

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE**

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

**CITOTOXICIDADE, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO DE *Syzygium cumini* (L.) Skeels APÓS
IRRADIAÇÃO GAMA**

MARIA CLÁUDIA VALÉRIO VICALVI COSTA

**Orientadores: Prof. Dr. Waldeciro Colaço
Prof. Dr. Elvis Joacir De França**

**Recife, PE
Janeiro, 2017**

MARIA CLÁUDIA VALÉRIO VICALVI COSTA

**CITOTOXICIDADE, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO DE *Syzygium cumini* (L.) Skeels APÓS
IRRADIAÇÃO GAMA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Área de Concentração: Aplicação de Radioisótopos na Agricultura e Meio Ambiente.

**Orientadores: Prof. Dr. Waldeciro Colaço
Prof. Dr. Elvis Joacir De França**

**Recife, PE
Janeiro, 2017**

Catálogo na fonte
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

- C837c Costa, Maria Cláudia Valério Vicalvi.
Citotoxicidade, propriedades antioxidantes e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de *Syzygium cumini* (L.) Skeels após irradiação gama. / Maria Cláudia Valério Vicalvi Costa. - Recife: O Autor, 2017.
132 f. : il., tabs.
- Orientador: Prof. Dr. Waldecir Colaço.
Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2017.
Inclui referências bibliográficas, apêndice e anexos.
1. *Syzygium cumini*. 2. Irradiação. 3. Antioxidante. 4. *S. aureus*. 5. *P. aeruginosa*. I. Colaço, Waldecir, orientador. II. França, Elvis Joacir de, orientador. III. Título.

CDD 621.48 (21. ed.)

UFPE
BDEN/2017-27

**CITOTOXICIDADE, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO DE *Syzygium cumini* (L.) SKEELS APÓS
IRRADIAÇÃO GAMA**

Maria Cláudia Valério Vicalvi Costa

APROVADO EM: 31 / 01 /2017

**ORIENTADORES: Prof. Dr. Waldeciro Colaço
Prof. Dr. Elvis Joacir De França**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo - DBR/CCB/UFPE

Profa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque - DANTI/ CCB/UFPE

Profa. Dra. Evelyne Gomes Solidônio – FACIPE- PE

Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira- CRCN/DEN/UFPE

Prof. Dr. Elvis Joacir de França – CRCN/DEN/UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado forças, saúde e coragem para lutar. Por me ter permitido chegar até aqui.

À minha querida mãezinha que confiou em mim e me fez acreditar que era possível seguir esse caminho. Mãe, TE AMO!

A meus orientadores, Professor Dr. Colaço e Prof. Dr. Elvis que me ensinaram e guiaram para que eu conseguisse chegar até aqui. Obrigada mesmo.

À Professora Kêsia, que me guiou, aconselhou, conversou, “puxou minha orelha”, por esses 10 anos em que estive no laboratório. MUITO obrigada professora por confiar em mim. MUITO OBRIGADA MESMO! Desculpa todo o trabalho que dei.

A todas as pessoas que se tornaram meus amigos, e que fazem parte do Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos e do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial: Tiago, Persinho (Pretchildo), Glêzia (GR), Lucimeri, Natália, João, Raysa, Professora Norma Gusmão, Erik, Nelânia, Camila e Diana muito obrigada pelas conversas, pelas horas de descontração, pela ajuda na execução dos meus experimentos, sem vocês seria mais difícil chegar até aqui.

A vocês que merecem destaque, pois os três me ajudaram, conversaram, ligaram, fizeram tudo o que estava ao seu alcance para me ajudar nessa jornada tão longa que foi esse doutorado. Rosilma, Igor, Vinícius, vocês foram essenciais para meus dias serem mais alegres. Obrigada por me ajudarem. Obrigada por serem meus anjos. Sem vocês não teria sido tão bom, como foi. O-B-R-I-G-A-D-A!! Vocês moram no meu coração e não pagam aluguel (Solidônio, forever).

Em especial, e por ser o mais importante na minha vida, meu esposo, Eduardo (Vida), que com muita paciência, carinho, compreensão e sabedoria, ajudou-me em todos os momentos, dos mais fáceis aos mais difíceis. Obrigada, meu amor, sem você eu não teria chegado até o fim. TE AMO MUITO.

A todos os funcionários e professores que fazem parte do Departamento de Energia Nuclear e do Departamento de Antibióticos. Obrigada pelos ensinamentos, pela ajuda, pelo suporte para que meu trabalho fosse desenvolvido com êxito.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

À Secretaria de Pós-Graduação, pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira ou de outra me ajudaram a concluir mais esta etapa da minha vida. Sou muito grata a vocês.

“O tempo é o melhor autor; sempre encontra um final perfeito.”

Charles Chaplin

“Ninguém ganha sempre, mas os corajosos sempre ganham no final.”

Paulo Coelho

RESUMO

A radiação tem sido utilizada para buscar o aumento de compostos com atividade antimicrobiana e antioxidante em extratos de plantas. Como *Syzygium cumini* (L.) Skeels apresenta atividades antioxidante, antimicrobiana, antidiarreica e adstringente já conhecidas, o objetivo deste trabalho foi avaliar os metabólitos secundários encontrados nos extratos irradiados com ^{60}Co nas doses de 6, 8 e 10 kGy de raiz e caule de *S. cumini*, analisar as propriedades citotóxica e antioxidante e quantificar a atividade antimicrobiana nos extratos irradiados. Para a análise qualitativa, foi realizada a cromatografia em camada delgada. Foram realizadas atividade hemolítica e anti-hemolítica. Na dosagem de compostos fenólicos foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu. Para a quantificação dos flavonóides, as misturas extrato-reagente permaneceram por 30 minutos no escuro e a absorvância foi medida em 420 nm. O método do DPPH aplicado às concentrações dos extratos irradiados permitiu a avaliação quanto à capacidade do sequestro do radical. No método do radical ABTS, a mistura extrato-solução foi lida na absorvância de 734 nm. A atividade antioxidante total foi avaliada a partir do método do Fosfomolibdênio. Para a quantificação dos taninos, a mistura vanilina-ácido sulfúrico foi adicionada aos extratos com respectivas leituras em 500 nm. A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foi testada nas concentrações de 2000 a 3,9 $\mu\text{g/mL}$ contra isolados clínicos de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Os resultados fitoquímicos qualitativos revelaram a presença de flavonóides, derivados cinâmicos, triterpenos, esteróides, mono e sesquiterpenos, cumarinas, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas nos extratos irradiados. Os melhores valores de atividade hemolítica foram os extratos irradiados na dosagem de 125 $\mu\text{g/mL}$, que resultou em 0% de hemólise. No caso de atividade anti-hemolítica, os extratos irradiados não apresentaram efeito significativo quando comparados com os extratos controle, contudo alíquotas menores de extrato, principalmente para caule, ocasionaram a melhora do efeito citoprotetor. Os maiores valores de compostos fenólicos foram encontrados nos extratos de raiz irradiados, todavia a irradiação causou a diminuição das concentrações de compostos fenólicos nos extratos de caule. Para flavonóides, o extrato irradiado com 8 kGy de raiz e com 6 kGy de caule obtiveram os melhores resultados quando comparados ao extrato não irradiado, enquanto que os taninos foram enriquecidos no extrato de caule irradiado a 8 kGy. O sequestro de radicais livres, na atividade do radical DPPH, manteve valores próximos de 90% para as concentrações acima de 125 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados do radical ABTS indicaram grande capacidade de sequestro para extrato de raiz irradiado com 10 kGy, confirmado com os resultados do TEAC. Na atividade do fosfomolibdênio, a maior capacidade antioxidante foi verificada para o extrato de caule irradiado com 8 kGy. Para CMI e CMB, a concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de raiz irradiado com 10 kGy foi capaz de inibir 50% dos micro-organismos Gram positivos. Assim, a irradiação não reduziu a citotoxicidade dos extratos, não causando hemólise nos eritrócitos e incrementou as propriedades antioxidantes e a atividade antimicrobiana dos extratos de raiz. Para o extrato de caule, a irradiação aumentou a quantidade de taninos e a atividade antioxidante total.

Palavras chave: *Syzygium cumini*. Irradiação. Antioxidante. *S. aureus*. *P. aeruginosa*

ABSTRACT

Radiation has been utilized to increase the compounds with antimicrobial and antioxidant activity in plant extracts. As *Syzygium cumini* (L.) Skeels presents antioxidant, antimicrobial, antidiarrheal and astringent activities already known, the objective of this work was to assess the secondary metabolites found in root and stem extracts of *S. cumini* irradiated with ^{60}Co in doses of 6, 8 and 10 kGy, to analyze the cytotoxic and antioxidant properties and to quantify the antimicrobial activity of the irradiated extracts. For the qualitative analysis, thin-layer chromatography was performed. The hemolytic and anti-hemolytic activity were done. The Folin-Ciocalteu reagent was used to measure phenol compounds. For the flavonoids quantification, the extract-reagent mixtures remained for 30 minutes in the dark and the absorbance was measured at 420 nm. The DPPH method applied to the concentrations of the irradiated extracts allowed the evaluation of the ability of the radical sequestration. In the ABTS radical method, the absorbance of 734 nm of the extract-solution mixture was determined. The total antioxidant activity was evaluated using the Phosphomolybdenum method. For the quantification of the tannins, the vanillin sulfuric acid mixture was added to the extracts. The evaluation of the antimicrobial activity of the extracts was tested at range of 2000 to 3.9 $\mu\text{g/mL}$ against the *S. aureus* and *P. aeruginosa* microorganisms, clinical isolates. The phytochemical qualitative results revealed the presence of flavonoids, cinnamic derivatives, triterpenes, steroids, mono and sesquiterpenes, coumarins, condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins in irradiated extracts. The best hemolytic activity values were the irradiated extracts at the concentration of 125 $\mu\text{g/mL}$ that have resulted in 0% hemolysis. In the case of anti-hemolytic activity, the irradiated extracts showed no significant effect when compared to the control extracts, however, smaller concentrations of extract, mainly for stem, improved the cytoprotective effect. The highest values of phenolic compounds were found in the irradiated root extracts, although the irradiation has reduced the phenolic compound concentrations in the stem extracts. For flavonoids, the extracts irradiated with 8 kGy for root and with 6 kGy for stem presented the best results when compared to the non-irradiated extract, while tannins were enriched in the stem extract irradiated at 8 kGy. In the activity of the DPPH radical, free radical sequestration values achieved about 90% for extract concentrations higher than 125 $\mu\text{g/mL}$. The ABTS results indicated a high sequestration capability for root extract irradiated with 10 kGy, thereby confirmed through the TEAC results. In the phosphomolybdenum activity, the highest antioxidant capability was verified for the stem extract irradiated with 8 kGy. For CMI and CMB, the dosage of 125 $\mu\text{g/mL}$ of the 10 kGy root extract was able to inhibit 50% of Gram positive microorganisms. Hence, the irradiation did not reduce the cytotoxicity of extracts, causing no hemolysis in red blood cells, and increased the antioxidant and antimicrobial activity of root extracts. For the stem extract, the irradiation increased the amount of tannins and the total antioxidant activity.

Key words: *Syzygium cumini*. Irradiation. Antioxidant. *S. aureus*. *P. aeruginosa*

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Árvores de <i>Syzygium cumini</i> (a) e suas folhas (b).....	27
Figura 2. Flores (a) e frutos (b) de <i>Syzygium cumini</i>	27
Figura 3. Figura esquemática do potencial antioxidante das plantas.....	31
Figura 4. Principais fatores relacionados ao acúmulo de metabólitos secundários nas plantas.....	32
Figura 5. Taninos hidrolisáveis encontrados em <i>S. cumini</i> (L.) Skeels	33
Figura 6. Constituintes fitoquímicos isolados de <i>S. cumini</i> (L.) Skeels. A: Meamsetin-3-O-(400-O-Acetyl)-a-L-rhamnopyranoside (1), Miracetina3-O-(400-O-acetyl-200-O-galloyl)-a-L-rhamnopyranoside (2), myricetin 3-O-(400-O-acetyl)-a-L-rhamnopyranoside (3), Myricetin 40-methyl ether 3-O-a-L-rhamnopyranoside (4), Myricetin (5) ; B: Myricetin 3-O-(4''-acetyl)-a-L-rhamnopyranoside; C: Quercetin; D: Kaempferol R=H; Myricetin R=OH; E:Oleanolic acid; F = Delphinidin-3-gentiobioside, R = Gentiobiose , R' = H Malvidine -3- laminaribioside R=Laminaribioside R	40
Figura 7. <i>Staphylococcus aureus</i> . Coloração de Gram (a). Colônias em Ágar Manitol (b). Colônias em Ágar Sangue.	42
Figura 8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . a) Coloração de GRAM. b) Crescimento em Agar Brain Heart Infusion (BHI). c) Produção de piocianina/pioverdina em Ágar Mueller Hinton	48
Figura 9. Representação esquemática de preparação dos extratos	53
Figura 10. Fluxograma de amostragem para a obtenção dos extratos.....	54
Figura 11. Representação esquemática dos ensaios	55
Figura 12. Foto do irradiador com fonte de cobalto-60 Gammacell 220 Excel – MDS Nordion. (1): local das amostras; (2): painel de controle; (3): local onde fica a fonte de Cobalto-60.	56
Figura 13. Representação esquemática do ensaio de atividade hemolítica	57
Figura 14. Esquema representativo da atividade anti- hemolítica	59
Figura 15. Esquema para a quantificação dos compostos fenólicos totais.....	63
Figura 16. Esquema representativo da quantificação de flavonóides.....	64
Figura 17. Esquema representativo da dosagem de taninos.....	65
Figura 18. Esquema representativo do método do DPPH (Sequestro de radicais livres) 67	67

Figura 19. Esquema representativo do Ensaio do ABTS.....	68
Figura 20. Esquema representativo do Ensaio do Fosfomolibdênio.....	69
Figura 21. Determinação da concentração mínima inibitória.....	71
Figura 22. Microplaca com o ensaio de atividade anti-hemolítica de extratos de raiz e caule de <i>S. cumini</i> (L.) Skeels. A presença de tons avermelhados indica hemólise dos eritrócitos.....	77
Figura 23. Teste de comparação entre médias do extrato de raiz controle (RC) e irradiados nas doses 6 (R6), 8 (R8) e 10 (R10) kGy na dosagem de 1 mg.	78
Figura 24. Teste de comparação entre médias do extrato de raiz controle (RC) e irradiados nas doses 6 (R6), 8 (R8) e 10 (R10) kGy na dosagem de 125 µg.	79
Figura 25. Teste de comparação entre médias do extrato de caule controle (CC) e irradiados nas doses 6 (C6), 8 (C8) e 10 (C10) kGy na dosagem de 1 mg.	80
Figura 26. Teste de comparação entre médias do extrato de caule controle (CC) e irradiados nas doses 6 (C6), 8 (C8) e 10 (C10) kGy na dosagem de 500 µg.	80
Figura 27. Teste de comparação entre médias do extrato de caule controle (CC) e irradiados nas doses 6 (C6), 8 (C8) e 10 (C10) kGy na dosagem de 250 µg.	81
Figura 28. Teste de comparação entre médias do extrato de caule controle (CC) e irradiados nas doses 6 (C6), 8 (C8) e 10 (C10) kGy na dosagem de 125 µg.	81
Figura 29. Comparação entre os resultados de fenol em extratos de raiz e caule de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels após irradiação gama.....	85
Figura 30. Teores em quercetina equivalente (mg EQ/g) de flavonóides em extratos irradiados de raiz e caule de <i>S. cumini</i>	87
Figura 31. Teor de taninos em extratos de raiz e caule irradiados de <i>S. cumini</i> (L.) Skeels	89
Figura 32. Placa multipoços com os resultados da atividade antioxidante pelo método do DPPH de extrato de raiz controle e irradiados. D = dosagem do extrato. Cor amarela representa a forte atividade antioxidante dos extratos analisados. Lilás, pouca atividade.	90
Figura 33. Placa multipoços com os resultados da atividade antioxidante pelo método do DPPH de extrato de caule controle e irradiados de <i>S. cumini</i> . D = dosagem do extrato. Cor amarela indica o poder oxidante dos extratos. Lilás, fraca atividade.....	91
Figura 34. Porcentagem de Sequestro de Radicais Livres – SRL% dos extratos irradiados de raiz de <i>S. cumini</i> e trolox.....	92

Figura 35. Porcentagem de Sequestro de Radicais Livres – SRL% dos extratos irradiados de caule de <i>S. cumini</i> e trolox.....	93
Figura 36. AAT em % dos extratos irradiados de raiz (A) e caule (B) de <i>S. cumini</i>.....	96
Figura 37. Placa multipoços com o conjunto extrato-solução de reagente da esquerda para direita: extratos de raiz controle e irradiados e na segunda linha os extratos de caule. A tonalidade da cor verde representa a intensidade da AAT.....	96
Figura 38. Comportamento dos extratos de raiz (a) e caule (b) com relação aos valores encontrados e as doses estudadas	98
Figura 39. Placa multipoços para os ensaios CMI e CMB de extratos de raiz irradiados de <i>S. cumini</i> com 10 kGy com CMI de 125 µg/mL para o micro-organismo 718 e 250 µg/mL para o micro-organismo 719. A cor roxa representa o não crescimento do micro-organismo, enquanto que a rosa crescimento positivo.....	100
Figura 40. Placa multipoços com CMI e CMB de extratos de caule controle de <i>S. cumini</i> com CMI e CMB de 500 µg/mL para os micro-organismos 725 e 728. A cor roxa representa o não crescimento do micro-organismo e a rosa crescimento positivo	103

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Lista de plantas medicinais utilizadas no Sistema Único de Saúde - SUS.....	22
Tabela 2. Propriedades medicinais de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	29
Tabela 3. Mecanismos de resistência a algumas classes de antibióticos utilizados	46
Tabela 4. Padrões, sistema de eluição e reveladores para a prospecção fitoquímica de <i>Syzygium cumini</i>	60
Tabela 5. Isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> , com o respectivo número de registro na Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos e sítio de infecção. ..	72
Tabela 6. Atividade hemolítica em porcentagem para as dosagens de 1000, 500, 250 e 125 µg dos extratos de raiz e caules não irradiados e irradiados.....	74
Tabela 7. Porcentagem de hemólise comparados com a absorbância do controle positivo	76
Tabela 8. Percentual do efeito citoprotetor (atividade anti-hemolítica) dos extratos irradiados e controle de raiz e caule de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	76
Tabela 9. Prospecção fitoquímica de extratos de acetato de etila das raízes e caule de <i>Syzygium cumini</i>	83
Tabela 10. Compostos fenólicos em extratos irradiados de raiz e caule de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	85
Tabela 11. Flavonóides em quercetina equivalente (mg EQ/g) quantificados em extratos irradiados de raiz e caule de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	87
Tabela 12. Teor de taninos em extratos de raiz e caule controle e irradiados de <i>S. cumini</i> (L.) Skeels	89
Tabela 13. Porcentagem de inibição do radical ABTS.....	94
Tabela 14. Capacidade antioxidante equivalente a Trolox - TEAC	95
Tabela 15. Compilação dos resultados quanto à atividade antioxidante dos extratos irradiados de raiz e de caule de <i>S. cumini</i>	97
Tabela 16. Valores de CMI e CMB para extratos irradiados e controle de raiz de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	101
Tabela 17. Valores de CMI e CMB para extrato de acetato de etila de caule de <i>S. cumini</i> (L.) Skeels	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AlCl ₃	Cloreto de Alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EAG	Equivalente ao Ácido Gálico
ESBL	β-Lactamases de Espectro Estendido
FAO	Food and Agriculture Organization
HC/UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IAEA	International Atomic Energy Agency
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MDR/RND	Multidrug resistance/ Resistance-nodulation-division
MEQ	Miligramas Equivalente a Quercetina
MIO	Motilidade Indol Ornitina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina
SIM	Ágar sulfeto-indol-motilidade
SRL	Sequestro de Radicais Livres
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TSI	Ágar tríplice açúcar-ferro
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Plantas medicinais e fitoterápicos	18
2.1.1 Histórico	18
2.1.2 Propriedades medicinais do gênero <i>Syzygium</i>	23
2.1.3 Informações botânicas de <i>S. cumini</i>	25
2.1.4 Propriedades medicinais de <i>S. cumini</i>	27
2.2 Fitoquímicos	30
2.2.1 Taninos	33
2.2.2 Terpenos ou Terpenóides.....	35
2.2.3 Esteróides	35
2.2.4 Saponinas.....	36
2.2.5 Derivados cinâmicos	36
2.2.6 Flavonóides.....	37
2.2.7 Cumarinas e quinonas.....	38
2.2.8 Alcalóides	38
2.3 Constituintes químicos de <i>Syzygium cumini</i> – Azeitona Preta	39
2.4 Micro-organismos de interesse clínico	41
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	41
2.4.1.1 Fontes de infecção	43
2.4.1.2 Virulência e Mecanismos de Patogenicidade.....	44
2.4.1.3 Resistência a Antimicrobianos	45
2.4.1.4 <i>Staphylococcus aureus</i> Oxacilina (Meticilina) Resistente	46
2.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
2.4.2.1 Mecanismos de resistência	49
2.5 Irradiação e sua aplicação em materiais de origem vegetal	49
2.5.1 Esterilização.....	50
3. MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Seleção das amostras	53
3.2 Obtenção dos extratos	53
3.3 Irradiação dos extratos	56
3.4 Citotoxicidade: Atividade hemolítica e anti-hemolítica	56
3.4.1 Atividade hemolítica.....	57

3.4.2 Atividade Anti-Hemolítica ou Fragilidade osmótica eritrocitária	58
3.5 Análises químicas: metabólitos secundários, compostos fenólicos, flavonóides, taninos e atividade antioxidante	59
3.5.1 Ensaio Fitoquímico	59
3.5.1.1 <i>Flavonóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos</i>	60
3.5.1.2 <i>Triterpenos e esteróides</i>	61
3.5.1.3 <i>Mono e sesquiterpenos</i>	61
3.5.1.4 <i>Cumarinas e quinonas</i>	61
3.5.1.5 <i>Alcalóides</i>	62
3.5.1.6 <i>Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas</i>	62
3.5.2 Teor de compostos fenólicos	62
3.5.3 Quantificação de flavonóides	63
3.5.4. Determinação dos taninos condensados	65
3.5.5 Atividade antioxidante.....	66
3.5.5.1 <i>DPPH (Radical 2,2-difenil 1- picrilhidrazil)</i>	66
3.5.5.2 <i>ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)</i>	67
3.5.5.3. <i>Ensaio de Fosfomolibdênio</i>	69
3.6 Determinação da CMI e CMB	70
3.6.1 Micro-organismos testes.....	71
3.7 Análise estatística	73
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1 Atividade hemolítica	74
4.1.1 Atividade Anti-Hemolítica ou Fragilidade Osmótica Eritrocitária	75
4.2 Ensaio fitoquímico	82
4.3 Compostos fenólicos	84
4.4 Flavonóides	86
4.5 Taninos condensados	88
4.6 DPPH (Radical 2,2-difenil 1- picrilhidrazil)	90
4.7 Método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)	94
4.8 Ensaio de Fosfomolibdênio	95
4.9 Avaliação das propriedades antioxidantes dos extratos irradiados	97
4.10 Concentração Mínima Inibitória -CMI e Concentração Mínima Bactericida -CMB	99
5 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICE A	Erro! Indicador não definido.
ANEXO A – Teste de susceptibilidade das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aos antimicrobianos de uso clínico.	129

ANEXO B -Teste de susceptibilidade das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aos antimicrobianos de uso clínico.	130
ANEXO C – Artigo publicado na Revista Experimental Pathology and Health Sciences....	131

1 INTRODUÇÃO

A origem do conhecimento do homem sobre as propriedades medicinais das plantas se confunde com sua própria história. Há milênios os vegetais têm sido utilizados pelos seres humanos no tratamento de doenças. Porém, apenas há pouco tempo, plantas se tornaram objeto de estudo científico quanto as suas variadas propriedades medicinais (NOVAIS et al., 2003).

Um dos assuntos mais preocupantes é a resistência de micro-organismos patogênicos a múltiplas drogas, que tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, comumente comercializados e usados no tratamento de doenças infecciosas. A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de micro-organismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA et al., 2001). Essa situação tem forçado os cientistas à busca de novas drogas, em que os vegetais são uma incomensurável fonte de prospecção. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química. Contudo, há dificuldade inerente na reprodução das rotas de sínteses de metabólitos secundários de plantas (NOVAIS et al., 2003).

Syzygium cumini (L) Skeels, pertencente à família Myrtaceae, é uma árvore nativa das regiões dos trópicos, particularmente do Leste e Oeste da Índia, Tailândia, Filipinas e Madagascar. Foi introduzida em muitas regiões tropicais tais como África, bem como em diversos estados das regiões Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil (DANADIO et al., 1998). Também pode ser encontrada em algumas regiões subtropicais como Flórida, Califórnia, Argélia e Israel (ROSS, 1999; MAHMOUD et al., 2001). Estudos relacionados com *S. cumini* mostram que algumas partes da planta têm propriedades antimicrobiana, antioxidante, antidiarreica e adstringente (MORTON, 1987; ROSS, 1999; ALBERTON et al., 2001).

