrato aquoso revela uma boa atividade antibacteriana deste extrato, comparado com os outros onde o mesmo é ausente.

Os metabólitos monoterpenóides e sesquiterpenóides, triterpenóides e esteróides encontram-se presente nos extratos de menor polaridade como (EEP) e (EAcEt), isso é

justificável pela sua polaridade baixa. O extrato (EAcEt) apresenta melhor atividade contra as leveduras, porque os metabólitos presente são lipofílicos e apresentam afinidade pela membrana plasmática e parede celular alterando o metabolismo da *Candida albicans*.

O estudo fitoquímico é fundamental para diferenciar quais classes de metabólitos secundários apresentam ação farmacológica, principalmente nas plantas medicinais usadas popularmente (CARNEIRO *et al.* 2008).

Com base nestes resultados, pode concluir-se que os extratos de plantas têm um grande potencial como compostos antimicrobianos contra microrganismos e que podem ser utilizados no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes. Essa triagem de vários compostos orgânicos naturais e identificação de agentes ativos é a necessidade da hora, pois a previsão de sucesso das propriedades medicamentosas como no início da descoberta da droga vai pagar mais tarde no desenvolvimento de medicamentos.

## **5.2 Atividade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos das folhas de *S. cumini* foi avaliada *in vitro* através do método de diluição em caldo frente a 36 bactérias e 8 leveduras diferentes. Os extratos utilizados foram (EEP), (EAcEt), (EMT) e (EAQ) numa concentração de 2,0 mg/mL. Por isso, em todos, foram avaliados a concentração inibitória mínima (CIM) quanto à atividade antibacteriana como se mostra na TABELA 3.

**TABELA 3-** Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos diferentes extratos de *S. cumini* (L.) Skeels frente as cepas estudadas.

Microrganismos		Concentração Inibitória Mínima de <i>S. cumini</i> (mg/mL)			
		EEP	EAcEt	EMT	EAQ
		X ± δ	X ± δ	X ± δ	X ± δ
Cocos Gram(+)	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=10)	1,00 ± 0	1,00 ± 0	2,00 ± 0	1,00 ± 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=10)	0,83 ± 0,25	0,79 ± 0,33	0,50 ± 0	0,41 ± 0,12
Bacilos Gram (-)	<i>Escherichia coli</i> (n=4)	2,00 ± 0	2,00 ± 0	2,00 ± 0	2,00 ± 0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	1,00 ± 0	1,00 ± 0	1,00 ± 0	2,00 ± 0
		2,00 ± 0	2,00 ± 0	2,00 ± 0	2,00 ± 0
	<i>Salmonella enterica</i> (n=6)	2,00 ± 0	2,00 ± 0	2,00 ± 0	2,00 ± 0
Levedura	<i>Candida albicans</i> (n=10)	1,50 ± 0,54	1,00 ± 0	1,50 ± 0,54	2,00 ± 0

<b>EEP-</b> Extrato Éter de Petróleo	<b>EAcEt-</b> Extrato Acetato de Etila	<b>EMT-</b> Extrato Metanólico
<b>EAQ-</b> Extrato Aquoso	<b>X ± δ =</b> Média de duas manipulações ± Desvio padrão	

O método de escolha para avaliação da atividade antimicrobiana foi a microdiluição em caldo, uma vez que usando testes de difusão em ágar pode conduzir a um resultado falso negativo, onde os resultados podem ser influenciados pelo tipo de ágar, a concentração de sal, temperatura de incubação e tamanho molecular do antimicrobiano componentes. O método de microdiluição em caldo é 30 vezes mais sensíveis que os outros métodos utilizados para a análise da atividade antimicrobiana (ELOFF *et al.*, 1998; COWAN, 1999; GABRIELSON *et al.*, 2002; LANGFIELD *et al.*, 2004; CUSHNIE; LAMB, 2005; ALVES *et al.*, 2008; OSTROSKY *et al.*, 2008; PALOMBO, 2011).

Todos os extratos de *S. cumini* (L.) Skeels mostraram sobre bacilos Gram negativos e leveduras valores de CIM igual ou superior a 1mg/mL. Extrato aquoso não apresentou atividade antibacteriana contra quase todas as bactérias estudadas. Resultados semelhantes têm sido relatados na literatura (IDU *et al.*, 2006; OWOLABI *et al.*, 2007).

Os EEP, EAcEt e EMT mostraram-se mais ativos frente às cepas de *Pseudomonas aeruginosa* quando comparados ao EAQ. Analisando os grupos das bactérias Gram negativas, os resultados obtidos dos extratos de *S. cumini* frente as enterobactérias do gênero *Salmonella* e *Escherichia* não foi eficaz na inibição desses microrganismos, corroborando os resultados de Ramzi *et al* (2010). Os resultados encontrados estão de acordo com o trabalho de Abu-Shanab *et. al.* (2004), que relatam a resistência das bactérias Gram negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa* a diversos compostos de origem natural. A resistência dos bacilos Gram negativos a estes compostos pode está ligada a concentrações muito baixas de substâncias ativas presentes nos extratos ou bloqueio na passagem destas para o interior da célula bacteriana.

Dos microrganismos ensaiados, as seis amostras de *Staphylococcus aureus* mostraram ser as mais sensíveis, cuja Concentração Inibitória Mínima CIM é de  $x 0,83 \pm \delta 0,25$ ;  $x 0,79 \pm \delta 0,33$ ;  $x 0,50 \pm \delta 0$  e  $x 0,41 \pm \delta 0,12$  para os EEP, EAcEt, EMT e EAQ, respectivamente.

Sobre a totalidade dos microrganismos estudados  $n=44$ , pode-se perceber a atividade dos extratos de *S.cumini* contra os microrganismos, onde a CIM varia de 2,00 a 0,41 mg/mL. No entanto, o EAQ obtido das folhas de *S. cumini* mostrou ser mais ativo contra *S. aureus* apresentando os seguintes metabólitos açúcares redutores, flavonóides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas e taninos hidrolisáveis. Essa atividade antimicrobiana foi seguida pelos EMT, EAcEt e EEP.

Esses resultados são bastantes significativos por causa da aumento da morbidade e mortalidade relacionada a clones de *S. aureus* multirresistentes nas últimas duas décadas. Além disso, vários microrganismos apresentam resistência a diversos agentes antimicrobianos (RAZERA *et al.*, 2009).

Um estudo sobre o perfil de cepas de *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados em São Paulo, segundo Oliveira *et al.*, (2001), aponta uma crescente resistência das cepas desse microrganismo aos antimicrobianos com atividade antiestafilocócica atualmente disponíveis, como aminoglicosídeos, cloranfenicol, lincosamídeos, macrolídeos, quinolonas e tetraciclina.

De todos os diferentes extratos utilizados contra dez amostras de *Candida albicans*, o EAcEt mostrou-se satisfatório com uma CIM em média 1mg/mL. O EAcEt apresentou a melhor atividade frente a leveduras do gênero *Candida* cuja CIM foi de  $x=1,00 \pm \delta=0$  sendo os monoterpenóides e sesquiterpenóides, triterpenóides e esteróides e flavonóides os

compostos detectados nesta fração. Outro grupo de metabólito secundário com atividade microbiana são os terpenoides ativos contra bactérias e fungos (AHMED *et al.*, 1993; AMARAL *et al.*, 1998; BARRE *et al.*, 1997; HIMEJIMA *et al.*, 1992; AYAFOR *et al.*, 1994; KUBO *et al.*, 1993; RAO *et al.*, 1993). O mecanismo de ação de terpenos não está completamente elucidado, mas pressupõe que ele envolve a ruptura das membranas biológicas pelos compostos lipofílicos.

A discreta atividade inibitória dos extratos brutos de *S. cumini* sobre as bactérias Gram negativas e leveduras *Candida albicans* obtida no presente estudo está provavelmente relacionada às diferenças estruturais que estes microrganismos apresentam em relação às bactérias Gram positivas. Os extratos vegetais testados foram mais ativos contra microrganismos Gram-positivos do que os microrganismos gram-negativas, que está de acordo com a literatura anterior pelos vários trabalhadores (BUWA; STADEN 2006; VALSARAJ *et al.*, 1997; SRINIVASAN *et al.*, 2001; SAMY; IGNACIMUTHU, 2000; PERUMALSAMY *et al.*, 1999; PAREKH *et al.*, 2005).

A diferença de sensibilidade pode ser atribuída a diferenças nas constituições morfológicas entre os organismos Gram positivos e Gram negativos. As diferenças de atividade contra bactérias gram positivas e negativas parecem derivar da constituição da parede celular bacteriana e dos constituintes do extrato vegetal, principalmente do grupo dos taninos. Conforme os autores (KHAN *et al.*, 2001; SRINAVASAN *et al.*, 2001; CIMANGA *et al.*, 2002), existe uma relação entre o teor de taninos e a atividade contra bactérias Gram positivas, que têm estrutura celular mais rígida, parede celular quimicamente menos complexa e menor teor de lipídico do que as Gram negativas.

As bactérias Gram negativas contêm uma porcentagem mais alta de lipídeos que as bactérias Gram positivas. Observa-se que as bactérias Gram positivas são mais permeáveis que as bactérias Gram negativas, permitindo a passagem dos compostos ao seu interior (ABU-SHANAB *et al.*, 2004). Isso significa que os metabólitos apolares, presente nos solventes apolares tem mais afinidade pelas membranas lipídicas, em contrapartida os extratos polares, contendo os metabólitos polares se difundem mais na parede celular das Gram positivas.

A complexidade das membranas das bactérias Gram negativas, o alto teor de lipídeos e a barreira à penetração a numerosas moléculas de antibióticos devido a composição química da parede celular e cujo espaço periplasmático rico em enzimas capazes de quebrar moléculas

estranhas, isso justifica a pouca atividade dos metabólitos secundários que mesmo vencendo a barreira de penetração por serem lipossolúveis são inativados pelas enzimas. Foram observados os melhores resultados da CIM para *S. aureus* que é uma bactéria Gram positiva, apresenta maior permeabilidade para os metabólitos secundários e estes sofrendo pouca influência das enzimas bacterianas no mecanismo de ação. (SCHAECHTER *et al.*, 2002; DUFFY; POWER, 2001; SARTORI *et al.*, 2003).

Muitos microrganismos Gram negativos exibem altos níveis de resistência intrínseca à grande número de agentes antimicrobianos e reforça a hipótese sobre a membrana externa e atividade de bomba de efluxo como barreira aos antibióticos e quimioterápicos (NIKAIDO, 1989; BAMBEKE *et al.*, 2003).

Segundo (CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004; DURAIANDIYAN *et al.*, 2006; DJIPA *et al.*, 2002; SHAFI *et al.*, 2002; LOGUERCIO *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2006) evidências *in vitro* demonstra que *S. cumini* tem atividade microbicida, confirmando nosso estudo. A partir dos resultados acima, pode-se concluir que as bactérias Gram positivas são mais sensíveis aos extratos estudados, em comparação com bactérias Gram negativas. Vários trabalhadores já têm relatado resultados semelhantes (LIN *et al.*, 1999; MOSHI; MBWAMBO, 2005; PAREKH; CHANDA 2006b). Atividade antifúngica não é comum em plantas medicinais. Por exemplo, vinte e três extratos de doze plantas cubanas, usado na medicina tradicional não apresentaram efeito inibitório para o crescimento de leveduras (KUIATE *et al.*, 2007).

As diferenças nas CIM dependem, principalmente de muitos fatores, por exemplo, das substâncias presentes nos extratos e sua atividade antimicrobiana, o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos no meio. A CIM pode ainda estar associada com polaridades das substâncias que compõem os extratos testados e também com a composição da parede celular de organismos de teste uma vez que as bactérias Gram - positivas paredes celulares presentes com níveis lipídicos mais baixas do que as bactérias gram - negativas (BANDEIRA *et al.*, 2006).

O conhecimento dos constituintes químicos nos extratos é importante no sentido de que estas moléculas estão diretamente relacionadas com a atividade farmacológica. Os taninos formam complexo com polissacarídeos (YA *et al.*, 1988), propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico ao precipitar proteínas (BRUNETON, 1991). Os flavonóides agem formando complexos com as células bacterianas (STERN *et al.*, 1996).

O modo de ação dos taninos pode ser traduzido pela habilidade de inativar enzimas microbianas e formar complexos com proteínas através de forças denominadas “não-específicas”, como pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas, assim como pela formação de ligações covalentes (COWAN, 1999).

Existem três hipóteses quanto ao mecanismo de ação dos taninos sobre as bactérias e fungos, a primeira seria uma inibição de enzimas dos microrganismos e/ou ligação com o substrato dessas enzimas; através da ação sobre a membrana celular, modificando seu metabolismo ou ainda, pela complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade desses íons, que são essenciais ao metabolismo dos microrganismos (LOQUERCIO *et al.*, 2006).

Flavonóides são conhecidos por serem sintetizados por plantas infectadas por microrganismos (DIXON *et al.*, 1983) e apresentam *in vitro* o mesmo efeito antimicrobiano. A atividade antimicrobiana *in vitro* de muitos flavonóides isolados de diferentes plantas foram relatados por (HARBORNE *et al.*, 1976; JENSEN *et al.*, 1998; ALCERITO *et al.*, 2002; PANIZZI *et al.*, 2002). A atividade antimicrobiana dos flavonóides está provavelmente relacionada à capacidade deste composto de se complexar com proteínas das células bacterianas formando complexos irreversíveis com ácidos aminonucleofílicos, o que, freqüentemente, leva à inativação da proteína e perda da função (STERN *et al.*, 1996). Muitos flavonóides lipofílicos podem ainda romper a parede bacteriana (TSUCHIYA *et al.*, 1996).

Este estudo buscou mostrar a importância da atividade antimicrobiana de vários extratos das folhas de *S. cumini* frente a microrganismos patógenos de alta resistência. A atividade antimicrobiana apresentou-se satisfatória frente a cepas de *S. aureus*.

Baseado nestes resultados, estudos químicos, farmacológicos e clínicos devem ser aprofundados com a planta *S. cumini*, pois demonstrou-se possuir potencial terapêutico devido sua atividade antimicrobiana. Estes estudos podem seguir dois caminhos distintos: tentar isolar qual o metabólito secundário específico responsável pela atividade biológica ou continuar a investigação da atividade do extrato bruto em diversos solventes e em outras partes da planta.

Uma outra opção, as atenções podem ser direcionadas, inicialmente para estudos das propriedades de segurança e toxicidade do extrato bruto. Seguido de avaliações da eficácia *in vivo*, primeiro em modelos animais e depois em estudos clínicos, como recomendados por

Calixto (2000). Esta opção é plenamente justificável uma vez que os efeitos terapêuticos de muitas plantas medicinais não resultam da ação isolada de um único composto químico e sim da ação complexa de sinergismos e antagonismos de várias substâncias (VASCONCELOS *et al.*, 2002).

### **5.3 Histocompatibilidade do extrato aquoso de *Syzygium cumini* (L.) Skeels**

O uso de materiais estranhos ao organismo surge na história de dezenas de civilizações em placas de argila, esculturas, vasos, pergaminhos e papiros (ROSSA, 2005).

Biocompatibilidade, segundo Williams (1987), refere-se à habilidade, desempenho adequado ou favorável, que ocorre entre um material produzido para implante cirúrgico, ou para inclusão biológica, e os tecidos circunjascentes, bem como a obtenção de uma resposta orgânica apropriada do hospedeiro, em termos da aplicação específica daquele material (FRANKE, 2003).

O tecido subcutâneo foi utilizado neste estudo para avaliar a biocompatibilidade pois de acordo com (COSTA, 2001) apresenta inúmeras vantagens, como: a facilidade na execução e na manutenção dos animais, possibilitando uma amostra maior em curto período de tempo, rapidez no processamento laboratorial, não havendo a necessidade da fase de desmineralização quando não envolve tecido calcificado; e o baixo custo para seu desenvolvimento.

A análise microscópica do tecido subcutâneo teve como objetivo verificar seus elementos estruturais, assim como detectar possíveis alterações morfológicas das células, bem como do tecido como um todo. Também foi realizado o acompanhamento clínico dos animais ao longo dos dias após a injeção dos extratos. A proposição de utilizar-se do tecido subcutâneo de ratos reveste-se de importância por se tratar de local onde se conhece perfeitamente a sucessão de fenômenos biológicos que compreendem o processo de reparo.

O resultado ao microscópio óptico revela a estrutura histológica típica do tecido subcutâneo. Foram observadas fibras colágenas coradas pela eosina, dispostas em diversos sentidos e numerosos fibroblastos de limites citoplasmáticos imprecisos, cujos núcleos se

destacam (FIGURA 13). Fibras musculares estriadas esqueléticas da musculatura dorsal profunda também foram vistas.

Não houve quaisquer alterações morfológicas significativas nos grupos experimentais quando estes foram comparados ao grupo controle. Após análise ao microscópio óptico, verificou-se que o extrato aquoso introduzido no tecido subcutâneo não provocou reação de incompatibilidade pelo fato de o organismo não reagir e não o considerar como elemento estranho, ou seja, não foi verificada nenhuma reação alérgica ou inflamatória no local da injeção do extrato. Como o conceito de biocompatibilidade, segundo Estrela (2005), está relacionado à capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem, contudo, causar danos ou prejuízo ao mesmo, esse resultado demonstra que o extrato aquoso da planta em estudo não acelera a cicatrização, nem se comporta como um material agressivo aos tecidos, sendo, portanto, biocompatível para este caso.

Materiais “biocompatíveis” e seguros, foram considerados aqueles que, ao serem submetidos a testes biológicos, não mostraram resultados de reatividade histopatológica, ou mostraram apenas uma reatividade inflamatória discreta, em termos de bioincorporação e de histocompatibilidade (HOLMES, 1990; HADDAD FILHO *et al.*, 2004).

Ao nível subcutâneo, estudos similares com outras plantas mostraram que os extratos aquosos não registraram respostas patológicas evidentes como infecções, necroses teciduais e calcificações. (HADDAD-FILHO *et al.*, 2004; ROSSA *et al.*, 2005; BENGTON *et al.*, 2006).

Não foram encontrados na literatura trabalhos sobre a biocompatibilidade da *S. cumini*, não sendo possível comparar os resultados deste estudo com outros dados.

A presença dos metabólitos secundários açúcares redutores, flavonóides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas e de taninos hidrolisáveis, no extrato aquoso das folhas de *S. cumini* não causaram no tecido conjuntivo analisado quaisquer alterações, sendo isto um indicativo da compatibilidade do extrato com o tecido animal. Segundo Moreira *et al.* (2006), dos pedidos de patentes das plantas brasileiras da Amazônia 89,3% foram pedidos para aplicações terapêuticas, principalmente para uso dermatológico, o que comprova a relevância de estudos que avaliem a biocompatibilidade desses princípios ativos com o tecido animal.

Deste modo, o Brasil por apresentar a maior diversidade vegetal do mundo, uma vasta área territorial e clima favorável o ano todo, teria todos os itens para transformar o conhecimento popular associando o mesmo às pesquisas e novas tecnologias em medicamentos fitoterápicos, garantindo assim, a segurança contra efeitos tóxicos, contra indicações e mutagenicidade, possibilitando desta maneira a distribuição mundial destes produtos (MELLO, 1980; LOPES *et al.*, 1989 ; SOARES, 1998; ANTONIO, 2005; SANTOS *et al.*, 2006).

A importância dos testes de histocompatibilidade se verifica no seu ineditismo e que pode no futuro buscar uma nova forma de exploração dos recursos vegetais existente em nosso país. Saber que existe um extrato compatível com o tecido vivo é uma iniciativa para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas.

A ampla preocupação a respeito da segurança do uso de plantas medicinais, deve-se ao recente crescimento no interesse da fitoterapia alternativa para o tratamento e prevenção de várias doenças. A crença de que remédios à base de plantas são isentos de reações adversas, sendo vistos como “naturais” pode levar a toxicidade acidental. Existem inúmeros cuidados a respeito do uso dos fitoterápicos e sua habilidade de produzir efeito tóxico e reações adversas. (SAAD, 2006).

Dessa forma, fazem-se necessários estudos que possam garantir o efeito não tóxico desses metabólitos secundários. Devido à atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato aquoso das folhas de *S. cumini* foi realizada a biocompatibilidade com tecido subcutâneo de ratos albinos (Wistar).

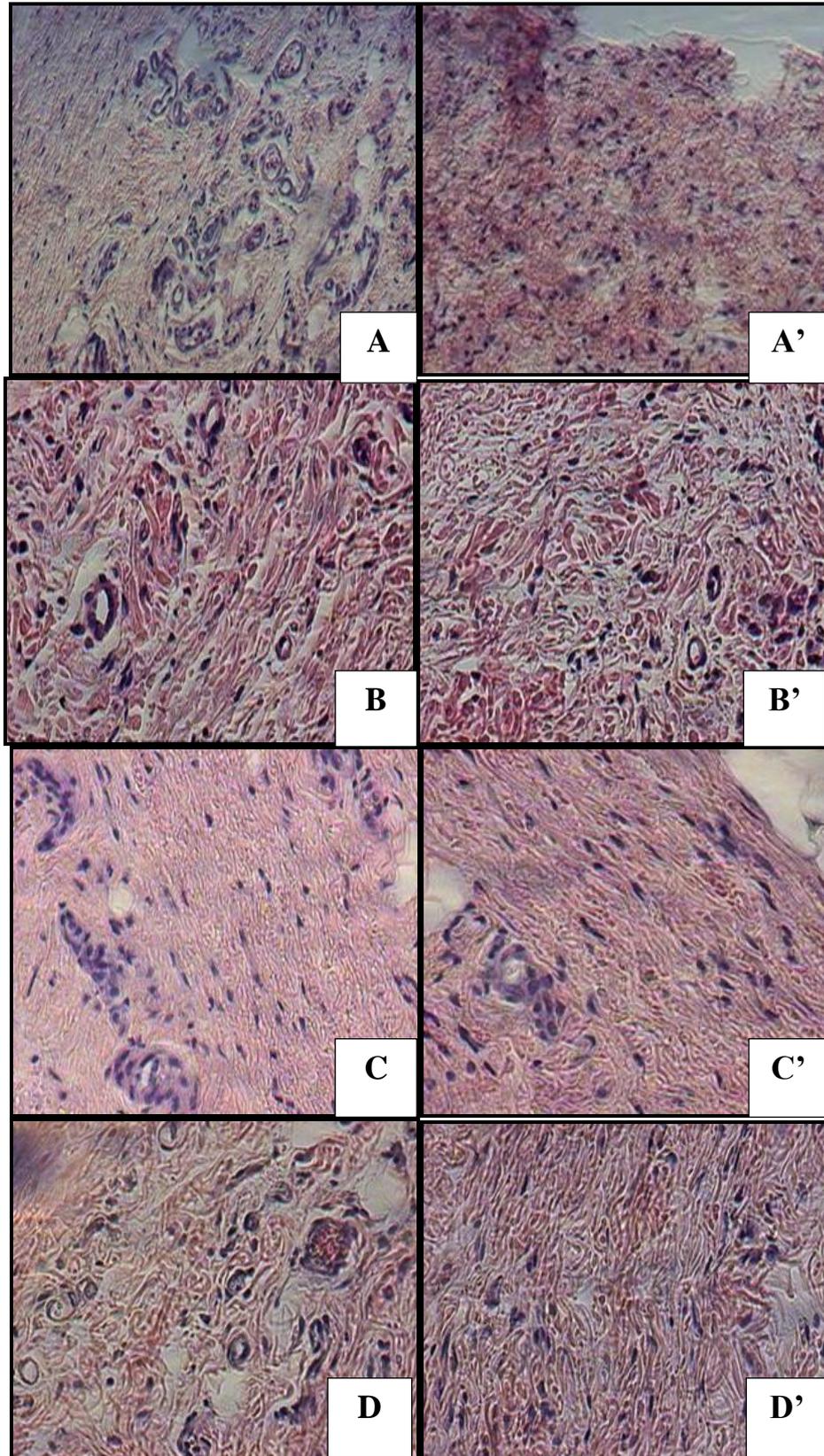
A indução de atividade de cicatrização apresenta algumas características como formação e amadurecimento de fibroblastos, responsável pela produção de matriz de colágeno e pela formação do tecido de granulação, quando significantes. (ROCHA; GURJÃO; BRITO JUNIOR, 2005). A regeneração e cicatrização, também chamada de fibroplasia ou fibrose envolve o reparo tecidual caracterizada pela migração, proliferação e diferenciação celular. O controle da proliferação celular é feito por fatores solúveis no microambiente, as citocinas, que podem estimular ou inibir este processo, (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000). A atividade cicatrizante sugere o aumento do número de células fibroblásticas e da epitelização. (MARTINS *et al.*, 2006), entretanto, esse tipo de resposta não ocorreu no presente trabalho com os implantes de extratos aquosos, ou quando foram tratados com solução fisiológica garantindo a histocompatibilidade.