Na busca de potencializar a ação antimicrobiana e antioxidante dos vários componentes químicos presentes nas plantas, tais como fenóis, taninos, flavonóides, dentre outros, diversas tecnologias tem sido aplicadas, incluindo a utilização das radiações ionizantes. Estudos mostram que a radiação foi capaz de reduzir ou aumentar a quantidade de fenóis, taninos ou flavonóides de acordo com a dose empregada em várias espécies de plantas influenciando assim na sua propriedade antimicrobiana e antioxidante (MACHI, 1998; MECHEI et al., 2005; SATOMI et al., 2005).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo geral analisar a citotoxicidade e as propriedades antioxidantes, bem como avaliar quantitativamente a atividade antimicrobiana dos extratos brutos de acetato de etila de raiz e caule de *S. cumini* irradiados nas doses de 6, 8 e 10 kGy por meio de um irradiador com fonte selada de ^{60}Co . Os objetivos específicos foram:

- 1) Avaliar a atividade hemolítica e anti-hemolítica dos extratos controle e irradiados;
- 2) Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos irradiados;
- 3) Quantificar os compostos fenólicos (fenóis, flavonóides e taninos) nos extratos das partes da planta antes e após irradiação;
- 4) Avaliar a atividade antioxidante dos extratos irradiados,
- 5) Verificar a atividade antimicrobiana dos extratos de raiz e de caule frente a isolados clínicos Gram positivos e Gram negativos,
- 6) Analisar a potencialização da ação antimicrobiana após irradiação dos extratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais e fitoterápicos

Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), *plantas medicinais* são todas aquelas silvestres ou cultivadas, utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico normal ou patológico, ou utilizado como fonte de fármacos e de seus precursores. *Fitoterápicos* são produtos medicinais acabados e etiquetados, cujos componentes ativos são formados por partes aéreas ou subterrâneas de plantas, ou outro material vegetal, ou combinações destes, em estado bruto ou em formas de preparações vegetais (OMS, 2000; RATES, 2001).

Com a regulamentação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelecida por meio da Resolução da Diretoria Colegiada n.º 48/2004, os fitoterápicos são medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou partes de plantas medicinais (raízes, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes), que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, validadas em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos de fase três (um novo tratamento é comparado com um tratamento padrão existente).

2.1.1 Histórico

A utilização dos recursos da flora no tratamento de diversas patologias está intimamente relacionada ao desenvolvimento da humanidade ao longo do tempo de modo que vários povos têm nessas plantas elementos próprios de sua cultura (FIRMO et al., 2011). Datações desde 3150 a.C. apontam que os egípcios foram os responsáveis pela produção da primeira farmacopeia da História (HELFAND; COWEN, 1990). Relatos sobre o uso de plantas com finalidades terapêuticas são datados de 3.000 a.C. na obra *Pen Ts'ao* do chinês Shen Nung (KO, 1999; TYLER, 1996).

Os egípcios, 1600 a.C., relataram no Papiro de Ebers a existência de muitos medicamentos feitos a partir de plantas, animais e minerais. Vários ainda estão em uso, como por exemplo, coentro (*Coriandrum sativum* L.), funcho ou Erva-doce (*Foeniculum vulgare* Miller), sene (*Cassia angustifolia* Vahl.), timo ou tomilho (*Thymus vulgare* L.) e a losna, absinto, erva-do-fel, alenjo, erva-de-santa-margarida (*Artemisia absinthium* L.). Na Índia,

poemas épicos, Vedas, com cerca de 1500 a.C., fazem citações de plantas medicinais que até hoje são utilizadas como alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), mirra, mirra-arábica ou incenso (*Commiphora myrrha* (Nees) Baillon), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), alho (*Allium sativum* L.), cúrcuma ou açafrão (*Curcuma domestica* L.) e aloe vera ou erva-babosa (*Aloe sp.*) (CRF-SP, 2015).

No ano 78 d.C., o botânico grego Pedânios Dioscórides descreveu cerca de 600 plantas medicinais, além de produtos minerais e animais no tratado *De Materia Medica*. Este tratado permaneceu como fonte de referência por mais de catorze séculos (ROBBERS et al., 1996; TYLER, 1996). Por meio da observação e da experimentação pelos povos primitivos, foram descobertas e propagadas as propriedades terapêuticas de determinadas plantas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular (ELVIN-LEWIS, 2001).

No século XVI, o médico suíço Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, conhecido como Paracelsus (1493-1541), formulou a “Teoria das Assinaturas”, baseada no provérbio latim “*similia similibus curantur*”, isto é, semelhante cura semelhante. Com esta teoria acreditava-se que a forma, a cor, o sabor e o odor das plantas estavam relacionados com as suas propriedades terapêuticas, podendo dar indícios de seu uso clínico. Algumas destas plantas passaram a fazer parte das farmacopeias alopáticas e homeopáticas a partir do século XIX, quando foi iniciada a investigação de suas bases terapêuticas (ELVIN-LEWIS, 2001).

Com o acontecimento da Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica, os produtos sintéticos foram adquirindo primazia no tratamento farmacológico. Isto ocorreu, entre outros fatores, pela maior facilidade de obtenção de compostos puros, com o desenvolvimento de processos de modificações estruturais (com vistas a fármacos mais ativos e mais seguros), e pelo crescente poder econômico das grandes companhias farmacêuticas. Contudo, os produtos naturais não perderam seu lugar na terapêutica, sendo considerados equivocadamente pela população como medicamentos seguros, garantindo um crescimento em sua utilização (EISENBERG et al., 1998).

O uso das plantas medicinais no Brasil, um país rico em diversidade, foi disseminado principalmente pela cultura indígena. Seu território possui cinco biomas bastante diversos como a Floresta Amazônica, o Cerrado, a Mata Atlântica, o Pantanal e a Caatinga. Portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas não foi ainda totalmente explorado ou regulamentado,

contrastando com o que ocorreu em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá, cuja biodiversidade é menor (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008).

Em meados dos anos 80, o desenvolvimento de pesquisas científicas resultou na identificação de 121 compostos de origem vegetal, originadas de 95 espécies de plantas, sendo que, no período de 1983 a 1994, 6% dos medicamentos aprovados foram originados diretamente de fontes vegetais e 24% eram de produtos derivados (ALVES, 2001). Mesmo com o avanço tecnológico das indústrias químicas, produtos derivados de plantas medicinais movimentam aproximadamente 500 milhões de dólares por ano no Brasil e estima-se que, no mundo, seriam gastos cerca de US\$ 27 bilhões (em torno de 7% do mercado mundial de medicamentos), conforme os dados do Instituto Brasileiro de Plantas Mediciniais - IBPM (BOTSARIS, 2016; DUARTE, 2006).

No Brasil, principalmente, nos locais em que 20% das 250 mil espécies catalogadas pela UNESCO estão localizadas, houve a expansão da fitoterapia. Esse fato pode ser atribuído a diversos fatores como os efeitos adversos de fármacos sintéticos, a preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, a validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, o desenvolvimento de novos métodos analíticos colocados à disposição do controle de qualidade, o desenvolvimento de novas formas de preparações e administrações de produtos fitoterápicos e um melhor conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais e seus derivados, além também do menor custo se comparado com os fármacos sintéticos (CAÑIGUERAL et al. 2003; CLARK, 2002; VIEIRA, 2001).

Dentre os 252 fármacos essenciais selecionados pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000), 11% são de origem exclusivamente vegetal e uma parcela significativa é preenchida por medicamentos semissintéticos, obtidos a partir de precursores naturais (RATES, 2001).

No início do século XXI, 80% da população africana já fazia uso dos fitoterápicos. Nos Estados Unidos da América, esse mercado representa US\$ 5 bilhões ao ano. Em 2010, 11 das 25 drogas mais vendidas no mundo eram produtos naturais, enquanto que 42% das vendas industriais eram produtos naturais ou seus derivados, totalizando US\$ 17,5 bilhões. Em 2013, uma análise da *Global Industry Analysts* apontou que o mercado de produtos com matéria-prima de plantas (incluindo, além de medicamentos, alimentos e cosméticos) atingiu US\$ 93 bilhões em 2014.

Para fins comparativos, um número aproximado a 80% da população européia consome de alguma forma medicamentos fitoterápicos (sendo o consumo da Europa

responsável por aproximadamente 50% do mercado total do produto), e nos países asiáticos, o consumo chega a 40%. Para os fitoterápicos, o setor movimenta globalmente US\$ 21,7 bilhões ao ano. No Brasil, cerca de US\$ 160 milhões ao ano são movimentados com crescimento estimado anual das vendas em 15%. De modo geral, o setor de fitoterápicos movimenta anualmente cerca de um bilhão de reais em toda sua cadeia de produção (ELISABETSKY, 2010; ICON GROUP INTERNACIONAL, 2013).

Em se tratando das particularidades do país, as plantas medicinais são utilizadas por até 90% da população carente do Nordeste do Brasil, abrangendo 483 espécies de 79 famílias, que, na maior parte das vezes, servem como acesso primário à saúde para muitas comunidades (MATOS, 2002; SILVA et al., 2006; LOPES, 2010).

Com o desenvolvimento da Ciência e da Tecnologia, o valor terapêutico das plantas medicinais vem sendo pesquisado e ratificado, assim como sua utilização vem crescendo a partir da recomendação por profissionais de saúde (ANVISA, 2004).

O Ministério da Saúde por meio do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF) aprovou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) por meio da Portaria nº 971 de 03 de maio de 2006, em que se estabelece o potencial terapêutico das plantas medicinais visando seu melhor aproveitamento e uso pela população. Refere-se a uma lista com 71 espécies de vegetais (Tabela 1), dentre elas, *Syzygium cumini* (L.) Skeels, que foram selecionadas por serem amplamente utilizadas pela população brasileira. A finalidade da relação Nacional de Plantas Medicinais é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da lista de plantas medicinal e fitoterápica a serem disponibilizados para uso da população. Todas as drogas vegetais aprovadas na relação são para o alívio de sintomas de doenças de baixa gravidade, porém, devem ser rigorosamente seguidos os cuidados apresentados na embalagem desses produtos, de modo que seja assegurado o uso correto e não leve a problemas de saúde, como reações adversas ou mesmo toxicidade (RENISUS, 2009).

Tabela 1. Lista de plantas medicinais utilizadas no Sistema Único de Saúde - SUS.

Número	Espécie	Nome Vulgar
1	<i>Achillea millefolium</i>	Mil-folhas, Milfólio, ou Macelão
2	<i>Eleutherine plicata</i>	Coquinho, marupaí ou marupuazinho
3	<i>Petroselinum sativum</i>	Salsa ou cheiro-verde
4	<i>Allium sativum</i>	Alho
5	<i>Equisetum arvense</i>	Cauda de cavalo, cavalinha ou pinheirinha
6	<i>Phyllanthus</i> spp.	Erva-pombinha ou quebra-pedra
7	<i>Aloe</i> spp.	Aloe vera ou erva-babosa)
8	<i>Erythrina mulungu</i>	(Mulungú)
9	<i>Plantago major</i>	Tanchagem ou tanchagem-maior
10	<i>Alpinia</i>	Colônia, falso-cardamomo, ou jardineira
11	<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto ou gomeiro-azul
12	<i>Plectranthus barbatus</i> = <i>Coleus barbatus</i>	Boldo ou Boldo-brasileiro
13	<i>Anacardium occidentale</i>	Cajueiro
14	<i>Eugenia uniflora</i> ou <i>Myrtus brasiliiana</i>	Pitangueira ou pitanga-vermelha
15	<i>Polygonum</i> spp.	Erva-de-bicho
16	<i>Ananas comosus</i>	Abacaxi
17	<i>Foeniculum vulgare</i>	Funcho ou erva-doce
18	<i>Portulaca pilosa</i>	Amor-crescido
19	<i>Apuleia ferrea</i> (<i>Caesalpinia ferrea</i>)	Jucá, pau-de-ferro-verdadeiro
20	<i>Glycine max</i>	Soja
21	<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira
22	<i>Arrabidaea chica</i>	Crajiru, pariri ou cipó-cruz
23	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Garra-do-diabo
24	<i>Punica granatum</i>	Romeira
25	<i>Artemisia absinthium</i>	Artemísia
26	<i>Jatropha gossypifolia</i>	Peão-roxo, jalopão ou batata-de-téu
27	<i>Rhamnus purshiana</i>	Cascára-sagrada
28	<i>Baccharis trimera</i>	Carqueija ou carqueija-amargosa
29	<i>Justicia pectoralis</i>	Anador
30	<i>Ruta graveolens</i>	Arruda
31	<i>Bauhinia</i> spp.	Pata-de-vaca
32	<i>Kalanchoe pinnata</i> = <i>Bryophyllum calycinum</i>	Folha-da-fortuna
33	<i>Salix alba</i>	Salgueiro branco
34	<i>Bidens pilosa</i>	Picão-preto
35	<i>Lamium album</i>	Urtiga-branca
36	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Aroeira
37	<i>Calendula officinalis</i>	Calêndula
38	<i>Lippia sidoides</i>	Alecrim-pimenta
39	<i>Solanum paniculatum</i>	Jurubeba-verdadeira
40	<i>Carapa guianensis</i>	Andiroba
41	<i>Malva sylvestris</i>	Malva
42	<i>Solidago microglossa</i>	Arnica-do-Brasil
43	<i>Casearia sylvestris</i>	Guaçatonga
44	<i>Maytenus</i> spp.	Espinheira-santa
45	<i>Stryphnodendron</i> spp.	Barbatimão-verdadeiro
46	<i>Chamomilla recutita</i>	Camomila
47	<i>Mentha pulegium</i>	Poejo
48	<i>Syzygium</i> spp. (<i>S. jambolanum</i> ou <i>S. cumini</i>)	Jamelão, azeitona ou jambolão
49	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Erva-de-santa-Maria
50	<i>Mentha</i> spp.	Hortelã
51	<i>Tabebuia avellanadae</i>	Ipê-roxo-de-bola, ipê-una, ipê-roxo-grande
52	<i>Copaifera</i> spp.	Copaíba
53	<i>Mikania</i> spp.	Guaco ou Cipó-caatinga
54	<i>Tagetes minuta</i>	Cravo
55	<i>Cordia</i> spp.	Moleque-duro ou cravo-do-norte
56	<i>Momordica charantia</i>	Melão-de-São-Caetano

Continua...

Tabela 1. Lista de plantas medicinais utilizadas no Sistema Único de Saúde - SUS.

Número	Espécie	Nome Vulgar	Conclusão
57	<i>Trifolium pratense</i>	Trevo-vermelho	
58	<i>Costus spp (Costus scaber ou Costus spicatus)</i>	Cana-do-brejo	
59	<i>Morus spp.</i>	Amoeira	
60	<i>Uncaria tomentosa</i>	Unha-de-gato	
61	<i>Croton spp.</i>	Canelinha ou Alecrim-de-caboclo	
62	<i>Ocimum gratissimum</i>	Alfavaca	
63	<i>Vernonia condensata</i>	Boldo-da-Bahia	
64	<i>Curcuma longa</i>	Gengibre-amarelo ou falso-açafrão	
65	<i>Orbignya speciosa</i>	Babaçu	
66	<i>Vernonia spp</i>	Assa-peixe	
67	<i>Cynara scolymus</i>	Alcachofra	
68	<i>Passiflora spp.</i>	Maracúja	
69	<i>Zingiber officinale</i>	Gengibre	
70	<i>Dalbergia subcymosa</i>	Verônica	
71	<i>Persea spp.</i>	Abacateiro	

Fonte: Brasil (2015)

2.1.2 Propriedades medicinais do gênero *Syzygium*

O gênero *Syzygium* é considerado um dos maiores da família Myrtaceae, com aproximadamente 1.139 espécies de árvores e arbustos, dos quais cerca de grande parte são distribuídas no Brasil e assumem destaque especial, por fornecer extratos utilizados na medicina tradicional como antimicrobianos, anti-inflamatórios, hipoglicemiantes e cardioprotetores (DE OLIVEIRA et al., 2005; HUSSEIN et al., 2003; VENDRUSCOLO et al., 2005; THE PLANT LIST 2013, 2016).

Nas últimas décadas, muitas são as espécies de plantas pesquisadas no mundo em busca de novas drogas contra as inúmeras enfermidades, seja para o tratamento de uma gastroenterite, dor de cabeça, hipertensão ou que possuam atividade anti-hipoglicemiante como é o caso da azeitona-preta (jambolão) *Syzygium cumini* (L.) Skells. (ROSS, 1999). Loguercio et al. (2005) avaliaram a existência de efeito antibacteriano de extrato hidroalcoólico a 10% (m/v) de folhas de jambolão em 17 isolados bacterianos Gram positivos dentre eles *S. aureus* e *Bacillus cereus* e Gram negativos, *P.aeruginosa* e *Proteus sp.*, e houve inibição do crescimento em 100% dos micro-organismos testados.

Locher et al. (1995) estudaram a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória de diversos extratos de plantas medicinais do Havaí. Estes autores observaram que o extrato aquoso da casca do caule de *Syzygium malaccense* (jambu vermelho) na concentração de 125 µg/mL foi capaz de inibir o crescimento do vírus Herpes Simplex-1. Os autores avaliaram também a atividade antibacteriana do extrato aquoso das folhas *S. malaccense* e

verificaram uma inibição do crescimento de cepas de *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* numa concentração de 100 µg/mL.

Em um estudo realizado na Suíça com a microflora natural encontrada em acelgas orgânicas, foi detectado que os óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Melaleuca alternifolia*, *Pimpinella anisum* e *Syzygium aromaticum* apresentaram a maior atividade antimicrobiana. Para estes óleos, os valores da concentração mínima bactericida (CMB) foram de 0,093-1,5 mL/100 mL (PONCE et al., 2003).

Em outro estudo realizado com quatro espécies de plantas medicinais, foi verificado por meio do teste de difusão em ágar, atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos dos botões florais do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) frente às cepas de *Candida* estudadas (SILVA, 2012a).

Venturoso et al. (2011), estudando extratos bruto aquosos de alho, arruda, canela, cravo-da-índia, cavalinha, eucalipto, hortelã, jabuticaba, melão são caetano e nim na concentração de 20% frente à *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp. concluíram que os extratos de cravo-da-índia, alho e canela apresentaram maior atividade antifúngica sobre os fitopatógenos, quando comparados aos demais extratos utilizados, destacando o extrato de cravo-da-índia (*S. aromaticum*), que inibiu completamente o desenvolvimento de todos os fungos testados.

Tsakala et al. (1996) observaram a ação antibacteriana de *Syzygium guineense* Willd. contra vários patógenos como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* e *Enterobacter*. Por outro lado, Burt e Reinder (2003) não observaram efeito inibitório de jambolão sobre *E. coli* O157:H7. Dorman e Deans (2000) testaram óleos essenciais extraídos de várias plantas medicinais dentre elas *Syzygium aromaticum* (L.) Merr, constatando ação antibacteriana sobre patógenos de plantas, animais e espécie humana, especialmente os causadores de infecção alimentar. Caio e Wu (1996) também, ao testar *S. aromaticum*, encontraram resultados semelhantes sobre várias bactérias Gram negativas anaeróbias, causadoras de infecções periodontais.

Em um estudo realizado com extratos metanólicos de *Syzygium australe* (Ber) e *S. luehmannii* (F. Muell), foi encontrada pouca atividade fungicida contra *Aspergillus niger* (Tiegh) (COCK, 2012; MARTINS et al., 2016). Wright et al. (2016), em estudo com extratos de frutos e folhas de *Syzygium australe* (Ber) e *S. luehmannii* (F. Muell) contra *Clostridium perfringens*, encontraram que o extrato metanólico do fruto de *S. australe* foi o inibidor mais potente com halos de 19 mm.

Na pesquisa de Govindarajan e Benelli (2016), o potencial mosquitocida do óleo essencial (OE) de folhas de *Syzygium zeylanicum* foi avaliado contra larvas de três mosquitos de importância médica e veterinária, o vetor da malária *Anopheles subpictus*, o vetor secundário da dengue *Aedes albopictus*, e o vetor encefalite japonesa *Culex tritaeniorhynchus*. O óleo essencial teve um efeito tóxico significativo contra larvas de terceiro estágio precoce de *A. subpictus*, *A. albopictus*, e *C. tritaeniorhynchus*, com valores de CL₅₀ de 83,11; 90,45 e 97,96 µg/mL, respectivamente.

Bai et al. (2014) isolaram a partir da haste de *Syzygium kusukusense* cinco triterpenos, ácido 2 α-hidroxibetulinico (1), o ácido betulínico (2), ácido platânico (3), ácido ursólico (4), e ácido hiptático-A (5). A avaliação das atividades citotóxicas destes compostos contra um painel de linhas celulares tumorais humanas revelou a alta potência dos compostos 1 (IC₅₀: 5,7-7,6 µM) e, especialmente, 4 (IC₅₀: 1,7-3,7 µM) na supressão da viabilidade celular.

Em um trabalho avaliando a atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Syzygium calophyllifolium* sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, dentre outros, Sumithra e Kumar (2016) concluíram que os extratos apresentaram CMI (concentração mínima inibitória) variando de 5 a 10 mg /mL e CMB (concentração mínima bactericida) de 8 a 20 mg/mL.

2.1.3 Informações botânicas de *S. cumini*

A espécie *Syzygium cumini* é pertencente à família Myrtaceae, cuja denominação provém do grego “myron”, ou seja, perfume. Compreende mais de 5.970 espécies agrupadas em 145 gêneros distribuídos em 2 subfamílias: Psiloxylloideae e Myrtoideae (PINTO, 1956; DANADIO et al., 1998; ROSS, 1999; DI STASI;HIRUMA-LIMA,2002; THE PLANT LIST 2013, 2016).

Há vegetais importantes sobre diversos aspectos nessas famílias, aqueles que dão frutos comestíveis como a jaboticabeira (*Eugenia cauliflora* O. Berg), a goiabeira (*Psidium guajava* L.), a romeira (*Punica granatum* L.), a uvaia (*Eugenia uvalha* (Cambess.) D. Legrand) e o jambo (*Eugenia jambosa* L.). Algumas espécies são denominadas aromáticas como o craveiro da Índia (*Caryophyllus aromaticus*), a murfa (*Myrtus communis*) e o cajepute (*Melaleuca cajeput*) (PINTO, 1956; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). No gênero *Syzygium* (sinonímia: *Eugenia*), 14 espécies, incluindo *Eugenia uniflora* L., *Eugenia punissifolia*,

Syzygium jambos (L.) Alst e *Syzygium jambolanum* DC., possuem comprovado efeito fisiológico em vários seres vivos, incluindo o homem (ALBERTON et al., 2001).

A espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels apresenta várias sinonímias científicas tais como *Eugenia jambolana* Lam., *Syzygium jambolanum* D.C., *S. caryophyllifolium* D.C., *Eugenia cortisona* Lour., *E. frondosa* Wall., *E. caryophyllifolia* Lam., *E. jambolifera* Roxb., *E. moorei* Muell., *E. obtusifolia* Roxb., *E. cumini* Druce, *Jambolifera pedunculata* Gaertn, *E. glomerata* Sieber, *Calyptranthes caryophyllifolia* Willd, *C. jambolana* Willd, *C. cumini* Pers. e *Myrtus cumini* L., dentre outros (TIMBOLA et al., 2002; MIGLIATO et al., 2006; THE PLANT LIST 2013, 2016).

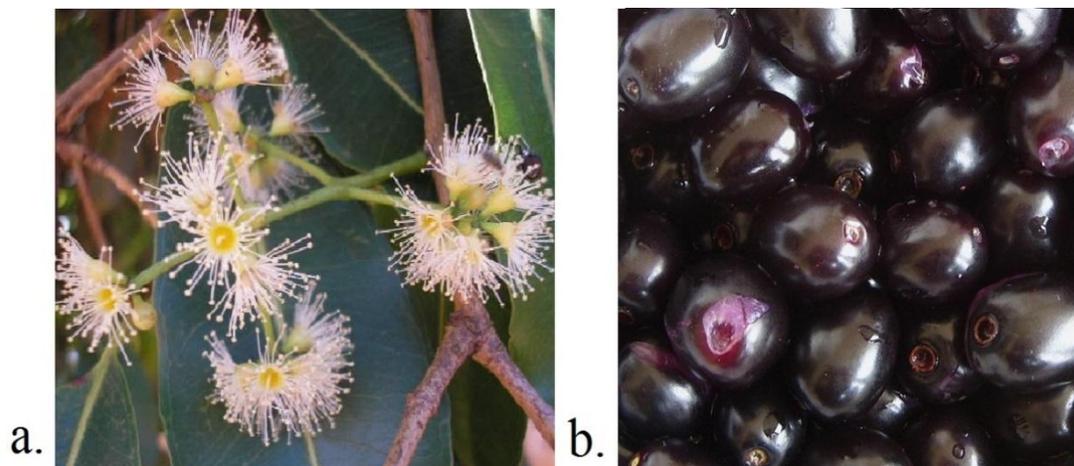
S. cumini é uma espécie arbórea (Figura 1a) que pode atingir cerca de 10 m de altura e de três a quatro metros e meio de diâmetro de projeção da copa, com folhagem abundante, no caule são encontrados ramos de coloração acinzentada-claro, com fissuras escuras e cicatrizes foliares bastante aparentes. Possui o caule aéreo, ereto, tipo tronco lenhoso e cilíndrico, apresentando ramificação caulinar do tipo simpodial. Os ramos são retorcidos com folhas dispostas em filotaxia oposta. As folhas (Figura 1b) são simples, pecioladas, lanceoladas ou lanceoladas oblongas até elípticas, com margens onduladas, ápices cuspidados e bases cuneadas. A nervação é peninérvea, apresentando nervura marginal e coletora (MORTON, 2013; ALBERTON et al., 2001; MIGLIATO et al., 2006). As flores (Figura 2a) estão dispostas em inflorescências, de coloração branca a creme, axilares, racemosas, plurifloras compostas, sendo semelhantes quanto à forma das panículas mirceóides, que caracterizam outros gêneros pertencentes à família Myrtaceae. Tanto o pedúnculo principal quanto os pedicelos se apresentam pouco retorcidos, como ocorre nos ramos. As flores são hermafroditas, com cálice gamossépalo e corola dialipétala. O androceu é dialistêmone e polistêmone, apresentando anteras globosas que, por sua vez, estão inseridas dorsiventralmente no filete e apresentam deiscência longitudinal. O gineceu apresenta ovário ínfero, gamocarpelar, bicarpelar, bilocular com placentação axial (MORTON, 2013; ALBERTON et al., 2001; MIGLIATO et al., 2006). Os frutos (Figura 2b) são carnosos do tipo baga, elípticos, apresentando cerca de 3 a 4 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, com pericarpo de coloração roxa escura intensa, apresentando apenas uma semente de aspecto oval e coloração marrom escura. O mesocarpo é carnosos, mucilaginoso e sucoso com sabor ácido e adocicado, oferecendo forte sensação de adstringência. 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 (MORTON, 2013; ALBERTON et al., 2001; MIGLIATO et al., 2006).

Figura 1. Árvores de *Syzygium cumini* (a) e suas folhas (b)



Fonte: A Autora.

Figura 2. Flores (a) e frutos (b) de *Syzygium cumini*.



Fonte: A Autora.

2.1.4 Propriedades medicinais de *S. cumini*

As espécies conhecidas como jamelão, jambolão e azeitona-preta são consideradas como plantas de uso múltiplo, devido a suas inúmeras aplicações. *Syzygium cumini*, além de fornecer frutos e madeira, produz óleo essencial com substâncias que apresentam

características antioxidante, antiviral e anticarcinogênica, antibacteriana, antialérgica, anti-inflamatória e hipoglicemiante (CARVALHO, 2013). O intenso uso do *S. cumini* na medicina popular despertou a atenção de pesquisadores quanto às propriedades medicinais da planta. Inúmeras ações farmacológicas do jambolão foram encontradas e descritas de acordo com a Tabela 2 (MIGLIATO et al., 2006). A utilização dos frutos do *S. cumini* como oficial ou farmacopéico foi apresentada pela *The British Herbal Pharmacopoeia* em 1983, na forma de extrato seco ou hidroetanólico na proporção de 1:1 em 25% de álcool (THE BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA, 1983).

Tabela 2. Propriedades medicinais de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Parte da planta	Propriedades
Folha	Diabetes, ação hipotensiva, diuréticas, adstringência, obstipação, leucorréia, cataplasma em doenças de pele, acalmar prurido, anti-inflamatória
Casca	Antidiarréica, ação inibitória contra atividade do HIV - 1 protease, hipoglicemiante, adstringência e obstipação, tratamento de hemorragias e leucorréia, diabetes e úlcera venérea, indigestão e purificação do sangue, disenteria, dispepsia, antisséptico, adstringente em ulcerações bucais, gengivas esponjosas e estomatite, inflamações locais, queimaduras, cardiotônico e estimulante do SNC, antipirético.
Semente	Anticonvulsivante, hipoglicemiante, adstringente e obstipação, atividade eupéptica, anti-hemorrágica, para alterações no estômago, anti-inflamatória, bactericida, diarreia, diabetes, disenteria e hipertensão.
Frutos	Hipoglicemia, adstringência e obstipação, diuréticos e estomáticos, tratamento gastrointestinal, adstringente e oral para úlcera de estômago, redução de acidez e diabetes, carminativo, antiescorbútico, diarreia aguda e crônica, retenção urinária, gargarejo para irritações da garganta, loção descamação do couro cabeludo, anti-inflamatório, antipirético no tratamento de disenteria.
Flores	Atividades antibióticas.
Raiz	Antiemético, aumentar a lactação em lactantes.

Fonte: Alberton et al. (2001); Timbola et al. (2002); Sharma et al. (2003).

Migliato et al. (2006) utilizaram frutos de *S. cumini* para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos, empregando diferentes concentrações e métodos extrativos, nos quais obtiveram uma concentração mínima antimicrobiana entre 1250 µg/mL a 312,5 µg/mL.

O emprego do extrato do jambolão obtido a partir da casca seca de seu tronco foi relatado por Blumenthal et al. (1998), para o tratamento da diarreia, adicionalmente ao de inflamações. Os autores apresentaram a utilização do extrato por meio das vias de

administração oral e tópica, salientando que a terapêutica envolvendo a atividade antidiarréica do extrato deve ser eficaz em, no máximo, quatro dias.

Diversos estudos mostram que *S. cumini* tem atividade antimicrobiana contra vários micro-organismos, dentre eles, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* sp., *Bacillus subtilis*, *Proteus* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, além de apresentar atividades antioxidante e antiproliferativa de células tumorais (NASCIMENTO et al., 2000; HOFLING et al., 2010; AFIFY et al., 2011).

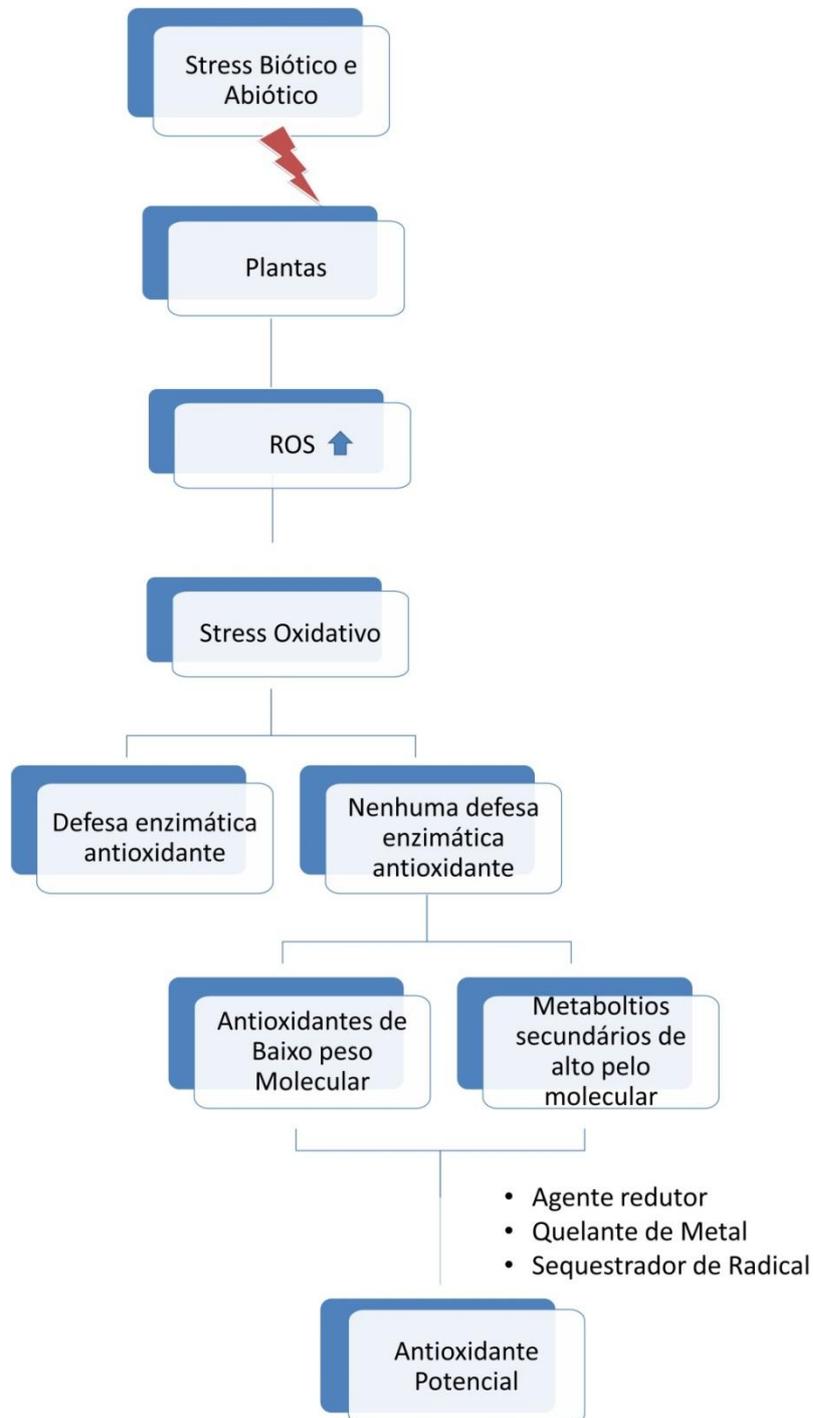
Contudo, esta planta apresenta constituintes químicos diversos (metabólitos primários ou secundários) e, por meio da triagem fitoquímica, os compostos apresentam variabilidade nas diferentes estruturas de sua anatomia configurando assim suas propriedades antioxidante e antimicrobiana (AHMAD; BEG, 2001).

2.2 Fitoquímicos

Os fitoquímicos são substâncias químicas de plantas, não nutritivas, com propriedades protetivas e de prevenção de doenças. São basicamente divididos em dois grupos: metabólitos primários e secundários de acordo com suas funções no metabolismo da planta. Os metabólitos primários compreendem açúcares comuns, aminoácidos, proteínas e clorofila, enquanto que metabólitos secundários consistem principalmente em alcalóides, flavonóides e taninos, também encontrados em *Syzygium cumini* (MISHRA et al., 2013). O metabolismo primário necessita de substâncias já formadas para manter os processos essenciais comuns nos vegetais. Essas substâncias exercem funções de: fotossíntese, respiração celular, transportes de solutos, síntese dos nucleotídeos, lipídios, carboidratos, e da clorofila, sendo, então, responsáveis pelo crescimento e manutenção celular (CASTRO et al., 2005).

As plantas têm uma capacidade inata de sintetizar antioxidantes não enzimáticos. No entanto, sob condições bióticas e abióticas, estresse, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) aumenta nas plantas, resultando na indução de estresse oxidativo. Em resposta ao aumento do estresse, as plantas aumentam a produção e acumulação de vários antioxidantes de baixo peso molecular (por exemplo, vitamina C, vitamina E, ácidos fenólicos etc.) e metabólitos secundários antioxidantes moleculares, tais como taninos, que conferem efeitos antioxidantes à maioria das plantas sob estudos *in vitro* funcionando como eliminadores de radicais livres, agentes redutores e quelantes de metais (Figura 3) (KASOTE et al., 2015).

Figura 3. Figura esquemática do potencial antioxidante das plantas



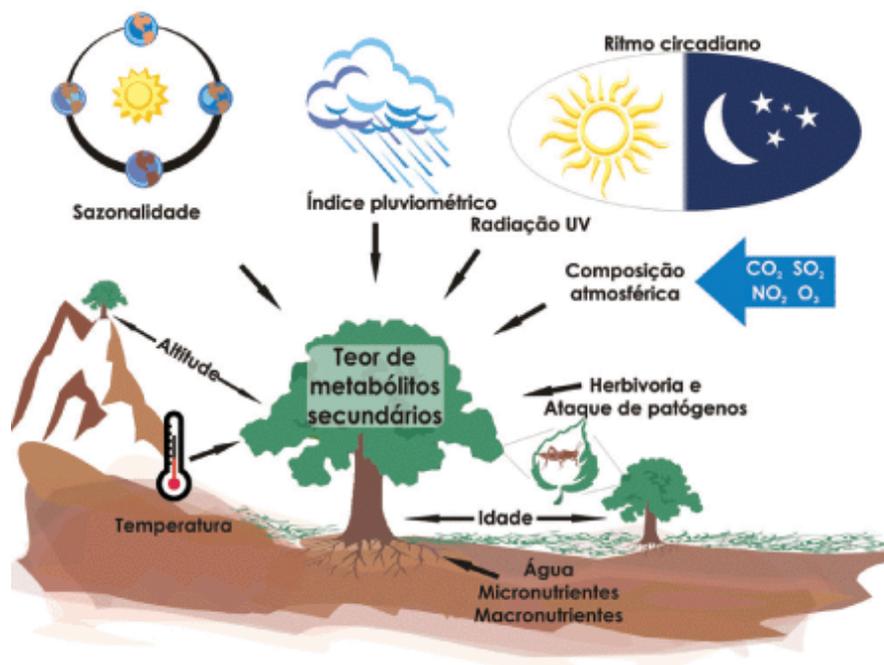
Fonte: Modificado de Kasote et al. (2015).

Pelo seu caráter de compostos não essenciais para o metabolismo da planta, compostos resultantes do metabolismo secundário podem ser vistos como substâncias que, aparentemente, não exercem função para o organismo, visto que a sobrevivência do indivíduo não é totalmente dependente de sua produção. Estes metabólitos apresentam funções de

defesa contra herbívoros e micro-organismos patogênicos, sustentação estrutural, pigmentação e de atração (odor, cor ou sabor) para animais polinizadores e dispersores de sementes e também atuam como agentes na competição planta-planta e nas simbioses entre plantas e micro-organismos (CASTRO et al., 2005).

Os fatores atuantes da formação e o acúmulo dos metabólitos secundários são sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, idade e desenvolvimento da planta, bem como as condições ambientais dos diferentes órgãos vegetais, disponibilidade hídrica, conforme é ilustrado na Figura 4 (LOPES; GOBBO-NETO, 2007).

Figura 4. Principais fatores relacionados ao acúmulo de metabólitos secundários nas plantas

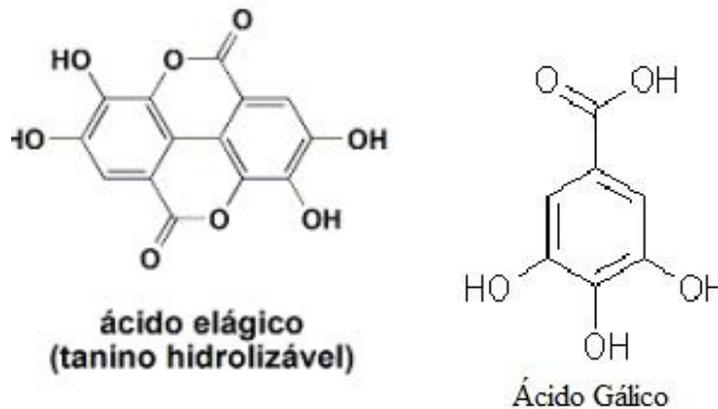


Fonte: Lopes e Gobbo-Neto (2007)

Em vários estudos feitos com partes do jambolão foram encontrados nas sementes taninos hidrolisáveis (ácido gálico, elágico, corilágico) (Figura 5), quercetina, antimelina, óleo essencial (α e β -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, *cis*-ocineno, *trans*-ocineno, γ -terpineno, acetato de bornila, α -copaeno, α -humuleno e candineno), materiais resinosos e glicose. Nas cascas, estão presentes o ácido acetil oleanólico, triterpenóides, ácido elágico, isoquercetina, quercetina, canferol e miricetina; nas folhas, ácido gálico, metilgalato, canferol, miricetina, ácido elágico, ácido clorogênico, quercetina e nilocitina. Nos frutos foram encontradas antocianidinas e nas flores o ácido oleanólico (ROSS, 1999; OLIVEIRA; AKISUE, 2000;

MAHMOUD et al., 2001; ALBERTON et al., 2001; TIMBOLA et al., 2002; DAMASCENO et al., 2002; ZANOELLO et al., 2002).

Figura 5. Taninos hidrolisáveis encontrados em *S. cumini* (L.) Skeels



Fonte: QNINT (2016)

2.2.1 Taninos

Tanino é um termo utilizado para designar substâncias poliméricas fenólicas de origem vegetal capazes de curtir couro ou precipitar gelatina em solução, propriedade essa que é conhecida como adstringência. A adstringência ocorre devido à precipitação de glicoproteínas salivares, levando à perda do poder lubrificante (BRUNETON, 1991). São polifênóis de origem vegetal encontrados em extratos de órgãos de plantas (casca, caule, folhas, frutos e raízes) (LOGUERCIO et al., 2005). Estas substâncias estão presentes em alimentos de origem vegetal, como por exemplo: frutas, legumes, sementes, grãos cereais e bebidas (vinho, chá, cidra e cacau) e nas plantas. São metabólitos secundários de vegetais superiores, solúveis em água, que possuem propriedades especiais como precipitar proteínas e alcalóides e proteção do vegetal frente ao ataque de alguns patógenos e herbívoros (COWAN, 1999; BUELGA; SCALBERT, 2000).

Os taninos são divididos de acordo com a estrutura química em dois grandes grupos: taninos hidrolisáveis (consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados) e taninos condensados ou proantocianidinas (produtos do metabolismo do fenilpropanol). São compostos fenólicos, e, portanto são altamente reativos quimicamente

(MONTEIRO et al., 2005). Estes compostos são facilmente oxidáveis, tanto por enzimas vegetais específicas quanto por influência de substâncias químicas, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (MELLO; SANTOS, 2001).

Viegas et al. (2007), ao estudar metabólitos secundários em jambolão, encontraram a presença das antocianinas malvidina, delphinidina e petunidina. Segundo os autores, os elevados teores de antocianinas encontrados na planta foram equivalentes aos teores encontrados nas “blueberries”, classificados como a primeira comódite nutracêutica de grande valor comercial.

Durães et al. (2009) quantificaram pigmentos antociânicos totais em frutos de jambolão, obtendo valor de 520 mg/L. Quando comparados com os teores encontrados para frutas pequenas como amora-preta (120-1726 mg/100 g) e açaí (50 mg/100g), foi possível perceber o grande valor dos frutos como fonte de antocianinas, especialmente na alimentação de comunidades localizadas no Nordeste brasileiro, que não possuem as fontes tradicionais deste antioxidante natural (MOTA, 2006; BOBBIO et al., 2000).

Muitos taninos encontrados em plantas medicinais e alimentos têm sido utilizados sem apresentarem toxicidade aparente (OKUDA, 2005). Taninos isolados de diversas plantas apresentaram atividade anti-hemorrágica, anti-inflamatória, antidiabética, diurética, antitumoral, antisséptica, purgativa, antiulcerogênica, anti-histamínica e antimicrobiana (PANSERA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; MUTHUSAMY et al., 2008; AMAROWICZ et al., 2008).

Uma das ações para a atividade antimicrobiana dos taninos é a formação de complexos irreversíveis com a prolina, resultando na inibição da síntese proteica da parede celular dos micro-organismos (DALL'AGNOL et al., 2003). Corrales et al. (2009) propuseram que a atividade antimicrobiana de taninos poderia ser devido a três mecanismos: inibição de enzimas bacterianas e fúngicas e/ou complexação com os substratos dessas enzimas; a ação sobre as membranas celulares dos micro-organismos, modificando seu metabolismo, e a complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano.

Devido ao seu potencial antimicrobiano, taninos isolados de diversas fontes vegetais são testados como uma possível alternativa terapêutica (ALBUQUERQUE et al., 2007; RODRIGUES et al., 2014). Silva et al. (2007) relataram a atividade antimicrobiana de taninos frente a bactérias Gram-positivas, afirmando que a ação se deu por meio da inibição do sistema enzimático bacteriano, levando a ruptura da parede celular.

2.2.2 Terpenos ou Terpenóides

São derivados do ácido malônico localizados no citoplasma da célula. São insolúveis em água e biossintetizados a partir de metabólitos primários. Alguns terpenos possuem função bem característica no crescimento e desenvolvimento da célula vegetal, podendo ser, em alguns casos, considerados metabólitos primários ao invés de metabólitos secundários, como por exemplo, a gliberelina, um hormônio vegetal que é um diterpeno (LICHTENTHALER, 1999).

Os triterpenóides, pertencentes à classe dos terpenos, são metabólitos secundários produzidos apenas pelas plantas. São igualmente provenientes do óxido de squaleno, contudo, ao contrário dos esteróis, não há degradação da cadeia carbônica e, portanto, apresentam um esqueleto com trinta átomos de carbono (PATOCKA, 2003). São diversos os relatos de atividades biológicas dos triterpenóides como anti-inflamatórios, bactericidas, fungicidas, antimicrobianos, antivirais, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais (MENDES, 2004).

É relatado na literatura que pelas suas características hidrofóbicas, os terpenos interagem com a membrana celular de células bacterianas provocando sua lise, aspecto importante que confere a essa substância uma propriedade antibacteriana (TURINA et al., 2006). Carson et al. (2002) em seus estudos comprovaram que o α -terpineol, um monoterpene álcool, que é isolado a partir de fontes vegetais, possui atividade antibacteriana não apenas para cepas de *Staphylococcus aureus*, mas também para bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

2.2.3 Esteróides

Os esteróides são triterpenos modificados e originados das frações lipídicas de vegetais e animais (DEWICK, 2001). Possuem um esqueleto formado por quatro anéis fundidos (tetracíclicos do lanosterol), de três a seis membros e um anel de cinco membros, podendo estar ou não ligado a uma cadeia de tamanho variável, em que na posição três está oxidada com um grupo hidroxila ou carbonila. Essas substâncias podem ocorrer na forma livre, esterificados ou conjugados como glicosídeo (JONES et al., 2000). Quase sempre, os esteróides se encontram em misturas devido às suas semelhanças estruturais, dificultando, assim, o isolamento individual. Vários estudos vêm revelando os efeitos indiretos dos fitosteróis na redução das doenças cardíacas, por meio da diminuição dos níveis plasmáticos

de colesterol total e LDL-colesterol. São componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteróides em mamíferos (testosterona, progesterona), plantas (brassinosteróides) e insetos (ecdisteróides) (PERES, 2004).

2.2.4 Saponinas

As saponinas são compostos amplamente distribuídos em vegetais e possuem diferentes estruturas químicas. São glicosídeos com núcleo tipo furostanólico ou espirostanólico e apresentam em sua estrutura uma parte lipofílica denominada aglicona ou sapogenina e uma parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares, conferindo a propriedade de formar espuma (PIRES et al., 2002). Dois grupos de saponinas são existentes: as esteroidais e triterpenóides, cuja diferenciação ocorre pela quantidade de átomos de carbono presente em sua estrutura química. Saponinas esteroidais possuem um esqueleto tetracíclico com 27 carbonos, já triterpenóides possuem um esqueleto pentacíclico com 30 carbonos (GUAJARDO-FLORES et al., 2012). Nas plantas, as saponinas atuam como uma barreira química, na regulação do crescimento e no sistema de defesa contra patógenos (WINA et al., 2005). Algumas saponinas também já mostraram ter propriedades antimicrobiana (ELSOHLY et al., 1999), antiviral (SIMÕES et al., 1999a) e antitumoral (XU et al., 2012).

2.2.5 Derivados cinâmicos

O ácido cinâmico é um ácido orgânico de ocorrência natural em plantas e apresenta baixa toxicidade e um amplo espectro de atividades biológicas. Os derivados do ácido cinâmico constituem uma classe de compostos que são facilmente encontradas em frutos, flores e vegetais. Essas substâncias desempenham papel importante como intermediários para a produção de diferentes fármacos (SHARMA, 2011). O ácido cinâmico e seus derivados tem despertado o interesse de pesquisadores devido às suas diversas atividades biológicas, dentre elas, as atividades antitumoral, antifúngica e antibacteriana (CHIRIAC et al., 2005), além do efeito citotóxico contra várias linhagens de células tumorais (LEE et al., 2003; DE et al., 2011).

Muitos derivados de ácido cinâmico, especialmente aqueles com o grupo de hidroxilo fenólico, são antioxidantes bem conhecidos e, supostamente, proporcionam vários benefícios para a saúde devido às suas fortes propriedades de eliminação de radicais livres. Os

derivados de ácido cinâmico, isolados a partir de material vegetal e sintetizados, têm sido descritos como possuindo propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas (SOVA, 2012). O ácido caféico, derivado do ácido cinâmico, apresenta atividades citotóxica, antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, enquanto o ácido ferúlico possui atividades antioxidante e antibacteriana (DE et al., 2011; JIANG et al., 2005; BORGES et al., 2013; DE PAIVA et al., 2013).

2.2.6 Flavonóides

Os flavonóides compreendem um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais tais como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Segundo Mahmoud et al. (2001), as folhas da azeitona preta são ricas em flavonóides. Esses compostos polifenólicos são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides e ácidos graxos, por exemplo. As antocianinas presentes nos frutos lhes conferem pigmentação, e também estão envolvidas nas interações planta-animal, auxiliando na atração de polinizadores por meio de sinais visuais e olfativos para flores e frutos, importantes para a dispersão de pólen e semente (SRIVASTANA, 1953).

Os flavonóides participam de importantes funções no crescimento, no desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (DIXON; HARRISON, 1990) e estão presentes na maioria das plantas, sendo concentrados em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (FELDMANN, 2001).

Vários fatores podem interferir na distribuição dos flavonóides na planta, tais como, a família do vegetal, a variação da espécie, as interações ambientais e os diferentes órgãos da planta. Além das funções de proteção contra variações climáticas, tais como incidência de radiação-UV, os flavonóides também agem contra micro-organismos patogênicos. Dentre as atividades biológicas, destacam-se a antioxidante, a anti-inflamatória, a antitumoral, a proteção do sistema cardiovascular e a antimicrobiana. A atividade antimicrobiana dos flavonóides segundo a literatura ainda não está bem clara, contudo uma das hipóteses ressalta a capacidade dessas substâncias em complexar-se com proteínas extracelulares solúveis e estruturas da parede bacteriana (PANIZZI et al., 2002; SIMÕES et al., 2000).

2.2.7 Cumarinas e quinonas

As cumarinas constituem um grupo de substâncias naturais com atividades biológicas bastante diversificadas. São substâncias encontradas em diferentes partes das plantas, sendo comum em diversas famílias. A cumarina (1,2-benzopirona) foi a primeira representante isolada, em 1820, da espécie *Coumarona odorata*. Esta molécula, por ser a mais simples, tornou-se o esqueleto básico de todos os outros derivados cumarínicos, conhecido como cumarina *per se* (MURRAY, 1978).

As substâncias dessa classe são classificadas quimicamente em cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas com substituintes no anel pirona e cumarinas miscelâneas. Há relatos de 32 atividades biológicas atribuídas às cumarinas tais como antibacteriana, antitumoral, antioxidante, anti-HIV, atividade diurética e analgésica (SOUSA, 2005).

As quinonas são compostos orgânicos considerados produtos da oxidação de fenóis, apresentando dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com, pelo menos, duas ligações duplas C-C, com as carbonilas sempre nas posições 1,2- ou 1,4-dicetonas cíclicas, ou seja, orto- ou para-quinona. Há três grupos principais de quinonas classificadas como benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas. As quinonas apresentam uma diversidade de atividades biológicas, em que as naftoquinonas são responsáveis pelas atividades antibacteriana, antifúngica e antitumoral, além de atividade contra *Leishmania*, enquanto que algumas benzoquinonas apresentam atividade contra tripanossomatídeos (SIMÕES et al., 2000).