Como o extrato aquoso de *S. cumini* apresentou uma boa atividade antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus*, pode-se pensar na utilização desta planta na formulação de um medicamento, uma vez que este microrganismo está entre os mais envolvidos em infecções hospitalares principalmente os resistentes a meticilina (WALDVOGEL, 2000; LOWY, 2003; DE LANCASTRE *et al*, 2007; RATTI, 2009).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem um potencial aplicação de *S. cumini* para o tratamento antimicrobiano e investigações adicionais devem ser realizados a fim de explorar este aplicativo. Plantas medicinais que contêm compostos fenólicos, incluindo taninos, como constituintes majoritários são usadas topicamente para o cuidado e reparo de feridas cutâneas (GONZALEZ *et al.*, 2004). A vantagem do uso de antimicrobianos tópicos é a sua capacidade de fornecer altas concentrações locais de antibiótico independentemente do suprimento vascular. Outros benefícios incluem a ausência de efeitos adversos sistêmicos, e uma baixa incidência de resistência (PORRAS, 2007).

Bactérias resistentes aos antibióticos continua a emergir rapidamente, constituindo um problema de importância crescente na dermatologia. Bactérias patogênicas, como *S. aureus* e *P. aeruginosa*, que são organismos predominantes em úlceras de perna e feridas superficiais, mostraram maior resistência aos antibióticos sintéticos (MAC DONALD *et al.*, 1997). O potencial dos extratos das folhas de *S. cumini* contra cepas multirresistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* podem ser explorados a fim de desenvolver uma terapia antimicrobiana tópica para promover a cicatrização de lesões cutâneas. Por isso, *S. cumini* apresenta eficácia para o desenvolvimento de novos fármacos.

O conhecimento comprovado da atividade antimicrobiana e da compatibilidade com o tecido vivo, marca o início da busca de novos fármacos para a melhoria da qualidade de vida. Segundo Noormohamed (1994), apesar dos recentes avanços na produção de fármacos, química sintética e biotecnologia, os produtos naturais como plantas e minerais continuam sendo a principal fonte para a obtenção de medicamentos e, muitos deles têm a sua origem na medicina popular.



**FIGURA 13-** Fotomicrografias do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos albinos. (A, B, C e D) Grupo Controle e (A', B', C' e D') Grupo Tratado, após 7, 14, 28 e 32 dias da injeção com o extrato aquoso de *S. cumini* (L.) Skeels Aumento (200x) Coloração (HE). (Antônio André L.Silva, 2009).

## 6. CONCLUSÕES

A atividade antimicrobiana verificada contra os microrganismos testados está relacionada a presença de metabólitos secundários, como taninos e flavonóides, nos extratos de *S. cumini*, uma vez que esses metabólitos agem respectivamente precipitando proteínas e formando complexos na célula bacteriana.

De todos os microrganismos estudados o *Staphylococcus aureus* foi o que apresentou maior susceptibilidade aos extratos de *S. cumini*.

O tecido subcutâneo analisado manteve preservado suas estruturas histológicas, não havendo sinais de alterações morfológicas nas células, necrose ou infiltrado inflamatório.

## REFERÊNCIAS

- ABU-SHANAB, B. et al. Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in Palestine. **Turkish Journal of Biology**, v. 28, p.99-102, 2004.
- AGRA, M.F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal Ethnopharmacol**, v.111, p.383-395, 2007b.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, p.114-140, 2007a.
- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal Ethnopharmacol**, v.74, p.113-23, 2001.
- AHMED, A.A. et al. New sesquiterpene  $\alpha$ -methylene lactones from the Egyptian plant *Jasonia candicans*. **Journal Nature Products**, v. 56, p.1276–1280, 1993.
- ALBERTON, J.R. et al. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.11, p. 37-50, 2001.
- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, p.678-689, 2006.
- ALCERITO, T.; BARBO, F.E.; NEGRI, G. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 7, p. 677-683, 2002.
- ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v.8, p.310-322, 2001.

ALVES, E.G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais de substâncias puras. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1224-1229, 2008.

AMARAL, J.A et al. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p.520–525, 1998.

ANISIMOV, A.; AMOAKO, K. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.1461-75, 2006.

ANTONIO, F.I. **Aspectos macroscópicos e microscópicos da reparação de feridas cutâneas de camundongos (SWISS-VALÉE) tratadas com creme de *Hyptis suaveolens* e *Croton urucurana baill.*** 2005. 49 f. (Dissertação – Mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

APEL, M.A. et al. Investigação da atividade antimicrobiana do óleo volátil de espécies da família Myrtaceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998, Águas de Lindóia. **Anais**. Águas de Lindóia, 1998. p. 51.

ASSIS, A.M. de; PEREIRA, O.J.; THOMAS, L.D. Fitosociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

AYAFOR, J.F.; TCHUENDEM, M.H.K.; NYASSE, B. Novel bioactive diterpenoids from *Aframomum aulacocarpos*. **Journal of Natural Products**, v.57, p.917–923, 1994.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Journal of Tropical Biomedicine**, Asian Pacific, v.1, p.240-246, 2012.

BAMBEKE, F.V. et al. Antibiotic efflux in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p.1055-1065, 2003.

BANDEIRA, M.F. et al. Avaliação *in vitro* da sensibilidade da *Candida albicans* ao hidróxido de cálcio associado ao óleo de copaíba. **Revista de Dentística**, v.6, p.12–22, 2006.

BARBOSA-FILHO, J.M. et al. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.135-154, 2008.

BARBOSA-FILHO, J.M. et al., Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.141-148, 2007.

BARBOSA-FILHO, J.M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.258-285, 2006.

BARRE, J.T. et al. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. **Phytochemistry**, v.45, p. 321–324. 1997.

BARROSO, G.M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v. 2, p.363, 1991.

BENGTSON, A.L. Implante de proteína morfogenética do osso (RHBMP-2) em arcabouço de osso inorgânico no tecido subcutâneo de rato. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.13, n.2, p. 137-144, 2006.

BEZERRA, J.L. et al. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.631–637, 2006.

BHATIA, I .S.; BAJAJ, K. L. Chemical constituents of the seeds and bark of *Syzygium cumini*. **Planta Medica**, v28, p.346-52, 1975.

BLUM, C.T. **A floresta ombrófila densa na Serra da Prata, Parque Nacional Saint-Hilaire/Lange, PR—caracterização florística, fitossociológica e ambiental de um gradiente altitudinal**. 2006. 185 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BNOUHAM, M. et al. Medicinal plants with potencial antidiabetic activity a review of ten years of herbal medicine research 1990-2000. **International Journal of diabetes metabolism**, v.14, p.1-25, 2006.

BONA, K.S.D. et al. *Syzygium cumini* extract decrease adenosine deaminase, 5' nucleotidase activities and oxidative damage in platelets of diabetic patients. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.26, p.729-738, 2010.

BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v.161, p.839-851, 2001.

BRAGA, F.G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p.396-402, 2007.

BRITO, F. A. et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos de espécies de Myrtaceae no modelo de edema de pata em camundongos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998. **Anais**. Águas de Lindóia: 1998. p.63.

BRITO, J.R.F. et al. Adoção de boas práticas agropecuárias em propriedades leiteiras da Região Sudeste do Brasil como um passo para a produção de leite seguro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p. 125-131, 2007

BROWN J.E.; RICE-EVANS, C.A. Luteolin rich artichoke extract protects low-density lipoprotein from oxidation *in vitro*. **Journal of Radiation Research**, v.29, p.247-55, 1998.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**, Zaragoza: Editorial Acribia. 1991.

BUWA, L.V.; STADEN, J.V. Antibacterial and antifungal activity of traditional medicinal plants used against venereal diseases in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.139-142, 2006.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, n.2, p. 179-189, 2000.

CARNEIRO, R.M.D.G. et al. Resistance to *Meloidogyne mayaguensis* in *Psidium* spp. Accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. Paluma. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF., v. 32, p. 281-284, 2008.

CECHINEL FILHO, V. Pesquisa com plantas medicinais na UNIVALI: principais avanços e perspectivas. **Alcance**, Itajaí, n.4, p. 59-64, 1995.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v.21, n.1, p. 99-105, 1998.

CERQUEIRA, M.D. et al. Estudo químico de *Myrcia* sp. (Myrtaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, Recife, 2000. **Anais...Recife**, 2000. p.148.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p.105 – 108, 2004.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seed. **Journal of Ethnopharmacology**, v.9, p.105–108, 2004.

CIMANGA, K. et al. 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**, Limerick, v.79, n.2, p.213-220, 2002.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE-CLSI. **Approved standard M2-A8: performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 8. ed., n. 20, 2005.

CORREIA, C. **Infecções urinárias e susceptibilidade de uropatógenos aos antimicrobianos**. 2009. p.34-47 (dissertação).Universidade de Aveiro.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. p. 1117, 2002.

COSTA, C.A.S.; HEBLING, J.; SOUZA, P.P.C. Testes de biocompatibilidade. In: ESTRELA, C. **Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia**. São Paulo: Artes Médicas, p. 161-194, 2001.

COUTO, G.B.L. Biocompatibilidade do Extrato Hidro-alcoólico da *Lippia sidoides Cham (verbenaceae)*. **Revista do Conselho Regional de Odontologia de Pernambuco**, Pernambuco, v. 3, n. 2, p. 83-90, jul/dez. 2000.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

CRAVEIRO, A.A. et al. Essential oil of *Eugenia jambolana*. **Journal of Natural Products**, v.46, p.591–592, 1983.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids – Review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DAMASCENO, D.C. et al. Efeito do extrato aquoso de *Allium sativum* L. sobre parâmetros bioquímicos de ratas com diabetes induzido por Streptozotocin. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, p. 46-54, 2002.

DANADIO, L.C.; NACHTIGAL, J.C.; SACRAMENTO, C.K. **Frutas Exóticas**. Funep, Jaboticabal, p. 119-120, 1998.

DE LENCASTRE, H.; OLIVEIRA, D.; TOMASZ, A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. **Current Opinion of Microbiology**, v.10, n. 5, p.428-35, 2007.

DIAS, M.C. et al. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares do rio Iapó, na bacia do rio Tibagi. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 183-195, 1998.

DIXON, R.A.; DEY, P.M.; LAMB, C. J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Advances in Enzymology**, v. 55, p. 1–69, 1983.

DJIPA, C.D.; DELMEE, D.; QUETIN-LACLERCG, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos*(L.) Alston (Myrtaceae) **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.307–313, 2002.

DUFFY, C.F.; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some chinese plant extracts. **International Journal of Antimicrobiol Agents**, v. 17, p.527-529, 2001.