2.2.8 Alcalóides

Alcalóides são substâncias orgânicas, cíclicas, nitrogenadas com distribuição limitada nos organismos vivos. São classificados de acordo com sua origem biogenética e possuem amplo espectro de atividades farmacológicas como amebicida, anticolinérgica, antimalárica, antitumoral, estimulante do SNC, diurética, miorelaxante e antiviral (SIMÕES et al., 2000).

Os alcalóides possuem caráter alcalino na sua grande maioria, porém existem alcalóides ácidos, como por exemplo, a colchicina. Certa dificuldade na nomenclatura dessas substâncias é encontrada devido à ausência de uma separação precisa entre alcalóides

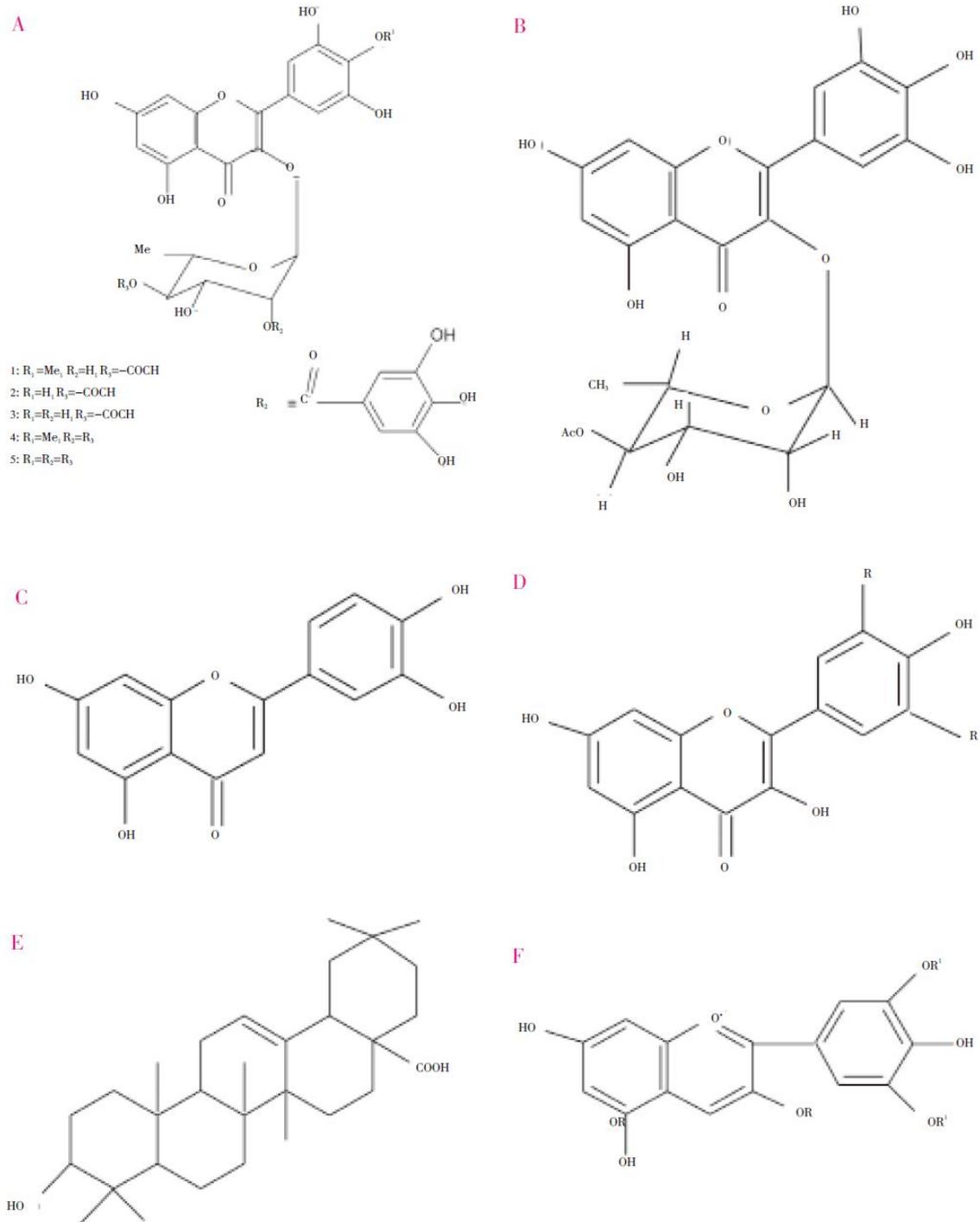
propriamente ditos e aminas complexas de ocorrência natural (RAO et al., 2011; SIMÕES et al., 2000; TAN et al., 2010).

O isolamento da escopolamina de *Datura stramonium* L. por Landenburg em 1881 e da papaverina por G. Merck em 1848 e a sua utilização por suas propriedades antiespasmódicas são igualmente exemplos da importância desse grupo de substâncias. Outros importantes alcalóides incluem a vincristina e a vimblastina (antineoplásicos), a reserpina (antidepressivo), a galantamina (tratamento do Mal de Alzheimer) e a quinidina (depressor cardíaco), embora muitas sejam as pesquisas em andamento para o isolamento de novos alcalóides com propriedades terapêuticas (RAO et al., 2011; SIMÕES et al., 2000; TAN et al., 2010).

2.3 Constituintes químicos de *Syzygium cumini* – Azeitona Preta

Centenas de componentes podem estar presentes nos tecidos vegetais da planta (Figura 6), contudo, quando expressos em peso a grande maioria se apresenta em quantidades muito pequenas. Dentre os componentes mais importantes presentes na azeitona, estão incluídos pigmentos antociânicos, vitaminas, minerais e outros componentes resultantes do metabolismo secundário. A composição química de diferentes partes da planta como sementes, cascas, folhas, e frutos em geral é rica em taninos, flavonóides, antocianidinas, iridoides, alcalóides, heterosídeos fenólicos simples, glicose, ácido gálico, metilgalato, canferol, miricetina, ácido elágico, ácido clorogênico, quercetina, isoquercetina e nilocetina. As folhas são ricas em flavonóides, glicosídeos, miricetina, quercetina e kaempferol triterpenóides, esterase, galoil carboxilase e taninos (MAHMOUND et al., 2001; MIGLIATO et al., 2007). Na casca do caule são encontrados ácido betulínico, friedelina, epifriedelanol, beta-sitosterol, quercetina, kaempferol, miricetina, ácido gálico, ácido elágico, bergeninas, flavonóides, e taninos (MIGLIATO et al., 2006; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012). As flores são ricas em kaempferol, quercetina, miricetina, isoquercetina, ácido oleanólico, ácido acetil-oleanólico, eugenol-triterpenóide A e eugenol-triterpenóide B. As raízes são ricas em flavonóides, glicosídeos e isorhametin (DAMASCENO et al., 2002). Nos frutos foram encontradas antocianinas, rafinose, glicose, frutose, ácido cítrico, ácido málico, ácido gálico, além de vitaminas e sais minerais (TIMBOLA et al., 2002).

Figura 6. Constituintes fitoquímicos isolados de *S. cumini* (L.) Skeels. A: Meamsetin-3-O-(400-O-Acetyl)-a-L-rhamnopyranoside (1), Miracetina3-O-(400-O-acetyl-200-O-galloyl)-a-L- rhamnopyranoside (2), myricetin 3-O-(400-O-acetyl)-a-L-rhamnopyranoside (3), Myricetin 40-methyl ether 3-O-a-L- rhamnopyranoside (4), Myricetin (5) ; B: Myricetin 3-O-(4''-acetyl)-a-L- rhamnopyranoside; C: Quercetin; D: Kaempferol R=H; Myricetin R=OH; E:Oleanolic acid; F = Delphinidin-3-gentiobioside, R = Gentiobiose , R' = H Malvidine -3- laminaribioside R=Laminaribioside R



Fonte: Muniappan e Pandurangan (2012)

Alguns desses metabólitos possuem atividades contra micro-organismos de interesse clínicos, dentre eles, estão *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, responsáveis por muitos óbitos no ambiente hospitalar (SÁ, 2008; ALBERTON et al., 2001).

2.4 Micro-organismos de interesse clínico

As primeiras evidências de disseminação de doenças em ambientes hospitalares foram registradas na primeira metade do século XIX, quando Oliver Holmes verificou que a febre puerperal passou de condição rara, assumindo um caráter epidêmico. A partir de uma análise de registros estatísticos, Holmes sugeriu que a doença poderia ser transmitida pelas mãos e aventais sujos dos médicos ao atenderem as parturientes (FERNANDES et al., 2000).

Na segunda metade do século XIX, surgiram normas de esterilização e higienização dos hospitais, marcando o início do controle das infecções hospitalares (LERNER; LERNER, 2002). No início do século XX, a teoria de que essas infecções eram causadas por micro-organismos já era amplamente aceita e a identificação de agentes antimicrobianos de possível uso terapêutico, como a penicilina por Alexander Fleming, veio seguida de grande euforia. Porém, pouco mais de um ano após a comercialização de penicilina, foi isolada em um hospital uma cepa de *Staphylococcus* resistente a esse antibiótico. Desde então, o número de pesquisas sobre infecções hospitalares teve uma rápida ascensão. *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa* são os agentes patogênicos frequentemente citados como responsáveis pelas IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (LOWY, 2003).

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus são cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados. Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas), devido à sua divisão celular, que ocorre em três planos perpendiculares (CASSETTARI et al., 2005; KONEMAN et al., 2012).

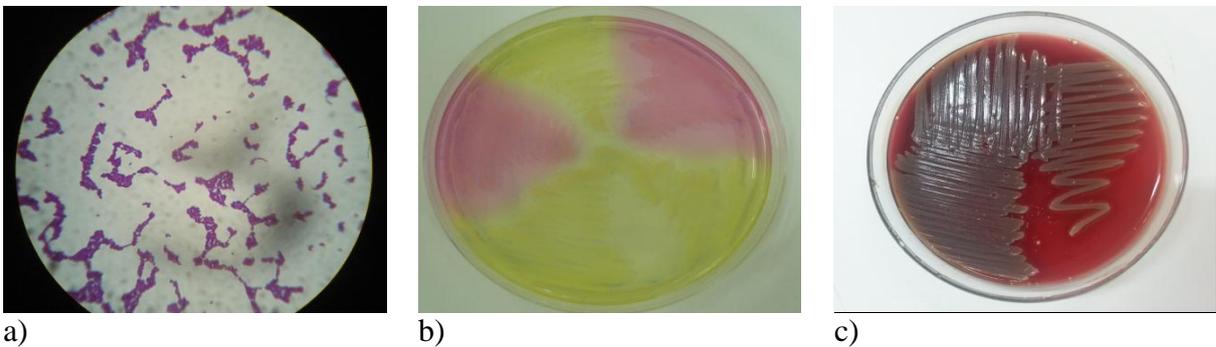
O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaecae*, juntamente aos gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. O gênero *Staphylococcus* possui 37 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas.

Geralmente, esse gênero faz parte da microbiota da pele humana normal e de outros sítios anatômicos. A espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, é *S. aureus*, que está frequentemente relacionada com diversas infecções em seres humanos (CASSETTARI et al., 2005; KONEMAN et al., 2012).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos Gram-positivos, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto, pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras) (SANTOS et al., 2007).

As cepas de *S. aureus* crescem em meios comuns, caldo ou Ágar simples, pH = 7, à temperatura ótima de 37 °C. As colônias formadas em placa, após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes (Figura 7). A coloração dessas colônias varia desde o acinzentado até o amarelo-ouro, em que a pigmentação aumenta com o tempo de incubação prolongado, não chegando a ser formada nos casos de crescimento em condições anaeróbicas, ou na cultura em caldo (SANTOS et al., 2007). Em placas de Ágar sangue, um halo de hemólise pode se desenvolver em torno das colônias formadas (CASSETTARI et al., 2005; TRABULSI et al., 2005, KONEMAN et al., 2012). Outro meio importante para a identificação do *S. aureus* é o Ágar manitol-sal, seletivo para essa espécie, uma vez que o *S. aureus* consegue fermentar o manitol, produzindo ácido lático. Essa espécie se desenvolve também na presença de 7,5% de NaCl, que estimula a produção de coagulase, enzima característica da espécie (KONEMAN et al., 2012).

Figura 7. *Staphylococcus aureus*. Coloração de Gram (a). Colônias em Ágar Manitol (b). Colônias em Ágar Sangue.



Fonte: A autora

A distribuição de *S. aureus* é muito ampla, visto que essa bactéria é significativamente capaz de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em

partículas de poeira. Esse micro-organismo pode ser encontrado no ambiente de circulação do ser humano, sendo o próprio homem seu principal reservatório, além de estar presente em diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele (BANNERMAN, 2003). É um dos mais comuns envolvidos nas IRAS, podendo apresentar elevados índices de morbidade e mortalidade em hospitais (ROCHA et al., 2010).

2.4.1.1 Fontes de infecção

A colonização nasal pelo *S. aureus* assume um papel importante na clínica médica, uma vez que, com as narinas colonizadas, o indivíduo contamina as próprias mãos e passa a ser veículo de transferência da bactéria no mecanismo de infecções por contato. De acordo com alguns estudos, o carreamento nasal também contribui para a transmissão da bactéria por disseminação aérea (CARVALHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005).

Em hospitais, principalmente em berçários e unidades de terapia intensiva (UTIs), é rotina o isolamento de pacientes colonizados. *S. aureus* também traz riscos para pacientes que fazem diálise, queimados, diabéticos e HIV positivos, visto que pode causar diversos processos infecciosos, que variam desde infecções cutâneas crônicas (relativamente benignas) até infecções sistêmicas (potencialmente fatais). As infecções cutâneas incluem foliculite simples e impetigo, assim como furúnculos e carbúnculos, que afetam o tecido subcutâneo e produzem efeitos sistêmicos, como febre (CAVALCANTI et al., 2005).

S. aureus é frequentemente isolado de feridas cirúrgicas infectadas, que podem representar focos para desenvolvimento de infecções sistêmicas. A broncopneumonia estafilocócica é observada usualmente em idosos e está associada à pneumonia viral como fator predisponente. A pneumonia nosocomial produzida por *S. aureus* ocorre em casos de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), intubação e aspiração. As doenças malignas subjacentes são reconhecidas como fatores de risco para o desenvolvimento de uma bacteriemia (BANNERMAN, 2003; CARVALHO et al., 2005).

A bacteriemia pode causar infecções em sítios anatômicos distantes, como endocardites, osteomielites, pioartrites e formação de abscessos metastáticos, em particular em pele, tecidos subcutâneos, pulmões, fígado, rins e cérebro. O *S. aureus* é a segunda maior causa de meningites associadas a derivações ventrículo peritoneais (aliviar a pressão do cérebro por acúmulo de líquido LCR), sendo um dos muitos agentes responsáveis por peritonite em pacientes submetidos à diálise peritoneal contínua (CARVALHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005).

2.4.1.2 Virulência e Mecanismos de Patogenicidade

As doenças provocadas pelo *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, de bacteremia primária ou, exclusivamente, das toxinas que os micro-organismos produzem (ANDRIOLO, 2005). A eficiência da disseminação de *S. aureus* se deve, em parte, à grande versatilidade dessa bactéria. A capacidade de se adaptar rapidamente a diferentes ambientes muitas vezes hostis devido ao pH, umidade, pressão osmótica ou deficiência de nutrientes possibilita não só a colonização do homem como do ambiente ao seu redor, criando reservatórios de células aptas a colonizar outros indivíduos (GORDON et al., 2008).

Classicamente, a análise do mecanismo de invasão de *S. aureus* revela que, no primeiro momento, essa bactéria adere à pele ou à mucosa para em seguida, romper as barreiras do epitélio, comprometendo estruturas de ligações intercelulares, como desmossomos e junções de aderência. Após a invasão do epitélio, *S. aureus* utiliza diversas estratégias para permitir a sua sobrevivência e proliferação no organismo hospedeiro. Essas estratégias estão relacionadas com a opsonização do complemento, a neutralização da fagocitose e a inibição das respostas imunes humoral e celular (IWATSUKI et al., 2006).

Esses fatores de virulência podem ser classificados, basicamente, nas três seguintes categorias: a) fatores relacionados com a aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, como a produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno ou da enzima coagulase; b) fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, como diversas enterotoxinas estafilocócicas (SEs A-E, G-J, K, L, M, O e P), a toxina da síndrome do choque tóxico (TSCT), a proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares; e c) fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos ou adesão de superfícies de cateteres e próteses, os quais incluem as proteínas (toxinas) α , β , δ , γ e δ – hemolisinas. *S. aureus* contém ainda, na estrutura de sua parede celular, polissacarídeos e proteínas antigênicas, bem como outras moléculas importantes, as quais podem induzir uma resposta imunológica no hospedeiro. Entre essas outras moléculas podemos citar o ácido tecóico, o glicanopeptídeo e a proteína A, além da presença de cápsula e de adesinas (OLIVEIRA et al., 2001).

A capacidade de colonização e a patogenicidade do *S. aureus* são, portanto, uma consequência de seus fatores de virulência, os quais têm papel relevante na adesão celular, na captação de nutrientes e na sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro (SANTOS et al., 2007).

O alto potencial infeccioso do *S. aureus* não está restrito apenas à sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também à produção de moléculas com grande poder patogênico, que incluem enzimas e toxinas. As betalactamases, coagulases, hialuronidases e catalases são algumas das enzimas produzidas para esse fim. Além dessas enzimas, *S. aureus* também produz DNAses, lipases, proteases e esterases. Entre as toxinas produzidas por esse patógeno destacam-se as seguintes: alfa, beta e gama toxinas, a leucocidina, a esfoliatina, a toxina do choque tóxico e as enterotoxinas (BRAUNWALD et al., 2013).

2.4.1.3 Resistência a Antimicrobianos

Os mecanismos de aquisição de resistência podem ser classificados em dois grupos principais: mutação em um gene no cromossomo bacteriano ou aquisição de um gene de resistência de outro micro-organismo, pela transdução, transformação ou conjugação (ITO et al., 2003). Essas modificações no genoma dos micro-organismos normalmente estão relacionadas a:

- Mudança na enzima ou estrutura-alvo;
- Mudança na via metabólica alvo;
- Bombas de efluxo,
- Inativação do antibiótico por (a) degradação do antibiótico ou (b) inibição competitiva.

Para *Staphylococcus aureus*, os mecanismos de resistência aos medicamentos mais comuns estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Mecanismos de resistência a algumas classes de antibióticos utilizados por *S. aureus*.

Classe do Antibiótico	Exemplo de Droga	Gene de Resistência	Mecanismos
β-lactâmicos	Penicilina	<i>blaZ</i>	Degradação da droga
	Ampicilina		Alteração no alvo
	Oxacilina	<i>mecA</i>	diminuindo afinidade
Glicopeptídeos	Vancomicina	<i>vanA</i>	Alteração no alvo da droga
		Desconhecido	Inibição competitiva
Quinolonas	Ciprofloxacina	<i>parC</i> <i>gyrA ou gyrB</i>	Alteração no alvo
	Levofloxacina		diminuindo afinidade
	Trovafloxacina		
Aminoglicosídeos	Gentamicina	<i>Aac(6')-Ie+aph(2)</i>	Degradação da droga
		<i>Ant(4')-Ia</i>	
		<i>Aph(3')-IIIa</i>	

Fonte: Modificado de Lowy (2003)

2.4.1.4 *Staphylococcus aureus* Oxacilina (Meticilina) Resistente

A implantação da antibioticoterapia no início da década de 1930, com o emprego da sulfanilamida (descoberta por Gerard Domagk, em 1932), aparentemente ditava o fim das doenças infecciosas. Contudo, ao se analisar a evolução da resistência de *S. aureus*, foi observado que, já no final daquela década, surgiam as primeiras cepas resistentes àquele quimioterápico. Com a entrada da penicilina em uso clínico, *S. aureus* passou a desenvolver resistência a esse betalactâmico pela produção da betalactamase (penicilinase), capaz de hidrolisar o anel betalactâmico da penicilina, tornando-a inativa. Em 1944, apenas 5% dos *S. aureus* eram resistentes à penicilina, enquanto que, em 1959, essa resistência já alcançava a taxa de 80%, sendo estendida tanto à amoxicilina como à ampicilina (SANTOS et al., 2007).

A metilina, introduzida em 1961, foi a primeira penicilina semissintética resistente à penicilinase. A sua introdução foi rapidamente seguida por relatos de cepas resistentes à metilina/oxacilina (MRSA/ ORSA), o que caracterizou resistência a todos os antibióticos β-lactâmicos. A propagação de clones resistentes à metilina/oxacilina é remanescente do surgimento de resistência à penicilina na década de 1940. Detectada pela primeira vez em hospitais na década de 1960, a resistência à metilina/oxacilina é cada vez mais reconhecida

pela comunidade científica. Enquanto muitas destas infecções ocorreram em pacientes com alguma experiência hospitalar antecedente, já existem casos de indivíduos sem exposição prévia hospitalar. O gene *mecA* (responsável pela resistência à meticilina/oxacilina) é parte de um elemento genético móvel encontrada em todas as cepas de MRSA/ORSA (LOWY, 2003).

A resistência à meticilina/oxacilina (representantes das penicilinas β -lactamases estáveis) requer a presença do gene *mecA* localizado cromossomicamente. O *mecA* é responsável pela síntese da proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2a, também chamado PBP2'), uma proteína de 78-kDa (LIM; STRYNADKA, 2002). *Staphylococcus aureus* possui cinco PBPs, que catalisam a etapa terminal da síntese da parede bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. As PBP 1, 2 e 3 são essenciais e têm alta afinidade (sítios-alvo) com os antibióticos β -lactâmicos, unindo-se a esses por ligações covalentes. A resistência à meticilina em estafilococos é devida à produção dessa PBP adicional, anômala, a PBP 2a (SOUZA et al., 2005).

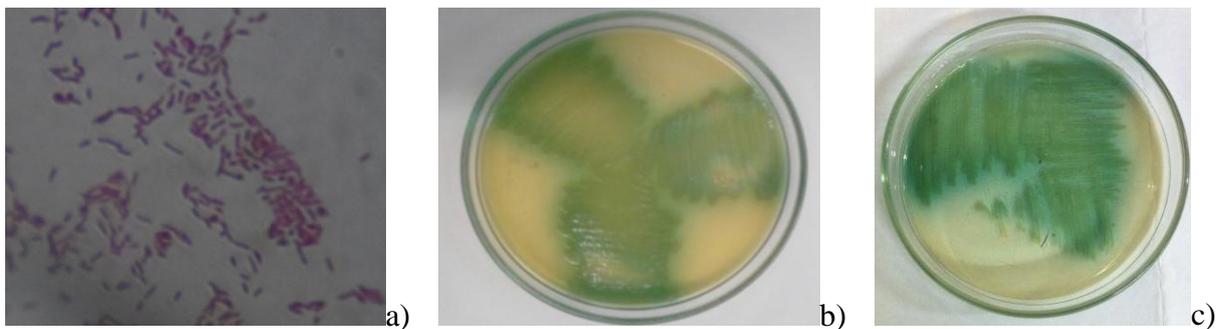
A sua atividade é semelhante a da serina protease, a partir do qual essas enzimas parecem ter evoluído. A PBP2a substituída para as outras PBPs e, pela sua baixa afinidade para todos os antibióticos β -lactâmicos, permite que os estafilococos sobrevivam à exposição a altas concentrações destes agentes. Assim, a resistência à meticilina confere resistência a todos os agentes β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas (LIM; STRYNADKA, 2002).

A expressão fenotípica da resistência à meticilina é variável e cada cepa de MRSA tem um perfil característico de células bacterianas que crescem em concentrações específicas de meticilina. A expressão da resistência em algumas cepas de MRSA é regulada por homólogos dos genes reguladores para *blaZ*. Estes genes denominados *mecI* e *mecR1* regulam a resposta *mecA* aos antibióticos β -lactâmicos de uma forma semelhante à da regulação da *blaZ* pelo genes *blaR1* *blaI* após exposição à penicilina, sendo as sequências de DNA ligadas pelos genes repressores para alcançar a inibição da ativação do gene idênticas (ROSATO et al., 2003).

2.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bacilo Gram-negativo, não fermentador, aeróbio, oxidase positiva, capaz de produzir pigmentos verdes e azuis (piocianina, pioverdina e fluoresceína) como mostrado na Figura 8 e cresce em solos, pântanos e habitat marinhos costeiros, bem como sobre os tecidos animais e vegetais. Faz biofilmes em superfícies molhadas, tais como aquelas de pedras e solo. É capaz de persistir por longos períodos em ambientes adversos e de desenvolver resistência a agentes antimicrobianos (STOVER et al., 2000).

Figura 8. *Pseudomonas aeruginosa*. a) Coloração de GRAM. b) Crescimento em Ágar Brain Heart Infusion (BHI). c) Produção de piocianina/pioverdina em Ágar Müller Hinton



Fonte: A Autora

O surgimento de *P. aeruginosa* como um importante patógeno humano oportunista durante o século passado pode ser uma consequência de sua resistência aos antibióticos e desinfetantes que eliminam outras bactérias ambientais (COSTERTON et al., 1999). *P. aeruginosa* é uma fonte significativa de bacteriemia em vítimas de queimaduras, em infecções do trato urinário em pacientes cateterizados e em quadros de pneumonia hospitalar em pacientes com respiradores. Também é a causa predominante de morbidez e mortalidade em pacientes com fibrose cística, cujos epitélios anormais das vias aéreas permitem a colonização em longo prazo dos pulmões. Estas infecções são impossíveis de eliminar, em parte devido à resistência natural da bactéria aos antibióticos, e em última análise, podem levar à insuficiência pulmonar e morte (PICOLI, 2008).

P. aeruginosa secreta vários fatores de virulência, incluindo toxinas, lipases e proteases. Quatro vias de secreção de proteínas foram descritos por bactérias Gram-negativas,

e três destes eram evidentes em *P. aeruginosa* (KONEMAN et al., 2012; TRABULSI et al., 2005).

2.4.3.1 Mecanismos de resistência

Pseudomonas aeruginosa pode causar infecções nosocomiais graves, com elevada letalidade, o que a classifica como uma das principais bactérias causadoras de IRAS, perdendo apenas para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativa. Relatos de redução da susceptibilidade da *P. aeruginosa* aos antimicrobianos vêm sendo publicados, sendo destacada a diminuição de sensibilidade aos antibióticos de maior espectro de ação como os carbapenêmicos e as cefalosporinas anti-*Pseudomonas* (KIFFER et al., 2005; MCGOWAN, 2006; LANDMAN et al., 2007; KONEMAN et al., 2012).

Diversos mecanismos de resistência têm sido identificados como a hiper-expressão de bombas de efluxo, a perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa e a produção das enzimas beta-lactamases e metallo-beta-lactamases. Geralmente, a resistência se manifesta em pacientes com maior tempo de internação e uso prévio de antimicrobianos (LI et al., 2000; LIVERMORE, 2002).

Na tentativa de buscar novos agentes antimicrobianos, os vegetais são uma incomensurável fonte de prospecção. Ainda, pode-se estudar a utilização das radiações ionizantes para potencializar a ação antimicrobiana dos vários componentes químicos presentes nas plantas, tais como fenóis, taninos, flavonóides, dentre outros.

2.5 Irradiação e sua aplicação em materiais de origem vegetal

A radiação ionizante é capaz de interagir com a constituição básica da matéria, transferindo assim, energia que pode alterar o estado físico de um átomo e com isso causar perda de elétrons, transformando-os em partículas eletricamente carregadas. Como exemplo, tem a radiação gama, que tem alto poder de penetração e baixo poder de ionização (OKUNO; YOSHIMURA, 2010). Os mecanismos de ação da radiação podem ser classificados em direto, quando a radiação interage diretamente com as moléculas importantes como as de DNA, podendo causar desde mutação genética até morte celular; e indireto, quando a radiação quebra a molécula da água, formando assim radicais livres que podem atacar outras moléculas

importantes. Esse mecanismo é importante, uma vez que nosso corpo é composto por mais de 70% de água (OKUNO, 2013).

2.5.1 Esterilização

Por ser um dos mecanismos de controle microbiano, a radiação tem sido utilizada como agente físico para aumentar o tempo de vida de prateleira tanto de produtos de origem vegetal quanto animal. A aplicação dessa tecnologia demandou a realização de estudos nessas matrizes, principalmente para verificar os possíveis efeitos da irradiação e atender as exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (SMITH; PILLAI 2004).

Em 1981, a preservação de alimentos pelo tratamento com a irradiação gama foi aprovada pelo Comitê Misto da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO/WHO) e pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA). No Brasil está em vigor a Resolução RDC Nº 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, em que qualquer alimento pode ser tratado por irradiação gama desde que não comprometa suas qualidades funcionais e sensoriais (ANVISA, 2001).

Em 2004, a ANVISA por meio da Resolução RDC Nº 48, de 16 de março de 2004, dispôs sobre o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil, estabelecendo que as indústrias que comercializam esses produtos devem informar a parte da planta utilizada, os testes de pureza e integridade, análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e/ou marcadores e a descrição detalhada de todas as metodologias utilizadas no controle de qualidade. É exigido, assim, da empresa o Certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC), emitido pela ANVISA (ANVISA, 2004). Além disso, a possível presença de bactérias patogênicas e fungos toxigênicos produtores de micotoxinas, dentre eles, espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, em produtos naturais tem despertado o interesse dos órgãos de saúde em relação à segurança alimentar (ABOU-ARAB et al., 1999; ARAÚJO; OHARA, 2000; ROCHA et al., 2004; BUGNO et al., 2005).

Considerando que a contaminação de produtos de origem vegetal torna-os inadequados para aplicação em indústrias de alimentos e farmacêuticas, o uso da radiação pode ser eficaz na eliminação desses micro-organismos, garantindo, assim, a qualidade das plantas medicinais (SATOMI et al., 2005). A irradiação, por ser um processo físico, pode ser ideal e emergir como uma técnica importante para melhorar a qualidade nutricional ou farmacêutica de materiais vegetais (BHAT et al., 2007).

2.5.2 Efeitos sobre as propriedades de extratos vegetais

Tratamentos com radiação gama têm sido realizados para aumentar ou diminuir o teor de compostos fenólicos totais de plantas, que é dependente da dose administrada e da matéria-prima utilizada. Um estudo para verificar a influência das dosagens de radiação de 1; 2; 4 e 6 kGy em rizoma de lótus (*Nelumbo nucifera*) verificou que os tratamentos utilizados aumentaram a produção de fenóis totais (KHATTAK ET AL., 2009). Breitfellner et al. (2002) realizando um estudo para avaliar o conteúdo de flavonóides em morangos, verificaram que até a dose de 6 kGy não houve alteração no teor de quercetina, porém os teores de catequina e kaempferol diminuíram.

Tem sido demonstrado que a exposição a determinadas doses de radiação não promove alterações na química e nos constituintes nutricionais das plantas medicinais (ARTHUR et al., 1989; DANTAS, 1998; MACHI, 1998; KOSEKI et al., 2002; MECHI et al., 2005; SATOMI et al., 2005). No entanto, estudos utilizando níveis crescentes de radiação gama em extratos vegetais revelaram algumas alterações físico-químicas nos metabólitos secundários de algumas espécies, principalmente de espécies que apresentam flavonóides, fenóis totais e taninos. Os níveis foram aumentados sem uma relação dependente da dose (1 a 10 kGy) (MOUSSAID et al., 2000; MECHI et al., 2005; MIRANDA et al., 2006; BHAT et al., 2007; STAJNER et al., 2007), ou houve o decréscimo do conteúdo dos taninos em doses de 0,5 a 10 kGy (VILLAVICENCIO et al., 2000; BRIGIDE; CANNIATTI-BRAZACA, 2006; TOLEDO et al., 2007).

Aouidi et al., (2011) avaliaram a influência da radiação em doses de até 25 kGy em folhas secas de azeitona e verificaram que a capacidade antioxidante bem como o teor dos compostos fenólicos totais e flavonóides não foram alteradas. Alguns desses metabólitos estudados possuem atividade antimicrobiana como os flavonóides e os fenóis.

Estudo conduzido por Lee et al. (2006) indicou não haver efeito significativo sobre a capacidade antioxidante quando se utilizou doses de até 20 kGy em chá e nos extratos de folhas do chá verde. Koseki et al. (2002), analisando doses de radiação de até 30 kGy em três ervas: manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e alcachofra (*Cynara scolymus* L.), mostraram que não houve aumento significativo nos níveis de β -caroteno e taninos. Entretanto, os fenólicos totais diminuíram no alecrim desidratado (*Rosmarinus officinalis* L.).

O efeito da irradiação (2,5; 4,0; 5,5 e 7,0 kGy) sobre as propriedades químicas em conteúdos voláteis de linhaça foi investigado por Yalcin et al. (2011). Diminuições consistentes foram observadas em ambos os conteúdos de proteína e óleo das amostras de linhaça irradiadas com o aumento das doses de irradiação. O teor de cinzas das amostras irradiadas de linhaça aumentou significativamente ($P < 0,05$) com o aumento das doses de irradiação, exceto com a dose de 5,5 kGy. A irradiação causou diminuições no teor de ácido palmítico, esteárico, estireno e p-xileno, enquanto que o teor de 1-hexanol só diminuiu com a dose de 7 kGy. Benzaldeído, p-cimeno, e nonanol não foram determinados em doses acima de 4,0 kGy (YALCIN et al., 2011).

Mexis et al. (2009) estudaram os efeitos da radiação gama sobre as propriedades físico-químicas e sensoriais de castanha de caju até a dose de 7 kGy e obtiveram resultados como o aumento dose-dependente de ácido esteárico e de compostos voláteis, tais como aldeídos, cetonas e álcoois, indicando uma oxidação lipídica reforçada. Também foi observada a diminuição dose dependente de ácido oleico, além de aumento de cinco vezes de peróxido e de duas vezes o teor hexanal. Doses próximas de 3 kGy conservaram as características organolépticas do material.

Novos ensaios para modificar as atividades biológicas dos alimentos por irradiação gama mostraram vantagem no aumento do teor de compostos fenólicos totais, melhorando a cor e a atividade antioxidante de vários sucos (NAJAFABADI et al., 2017). Desse modo, podem ocorrer alterações na citotoxicidade, nas propriedades antioxidantes e na avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana do extrato de *Syzygium cumini* após irradiação gama.

3 MATERIAL E MÉTODOS

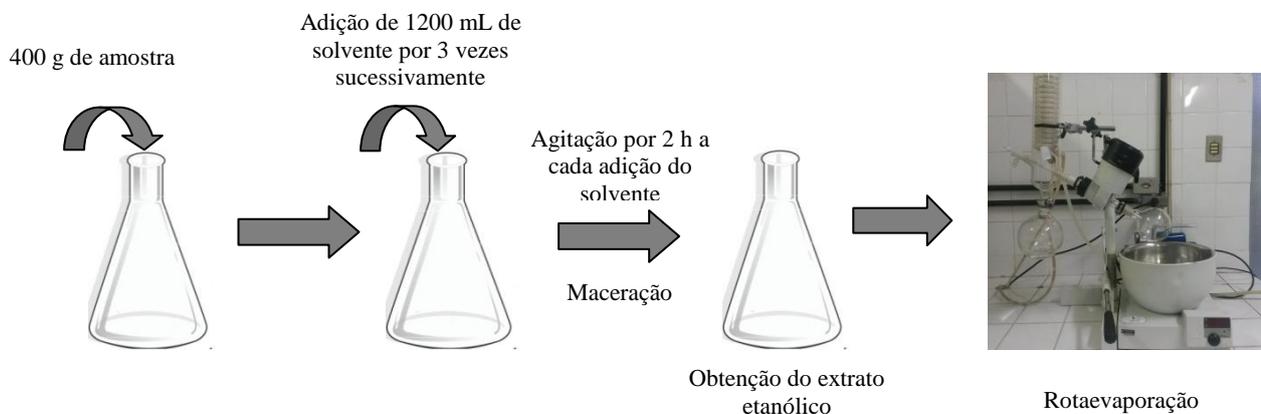
3.1 Seleção das amostras

O material vegetal, raiz e caule de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, foi coletado no período de março de 2013 a abril de 2015 no campus da Universidade Federal de Pernambuco, com exsicata depositada no Herbário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PEUFR) sob o número 52527.

3.2 Obtenção dos extratos

A secagem do material foi feita em estufa FANEM (Modelo 002 CB) à 50 °C por sete dias ou até completa perda da umidade (avaliada por pesagens sucessivas). Em seguida, as partes caule e raiz foram manualmente dilaceradas para uma melhor extração dos compostos (DUARTE et al., 2004). A 400 g das amostras, foram acrescentados 1.200 mL de etanol p.a., pH = 7 em três subsequentes momentos até o volume final de 3.600 mL e o conjunto (planta-solvente) foi levado para mesa agitadora por 2 horas em cada adição de solvente para otimizar a retirada dos princípios ativos, gerando o extrato etanólico, que foi evaporado sob pressão em rotaevaporador FISATOM modelo 558 até a completa secura. Depois deste procedimento, os extratos passaram pelo processo de partição com o solvente acetato de etila e, assim, gerou o extrato de acetato de etila de raiz e caule que, em seguida, foram evaporados sob pressão em rotaevaporador FISATOM modelo 558, sendo obtido o extrato bruto de acetato de etila (Figura 9).

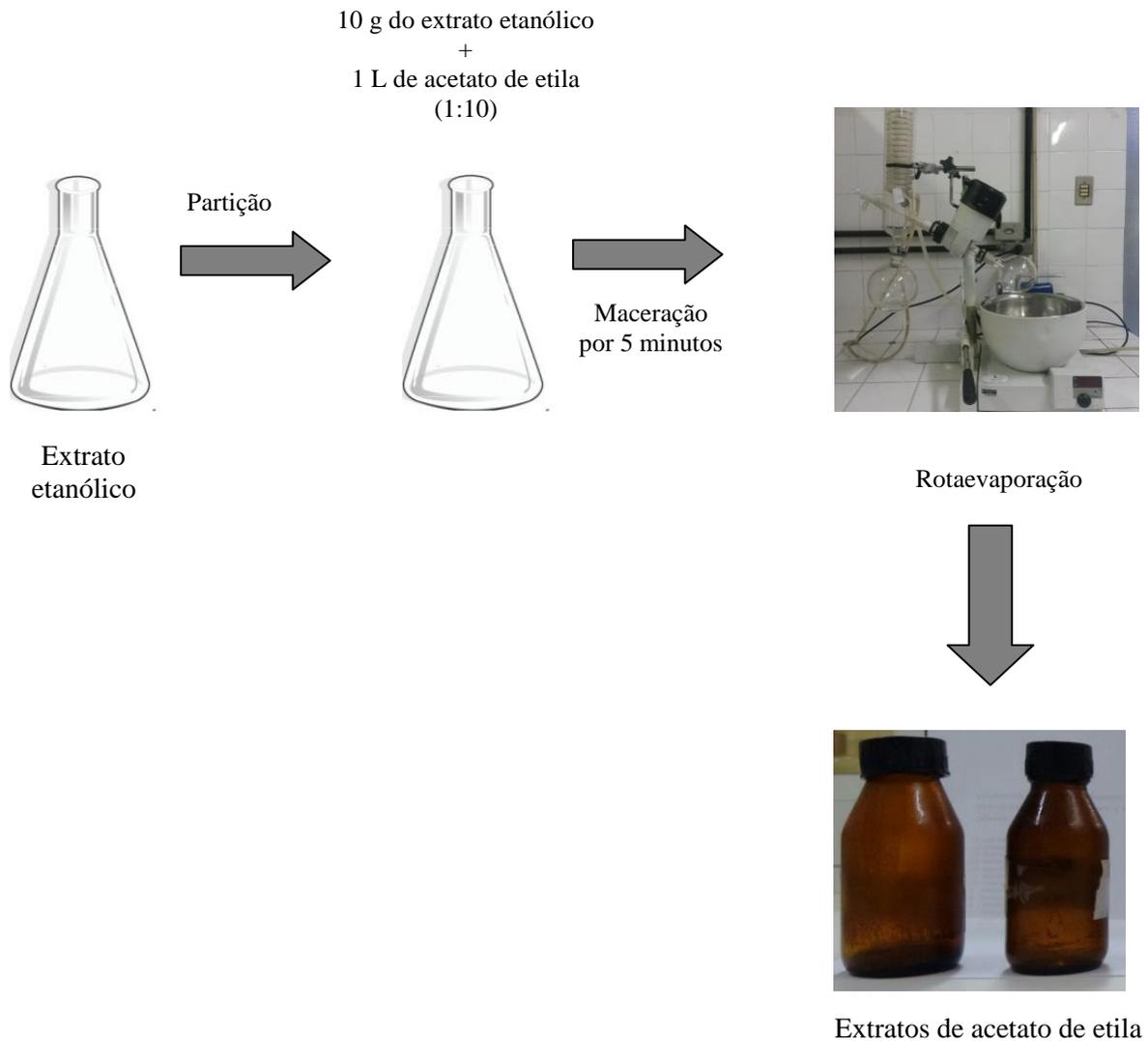
Figura 9. Representação esquemática de preparação dos extratos etanólicos



Fonte: A Autora.

Na Figura 10 pode ser observado o fluxograma para a obtenção dos extratos de acetato de etila de raiz e caule (CERQUEIRA et al., 2012, modificado), em que a 10 g do extrato etanólico foi adicionado 1 L de acetato de etila, seguido pela maceração e rotaevaporação.

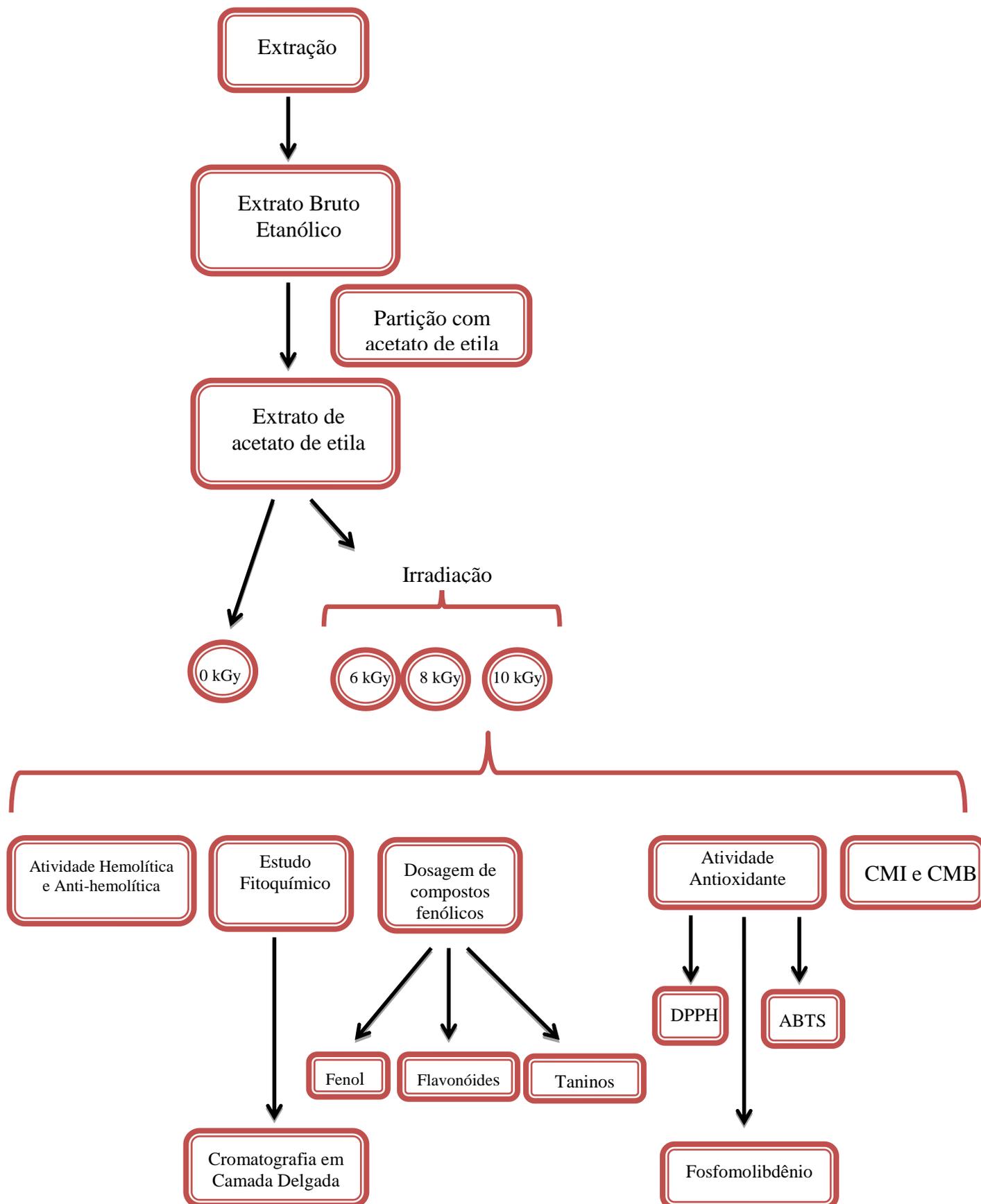
Figura 10. Fluxograma de amostragem para a obtenção dos extratos de acetato de etila



Fonte: A Autora.

Após a obtenção dos extratos de acetato de etila de raiz e caule, foram realizados os ensaios apresentados na Figura 11 para a realização da pesquisa científica envolvendo a influência da radiação gama sobre as propriedades dos extratos estudados.

Figura 11. Representação esquemática dos ensaios



Fonte: A Autora

3.3 Irradiação dos extratos

Os extratos de caule e raiz de acetato de etila foram irradiados com as doses de 0 (não irradiado), 6, 8 e 10 kGy no irradiador com uma fonte de Co^{60} (Gammacell modelo 220 Excel-MDS Nordion), pertencente ao Departamento de Energia Nuclear da UFPE (Figura 12) com taxa de dose de 2,934 kGy/h, do dia 22/07/ 2015. As doses escolhidas foram baseadas nos resultados de Santos et al., (2010) e Solidônio et al., (2015). O material não irradiado foi usado como controle dos experimentos.

Figura 12. Foto do irradiador com fonte de cobalto-60 (Gammacell 220 Excel – MDS Nordion). (1) local onde são colocadas as amostras; (2) painel de controle; (3) local da fonte de Cobalto-60.



Fonte: A Autora

3.4 Citotoxicidade: Atividade hemolítica e anti-hemolítica

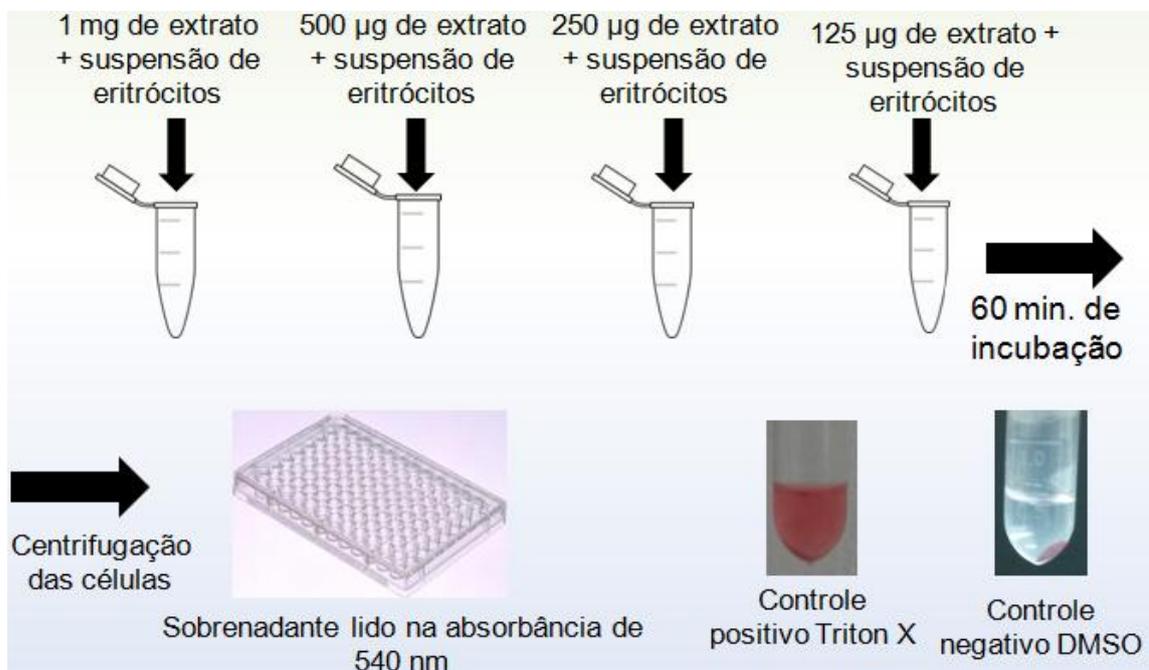
Para a realização da atividade hemolítica e anti-hemolítica, foi realizada a coleta de sangue tipo O, de voluntário saudável, não fumante, por punção venosa depois de um termo

de consentimento assinado (Apêndice), de acordo com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 55704016.6.0000.5200).

3.4.1 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada seguindo a metodologia de Oliveira et al. (2012), em que o sangue (5-10 mL) foi obtido por punção venosa de paciente saudável, utilizando como anticoagulante o citrato de sódio. Eritrócitos humanos foram imediatamente isolados por centrifugação a 1500 rotações por minuto durante 10 minutos. Após a remoção do plasma, os eritrócitos foram lavados três vezes com solução tampão fosfato-salina (PBS; pH 7,4) e, posteriormente, uma suspensão de eritrócitos a 1% foi preparada com a mesma solução tampão. Uma alíquota de 1,1 mL de suspensão de eritrócitos foi misturada a 0,4 mL do extrato que foi dissolvido em metanol em várias concentrações (1mg-125 µg/mL) conforme mostra a Figura 13.

Figura 13. Representação esquemática do ensaio de atividade hemolítica



Fonte: A autora.