DURAIANDIYAN, V.; AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.6, n.35, 2006.

EDEOGA, H.O.; OKWU, D.E.; MBAEBIE, B.O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v.4, p.685–688, 2005.

ELOFF, J.N. A Sensitive an quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

ESTRELA, C. **Metodologia científica: ciência, ensino e pesquisa**. 2. ed. Artes Médicas: São Paulo, cap. 11, p.213, 2005.

FARIA, A.F., MARQUES, M.C., MERCADANTE, A.Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v.126, p. 1571-1578, 2011.

FRANKE, M. Fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, 2003. p.104, 367-373. Apresentação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina.

GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.

- GAMBLE, J.S. **The flora of the presidency of Madras**, London: Adlard & Son LTD; 1935.
- GONZALEZ, F.G. et al. Atividade Antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart.. In: IX SEMANA DA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2004, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: USP, v. 40, p. 79-79, 2004.
- GOVAERTS, R.M. et al. World checklist of Myrtaceae, Local: Royal. **Botanic Gardens**, p.455, 2008.
- HADDAD FILHO, D. et al. Estudo comparativo das reações teciduais ao implante de pericárdio bovino e a inclusão de “politetrafluoroetileno” expandido em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 131-135, 2004.
- HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods**, Second Edition, Chapman and Hall Ltd, London, p. 52-55, 1976.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 52, p. 481-504, 2000.
- HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods: A guide to modern technique of plant analysis**, Chapman and Hall, London, 1998.
- HIMEJIMA, M. et al. Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: a defense mechanism against microbial invasion. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, p.1809–1818. 1992.
- HOLMES, R.E. Alloplastic implants. In: MCCARTHY, J.C. **Plastic Surgery**, Philadelphia: Saunders. 4. ed., p. 698-731, 1990.
- HOOKER, J.D. The flora of British India. **Nabu Press**, London, p. 499, 1879.

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**, São Carlos: EdUFSCar, p. 09, 60-61. 2003.

IDU, M. et al. Preliminary investigation on the phytochemistry and antimicrobial activity of *Senna alata* L. leaves. **Journal of Applied Science**, v.6, p.2481–5, 2006.

JAMELÃO. Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental. **The Nature Conservancy**, Disponível em: <[http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Syzygium\\_jambolanum.htm](http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Syzygium_jambolanum.htm)>. Acesso em: 01 de maio de 2008.

JENSEN, H.S. et al. Forms and availability of sediment phosphorus in carbonate sand of Bermuda seagrass beds. **Limnology and Oceanography**, v.43, p. 799-810.

JUDD, W.S. et al. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, p. 612, 1998.

KHAN, M.R. et al. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. **Fitoterapia**, Milão, v.72, n.7, p.825-828, 2001.

KLIEBENSTEIN, D.J. Secondary metabolites and plant environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. **Plant, Cell and Environment**, v.27, p.675- 684, 2004.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Combination effects of antifungal nagilactones against *Candida albicans* and two other fungi with phenylpropanoids. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 220–226. 1993.

KUIATE, J.R. et al. Antidermatophytic Triterpenoids from *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Phytotherapy Research**, v.21, p.149–52, 2007.

LAGO, E.S.; GOMES, E.; SILVA, R. Produção da geléia de jambolão. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 26, p. 847-852, 2006.

- LANDRUM, L. R. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma* (Myrtaceae). **Botanical Garden**, New York: New York, p.78, 1986.
- LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, Nova York, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.
- LANGFIELD, R.D. et al. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 279-281, 2004.
- LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. Mirtáceas – *Gomidesia*. In: REITZ, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 1-44, 1967.
- LI, L. et al. *Eugenia jambolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n. 3, p.826–831, 2009.
- LIMA, R.C. et al. Coconut meal in laying hens diets: nutrients digestibility, performance and egg quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n. 5, p.1340-1346, 2007.
- LIN, J. et al. Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for anti-inflammatory and antimicrobial activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p.267–74, 1999.
- LOGUERCIO, A.P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini*(L.) Skells). **Ciencia Rural**, v.35, p.371–376, 2005.
- LOPES, H.S.; CAMBERROS, L.O.; OCAMPO, A. Evaluación de la mezela propoleo zabila com cicatrizantes comerciales. **Veterinaria México**, v.20, p. 407-414, 1989.
- LOPES, H.V. Novos Antibióticos. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.11, n. 1, p.60-61, 2009.

LOQUERCIO, A.P. et al. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*). **São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2006.

LORENZI, H. et al. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*). **São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2006.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, p.1265–1273, 2003.

LUCAS, E.V. et al. Phylogenetic patterns in the flesy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 251, p. 35-51, 2005.

LUCAS, E.V. et al. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). **Taxon**, Viena, v. 56, n. 4, p. 1105-1128, 2007.

MAC DONALD, C.L. et al. Vancomycin-resistant *Enterococci* outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, n. 3, p.311-317, 1997.

MAHMOUD II, et al. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v.58, p.1239–1244, 2001.

MAIA, C.N. **Análise fitoquímica e atividade antibacteriana "in vitro" de extrato de plantas do Cerrado**, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros/MG.

MANDAL B. et al. Biological and Molecular Analyses of the Acibenzolar-S-Methyl-Induced Systemic Acquired Resistance in Flue-Cured Tabaco Against Tomato-spotted with virus. **Phytopathology**, v.98, p.196-204, 2008.

MARKHAM, K.R. Techniques of flavonoids identification. **Academic Press**, London, p.113, 1982.

MARTINS, N.L.P. *et al.* Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu): estudo controlado em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.21, p.66-75, 2006.

MAZID, M., KHAN, T.A., MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants, **Biology and Medicine**, v.3, p. 232-249, 2011.

McVAUGH, R. The genera of american Myrtaceae: an interim report. **Taxon**, Viena, v. 17, n. 4, p.354-418, 1968.

MELLO, J.F. Plants in traditional medicine in Brasil. **Journal of Natural Products**, v.2, n.1, p. 49-55, 1980.

MENDONÇA, R.C. et al.. Flora vascular do cerrado. **Cerrado, Ambiente e flora**, Planaltina, EMBRAPA CPAC., p. 289-556, 1998.

METZ, H. Dünnschichtchromatographische schnellanalyse bei enzymatischen steroidumsetzungen. **Naturwissenschaften**, v.48, n.17, p.569-570, 1961.

MIGLIATO, K.F. “*Syzygium cumini* (L.) Skeels - jabolão: estudo farmacognóstico, otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade anti-séptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato” . 2006. p. 1-179, Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Araraquara-São Paulo.

MIGLIATO, K.F. et al. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.94-101, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Alimentos Regionais Brasileiros**, p.140, 2002.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSARD, L. Nitrogen-fixing Leguminosae nodulating Bacteria. In: **Soil Biodiversity In Amazonian And Other Brazilian Ecosystems**. Eds. Cabi Publishing, p. 237-270, 2006.

MORI, S.A. et al. Ecological importance of Myrtaceae in an eastern Brazilian wet forest. **Biotropica**, Zurique, v. 15, n. 1, p. 68-70, 1983.

MORTON, J. JAMBOLAN. IN: MORTON, J. Fruits of warm climates. **Miami: Creative Resoursh Systems**, p. 375-378, 1987. Disponível em: <[http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/jambolan\\_ars.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/jambolan_ars.html)>. Acesso em: 10 nov. 2005.

MORTON, J. Fruits of warm climates. **Miami: Julia Morton, Winterville North Carolina**. 1987.

MOSHI, M.J.; MBWAMBO, Z.H. Some pharmacological properties of extracts of *Terminalia sericea* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.43-7, 2005.

MURUGANANDAN, S. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia**, v.72, p.369-375, 2001.

NEU, R. A new reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. **Naturwissenschaften**, Berlin / Heidelberg, v. 43, p. 82, 1956.

NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as mechanism of antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.33, p.1831-1836, 1989.

NINO, J. et al. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from Colombian biodiversity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.566-70, 2006.

NOORMOHAMED, S.E.; KUMAR, V.; MIN, D.I. Evaluation of tradicional African medicine "compound R" for the treatment of thermal burn wounds in fuzzy rats. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, v.15, n.6, p.519-522, 1994.

OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C.; Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v.1, p. 49-58, 2003.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**, Ed. Atheneu, 2<sup>o</sup> edição, São Paulo, p. 67-139, 2000.

OLIVEIRA, L.C.; BLOISE, M.I. Extratos e óleos naturais vegetais funcionais. **Cosmetics & Toiletries**, v. 7, p.30-37, 1995.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OWOLABI, O.J.; OMOGBAI, E.K.I.; OBASUYI, O. Antifungal and antibacterial activities of the ethanolic and aqueous extract of *Kigelia africana* (Bignoniaceae) stem bark. **African Journal of Biotechnology**, v.6, p.1677–80, 2007.

PÁDUA, M.M. Patologia Clínica para Técnicas – Tomo I Bacteriologia. **Camarate: Lusociência**, Edições Técnicas e Científicas, Lda. p.117-41. 2009.

PALOMBO, E.A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potencial application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1- 15, 2011.

PANIZZI, A.R. Stink bugs on soybean in Northeastern Brazil and a new record on the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v.31, p.331-332, 2002.

PAREKH, J.; CHANDA, S. In vitro antimicrobial activities of extract of *Launaea procumbens* Roxb (Labiatae), *Vitis vinifera* (Vitaceae) and *Cyperus rotundus* (Cyperaceae). **African Journal of Biomedical Research**, v.9, p.89–93, 2006b.

PAREKH, J.; JADEJA, S.; CHANDA, S. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. **Turkish Journal of Biology**, v.29, p.203–210, 2005.

PARISIEN, A. et al. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1-13, 2008.

PEPATO, M.T. et al. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.34, p.389-95, 2001.

PERUMALSAMY, R.; IGNACIMUTHU, S.; RAJA, D.P. Preliminary screening of ethnomedicinal plants from India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p.235–40, 1999.

PORRAS-LUQUE. Antimicrobianos tópicos en Dermatología. **Actas Dermosifiliográficas**, v.98, p.29-39, 2007.

PUSHPALATHA, E.; MUTHUKRISHNAN, Larvicidal and repellent potential of *Moringa oleifera* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae) **Indian Journal of Malariology**, v.32, p. 14-23, 1995.

RAHMAN, M.A, et al. Medicinal plant diversity in the flora of Saudi Arabia 1: a report on seven plant families. **Fitoterapia**, v.75, p.149–161, 2004.

RAMZI, A.A.M, et al. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of some Yemeni Medicinal Plants. **Evidence-based complementary and Alternative Medicine**, v.7, p.323-330, 2010.

RANDAU, K.P. et al. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, p.89-96, 2004.

RAO, K.V. et al. Two new sesquiterpene lactones from *Ceiba pentandra*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 2041–2045, 1993.

RATTI, R.P.; SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n. 2, p. 9-16, 2009.

RAZERA, F. et al . CA-MRSA em furunculose: relato de caso do sul do Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 5, Oct. 2009

REGINATO, M.; GOLDENBERG, R. Análise florística, estrutural e fitogeográfica da vegetação em região de transição entre as Florestas Ombrófilas Mista e Densa Montana. **Hoehnea**, v. 34, n. 3, p. 349-364, 2007.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. Projecto Madeira de Santa Catarina. **Sellowia**, Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues v. 28, p. 320, 1978.

REYNERTSON, K.A.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research and Applications**, v.3, p.25–35, 2005.

ROBERTS, E.A.H.; CARTWRIGHT, R.A.; WOOD, D.J. Flavonols of tea. **Journal of the Sciences of Food and Agriculture**, n.7, p.637-646, 1956.

ROCHA, L.G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v.12, p.514-535, 2005.

ROCHA, R.P.A. et al. **Avaliação morfológica da cicatrização de lesões ulcerativas assépticas tratadas com soluções de papaína**. VII Congresso Virtual Hispano-americano de Anatomia Patológica, Pág. 1 de 8.