O controle negativo e controle positivo receberam 0,4 mL de DMSO (Absorbância: 0,047) e de Triton X-100 (Absorbância: 1,151), respectivamente. Após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi usado para medir a absorbância da hemoglobina liberada a 540 nm. O valor médio foi calculado a partir dos ensaios em triplicata. A atividade hemolítica foi expressa em relação à ação do Triton X-100 e calculada pela Equação 1:

$$Atividade(\%) = \frac{(A_s - A_b) \times 100}{(A_c - A_b)} \quad (1)$$

em que,

A_c = a absorbância do controle (branco, sem extrato)

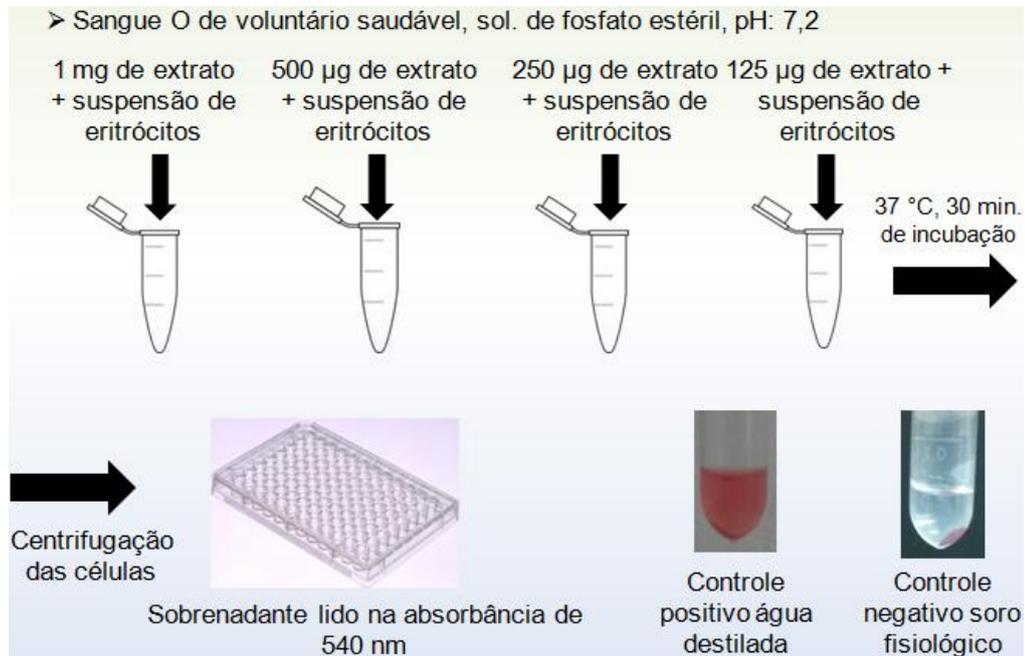
A_s = a absorbância na presença de extrato

A_b = a absorbância da solução de Triton X-100

3.4.2 Atividade Anti-Hemolítica ou Fragilidade osmótica eritrocitária

A atividade anti-hemolítica foi avaliada seguindo o método de Yang et al., (2005) de acordo com a Figura 14. Amostras de sangue (5 mL) foram obtidas a partir de um voluntário saudável. A centrifugação do sangue ocorreu a 1500 rotações por minuto durante 3 minutos. Eritrócitos humanos a partir de sangue citratado foram imediatamente isolados por centrifugação a 1500 rotações por minuto durante 10 minutos. O sedimento do sangue foi lavado três vezes em solução salina tampão de fosfato estéril (pH 7,2). O pellet foi ressuspenso em solução salina a 0,5%. Alíquota de 0,5 mL do extrato dissolvido em diversas concentrações (1000 µg - 125 µg/mL em solução salina) foram adicionados em 0,5 mL de suspensão de células. Após a incubação da mistura a 37 °C durante 30 minutos, a solução foi centrifugada a 1500 rotações por minuto durante 10 minutos. A atividade anti-hemolítica foi avaliada por meio da medição da absorbância no comprimento de onda correspondente a 540 nm. Para o controle positivo e negativo, água destilada e soro fisiológico foram utilizados, respectivamente. A percentagem de hemólise foi comparada com a absorbância do controle positivo, isto é, 0,615.

Figura 14. Esquema representativo da atividade anti- hemolítica



Fonte: A Autora.

3.5 Análises químicas: metabólitos secundários, compostos fenólicos, flavonóides, taninos e atividade antioxidante

Nesta secção, foram realizadas diversas análises químicas para a avaliação qualitativa dos metabólitos secundários, com a quantificação de compostos fenólicos, flavonóides, taninos e atividade antioxidante dos extratos de caule e raiz irradiados nas doses 0; 6; 8 e 10 kGy.

3.5.1 Ensaio Fitoquímico

Extratos controle e irradiados foram analisados por Cromatografia de Camada Delgada - CCD, técnica analítica bastante utilizada para a identificação de compostos encontrados em materiais vegetais. CCD é um método rápido, eficiente e largamente empregado em controle de qualidade de plantas medicinais, tanto em matéria-prima vegetal quanto em fitoterápicos derivados. Além disso, emprega pouco solventes, resultando em volume reduzido de resíduos gerados (JULIÃO et al., 2003). Para esta técnica, são utilizadas pequenas quantidades de amostra (microgramas a miligramas), em que as manchas formadas

podem ser reveladas por luz UV, vapores de iodo, soluções de cloreto férrico, tiocianoferrato de potássio, fluorescências e radiação ionizante, por exemplo. Os materiais adsorventes mais utilizados são sílica, alumina, celulose, poliamida e terra diatomácea (COLLINS et al., 2006).

Foram realizados ensaios fitoquímicos em CCD em sílica para a avaliação qualitativa dos metabólitos secundários encontrados em extratos de raiz e caule de *S. cumini*. Com a intensidade da cor das bandas, foi determinado se a presença do metabólito era fraca (+), média (++) , forte (+++) ou ausente (-). Os reagentes, padrões e reveladores utilizados estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4. Padrões, sistema de eluição e reveladores para a prospecção fitoquímica de *Syzygium cumini*

Classe de metabólitos secundários	Padrões	Sistema de eluição	Revelador	Referências
Flavonóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	Quercetina, rutina e ácido clorogênico	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner e Bladt (1996) Brasseur e Angenot (1986)
Triterpenos e esteroides	β-sitosterol	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne (1998)
Mono e sesquiterpenos	Timol	Tolueno:AcOEt (97:3 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Harborne (1998)
Cumarinas e Quinonas	Cumarina e lapachol	CHCl ₃ -MeOH (98:2 v/v)	KOH	Wagner e Bladt (1996)
Alcaloides	Pilocarpina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	Wagner e Bladt (1996)
Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	Catequina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídrica	Roberts et al. (1957)

Fonte: A Autora.

3.5.1.1 Flavonóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos

Para a identificação do flavonóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos, foram colocados em cromatoplas (MERCK®) 10 µl dos extratos de acetato de etila e a fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27 v/v) e depois revelado com o reagente de NEU (difenilaminatetraborato/polietilenoglicol). A presença de

flavonóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos foi observada em câmara UV no comprimento de onda de 365 nm quanto à formação de bandas de fluorescência alaranjadas (às vezes avermelhadas), amareladas ou esverdeadas (WAGNER; BLADT, 1996; BRASSEUR; ANGENOT, 1986).

3.5.1.2 *Triterpenos e esteróides*

A identificação de triterpenos e esteróides foi realizada a partir da transferência de 10 µl dos extratos de acetato de etila e a fase móvel de tolueno: acetato de etila (90:10 v/v) para cromatoplas (MERCK® F 250) com consequente revelação a partir do revelador de Lieberman- Burchard. A presença de triterpenos e esteróides foi observada em câmara UV no comprimento de onda de 365 nm. A formação de bandas de fluorescência variando de rósea a avermelhada foi indicativa da presença de triterpenos e esteróides nos extratos (HARBORNE, 1998).

3.5.1.3 *Mono e sesquiterpenos*

Para a identificação de mono e sesquiterpenos, o extrato foi aplicado em cromatoplas (MERCK® F 250) com alíquotas de 10 µl dos extratos de acetato de etila usando a fase móvel de tolueno: acetato de etila (97:3 v/v) e depois reveladas com o anisaldeído sulfúrico. A presença de mono e sesquiterpenos foi observada em câmara UV no comprimento de onda de 365 nm. A formação de bandas de fluorescência azuis escuras foi o critério utilizado para a confirmação da presença destes compostos (HARBORNE, 1998).

3.5.1.4 *Cumarinas e quinonas*

A identificação de cumarinas e quinonas foi possível a partir da aplicação de 10 µl do extrato acetato de etila na cromatoplasa usando a fase móvel de clorofórmio: metanol (98:2 v/v) (MERCK® F 250). A revelação ocorreu com o hidróxido de potássio em câmara UV no comprimento de onda de 365 nm. A formação de bandas de fluorescência azuis foi considerada como indicativa da presença de cumarinas (WAGNER; BLADT, 1996).

3.5.1.5 *Alcalóides*

Para a identificação de alcalóides, foram colocados em cromatoplasas (MERCK® F 250) 10 µl dos extratos de acetato de etila com a fase móvel de acetato de etila: ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:27 v/v) e depois reveladas com o reagente de Dragendorff. A presença de alcalóides foi observada em câmara UV no comprimento de onda de 365 nm. A formação de bandas de fluorescência alaranjadas intensas foram indicativas desses compostos (WAGNER; BLADT, 1996).

3.5.1.6 *Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas*

Para a identificação de proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas, 10 µL dos extratos de acetato de etila com a fase móvel de acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:27 v/v) foram colocados em cromatoplasas (MERCK® F 250) e depois reveladas com vanilina clorídrica. A presença de proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas foi observada em câmara UV no comprimento de onda de 365 nm. A formação de bandas de fluorescência vermelhas foram indicativas da presença dos metabólitos pesquisados (ROBERTS et al., 1957).

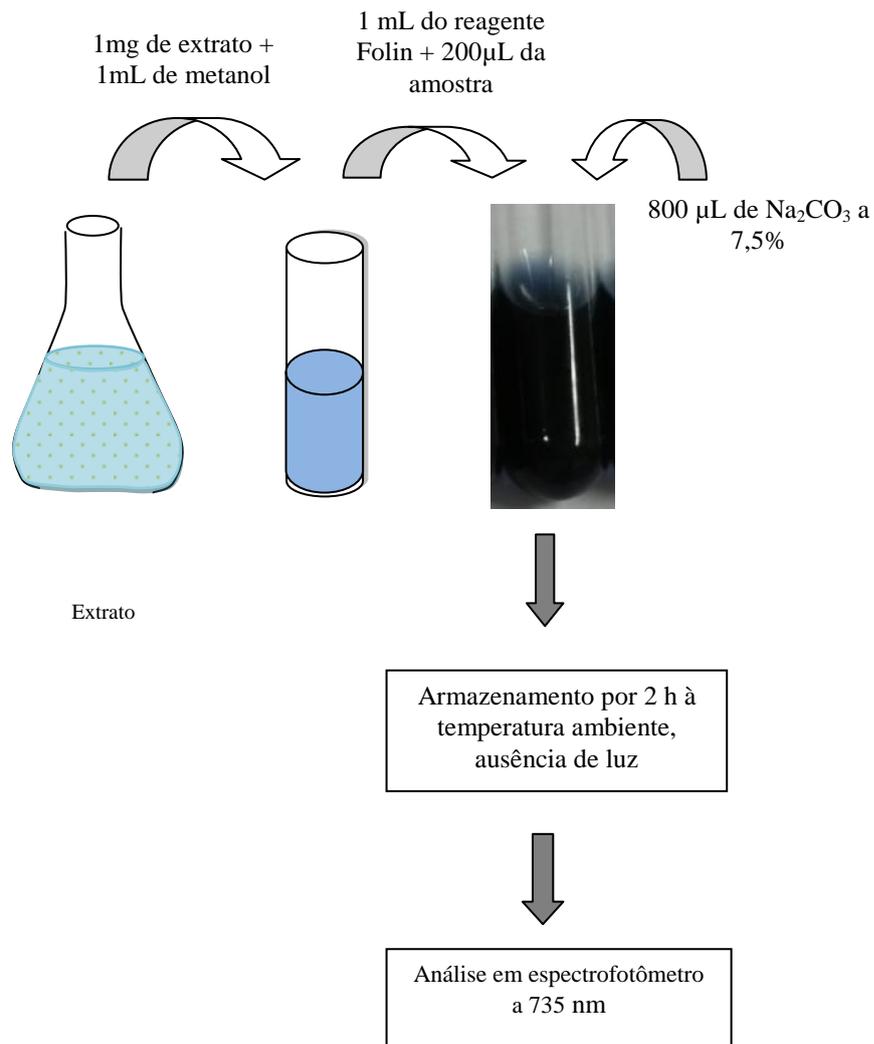
3.5.2 Teor de compostos fenólicos

A medição do teor de compostos fenólicos foi realizada de acordo com o metodologia utilizada por McDonald et al. (2001) (Figura 15). O procedimento realizado em triplicata, consistiu em adicionar 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10) a 200 µL da amostra (extrato+solvente). Em seguida, o conjunto (amostra+reagente) permaneceu em temperatura ambiente por três minutos e depois foram adicionados 800 µL de Na₂CO₃ 7,5% a cada tubo contendo a mistura. Após duas horas de incubação em temperatura ambiente e abrigados da luz, os tubos seguiram para leitura de absorbância em Espectrofotômetro Biochrom (Libra S22) no comprimento de onda de 735 nm. O ácido gálico foi utilizado para a obtenção da curva analítica. Branco analítico consistiu apenas do solvente utilizado para diluir as amostras. Como o ácido gálico foi utilizado como padrão, o teor de compostos fenólicos foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de cada fração, isto é, Equivalente de Ácido Gálico (mg EAG)/g de peso seco de extrato de planta. A relação entre a absorbância e o teor de compostos fenólicos é expressa pela Equação 2.

$$mg \text{ EAG } g^{-1} = 0,012x + 0,032 \quad (2)$$

x = Absorbância no comprimento de onda de 735 nm

Figura 15. Esquema para a quantificação dos compostos fenólicos totais



Fonte: A Autora.

3.5.3 Quantificação de flavonóides

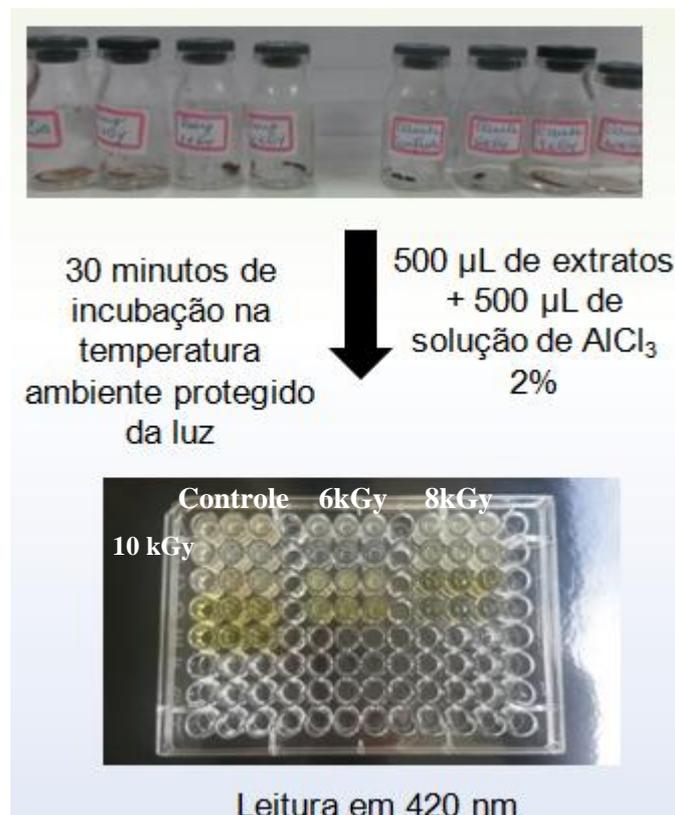
O conteúdo de flavonóides foi medido pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio por meio da metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998) (Figura 16). Ao volume de 500 µL dos extratos foram adicionados 500 µL da solução de cloreto de alumínio

(AlCl₃) a 2% preparada em meio contendo metanol. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e protegida da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro BioTek µQuant a 420 nm. O conteúdo de flavonóides foi estimado, utilizando uma curva padrão de quercetina (5-35 mg/mL), em que os resultados foram expressos em miligrama de quercetina equivalentes (mg EQ)/g de peso seco de extrato de planta. As quantificações foram realizadas em triplicata. A Equação 3 mostra a relação linear entre a absorbância de cada amostra e a quantidade de flavonóides.

$$mg EQ g^{-1} = 0,004x + 0,121 \quad (3)$$

x = Absorbância no comprimento de onda de 420 nm

Figura 16. Esquema representativo da quantificação de flavonóides



Fonte: A Autora.

3.5.4 Determinação dos taninos condensados

O teor de taninos condensados (TC) no extrato foi determinado por meio do método proposto por Swain e Hillis (1959) (Figura 17). A 1 mL dos extratos, foi adicionado 2 mL do reagente de vanilina (1 g de vanilina dissolvido em ácido sulfúrico a 70%). Logo após, a mistura foi incubada à temperatura de 50 °C por 20 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Biochrom Libra S22 no comprimento de onda de 500 nm após o arrefecimento da solução. Os resultados foram expressos em miligrama de catequina equivalentes (mg CE) por grama de peso seco de extrato de planta. As determinações foram realizadas em triplicata. A curva analítica é expressa pela Equação 4:

$$\text{mg CE g}^{-1} = 0,0218x + 0,004 \quad (4)$$

x = Absorbância no comprimento de onda de 500 nm

Figura 17. Esquema representativo da dosagem de taninos



Fonte: A Autora.

3.5.5 Atividade antioxidante

Foram utilizadas as metodologias descritas abaixo para determinar a atividade antioxidante dos extratos de raiz e caule controle (não irradiados) e irradiados. A atividade antioxidante total foi avaliada pelo método do Fosfomolibdênio.

3.5.5.1 DPPH (*Radical 2,2-difenil 1- picrilhidrazil*)

Neste ensaio, a atividade de radical livre do extrato foi medida em termos de hidrogênio doado usando o DPPH radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo produzido pela Sigma-Aldrich (BLOIS, 1958). Uma alíquota de 250 µL de solução de DPPH (1 mM) foi adicionada em 40 µL de concentrações variáveis dos extratos (31,25 a 1000 µg/mL). Tal procedimento foi necessário para avaliar as diferentes concentrações dos extratos irradiados. Após 30 minutos, a absorvância foi medida a 517 nm no leitor de Elisa BioTek µQuant (Figura 18). Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, Sigma -Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado como substância-padrão para o ensaio de DPPH. A atividade sequestradora de radicais livres foi calculada por meio da seguinte Equação:

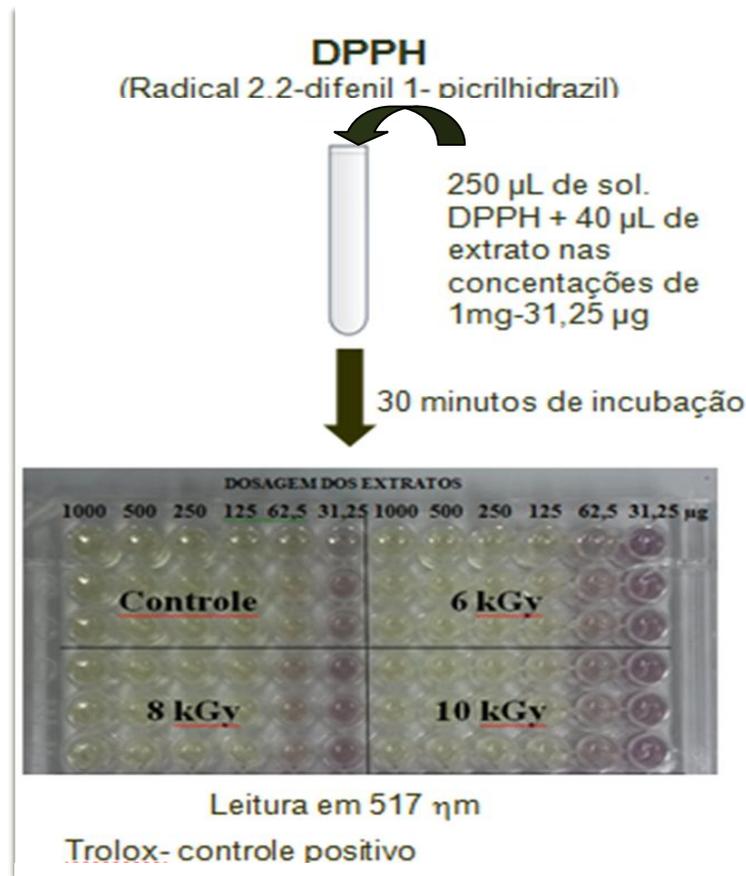
$$DPPH(\%) = \frac{(A_c - A_s) \times 100}{A_c} \quad (5)$$

em que,

A_c = a absorvância do controle (branco, sem extrato)

A_s = a absorvância na presença de extrato

Figura 18. Esquema representativo do método do DPPH (Sequestro de radicais livres)



Fonte: A Autora.

3.5.5.2 ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)

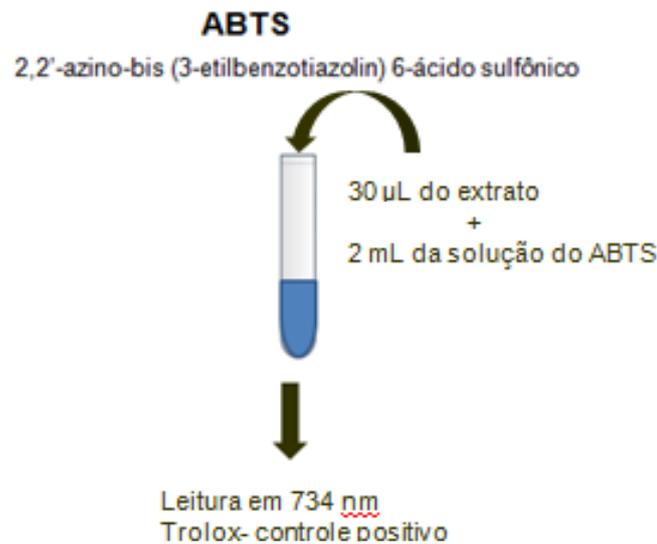
Para o ensaio ABTS (Figura 19), foi realizada uma reação de oxidação preparada com solução-padrão de ABTS 7 mM da Sigma-Aldrich com o persulfato de potássio 140 mM (concentração final) (RE et al., 1999). A mistura permaneceu no escuro à temperatura ambiente (23 °C - 25 °C) durante 12-16 h para a formação de radicais. A solução ABTS contendo os radicais livres foi diluída em etanol a absorvância de 0,700 (\pm 0,02) no comprimento de onda de 734 nm. O efeito da atividade antioxidante ABTS dos extratos foi estimado a partir da adição de alíquotas de 30 µL dos extratos irradiados com 3 mL da solução de ABTS preparada. As absorvâncias foram medidas a 734 nm em espectrofotômetro

Biochrom (Libra S 22) durante um intervalo de tempo de 6 minutos. Trolox foi empregado como padrão de referência. A curva analítica gerou a seguinte Equação:

$$TEAC = -0,003x + 0,663 \quad (5)$$

x = Absorbância das amostras

Figura 19. Esquema representativo do Ensaio do ABTS



Fonte: A Autora.

Os valores de porcentagem de inibição da oxidação foram calculados e representados graficamente em função da concentração do antioxidante padrão (Trolox) e expresso como capacidade antioxidante equivalente ao trolox, ou seja, TEAC em µmol (RE et al., 1999). Para a porcentagem de inibição do radical ABTS, foi empregada a seguinte Equação:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad (7)$$

A_c = a absorbância do controle (branco, sem extrato)

A_s = a absorbância na presença de extrato

3.5.5.3 Ensaio de Fosfomolibdênio

Para a avaliação da atividade antioxidante total (AAT%), foi empregado o método do complexo fosfomolibdênio (Figura 20) (PRIETO et al.,1999). As alíquotas de 0,1 mL de solução dos extratos irradiados e não irradiados, foi adicionado 1 mL de solução de reagente (ácido sulfúrico 600 mM, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio a 4 mM). Os tubos foram lacrados e levados a banho-maria a 90 °C durante 90 minutos. Após arrefecimento da solução, a absorvância foi medida no comprimento de onda de 695 nm em espectrofotômetro BioTek µQuant . Para o branco analítico, foi utilizado 1 mL de reagente e 0,1 mL de solvente utilizado para diluir o extrato. A atividade antioxidante total foi expressa com relação ao ácido ascórbico (200 µg/mL) e calculada pela Equação 7.

$$AA (\%) = \frac{A_s - A_c}{(A_{aa} - A_c)} \times 100 \quad (7)$$

A_s = a absorvância na presença de extrato

A_c = a absorvância do controle (branco, sem extrato)

A_{aa} = a absorvância do ácido ascórbico

Figura 20. Esquema representativo do Ensaio do Fosfomolibdênio

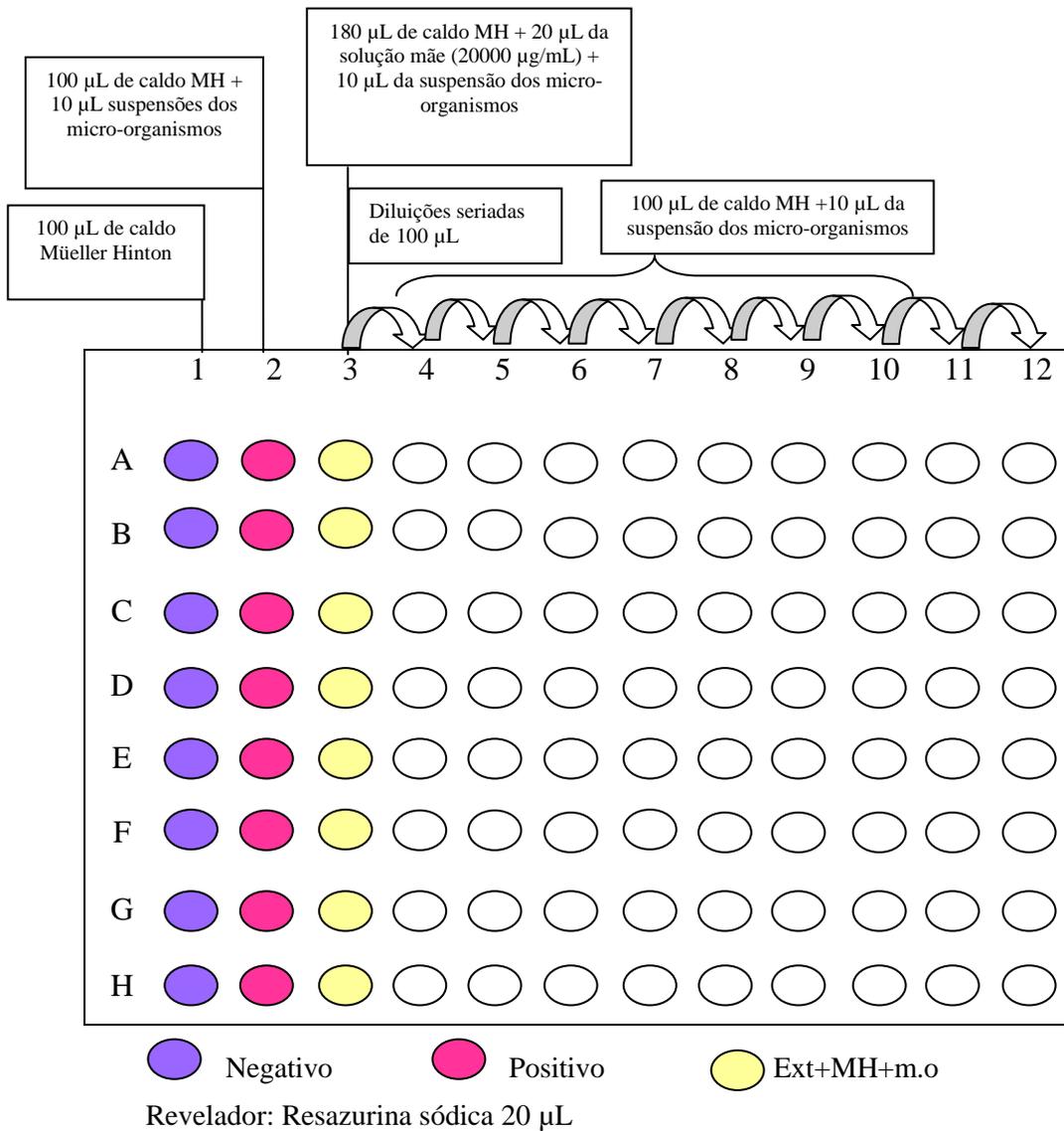


Fonte: A Autora.