RODRIGUES, R. et al. Estrutura, Fisiologia e composição de frutas e hortaliças. **Módulo I**, Pelotas, p. 43, 2007.

ROSS, I.A. Medicinal Plants of the World: Chemical constituents, Traditional and Modern Uses. **Human Press**, Totowa, p. 283-289, 1999.

ROSSA, R. *et al.* Reações teciduais às inclusões subcutâneas do polietileno poroso em ratos. **Revista Brasileira de Pós Graduação**, v.12, n.3, p.323-329, 2005.

RUAN, Z.P.; ZHANG, L.L.; LIN, Y.M. Evaluation of the Antioxidant Activity of *Syzygium cumini* leaves. **Molecules**, v.13, p.2545-2556, 2008.

SAAD, B. et al. Safety of Traditional Arab Herbal Medicine, **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.3, n.4, p.433–439, 2006.

SAMY, R.P.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in Western Ghats of India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, p.63–71, 2000.

SANT'ANA, P. J. P.; ASSAD, A. L. D. Programa de Pesquisa em Produtos Naturais: A Experiência da CEME. **Química Nova**, v. 27, n.03, p. 508-512, 2004.

SANTOS, M.F.S. et al. Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p.2-7, 2006.

SANWAL, P.C. et al. Effect of environmental temperature on the development of reproductive organs and endocrine glands in pigs. **Indian Journal of Animals Science**, v.43, p.645-647, 1973.

SARTORI, M.R.K. et al. Antifungal Activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (ASTERACEAE). **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 567-9, 2003.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p.642, 2002

SCHAPOVAL, E.E.S. et al. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v.28, p. 55-7, 1988.

SCHELLINI, S.A. et al. Complicações com o uso de esferas não integráveis e integráveis na reconstrução da cavidade anoftálmica. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, p. 62-382, 1999.

SHAFI, P.M. et al. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancorium* leaf essential oils. **Fitoterapia**, Milão, v.73, n.4, p. 414-416, 2002.

SHAFI, P.M. et al. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancorium* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v.73, p.414–416, 2002.

SHANKAR, C. et al. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. **Journal of Hazardous Materials**, v.146, p. 270-277, 2007.

SHARMA, S.B. et al. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.367-373, 2006.

SHARMA, S.B.; et al. Determination of phenolic compounds and antioxidant capacity of aqueous and ethanolic extracts of Jambul (*Syzygium cumini*) **Journal Ethnopharmacology**, v. 85, p. 201-206, 2008.

SHINDE, A.N.; et al. Effect of different probiotics *Macrobrachium Rosembergii* (De-Man) post larvae. **Aquaculture**, v.9, p. 7-12, 2008.

SILVA J.S. et al. Natural products inhibitors of ovarian neoplasia. **Phytomedicine**, v.10, p.221-232, 2003.

SILVA, F. C. Composição florística e estrutura fitossociológica da floresta tropical ombrófila da Encosta Atlântica no município de Morretes, estado do Paraná. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 23, n. 1, 2, 3, 4, p. 1-54, 1994.

SILVA, M. G. et al. Estudo farmacognóstico de *Myrciaria glomerata* In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, Recife, 2000. **Anais**..Recife, 2000. p. 172.

SIMÕES, C.M.O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª Edição ed. Editora UFRGS/Editora UFSC, Porto Alegre/Florianópolis.1999b.

SIMÕES, C.M.O.; et al. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.312, 1998.

SIQUEIRA, JR.; J.F.;DANTAS, C.J.S.. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 1a. Edição, São Paulo, SP: Medsi, 238p, 2000.

SOARES, R.O.A. et al. Avaliação da capacidade antineoplásica de extratos de erva-de-passarinho *Struthantus* sp. **XV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, Águas de Lindóia, Brasil, 1998.

SOBRAL, M. **A família Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. São Leopoldo: Ed. Unisinos, p. 215, 2003.

SOBRAL, M. et al. Myrtaceae *in* **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., p. 704, 2008.

SRINIVASAN, D. et al. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.74, n.2, p.217-220, 2001.

STERN, J.L. et al. Phlorotanninprotein interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, p. 1887–1899. 1996.

STIASNY, E. The qualitative detection and differentiation of vegetable tannins. **Collegium**, p.483-499, 1912.

SULTANA, B., ANWAR, F., PRZYBYLSKI, R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica* and *Eugenia jambolana* Lam. trees. **Food Chemistry**, v.104, p.1106-1114, 2007.

TEIXEIRA, C.C., FUCHS, F.D. The efficacy of herbal medicines in clinical models: The case of jambolan. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p.16-19, 2006.

The British Herbal Pharmacopoeia. **The British Herbal Medicine Association**, Bournemouth, p. 204-5, 1983.

TSUCHIYA, H. et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 27–34, 1996.

VALSARAJ, R. et al. Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.58, p.75–83, 1997.

VASCONCELOS, A.G. et al. Fitofarmaco, fitoterápico, plantas medicinais: o reducionismo e a complexidade na produção do conhecimento científico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, supl., p. 103-105, 2002.

VERPOORTE, R., MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.181-187, 2002.

VIEGAS, J.M. et al. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 619-627, 2007.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**. 2.ed., Springer, New York, 1996.

WALDVOGEL, F.A. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). **In Principles and Practice of Infectious Diseases**, Philadelphia, p. 2069–2092, 2000.

WANG, H. et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaries* fruit. **Food Chemistry**, v.106, p.888–895, 2008.

WHO. **Monographs on selected medicinal plants**. v.1, 1999.

WILLIAMS, D.F. **Definitions in Biomaterials**. Oxford: Elsevier, 2000.

WILLIAMS. apud in: SILVER, F.H.; MASS, C.S. 1994. Biology of synthetic facial implant materials. **Facial Plastic Surgery Clinic of North America**, New York v. 2, p.241-253, 1987.

WILSON, P. G. et al. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 88, n. 11, p. 2013-2025, 2001.

WILSON, P. G. et al. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 251, p. 3-19, 2005.

XAVIER, C. et al. **Comportamento histopatológico do tecido conjuntivo de *Rattus norvegicus var albinus* a implante dos cimentos para obturações de canis : rickert, AH-26E endométerasone**. 1973. (Tese, Faculdade de Odontologia de Bauru), Bauru.

YA, C. et al. Carbohydratepolyphenol complexation, *In* R. W. HEMINGWAY AND J. J. KARCHESY, Chemistry and significance of condensed tannins. **Plenum Press**, New York, p. 553, 1988.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Farmacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quimica Nova**, São Paulo, v.24, n.1, p.147-152, 2001.

ZANOELLO, A.M. et al. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.21, p. 31-6, 2002.

ZARONI, M. et al. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, p.29-39, 2004.

## APÊNDICE

### ARTIGO

#### EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND HISTOCOMPATIBILITY FROM *Syzygium cumini* (L.) Skeels EXTRACTS

Antonio Andre Lima da Silva<sup>1</sup>

Maria Bernadete de Souza Maia<sup>2</sup>

Mônica Camelo Pessôa de Azevedo Albuquerque<sup>3</sup>

Mário Ribeiro de Melo Junior<sup>4</sup>

Eulália Azevedo Ximenes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Physiology and Biochemistry of Microorganisms, Department of Antibiotics, Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

**Keywords:** *Syzygium cumini*; Myrtaceae; antimicrobial activity; medicinal plants; biocompatibility.

\*Correspondence address: Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, CEP: 50670-901. E-mail: eulaliaximenes@yahoo.com.br

Artigo a ser submetido

## ABSTRACT

The *Syzygium cumini* has been intensively studied as an antidiabetic agent and is often recommended as an aid in the treatment of type 2 diabetes. Few studies have focused on the antimicrobial activity of the plant. The leaves have biological activities and used in addition to diabetes, also have hypotensive action, diuretic, astringent, against constipation, leucorrhea and pruritus, and are used in poultices for skin diseases. Few reports in the literature on the antimicrobial activity of the leaves, as well as the uniqueness of the histopathologic evaluation of the aqueous extract front subcutaneous tissue, became relevant your search. In the present study, histopathological tests were done to try to evaluate the induction of reactions by aqueous extracts of the species *S. cumini*, verified by the simple application of these extracts in the subcutaneous tissue of Wistar rats. As a way to complement this study, phytochemical analysis of the leaves of *S. cumini*, which served to show the qualitative profile of secondary metabolites present, and assess whether they have antimicrobial activity. The minimal inhibitory concentration (MIC) determination was performed by broth microdilution method, following the recommendations established by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2012, with some modifications. The extracts were evaluated for antimicrobial activity using the microdilution method recommended by the CLSI, to determine the MIC. Were used 10 strains of bacteria of the genus *Enterococcus faecalis* and 6 strains of *Staphylococcus aureus* multiresistant to many antibiotics used in clinical medicine and the American Type Culture Collection (ATCC). The results of MIC were statistically analyzed by the Variance Analysis one-way (ANOVA). The aqueous extract extracted from leaves of *S. cumini* was the most active obtaining an average MIC of 0.41 mg ml<sup>-1</sup>. The obtained aqueous extract showed the highest activity against gram-positive bacteria *S. aureus*, against the other strains. The biocompatibility of the aqueous extract was found to be no significant change in the structural elements present in the subcutaneous tissue. The results increase the potential of the plant in herbal applications, and promising the development of innovative medicines based on research with *S. cumini*.

## 1 INTRODUCTION

The widespread increase in bacterial resistance to a large number of antimicrobials provides major health problems due to the difficulty of treatment [1]. The WHO recognizes that antimicrobial resistance is a serious problem worldwide, affecting developed and developing countries [2]. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant microorganisms represented a major public health pr

oblem in the last decade. These infections cause a prolonged period of hospitalization and high mortality rates [3, 4].

It is estimated that about 16 billion dollars are being spent annually to treat nosocomial infections caused by organisms resistant to multiple drugs, the treatment is limited to the use of some antimicrobials, which are often ineffective. The demand for antimicrobial agents is an important strategy for establishing new therapeutic alternative in difficult infections to handle [5, 6].

In Brazil, despite its rich flora represent 20% of known plant species in the world, only about 5% of these have been studied phytochemically, showing up as a virtually unexplored field. When one considers the number of plants subjected to bioassays this percentage is even lower [7], but the scientific community has already shown great interest in validating the plants used in folk medicine, especially when it comes to development and production of new herbal medicines and phytochemicals, which benefit Brazilian industry and the population [8].

Medicinal plants represent important health and is economical component of biodiversity and also the conservation and sustainable use [9]. Information on traditional knowledge of medicinal plants and their uses represent a vital role in the discovery of new pharmaceutical products from plants as chemotherapeutic agents [10, 11, 12, 13]. The plants are an integral part of the culture of these peoples and the information about the plant is passed from generation to generation. A detailed study of botany and pharmacological action of plants is necessary to create a scientific basis to facilitate their inclusion in medical practice [14, 15].

*Staphylococcus aureus* is an important pathogen acquired both in the community and in hospital infections is a common etiologic agent of infections in many different tissues and organs (eg, boil, abscess, myocarditis, endocarditis, pneumonia, meningitis, bacterial arthritis and osteomyelitis ) [16]. The multidrug-resistant strains of *S. aureus* cause serious problems for hospitalized patients. This organism evolved successfully in numerous strategies to resist the action of virtually all antimicrobial agents [17, 18, 19]. Thus, it is extremely important to

find new antimicrobial agents for treating infectious diseases caused by multidrug resistant organisms [20]. Screening of plant extracts and phytochemicals for antimicrobial activity showed that higher plants, especially their secondary metabolites, are a source to provide structurally different bioactive compounds with different pharmacological activities, including antimicrobial agents [21].