3.6 Determinação da CMI e CMB

A determinação da Concentração Mínima Inibitória - CMI foi avaliada segundo os critérios adotados pela CLSI (2013). Foi utilizada uma placa multipoços (96 poços), enumerados de 1 a 12 na horizontal e de A a H na vertical (Figura 21). Uma solução-mãe do composto a ser testado a 20.000 µg/mL foi preparada e uma suspensão padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland do micro-organismo teste. Com exceção da terceira coluna, foram transferidos 100 µL do meio caldo Müeller Hinton (MH), sendo a primeira coluna o controle negativo, ou seja, só contendo os 100 µL do meio MH, e na segunda coluna foi adicionado 10 µL da suspensão microbiana padronizada aos 100 µL do meio MH (controle positivo). Na terceira coluna, foram transferidos 180 µL do meio MH e depois adicionado 20 µL da solução-mãe. A partir dessa coluna foram realizadas diluições seriadas na proporção 1:2, até a décima segunda coluna. Aos poços contendo as diluições, foram colocados 10 µL da suspensão do micro-organismo teste. A placa foi incubada durante 18 horas e após o período de incubação foi aplicado o corante revelador (resazurina), capaz de exibir de forma mais precisa se houve ou não turbidez no poço. O valor de CMI foi determinado na concentração do último poço em que não foi detectada turbidez visível. A partir deste poço, foram feitos semeios por esgotamento em placas com meio ágar Müeller Hinton para estabelecer a Concentração Mínima Bactericida - CMB, considerada a concentração em que não houve crescimento de colônias. Toda a análise foi realizada em triplicata conforme a metodologia proposta por Clinical and Laboratory Standards Institute (2013).

Figura 21. Determinação da concentração mínima inibitória



Fonte: A Autora.

3.6.1 Micro-organismos testes

Para os testes foram utilizados isolados de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* pertencentes à Coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco conforme a Tabela 5.

Tabela 5. Isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* com o respectivo número de registro na Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos e sítio de infecção.

Número	Micro-organismos	Sítio de Isolamento
UFPEDA 670	<i>Staphylococcus aureus</i>	Urina
UFPEDA 671	<i>Staphylococcus aureus</i>	Urina
UFPEDA 672	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sangue
UFPEDA 679	<i>Staphylococcus aureus</i>	Secreção de Ferida Operatória
UFPEDA 691	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ponta de Cateter
UFPEDA 700	<i>Staphylococcus aureus</i>	Secreção de Úlcera
UFPEDA 707	<i>Staphylococcus aureus</i>	Secreção Traqueal
UFPEDA 711	<i>Staphylococcus aureus</i>	Secreção de Ferida Operatória
UFPEDA 718	<i>Staphylococcus aureus</i>	Secreção Traqueal
UFPEDA 719	<i>Staphylococcus aureus</i>	Secreção de Ferida Operatória
UFPEDA 725	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ponta de Cateter
UFPEDA 728	<i>Staphylococcus aureus</i>	Orofaringe
UFPEDA 729	<i>Staphylococcus aureus</i>	Secreção Nasal
UFPEDA 730	<i>Staphylococcus aureus</i>	Escarro
UFPEDA 731	<i>Staphylococcus aureus</i>	Secreção de Ferida Operatória
UFPEDA 732	<i>Staphylococcus aureus</i>	Fragmento Ósseo
UFPEDA 64	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Secreção Peniana
UFPEDA 261	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Secreção de Ferida Operatória
UFPEDA 262	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Secreção de Úlcera
PSEUDO 1*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Secreção de ferida operatória
PSEUDO 2*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Secreção de ferida operatória
PSEUDO 3*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sangue

*Micro-organismos em fase inicial de registro

Fonte: A Autora.

3.7 Análise estatística

Análise descritiva (média e desvio padrão) foi usada para a discussão dos resultados, assumindo a distribuição normal das variáveis estudadas. Para o ensaio de atividade anti-hemolítica, foi utilizada análise de variância, após a confirmação dos requisitos quanto à distribuição normal dos resíduos do modelo e à homocedasticidade de variâncias. Para a comparação entre médias, foram estimados os intervalos de confiança em nível de 95% de confiança para as médias dos tratamentos, seguidas pela comparação gráfica dos resultados. Para o ensaio de sequestro de radicais livres, foi utilizado método de estimação não linear após 1.000 iterações (método dos quadrados mínimos) para os parâmetros da equação pré-selecionada a partir do conjunto de dados. Todas as análises foram realizadas no programa de computador STATISTICA (STATSOFT, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica dos extratos de raiz e caule reflete a habilidade dos extratos em realizar a hemólise das células sanguíneas. Na Tabela 6, os valores encontrados estão expressos em porcentagem de hemólise. Os resultados, na sua maioria, ficaram muito próximos a zero, o que indicou baixa taxa de hemólise, resultando em uma baixa toxicidade. Os extratos irradiados não aumentaram significativamente a taxa de hemólise, em quase todas as doses utilizadas e concentrações as porcentagens diminuíram, sendo aproximado à zero. É notada também que a porcentagem de hemólise está diretamente ligada à concentração dos extratos, à medida que a concentração do extrato diminui, a hemólise se aproxima a zero. Mesmo assim, os extratos não possuíam atividade hemolítica para células humanas, pois segundo Silva (2012b), uma taxa de hemólise menor que 20% é indicativa de que não há danos à membrana celular dos eritrócitos humanos, ou seja, uma baixa toxicidade para células eucarióticas.

Tabela 6. Atividade hemolítica em porcentagem para as concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg dos extratos de raiz e caules não irradiados e irradiados

Extrato	Doses	Atividade hemolítica (%)			
		1000 µg*	500 µg*	250 µg*	125 µg*
Raiz	Controle	0,60 ±0,5	0,30±0,05	0,18±0,09	0,12±0,05
	6 kGy	0,12±0,05	0,12±0,37	0,03±0,29	0
	8 kGy	0,21±0,05	0	0	0
	10 kGy	0,48±0,26	0,24±0,14	0,21±0,28	0
Caule	Controle	0,45±0,16	0,09±0,16	0	0
	6 kGy	0,24±0,05	0	0	0
	8 kGy	0,27±0,18	0	0	0
	10 kGy	1,42±0,05	0,24±0,05	0	0

* Média e desvio padrão (n = 3)

Fonte: A autora.

A confirmação da atividade citotóxica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos. Os eritrócitos são células muito utilizadas para estudos de citotoxicidade *in vitro*, devido, principalmente, ao fácil acesso e à grande disponibilidade, permitindo a investigação do efeito tóxico ou protetor de princípios ativos sobre a membrana celular. Após este ensaio, a baixa ocorrência de hemólise pôde ser diretamente relacionada com a baixa citotoxicidade dos extratos, contudo é evidente a necessidade de ensaios mais específicos de citotoxicidade (BATISTA et al., 2007; FIRMINO, 2007; SCHIAR et al., 2007; COSTA, 2015).

Na literatura, os relatos sobre atividade hemolítica de extratos irradiados de plantas do gênero *Syzygium* são escassos. Em uma pesquisa para avaliar a atividade hemolítica *in vitro* da fração hexano dos caules de *Mollinedia clavigera* Tul. conhecida como pimenteira, capixim-pimenteira ou capixim, para a concentração de 100 µg/mL foi encontrada uma porcentagem de hemólise de 77,02% em comparação ao controle positivo (hemólise 100%), seguida da concentração de 250 µg/mL com 75,06% da mesma fração (HOMEM, 2015), resultados bem acima dos encontrados no presente trabalho, quando comparados com os extratos controle e os irradiados. Em pesquisa com extratos de caule de *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. conhecida popularmente como bombardeira ou algodoeiro de seda, Costa (2015) constatou que o extrato bruto etanólico, bem como a fração clorofórmica do caule de *C. procera*, não induziu hemólise quando avaliado na concentração de 10 µg/mL. Porém, nas demais concentrações foi verificada atividade hemolítica frente aos eritrócitos dos tipos sanguíneos ABO com valores que variaram de 39,75% a 97,4%. Esses valores foram muito superiores aos encontrados no presente estudo (menor que 1,4%).

4.1.1 Atividade Anti-Hemolítica ou Fragilidade Osmótica Eritrocitária

A avaliação da atividade anti-hemolítica consistiu em verificar se o extrato de raiz e caule tem efeito citoprotetor frente às hemácias, evitando, assim, sua hemólise. Na Tabela 7 estão listados os valores referentes à hemólise em comparação ao controle positivo, que causou 100% de rompimento dos eritrócitos. Para facilitar o entendimento, a Tabela 8 mostra a porcentagem do efeito citoprotetor dos extratos frente os eritrócitos.

Tabela 7. Percentagem de hemólise dos extratos de raiz e caule irradiados

Amostras	Doses	Hemólise* (%)			
		Quantidade do extrato			
		1000 µg	500 µg	250 µg	125 µg
Raiz	Controle	10,40 %	8,29 %	8,29 %	7,31 %
	6 kGy	13,65 %	9,91 %	9,43 %	8,45 %
	8 kGy	8,45 %	8,13 %	7,15 %	7,15 %
	10 kGy	8,78 %	7,31 %	7,15 %	6,99 %
Caule	Controle	8,61 %	7,15 %	8,94 %	6,82 %
	6 kGy	26,66 %	9,43 %	8,94 %	7,80 %
	8 kGy	29,26 %	15,12 %	8,13 %	7,47 %
	10 kGy	37,72 %	10,40 %	8,13 %	7,47 %

*valor referente à média de três repetições (absorbância)

Fonte: A Autora.

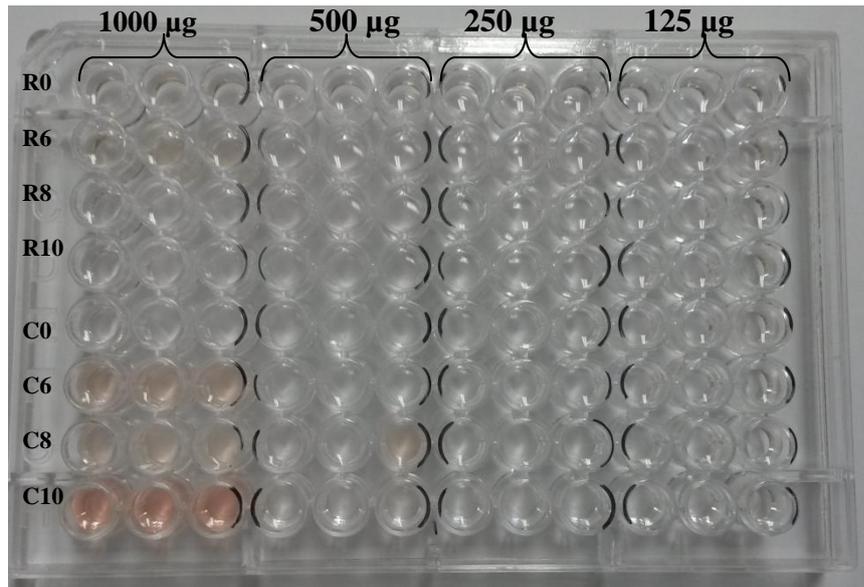
Tabela 8. Percentual do efeito citoprotetor (atividade anti-hemolítica) dos extratos irradiados e controle de raiz e caule de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Amostras	Doses	Efeito citoprotetor (%)			
		Quantidade do extrato			
		1000 µg	500 µg	250 µg	125 µg
Raiz	Controle	89,6 %	91,71 %	91,71 %	92,69 %
	6kGy	86,35 %	90,09 %	90,57 %	91,55 %
	8kGy	91,55 %	91,87 %	92,85 %	92,85 %
	10 kGy	91,22 %	92,69 %	92,85 %	93,01 %
Caule	Controle	91,39 %	92,85%	91,06 %	93,18 %
	6kGy	73,34 %	90,57%	91,06 %	92,20 %
	8kGy	70,74 %	84,88 %	91,87 %	92,53 %
	10 kGy	62,28 %	89,6 %	91,87 %	92,53 %

Fonte: A Autora.

A visualização desses resultados pode ser encontrada na Figura 22, em que é mostrada a placa multipoços com os extratos nas quatro concentrações utilizadas. A coloração transparente indicou a ausência de hemólise.

Figura 22. Microplaca com o ensaio de atividade anti-hemolítica de extratos de raiz e caule de *S. cumini* (L.) Skeels. Tons avermelhados indicam hemólise dos eritrócitos.



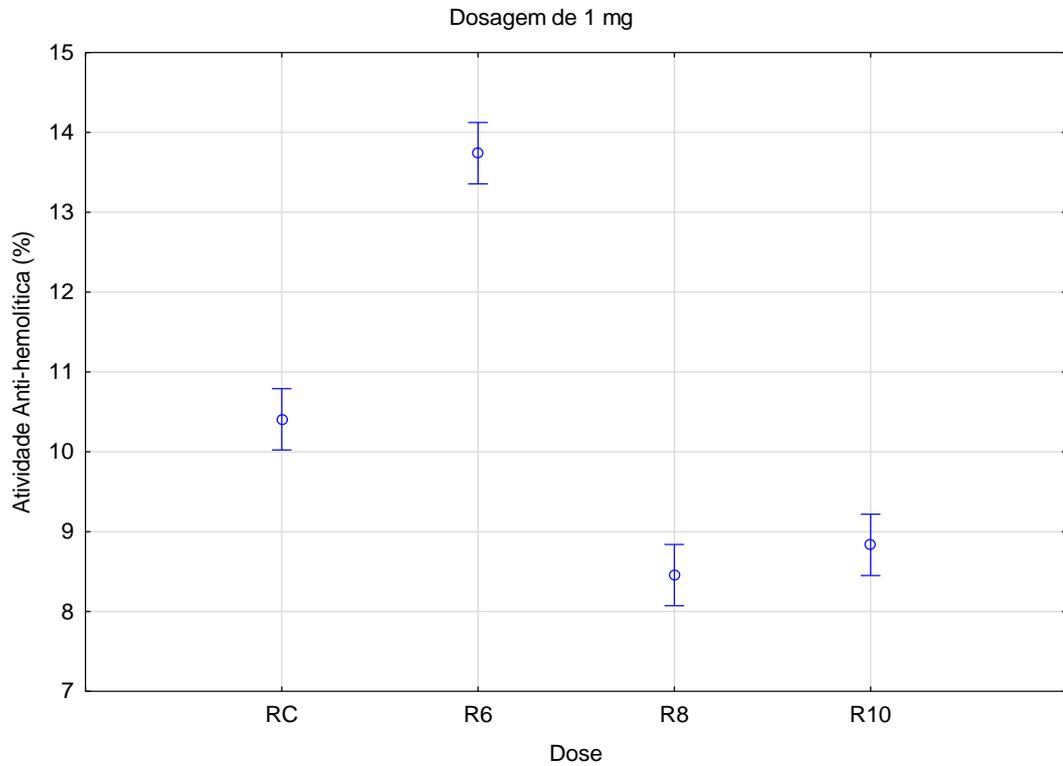
Legenda: R0: raiz controle; R6: extrato de raiz irradiado com 6 kGy; R8: raiz 8 kGy; R10: raiz 10 kGy; C0: caule controle; C6: caule 6 kGy; C8: caule 8 kGy; C10: caule 10 kGy.

Fonte: A Autora.

Portanto, a maioria dos extratos de caule e raiz apresentou proteção às hemácias para que não ocorresse a hemólise, principalmente nas menores concentrações, em que a porcentagem de hemólise não passou de 8,45% (Tabela 8). De acordo com os resultados da análise estatística, foi possível verificar que os extratos controle e irradiados de raiz nas concentrações de 1 mg e 125 µg tiveram diferenças significativas em nível de 95% de confiança (Figuras 23 e 24). Por outro lado, não houve indícios estatísticos em nível de 95% de confiança de que as médias para as dosagens de 250 e 500 µg sejam diferentes entre si.

Na alíquota de 1 mg, os extratos de raiz controle e irradiado com 6 kGy tiveram diferenças estatísticas em nível de 5% de significância, enquanto que as médias dos extratos irradiados com 8 e 10 kGy não foram diferentes entre si (95% de confiança) conforme mostra a Figura 23.

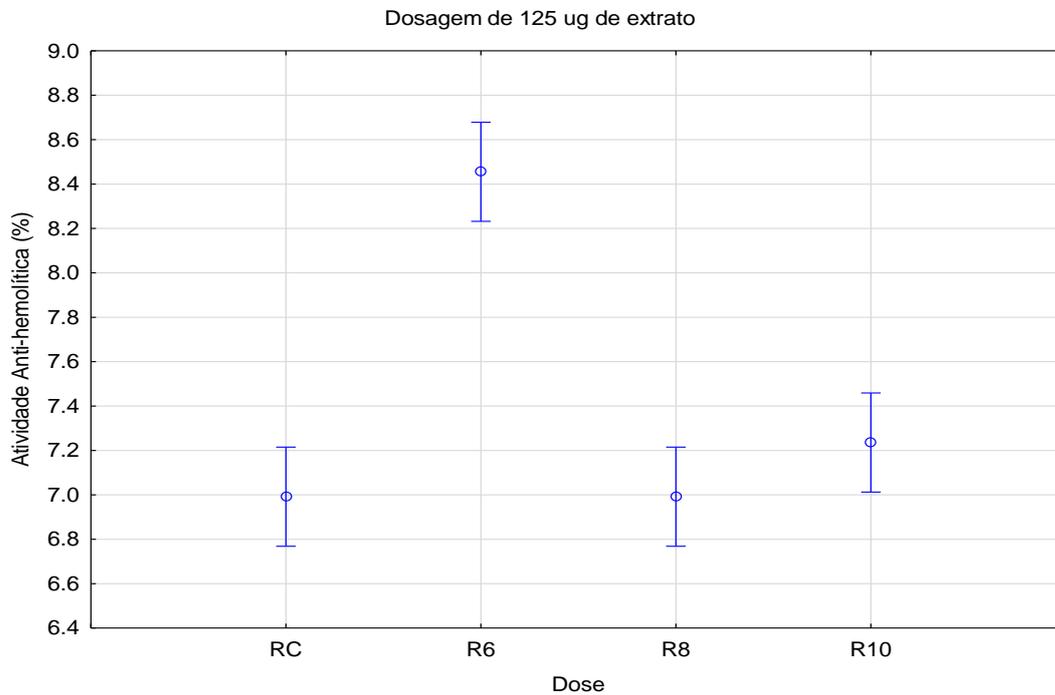
Figura 23. Teste de comparação entre médias do extrato de raiz controle (RC) e irradiados nas doses 6 (R6), 8 (R8) e 10 (R10) kGy na alíquota de 1 mg.



Fonte: A autora.

O mesmo comportamento aconteceu para a alíquota de 125 µg, em que houve diferença significativa em nível de 95% de confiança entre o extrato de raiz irradiado com 6 kGy e aqueles irradiados com 8 e 10 kGy. Diferentemente da dose de 1 mg, não houve diferenças entre os extratos controle e os irradiados com dose de 8 e 10 kGy (Figura 24).

Figura 24. Teste de comparação entre médias do extrato de raiz controle (RC) e irradiados nas doses 6 (R6), 8 (R8) e 10 (R10) kGy na alíquota de 125 µg.

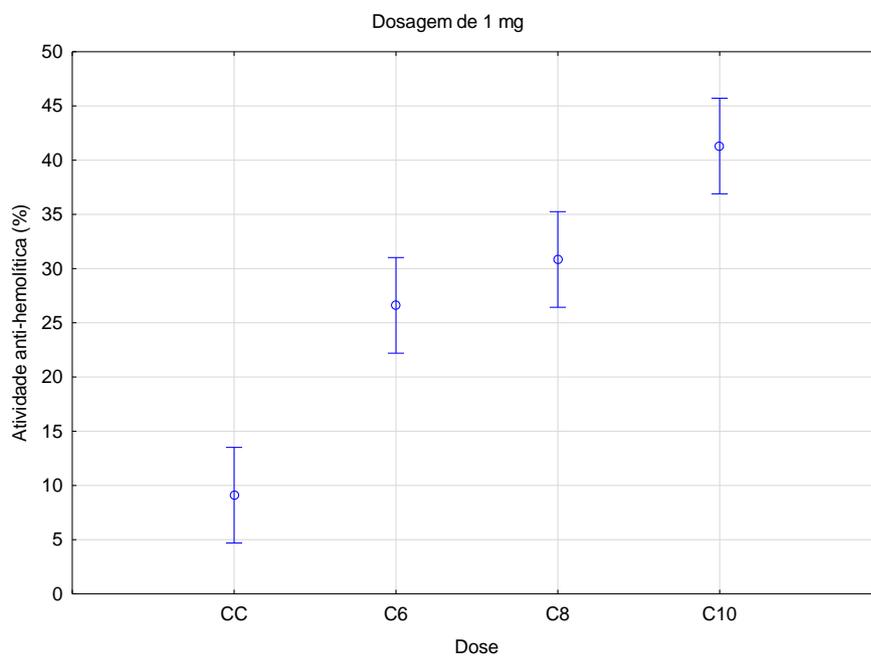


Fonte: A autora.

Para os extratos de caule, houve diferenças significativas em nível de 95% de confiança entre as médias de atividade anti-hemolítica para todas as concentrações conforme mostram as Figuras 25, 26, 27 e 28. Para a dosagem de 1 mg, houve diferença entre o extrato de caule controle e aqueles irradiados, contudo foi possível afirmar que os extratos irradiados com 6 e 8 kGy não diferiram entre si (Figura 25).

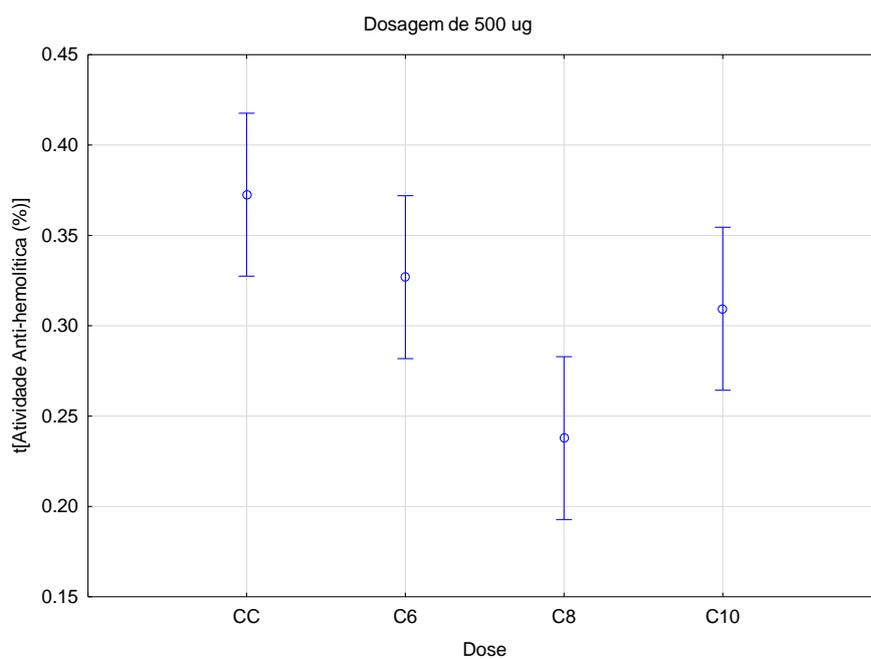
De acordo com os resultados da análise estatística, para a alíquota de 500 µg dos extratos de caule, houve diferença entre o extrato controle e aquele irradiado com 8 kGy. Não houve indícios estatísticos de diferença entre o extrato controle e os irradiados com 6 e 10 kGy (Figura 26). Na verdade, os resultados apresentados se mostraram bastante variáveis para os extratos de caule, em que, para a dosagem de 250 µg, a análise mostrou diferença entre o controle e 6 kGy, mas não houve diferenças entre os irradiados (6, 8 e 10 kGy) e nem entre o controle e aqueles irradiados com 8 e 10 kGy (Figura 27). Para a dosagem de 125 µg, houve diferença significativa em nível de 95% de confiança entre o extrato controle e os irradiados com 8 e 10 kGy (Figura 28).

Figura 25. Teste de comparação entre médias do extrato de caule controle (CC) e irradiados nas doses 6 (C6), 8 (C8) e 10 (C10) kGy na alíquota de 1 mg.