*Syzygium cumini* (L.) Skeels is one of the best known species of the Myrtaceae family and is very often cultivated. Some synonyms *Syzygium cumini* are *Eugenia jambolana* Lam., *Syzygium jambolana* DC., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC. [22]. It is popularly known as jambolão, black plum, purple plum [23]. In Brazil, it is grown in several states, Roraima, Amazonas, Pernambuco and Bahia to Rio Grande do Sul [24]. *S. cumini* present as secondary metabolites various chemical constituents and, by phytochemical screening, leaves were found gallic acid, metilgalato, kaempferol, myricetin, ellagic acid, quercetin and nilocitina [25]. The *S. cumini* has been intensively studied as an antidiabetic agent and is often recommended as an aid in the treatment of type 2 diabetes [26].

Few studies have focused on the antimicrobial activity of the leaves. The leaves have biological activities and as well as used in diabetes, also have hypotensive action, diuretic, astringent, against constipation, leukorrhea and itching, and are used in poultices for skin diseases [27].

Given the above, the few reports in the literature on the antimicrobial activity of the leaves, as well as the uniqueness of the histopathologic evaluation of the aqueous extract front subcutaneous tissue, became relevant your search. The in vivo studies allow a more detailed analysis of adverse reactions caused by plants on the body, since the cells and tissues do not exist in isolation but interconnected with cells and tissues [28].

In the present study, histopathological tests were done to try to evaluate the induction of reactions by aqueous extracts of the species *S. cumini*, verified by the simple application of these extracts in the subcutaneous tissue of Wistar rats. As a way to complement this study, phytochemical analysis of the leaves of *S. cumini*, which served to show the qualitative profile of secondary metabolites present, and assess whether they have antimicrobial activity.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Plant Material**

The leaves of *Syzygium cumini* were collected in December 2007 on the campus of the Federal University of Pernambuco (UFPE), state of Pernambuco, Brazil (latitude 8 ° 03 '16.26 "S and longitude 34 ° 56' 49.72" W) and 12,8m above sea level. The identification was carried out by biologist Marlene Barbosa, Department of Botany, UFPE, where a voucher specimen is deposited under number 52301 in the Herbarium of the Centre for Biological Sciences (CCB).

## 2.2 Extracts Preparation

The leaves of *Syzygium cumini* were dried at room temperature and then ground in an electric mill (Primotécnica Mod. P2003). A thorough maceration of the leaves 50g, using solvents in increasing polarity: Petroleum ether (PEE), Ethyl acetate (EAE), methanol (ME) and aqueous (AE) was performed. Each extract was filtered and the solvents removed with the aid of rotary evaporator (Model Q344B) under reduced pressure. The extracts were packaged in amber bottle and kept under refrigeration, except for the aqueous extract was lyophilized.

## 2.3 Phytochemical Screening

The phytochemical screening was carried out by thin layer chromatography (TLC) on silica gel (Merck, Germany), following the procedures described by Wagner and Harborne [29]. 15  $\mu$ L aliquots of each extract solution (0.5% w/v) were applied to evaluate the presence of monoterpenes, sesquiterpenes, triterpenes, steroids, alkaloids, iridoids, coumarins, saponins, hydrolyzed and condensed tannins, phenylpropanoids, flavonoids, and sugars. The determination was performed by anthraquinones Bornträger methodology in test tubes [30].

## 2.4 Determination of Antibacterial Activity

### 2.4.1 Bacterial Strains and Inocula Standardization

Bacteria ( $n = 16$ ) were obtained from stock cultures and maintained at our laboratory (Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos - LFBM). For this study we used the following bacterial strains isolated from clinical specimens: *Enterococcus faecalis* (LFBM 068, LFBM 144, LFBM 55245, LFBM 55295, LFBM 56288, LFBM 56354, LFBM 55671, LFBM 55915, LFBM 55995), *Staphylococcus aureus* (LFBM 138, LFBM 311, LFBM 155,

LFBM 247), *Staphylococcus aureus* 13 QC, isolated curd cheese, came from the LACEN-PE Pernambuco State Central Laboratory. Two representative collection of microorganisms each studied bacterial genus: *Enterococcus faecalis* ATCC 27212 ATCC American Type Culture Collection, and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; belonging to the Culture Collection of the Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco.

The bacteria were kept on agar slants Müller-Hinton and were kept under refrigeration at 4°C. Bacterial inocula were obtained from the cultures 18 hours of incubation at 37°C in liquid medium Muller Hinton. With these cultures were performed suspensions in distilled water of the dilution was adjusted according to the turbidity of 0.5 McFarland standard tube scale, equivalent to 108 CFU / ml. Dry extracts of *Syzygium cumini* PEE, EAE and ME standard solutions were obtained concentration equivalent to 2 mg / ml by analytical weighing and dissolving in a system consisting of dimethylsulfoxide (DMSO) /Tween/H<sub>2</sub>O(1.5:1.0:17.5)v/v/v. The aqueous extract (AE) was subjected to lyophilization and a solubilized in distilled water to obtain a solution of equal concentration. These extracts were sterilized by millipore filtration membrane of 0.45µm.)

#### 2.4.2 Antibacterial Activity

The minimal inhibitory concentration (MIC) determination was performed by broth microdilution method, following the recommendations established by CLSI 2012 [31], with some modifications. Serial dilutions of standard solutions of the extracts were prepared in 96 well microplates containing Mueller-Hinton broth (MHB) for bacteria. Five microliters of the bacterial suspension was inoculated in each well to give a final concentration of 10<sup>4</sup> CFU. Two columns were reserved, one for control of a possible intrinsic activity of the DMSO used in the preparation of the extracts. Another column received only broth (MHB) to board sterility verification. The microplates were incubated at 35 ° C for 18 hours for bacteria. Bacterial viability was detected by adding 20 µl of 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) in 0.5% aqueous solution. The plates were reincubated for three hours at 35 ° C, and alveoli, where bacterial growth occurred TTC changed to red. The absence of a color change indicated no growth. MIC was defined as the lowest concentration of antimicrobial agent that inhibited visible growth, as indicated by TTC staining. All experiments were performed in duplicate.

## 2.5 Statistical Analysis

The statistical analysis was made through a one-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test, using GraphPad Prism version 5.0 for Windows, GraphPad software (San Diego, CA, USA), and  $P < 0.05$  was used as the level of significance.

## 2.6 Histological evaluation of the subcutaneous tissue exposed to aqueous extract

2.6.1 Animals - 24 rats (*Rattus norvegicus*, Albinus Wistar) male and 60 days old, weighing on average  $275 \pm 25$  g. The animals were kept at a temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  under standard lighting conditions (light-dark cycle of 12/12 h) with free access to water and Labina® chow (Purina Agribands of Brazil Ltda). The procedures adopted and approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of UFPE under number 23076.005814/2008-18. For histological analysis of the subcutaneous tissue, the animals were separated into four groups, each group with six animals ( $n = 24$ ): Group I (euthanized group after seven days extract injection), Group II (euthanized group after fourteen days of extract injection), group III (group euthanized after twenty-eight-day extract injection) and group IV (group euthanized after thirty and two days of the extract injection).

2.6.2 Methodology applied to the histopathological - Held shaving and antiseptics in the dorsal region with the polyvinyl pyrrolidone solution of 10% (Merck). Two symmetrical applications, were made in the subcutaneous tissue média. One line located on the right side where the aqueous extract of *Syzygium cumini* was applied in the minimum inhibitory concentration 0.4 mg / mL, equivalent to a dose of 1.3mg / kg and another on the left, which was applied to 0.9% saline solution (control). After 7, 14, 28 and 32 days this administration, the animals of each group were euthanized subjected to excessive dose of anesthetics with ketamine hydrochloride 5% (vetanarcol König) in dose 0.25 ml/100g of animal weight and xylocaine 2% (kensol König) at a dose of 0.03 ml/100g body weight. The collected material, subcutaneous connective tissue was immediately immersed in physiological solution and cross cuts were made in order to facilitate penetration of the fixative substance Boiun (750ml of saturated picric acid solution, 250mL of 40% formaldehyde, glacial acetic acid 50mL). Then several histological procedures were performed for observation with optical microscopy [32]. Side sections were obtained by microtome ERMA (Tokyo, Japan) using razor set to  $6\mu\text{m}$  each. The histological cuts were drawn in a water bath, disposed on slides smeared with

Mayer albumin, placed in ovens for about 30min at 37°C for drying the material. Specimens received treatment staining with hematoxylin and eosin (HE). The slides were mounted Entellan and finalized for observation and photomicrographed in Olympus Optical Microscope Model BX50, Video Camera Samsung SHC 410NAD Model, Software: TV Tuner Application. For each animal were made two blades.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Phytochemical Screening

All extracts were undergoing phytochemical analysis revealed the presence of monoterpenoids and sesquiterpenoids in PEE and EAE; triterpenoids and steroids in PEE, EAE and ME; reducing sugars in ME and AE; Flavonoids in EAE, ME and AE; condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins in ME and AE; and hydrolysable tannins in the AE. It is possible that these secondary metabolites may be responsible for bioactivity of the extracts of this plant. A wide variety of classes of secondary metabolites, corroborates the possibility of finding antimicrobial effect in the extracts studied because this effect may be the result of synergism of chemical groups present [33]. Advantage of the aqueous extract as a more polar concentrates more polar chemical groups compared to the other organic solvent extracts used. Of the compounds present in *Syzygium cumini* extracts, tannins and other phenolic compounds are the most studied because of their relevance antibacterial activity [34]. Phenolic compounds are a major groups having a broad spectrum of chemical and biological activities including radical scavenging properties. The presence of hydrolyzable tannins in the aqueous extract shows a good antibacterial activity of the extract, compared with others where it is absent. The phytochemical study is critical to differentiate the classes of secondary metabolites have pharmacological action, particularly in the medicinal plants used popularly [35].

#### 3.2 Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of crude extracts of *Syzygium cumini* sheets was evaluated in vitro against 16 bacterial different. The extracts used were PEE, EAE, ME and AE in a concentration of 2.0 mg / ml. The microdilution broth method is 30 times more sensitive than

the other methods used for the analysis of antimicrobial activity [36, 37, 38]. All extracts of *Syzygium cumini* (L.) Skeels shown on gram negative bacilli Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values greater than or equal to 1mg / ml. The aqueous extract presented no antibacterial activity against almost all bacteria studied. Similar results have been reported in literature [39, 40].

The tested microorganisms, the six strains of *Staphylococcus aureus* proved to be the most sensitive, whose MIC is  $x 0,83 \pm \delta 0,25$ ;  $x 0,79 \pm \delta 0,33$ ;  $x 0,50 \pm \delta 0$  e  $x 0,41 \pm \delta 0,12$  for PEE, EAE, ME and AE respectively. About all the microorganisms studied ( $n = 16$ ), can perceive the activity of *Syzygium cumini* extracts from microorganisms, where the MIC ranges from 2.00 to 0.41 mg / ml. However, AE obtained from leaves of *Syzygium cumini* proved to be the most active against *Staphylococcus aureus*. These results are quite significant because of increased morbidity and mortality related to multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the last two decades. In addition, several microorganisms are resistant to various antimicrobial agents [41, 42].

The best MIC results were observed for *Staphylococcus aureus* that is a Gram positive bacterium, has greater permeability for secondary metabolites and these suffering little influence of bacterial enzymes in the mechanism of action [43, 44]. There are three hypotheses about the mechanism of action of tannins on the bacteria, the first would be an inhibition of enzymes of microorganisms and / or connection with the substrate of these enzymes; through action on the cell membrane, changing their metabolism or by complexation of tannins with metal ions, reducing the availability of these ions, which are essential to the metabolism of microorganisms [45]. The antimicrobial activity of flavonoids are probably related to the ability of this compound to complex with proteins from bacterial cells forming irreversible complexes with nucleophilic acids, which often leads to inactivation of the protein and loss of function [46]. Many lipophilic flavonoids may further disrupt the bacterial wall [47].

This study aimed to show the importance of antimicrobial activity of various extracts from leaves of *Syzygium cumini* against high resistance pathogenic microorganisms. The antimicrobial activity is presented satisfactory against strains of *Staphylococcus aureus* as shown in Table 1.

### 3.3 Histopathological evaluation of the aqueous extract

The subcutaneous tissue was used in this study to evaluate the biocompatibility because it has many advantages, such as ease of implementation and maintenance of animals, allowing a larger sample in a short period of time, speed in laboratory processing, with no need of demineralization phase when it does not involve calcified tissue; and low cost for development. Microscopic analysis of the subcutaneous tissue was to verify its structural elements, as well as detect possible morphological changes of cells and tissue as a whole. It was also performed the clinical monitoring of animals during the days after the injection of extracts. The proposal to use up the subcutaneous tissue of rats is of importance because it is where perfectly know the succession of biological phenomena that comprise the repair process [48].

The result of the optical microscope shows the typical histological structure of the subcutaneous tissue. Eosin stained collagen fibers arranged in different directions and numerous fibroblast cytoplasmic inaccurate limits were observed, which more evident nucleus. Muscle fibers skeletal deep dorsal muscles were also seen (Figure 1).

There were no significant morphological changes in experimental groups when they were compared to the control group. After analysis of the optical microscope, it was found that the aqueous extract introduced in the subcutaneous tissue caused no incompatibility reaction because the body does not react and not considered as foreign element, ie, it was not verified any allergic reaction at the injection site extract.

As the concept of biocompatibility is related to the ability of a material perform specific tasks when applied in contact with living tissue of a particular host, without, however, causing damage or injury to it, this result shows that the aqueous extract of the plant under study does not accelerate healing, or behaves as an aggressive materials to fabrics, and therefore, biocompatible for this case [28]. Subcutaneous level, similar studies with other plants have shown that aqueous extracts reported no obvious pathological responses such as infection, tissue necrosis and calcification [49, 50].

Were not found in literature work on the histopathology of *Syzygium cumini*, it is not possible to compare our results with other data. The presence of secondary metabolites reducing sugars, flavonoids, condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins and hydrolysable tannins, in the aqueous extract of *Syzygium cumini* leaves did not cause the connective tissue analyzed any changes, and this is an indicative extract compatible with animal tissue.

Applications for patents of Brazilian Amazonian plants, 89.3% were requests for therapeutic applications, especially for dermatological use, which proves the relevance of studies to evaluate the biocompatibility of these active ingredients with animal tissue [51, 52].

The importance of histopathological tests can be seen in its uniqueness and that may in the future seek a new form of exploitation of the existing plant resources in our country. Knowing that there is a compatible with living tissue extract is an initiative for the development of novel dosage forms. The healing activity induce presents some characteristics such as formation and maturation of fibroblasts, responsible for the production of collagen matrix and the formation of granulation tissue when significant [53, 54]. The regeneration and healing, also called fibrosis involves tissue repair characterized by migration, proliferation and cell differentiation. The control of cell proliferation is done by soluble factors in the microenvironment, the cytokines which can stimulate or inhibit this process [55, 56, 57].

The healing activity suggests increasing the number of fibroblast cells and epithelialization [58, 59, 60] however, this kind of response did not occur in this work with the aqueous extracts of implants, or when they were treated with saline solution, ensuring not histopathological aggression.

Proven knowledge of antimicrobial activity and compatibility with living tissue marks the beginning of the search for new drugs to improve the quality of life. Despite recent advances in the production of pharmaceuticals, synthetic chemistry and biotechnology, natural products such as plants and minerals remain the main source for obtaining medicines, and many of them have their origin in folk medicine [61, 62, 63].

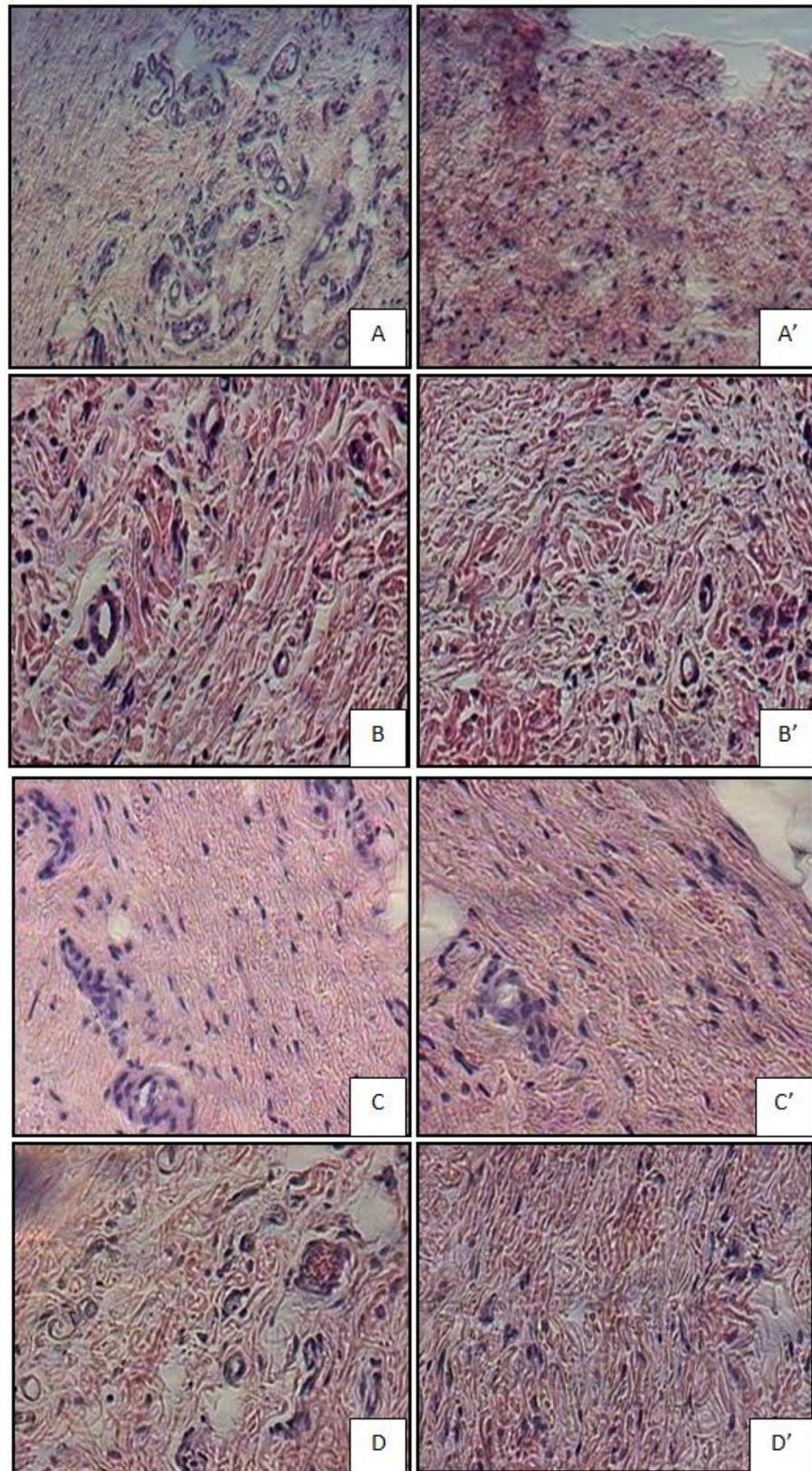
#### **4 CONCLUSION**

The antimicrobial activity observed against the microorganisms tested is related to the presence of secondary metabolites, such as tannins and flavonoids, in *Syzygium cumini* extracts since these metabolites act respectively precipitating proteins and complexes formed in the bacterial cell. Of all the microorganisms studied *Staphylococcus aureus* showed the greatest susceptibility to the extracts of *Syzygium cumini*. The analyzed subcutaneous tissue retained its histological structures preserved, with no signs of morphological changes in cells, necrosis or inflammatory infiltrate.

**Table 1 - Minimal Inhibitory Concentration of the petroleum ether extracts (PEE), ethyl acetate (EAE), methanol (ME) and aqueous (AE) *Syzygium cumini* against Gram-positive cocci.**

Gram-positive cocci	Origin	Minimal Inhibitory Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )				Resistance profile
		EEP	EAE	EM	EA	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	ATCC	500	1000	500	250	American type culture collection
<i>Staphylococcus aureus</i> 13 QC	Cheese curds	1000	250	500	1000	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 138	IC	500	1000	500	500	Vaginal secretion
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 155	Cheese curds	15.6	15.6	15.6	15.6	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; SZT; ERI; TET; PEN
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 247	ND	1000	2000	1000	500	AMP; CFO; ERI; AMOX GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; SZT; ERI;
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 311	Wound on the finger	15.6	1000	500	1000	TET; PEN
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 27212	ATCC	1000	1000	2000	500	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 068	Urine	1000	1000	2000	15.6	CLO; ERI; TET; ATM
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 144	Urine	1000	1000	2000	500	CLO; TET; ATM
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 55245	Urine	1000	1000	2000	15.6	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 55295	Urine	1000	1000	2000	15.6	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 55671	Urine	1000	1000	2000	15.6	CLO; GEN; TET; ATM
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 55915	Urine	1000	1000	2000	15.6	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 55995	Urine	1000	1000	2000	15.6	CLO; ERI; TET; ATM
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 56288	Urine	1000	1000	2000	15.6	CLO; GEN; TET; ATM; AMP
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 56354	Urine	1000	1000	2000	15.6	CLO; ERI; TET; ATM

ATCC: American Type Culture Collection; LFBM: Laboratory of Physiology and Biochemistry of Microorganisms; ND: Not determined; AMI: Amicacin; AMOX: Amoxicillin; AMP: Ampicillin; ATM: Aztreonam; CFO: Cefoxitin; CLO: Chloramphenicol; CTX: Cefotaxime; ERI: Erythromycin; GEN: Gentamicin; OXA: Oxacillin; TET: Tetracycline; PEN: Penicillin SZT: Sulfazotrim.



**FIGURE 1.** Photomicrographs of the subcutaneous connective tissue of albino rats. (A, B, C and D) and control group (A', B', C' and D') treated group after 7, 14, 28 and 32 days injection with the aqueous extract of *S. cumini* (L.) Skeels. Increase (200x). Staining HE (Antonio André L.Silva, 2009).

## 5 REFERENCES

- [1] M. Ayyanar and P. Subash-Babu, "Syzygium cumini (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol.2, pp. 240-246, 2012
- [2] A. Banerjee and N. Dasgupta, "In vitro study of antioxidant activity of Syzygium cumini fruit," *Food Chemistry*, vol. 90, pp.727-733, 2005
- [3] P. S. Benherlal and C. Arumugan, "Chemical composition and in vitro antioxidant studies on Syzygium cumini fruit," *Journal of the Science Food and Agriculture*, vol.87, pp. 2560-2569, 2007
- [4] A. F. Faria, M. C. Marques and A. Z. Mercadante, "Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions," *Food Chemistry*, vol.126, pp.1571-1578, 2011
- [5] A. Jain, S. Sharma, M. Goyal et al., "Anti-inflammatory activity of Syzygium cumini leaves," *International Journal of Phytomedicine*, vol.2, pp.124-126, 2010
- [6] M. Kaneria, S. Chanda, Y. Baravalia et al., "Determination of antibacterial and antioxidant potential of some medicinal plants from Saurashtra Region, India," *Indian Journal Pharmaceutical Sciences*, vol.71, pp.406-412, 2009
- [7] K. Pavan Kumar, P. D. Prasad, A. N. Rao et al., "Anti-inflammatory activity of Eugenia jambolana in albino rats," *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, Vol. 1, pp. 435-438, 2010
- [8] Z. P. Ruan, L. L. Zhang, Y. M. Lin, "Evaluation of the antioxidant activity of Syzygium cumini leaves," *Molecules*, Vol 13, pp.2545-2556, 2008
- [9] P. Sari, C. H. Wijaya, D. Sajuthi, et al., "Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model

system: Natural and copigmented anthocyanins”, *Food Chemistry*, Vol. 132, pp.1908-1914, 2012

[10] S. Achrekar, G. S. Kaklij, M. S. Pote, et al., “Hypoglycemic activity of *Eugenia jambolana* and *Ficus bengalensis*: mechanism of action”, *In Vivo*, Vol. 5, pp. 143-147, 1991

[11] M. Ayyanar and P. Subash-Babu, “*Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol 2, pp.240-246, 2012

[12] P. Chirvan-Nia, and A. R. Ratsimamanga, “Regression of cataract and hyperglycemia in diabetic sand rats (*Psammomys obesus*) having received an extract of *Eugenia jambolana* (Lamarck)”, *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie* , vol. 274, pp. 254-257, 1972

[13] D. C Modi, J. K. Patel, B. N. Shah, B. S. Nayak, “Antiinflammatory activity of seeds of *Syzygium cumini* Linn.”, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, vol. 1, pp. 68-70, 2010

[14] S. Muruganandan, K. Srinivasan, S. Chandra, et al., “Antiinflammatory activity of *Syzygium cumini* bark”, *Fitoterapia*, vol.72, pp.369-377, 2001

[15] S. Muruganandan, S. Pant, K. Srinivasan, “Inhibitory role of *Syzygium cumini* on autacoid-induced inflammation in rats”, *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*., vol.46, pp. 482-486, 2002

[16] M. Pandey, A. Khan, “Hypoglycemic effect of defatted seeds and water soluble fiber from the seeds of *Syzygium cumini* (Linn.) skeels in alloxan diabetic rats”, *Indian Journal of Experimental Biology*, vol 40, pp. 1178-1182, 2002

[17] S. B. Scharma, A. Nasir, K. M. Prabhu, et al., “Hypoglycemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol.85, pp.201-206, 2003

- [18] P. Stanely Mainzen Prince, N. Kamalakkannan, V. P. Menon, “*Syzygium cumini* seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol 84, pp. 205-209, 2003
- [19] M. E. B. Oyarzabal, L. F. D. Schuch, L. S. P. Prestes, et al., “Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino”, *Revista Cubana de Plantas Medicas*, vol. 16, no 3, pp. 260-6, 2011
- [20] A. C. P. Costa, C. A. Pereira, F. Freire, et al., “Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*”, *Revista de Odontologia da UNESP*, vol. 38, no 2, pp.111-6, 2009
- [21] K. F. Migliato, A. R. Baby, V. Zague, et. al., “Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels”, *Acta Farmacêutica Bonaerense*, vol.25, no 2, pp.310-4, 2006
- [22] M. Ayyanar and P. Subash-Babu, “*Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 2, pp. 240 - 246, 2012.
- [23] T. S. O. de Brandão, et al., “Changes in enzymes, phenolic compounds, tannins, and vitamin C in various stages of jambolan (*Syzygium cumini* Lamark) development”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 31, no 4, pp. 849-855, 2011
- [24] A. C. Jacques and R. C. Zambiasi, “Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp)”, *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 32, no 1, pp. 245-260, 2011
- [25] Kuncha, et al., “In vitro evaluation of nitric oxide scavenging activity of methanolic and aqueous extract of *Syzygium Cumini* Linn. Bark (Myrtaceae)”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, pp. 615-619, 2012.
- [26] K. F. Migliato, et al., “Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels”, *Química Nova*, vol.34, no 4, pp. 695-699, 2011

- [27] G. G. Saravanan and L. Pari, "Hypoglycaemic and Antihyperglycaemic Effect of *Syzygium cumini* Bark in Streptozotocin Induced Diabetic Rats", *Journal of Pharmacology and Toxicology*, vol. 3, pp. 1- 10, 2008
- [28] P. C. de C. Pita , F. C. M. Pinto, M. M.de M. Lira et al., "Biocompatibility of the bacterial cellulose hydrogel in subcutaneous tissue of rabbits", *Acta Cirurgica Brasileira.*, vol. 30, no.4, 2015
- [29] A.C.B.P. Costa, C.A. Pereira, F. Freire, et al., "Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida Glabrata* e *Candida tropicalis*", *Revista de Odontologia da UNESP*, vol.38, no 2, pp.111-116, 2009
- [30] T. King, G. Dykes, R. Kristianti, "Comparative evaluation methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds", *Journal of AOAC International*, Australia, vol.91, no 6, p.1423-1429, 2008
- [31] Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, PA Publication M100-S22, Wayne, Pa, USA, 2012.
- [32] M. Othman, H. S. Loh, C. Wiart, et al., "Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts", *Journal of Microbiological Methods*, vol. 84, p.161-166, 2011
- [33] V.C. Kalia and H. J. "Purohit, Microbes, Antimicrobials and Resistance: The Battle Goes On Crit", *Revista de Microbiologia*, vol. 37, no 2, pp.140, 2011
- [34] V. C. Kalia, T. K. Wood and P. Kumar, "Inhibiting *N*-acyl-homoserine lactone synthesis and quenching *Pseudomonas* quinolone quorum sensing to attenuate virulence", *Microbial Ecology*, vol. 68, no 1, pp.23, 2014

- [35] D. R. Monteiro, S. Silva, M. Negri, et al., “Antifungal Activity of Silver Nanoparticles against Phytopathogenic Fungus (*Phomopsis sp*) in Soybean Seeds”, *Journal of Applied Microbiology*, vol 54, no 5, pp. 391, 2012
- [36] S. Barua, R. Konwarh, M. Mandal, et al., “Compatibility Score Generation for Kidney Transplant Among Donor–Recipient Pair Using Fuzzy Logic”, *Advanced Science, Engineering and Medicine.*, vol 5, pp. 8, 2013
- [37] V. V. Makarov, A. J. Love, O. V. Sinitsyna, et al., “Green nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants”, *Acta Nature*, vol 6, no 1, pp. 44, 2014
- [38] P. Kumar, S. S. Selvi, M. Govindaraju, “Electrospun PCL membranes incorporated with biosynthesized silver nanoparticles as antibacterial wound dressings”, *Applied Nanoscience.*, vol. 3, pp. 500, 2013
- [39] S. Swanni, N. Thakeor, M. Patil, and P. Halalankar, “Seaweed-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* for its antifungal activity against *Candida spp.*”, *Food and Nutrition Sciences.*, vol. 3, pp. 1100, 2012.
- [40] S. Sherstha, S.R. Subaramaiha, S.G. Subbaiah, et al., “Evaluating the antimicrobial activity of methanolic extract of *Rhus succedanea* leaf gall”, *BioImpacts*, vol. 3, pp. 195-198, 2013.
- [41] A. Sartoratto, A. L. M. Machado, C. Delarmelina, G. M. Figueira, M. C. T. Duarte, and V. L. G. Rehder, “Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil,” *Brazilian Journal of Microbiology*, vol.35, no. 4, pp. 275–280, 2004.
- [42] A.K. Sharma, S. Bharti, R. Kumar, et al., “*Sygygium cumini* ameliorates insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction via modulation of PPAR, dyslipidemia, oxidative stress, and TNF- $\alpha$  in type 2 diabetic rats”, *Journal of Pharmacology Science*, vol. 119, pp. 205-213, 2012
- [43] S. Srivastava and D. Chandra, “Pharmacological potentials of *Sygygium cumini*: a review”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 93, pp. 2084-2093, 2013

- [44] M.R.K. Sartori, et al., “Antifungal Activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae)”, *Pharmazie*, vol. 58, no 8, pp. 567-9, 2003
- [45] A. A. Mohamed, A. A. Khalil, H. E. S. El-Beltagi, “Antioxidant and antimicrobial properties of Kaff maryam (*Anastatica hierochuntia*) and Doum palm (*Hyphaene thebaica*)”, *Grasas Y Aceites*, vol. 61, pp. 67-75, 2010
- [46] W. R. Galloway, J. T. Hodgkinson, S. Bowden, et al., “Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria”, *Trends in Microbiology*, vol 20, pp. 449-458, 2012
- [47] H. Y. Chenia, “Anti-quorum sensing potential of crude *Kigelia Africana* fruit extracts”, *Sensors*, vol. 13, pp.2802-2817, 2013
- [48] J. S. Quintans, R. G. Brito, P. G. Aquino et al., “Antinociceptive activity of *Syzygium cumini* leaves ethanol extract on orofacial nociception protocols in rodents”, *Pharmaceutical Biology.*, vol. 52, no 6, pp. 762-6, 2014
- [49] A.A. Sikder, M.A. Kaiser, M.S. Rahman et al., “Secondary metabolites from seed extracts of *Syzygium cumini* (L.), *Journal of Physical Science*, vol 23, pp. 83-87, 2012
- [50] A.C. Donepudi, L.M. Aleksunes, M.V. Driscoll et al., “The traditional ayurvedic medicine, *Eugenia jambolona* (Jamun Fruit) decreases liver inflammation, injury, and fibrosis during cholestasis”, *Liver International*, vol. 32, pp. 560-573, 2012
- [51] W. F. Yin, K. Purmal, S. Chin, X.Y. Chan et al., “N-acyl homoserine lactone production by *Klebsiella pneumonia* isolated from human tongue surface”, *Sensors*, vol.12, pp. 3472-3483, 2012
- [52] M. Kaneria and S. Chanda, “Evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of *Syzygium cumini* L. leaves extracted sequentially in different solvents”, *Journal of Food Biochemistry*, vol. 37, pp.68-76, 2013

- [53] J. Zhang, X. Rui, L. Wang et al., “Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation”, *Food Control*, vol. 42, pp. 125-131, 2014
- [54] F. Pérez-Montaña, I. Jimenez-Guerrero, R. Contreras Sánchez-Matamoros et al., “Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilm by plant-associated bacteria”, *Research in Microbiology*, vol.164, pp. 749-760, 2013.
- [55] L. Guerra-Boone, R. Alvarez-Román, R. Salazar-Aranda et al., “Chemical compositions and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils from *Magnolia grandiflora*, *Chrysactinia mexicana*, and *Schinus molle* found in northeast Mexico”, *Natural Product Communications*, vol. 8, pp.135-138, 2013
- [56] P. Jakowiemko, B. Wojcik-Stopczynska, D. Jadcak, “Antifungal activity of essential oils from two varieties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.)”, *Vegetable Crops Research Bulletin*, vol. 74, pp.97-106, 2011
- [57] M. Khan, A. A. Mousa, K. V. Syamasundar, H. Z. Alkhatlan, “Determination of chemical constituents of leaf and stem essential oils *Artemisia monosperma* from central Saudi Arabia”, *Natural Product Communication*, vol. 7, pp. 1079-1082, 2012
- [58] G. I. Kh Marei, M. A. Abdel Rasoul, S. A. M. Abdelgaleil, “Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 103, pp. 56-61, 2012
- [59] K. Zomorodian, M. Moein, Z. G. Lori, et al., “Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from *Myrtus communis* Leaves”, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol. 16, pp. 76-84, 2013
- [60] M. Vizzotto and M. C. Pereira, “Amora-preta (*Rubus* sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes”, *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 33, no 4, pp.1209-1214, 2011

[61] M. Nawaz, S.A. Khan, Q. Tran, et al., “Isolation and characterization of multidrug-resistant *Klebsiella* spp. isolated from shrimp imported from Thailand”, *International Journal of Food Microbiology*. vol. 155, pp. 179-184, 2012

[62] A. C. Siani, M. C. Souza, M. G. Henriques, M. F. Ramos, “Anti-inflammatory activity of essential oils from *Syzygium cumini* and *Psidium guajava*”, *Pharmaceutical Biology.*, vol. 51, no 7, pp. 881-7, 2013

[63] H. Spicknall, B. Foxman, C. F. Marrs, and J. N. Eisenberg, “A modeling framework for the evolution and spread of antibiotic resistance: literature review and model categorization,” *American Journal of Epidemiology*, vol. 14, pp. 1–13, 2013.