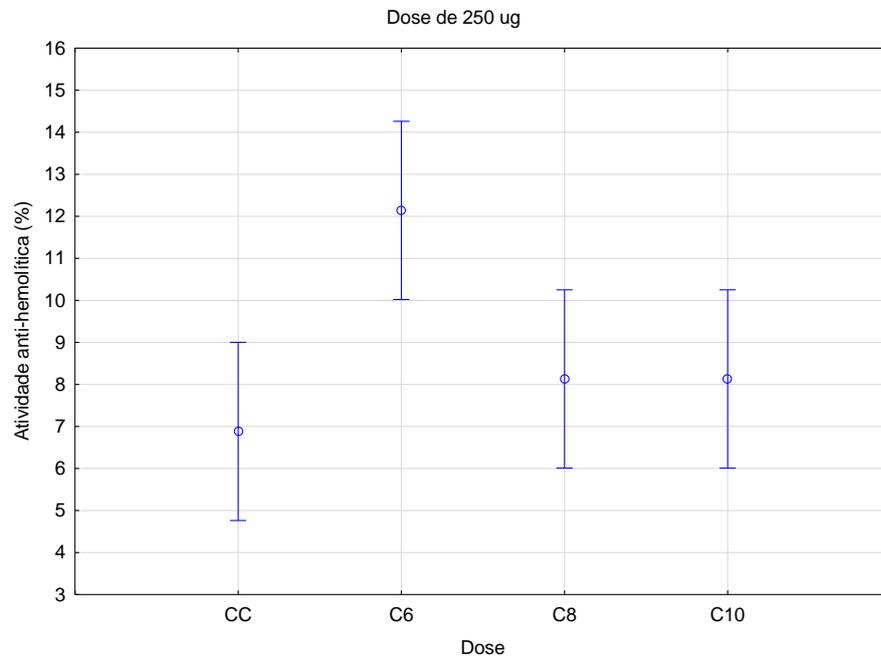
Fonte: A autora.

Figura 26. Teste de comparação entre médias do extrato de caule controle (CC) e irradiados nas doses 6 (C6), 8 (C8) e 10 (C10) kGy na alíquota de 500 µg.



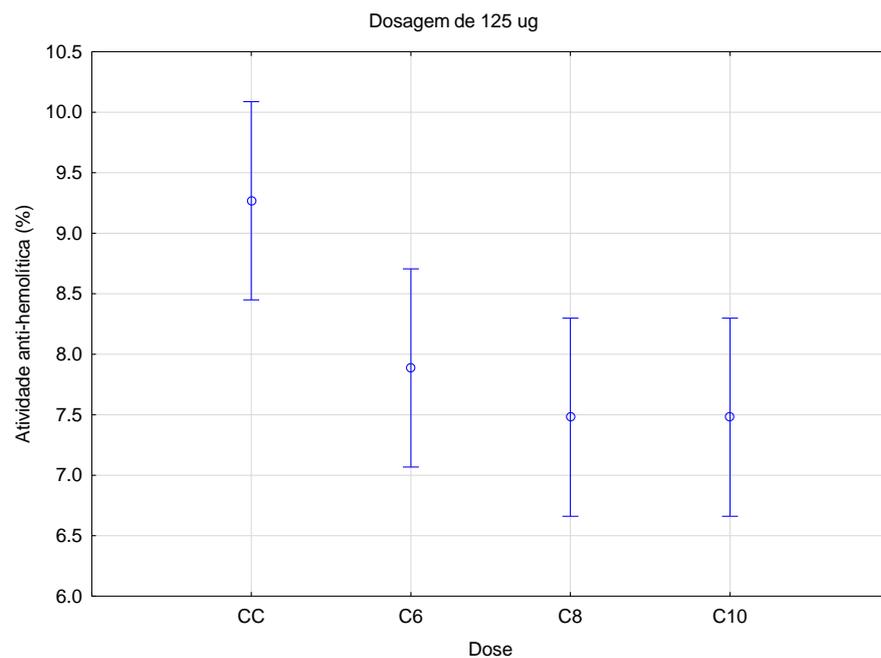
Fonte: A autora.

Figura 27. Teste de comparação entre médias do extrato de caule controle (CC) e irradiados nas doses 6 (C6), 8 (C8) e 10 (C10) kGy na alíquota de 250 µg.



Fonte: A autora.

Figura 28. Teste de comparação entre médias do extrato de caule controle (CC) e irradiados nas doses 6 (C6), 8 (C8) e 10 (C10) kGy na alíquota de 125 µg.



Fonte: A autora.

Em seu estudo de atividade anti-hemolítica, Costa (2015) constatou que nenhum extrato de caule de *Calotropis procera* (Ait.) Ait.F. foi capaz de proteger o eritrócito, pois tanto o extrato etanólico bruto quanto a fração clorofórmica na concentração de 10 µg/mL permitiram a ocorrência de hemólise. A porcentagem média de hemólise obtida foi cerca de 90% (COSTA, 2015). Por outro lado, os extratos metanólicos de sementes e da polpa do fruto de *S. cumini* nas concentrações variando entre 0 e 1,5 mg/mL apresentaram as respectivas faixas de atividade anti-hemolítica induzida por água oxigenada (H₂O₂) de 50-64% e 62%-95% (SAHA et al., 2013). Além de inovadores por tratar-se de extratos de caule e de raiz, os resultados confirmaram os efeitos da radiação gama sobre a atividade anti-hemolítica por meio do aumento do efeito citoprotetor como ocorreu para os extratos de raiz irradiados com 8 e 10 kGy na concentração de 1 mg e para os extratos de caule irradiados com 8 kGy na alíquota de 500 µg. Por outro lado, a irradiação não afetou negativamente essa propriedade com relação aos extratos não irradiados para as concentrações de 125 µg de extrato de raiz e para as de 250 µg de extrato de caule. Vale ressaltar que a irradiação gama prejudicou o efeito citoprotetor do extrato de caule na dosagem de 1 mg.

4.2 Ensaio fitoquímico

Na prospecção fitoquímica, foi realizada análise qualitativa dos extratos controle e irradiado no qual foram encontrados flavonóides, derivados cinâmicos, triterpenos, esteróides, mono e sesquiterpenos, cumarinas, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas como mostra a Tabela 9.

Tabela 9. Prospecção fitoquímica de extratos controle e irradiados de acetato de etila das raízes e caule de *Syzygium cumini*

Classe de metabólitos secundários	Raiz		Caule	
	Controle/Irradiados		Controle/Irradiados	
Flavonóides	+(¹)		+(¹)	
Derivados cinâmicos	+		+	
Saponinas	-		-	
Alcalóides	-		-	
Triterpenos e Esteroides	+++		+++	
Monoterpenos e Sesquiterpenos	+++		+++	
Cumarinas	+		++	
Quinonas	-		-	
Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas (taninos)	+++ ⁽²⁾		+++ ⁽²⁾	

(+++) forte; (++) médio; (+) fraco; (-) ausente

⁽¹⁾ 4'-OH flavonóides

⁽²⁾ Proantocianidinas oligoméricas e poliméricas

Fonte: A autora.

Flavonóides, derivados cinâmicos, triterpenos, esteróides, mono e sesquiterpenos, cumarinas e proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas (taninos) foram os metabólitos encontrados neste trabalho sobre *S. cumini*. Saha et al. (2013) avaliaram a presença de metabólitos secundários em extratos de sementes e de polpas de fruto de *S. cumini*, assim como o suco dos frutos, encontrando grande quantidade de polifenóis e flavonóides. Ainda, identificou a presença de cafeína (alcaloide) na ordem de 8 a 24 mg/g nos extratos de sementes e de polpas de frutos e suco de frutos.

Bustamante et al. (2005), ao avaliar extratos da casca do caule de *Pterodon emarginatus* Vog. (Fabaceae), popularmente conhecida como sucupira branca, detectaram a presença de flavonóides, heterosídeos saponínicos, resinas, traços de esteróides e triterpenóides na avaliação farmacognóstica. Iha et al. (2008) em seu estudo fitoquímico com goiaba, encontraram flavonóides no extrato etanólico, enquanto que, na fração de acetato de etila, encontraram taninos. Nesse caso a fração mais rica em flavonóides foi a mais polar, ou

seja, a butanólica. Neste estudo, taninos também foram encontrados na fração acetato de etila nos extratos controle e irradiados.

Um estudo com *Sapium glandulosum* (L.) Morong (Família Euphorbiaceae), realizado por Ocampos et al. (2013), encontraram flavonóides e taninos hidrolisáveis e condensados no extrato de acetato de etila de caule.

A cana-do-brejo *Costus spicatus* (Jacq.) Sw (Costaceae) apresentou no extrato aquoso de caule, taninos e saponinas, na raiz, somente foi encontrado saponina. No extrato hidroalcoólico, o caule apresentou fenóis, leucoantocianidinas, flavonas, saponinas e alcaloides, enquanto que no extrato de raiz foram encontrados fenóis, leucoantocianidinas, flavonas, saponinas (PAES et al., 2013).

Nos extratos etanólicos de caule e raiz de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae), foram encontrados flavonóides, triterpenos, ácido gálico e catequinas (SILVA et al., 2012). Os trabalhos mostram que o acetato de etila é um solvente eficaz para a extração de metabólitos secundários de plantas que possuem atividade antimicrobiana, dentre outras.

4.3 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos nos extratos de acetato de etila de raiz foram quantificados na ordem de 189 (± 2) mg EAG/g de amostra para o extrato controle e 213 (± 2) mg EAG/g de amostra para o extrato irradiado com 10 kGy. Para o extrato de caule, os valores encontrados foram 205 (± 4) e 174,2 ($\pm 1,7$) mg EAG/g de amostra para o extrato controle e aquele irradiado com 10 kGy, respectivamente. Comparando com os resultados encontrados na literatura, o maior valor identificado foi 21.000 mg/g de compostos fenólicos totais equivalente de ácido tânico encontrado em sementes secas moídas de *S. cumini* (SAHA et al., 2013).

A radiação aumentou a concentração de compostos fenólicos em todas as doses dos extratos de raiz analisados, não acontecendo o mesmo com os extratos do caule, sendo o maior valor encontrado na dose de 10 kGy para o extrato de raiz (Tabela 10). A Figura 29 ilustra melhor os resultados, facilitando a comparação entre os resultados obtidos para compostos fenólicos.

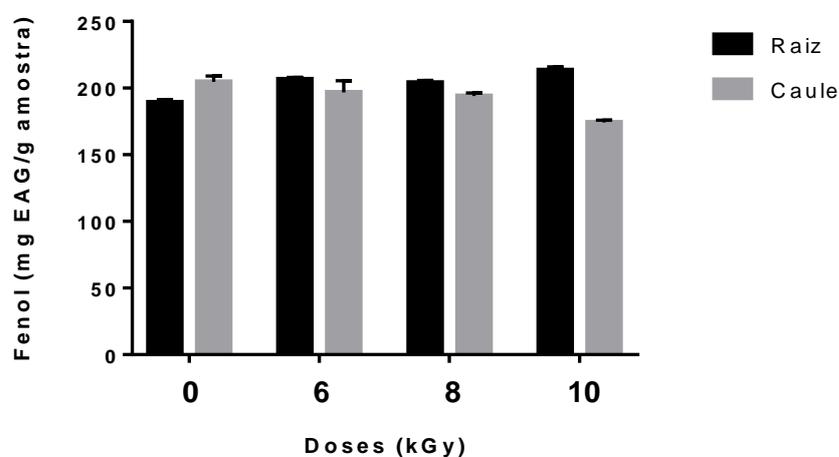
Tabela 10. Compostos fenólicos em extratos irradiados de raiz e caule de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Dose	Extratos de raiz	Extrato de caule
	Fenol (mg EAG/g extrato)	Fenol (mg EAG/g amostra)
0 kGy	189 ± 2	205 ± 4
6 kGy	206,5 ± 1,4	197 ± 8
8 kGy	204 ± 1,6	194 ± 2
10 kGy	213,4 ± 2	174,2 ± 1,7

Fonte: A autora.

Estudos realizados por Santos (2008) com cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn.) evidenciaram um aumento na concentração de compostos fenólicos e taninos em folhas e cascas de caule, apresentando comportamento dose-dependente. Para *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, Santos et al. (2010) verificaram que a quantidade de compostos fenólicos diminuiu com o aumento das doses de radiação nos extratos de caule, assim como ocorreu para os extratos irradiados de *S. cumini* de caule analisados no presente estudo, sendo os menores valores encontrados na dose de 10 kGy (Figura 29).

Figura 29. Comparação entre os resultados de fenol em extratos de raiz e caule de *Syzygium cumini* (L.) Skeels após irradiação gama



Fonte: A autora.

Sousa et al., (2007) analisando cinco plantas medicinais, de famílias diferentes da Myrtaceae, do semiárido piauiense obtiveram valores dos compostos fenólicos das cascas de caule de *T. brasiliensis* de $45,8 \pm 0,8$ mg de EAG/g de material vegetal seco. O valor encontrado nesse estudo tanto para extrato de caule quanto para o extrato de raiz são até cinco vezes maiores que o relatado por esses autores, indicando o potencial de utilização dos extratos *S. cumini* como antissépticos, germinicidas e antioxidantes (SATHYAPRABHA et al., 2011; BERLOWSKI et al., 2013).

Por outro lado, em um trabalho com cascas de caule de *Anacardium occidentale* L. para quantificar compostos fenólicos, o valor encontrado foi 345 ± 16 mg EAG/g (CHAVES et al., 2010), valores maiores que os encontrados neste estudo.

A partir da análise de várias partes da planta *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae) para a quantificação dos compostos fenólicos, Silva (2012b) encontrou valores de 206 ± 4 mg EAG/g e $150,3 \pm 0,4$ mg EAG/g para os extratos etanólicos de caule e raiz, respectivamente. Esses valores foram próximos àqueles encontrados nesta pesquisa para o extrato controle do caule e da raiz.

Valadares et al. (2015) com *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke. encontraram valor de 301 ± 7 mg EAG/g para o extrato metanólico. Gindri et al., (2010) dosaram compostos fenólicos em raiz de *Urera baccifera* (L.) Gaudich (Urticaceae) conhecida como urtiga-brava, na ordem de $29,8 \pm 1,5$ mg EAG/g. A variação percentual encontrada em extratos da casca de caule irradiados de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan com 5; 7,5 e 10 k Gy em estudo realizado por Santos et al. (2010) foi entre $7,8 \pm 0,4$ e $8,2 \pm 0,3$, mostrando que a radiação não teve influência significativa no conteúdo dos compostos fenólicos totais. Neste estudo, como não houve influência da radiação nos extratos de caule e de raiz, foi demonstrada certa radiorresistência dos extratos de *S. cumini*.

4.4 Flavonóides

Os resultados da quantificação de flavonóides em extratos de raiz e caule de *S. cumini* irradiados com 0 kGy, 6 kGy, 8 kGy e 10 kGy encontram-se na Tabela 11. Para o extrato de raiz, foi quantificado valor de 247 ± 4 mg EQ/g para o controle, observando um decréscimo na dose de 6 kGy e de 10 kGy, que atingiram 150 ± 6 mg EQ/g e 176 ± 6 mg EQ/g, respectivamente. Para a dose de 8 kGy, houve um acréscimo de 10% nos teores de flavonóides, alcançando 273 ± 4 mg EQ/g. Para o extrato de raiz, foi observado acréscimo de 30% no extrato irradiado com 6 kGy com relação ao controle, contudo houve

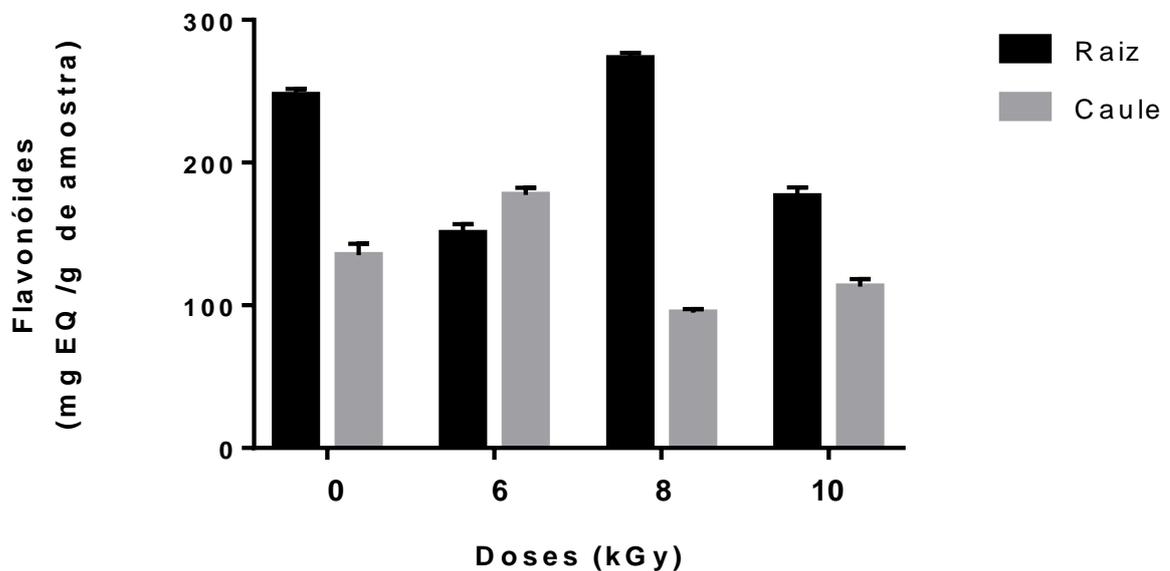
redução do teor de flavonóides nos extratos irradiados com 8 e 10 kGy (Tabela 11). A comparação entre os resultados obtidos pode ser melhor visualizada na Figura 30. De modo geral, a radiação gama aumentou o teor de flavonóides nas doses de 8 kGy para o extrato de acetato de etila da raiz e na dose de 6 kGy para o extrato de caule.

Tabela 11. Flavonóides em quercetina equivalente (mg EQ/g) quantificados em extratos irradiados de raiz e caule de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Dose	Raiz (mg EQ/g)	Caule (mg EQ/g)
0 kGy	247 ± 4	135 ± 8
6 kGy	150 ± 6	177 ± 5
8 kGy	273 ± 3	94 ± 2
10 kGy	176 ± 6	113 ± 5

Fonte: A autora.

Figura 30. Teores em quercetina equivalente (mg EQ/g) de flavonóides em extratos irradiados de raiz e caule de *S. cumini*



Fonte: A autora.

Valadares et al. (2015) encontraram valores de flavonóides em extrato metanólico de caule de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke. Ao quantificar flavonóides em raiz, Gindri et al. (2010) encontraram valores de $16,4 \pm 0,1$ mg/g nos extratos

de raiz de *Urera baccifera* (L.) Gaudich. Ambos os estudos com valores bem abaixo daqueles encontrados neste estudo. Como não foram encontradas as informações referentes ao procedimento de preparo das plantas para a obtenção dos extratos, tal diferença pode ser explicada pelo teor de água. Além disso, extratos de polpa de frutos e de sementes de *S. cumini* apresentaram quantidades significativas de flavonóides (valor máximo de aproximadamente 7.800 mg/g catequina equivalente para o extrato de sementes) conforme estudo realizado por Saha et al. (2013).

Valores de flavonóides entre 79 ± 3 e 197 ± 33 mg de apigenina por 100 g de amostra em extrato aquoso fresco e seco, respectivamente, de raiz de *Cochlospermum angolense* (borututu) foram encontrados por Vinha et al., (2012). Lee et al. (2011), encontraram valor de flavonóides de 2,2 mg EQ/g de peso de extrato seco de cascas de caule de *Rhododendron yedoense* var. *Poukhanense*.

Ácidos fenólicos, flavonóides e taninos são considerados os principais compostos fenólicos com propriedades farmacológicas presentes na dieta humana (MOLLER et al., 2009). Contudo, dados sobre o incremento/redução como ocorreu para o extrato de raiz irradiado com 8 kGy são escassos na literatura, demonstrando o ineditismo dos resultados obtidos pelo nesta pesquisa.

4.5 Taninos condensados

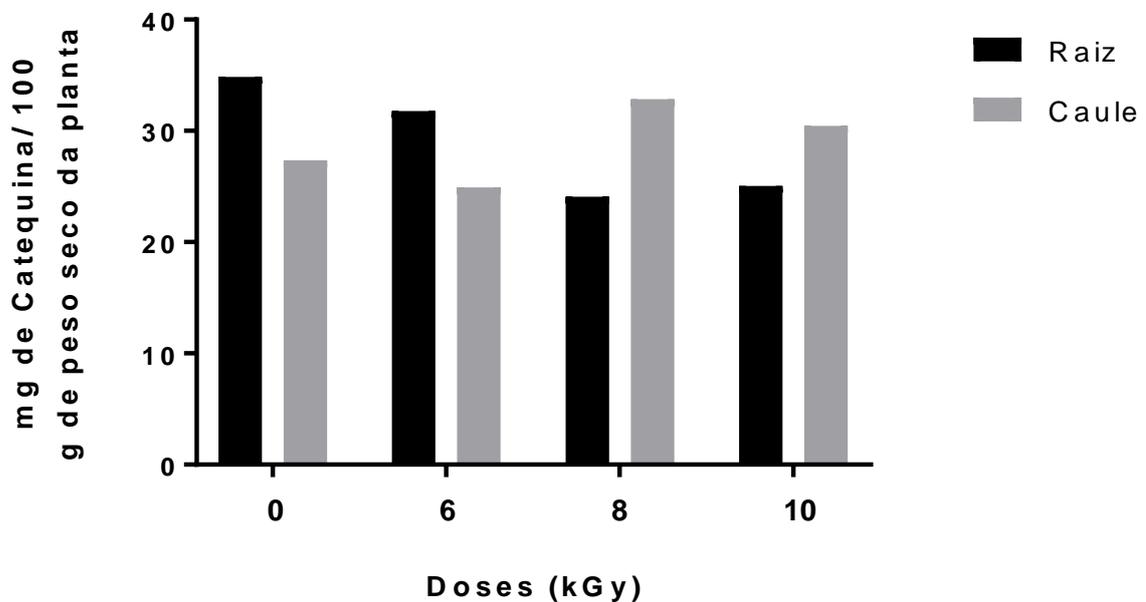
Na Tabela 12, são apresentados os valores de taninos quantificados nos extratos de raiz e caule irradiados. As concentrações variaram de 25,0 a 34,9 mg de catequina por 100 g de peso seco da planta para os extratos de raiz. A radiação ocasionou a diminuição de até 30% na concentração dos taninos nos extratos de raiz. Para os extratos de caule de *S. cumini*, a faixa de valores encontrados foi 24,9 -32,8 mg de catequina por 100 g de peso seco da planta (Tabela 12). Houve um acréscimo na quantidade de taninos nos extratos de caule irradiados com 8 e 10 kGy com relação ao extrato controle (Figura 31).

Tabela 12. Teor de taninos em extratos de raiz e caule controle e irradiados de *S. cumini* (L.) Skeels

Extratos irradiados	Raiz	Caule
	mg de catequina por 100 g de peso seco da planta	
0 kGy	34,9	27,3
6 kGy	31,8	24,9
8 kGy	24,1	32,8
10 kGy	25,0	30,5

Fonte: A autora.

Figura 31. Teor de taninos em extratos de raiz e caule irradiados de *S. cumini* (L.) Skeels



Fonte: A autora.

Siqueira (2011) realizou a quantificação de taninos na vegetação da Caatinga do Estado de Pernambuco, sendo que valores entre 1,5 a 12,6 mg de taninos foram obtidos apenas para 12 das 21 plantas, cujas cascas de caule foram analisadas. Duas plantas tiveram suas raízes analisadas e apenas uma apresentou taninos com o valor de 1,2 mg/100 g de peso seco de extrato da planta (SIQUEIRA, 2011). Ao analisar 14 plantas de nove famílias utilizadas popularmente com propriedades farmacológicas, Cabral (2014) encontrou valores de taninos variando de $0,02 \pm 0,02$ a $8,21 \pm 0,22$ mg. Assim, valores muito abaixo dos encontrados nesta pesquisa têm sido reportados na literatura. Por outro lado, valores de $19,1 \pm 0,8$ mg/g de taninos condensados foram encontrados em um estudo realizado por

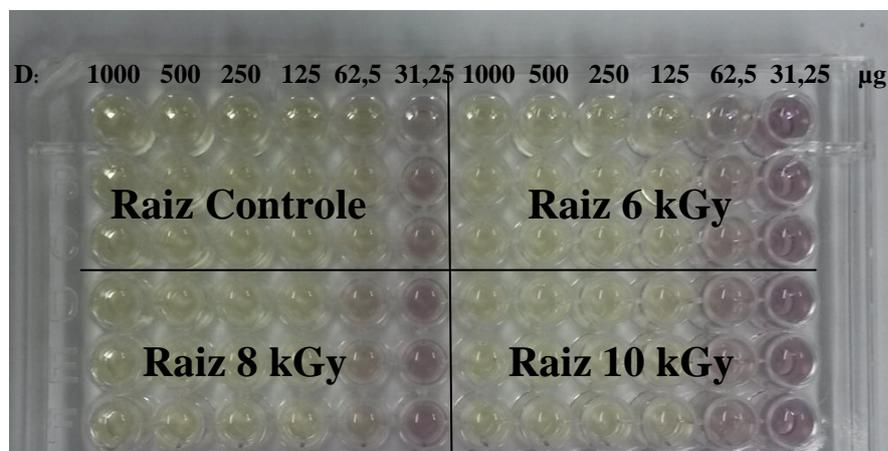
Gindri et al., (2010) em raízes de *Urera baccifera* (L.) Gaudich. Ex Wedd. Vinha et al. (2012) quantificou o teor de taninos em raiz de *Cochlospermum angolense* conhecida como Borututu e encontrou valores de $11,3 \pm 0,8$ e $16,0 \pm 0,9$ mg para extrato aquoso fresco e seco, respectivamente.

Em trabalho realizado com extratos irradiados com doses de 0, 5, 7,5 e 10 kGy de *A. colubrina* (Vell.) Brenan, Santos et al. (2010) obtiveram valores entre $4,0 \pm 0,2$ e $4,6 \pm 0,3$ mg de Catequina/100 g, não constatando o efeito da radiação no teor de taninos na planta. Trabalhos sobre os efeitos do tratamento com radiação gama em extratos vegetais são escassos, porém já foi observada, de acordo com Yalcin et al., (2011), a ação da radiação com ^{60}Co nas doses entre 0,5 e 10 kGy, promovendo alterações nos conteúdos de polifenóis e taninos.

4.6 DPPH (Radical 2,2-difenil 1- picrilhidrazil)

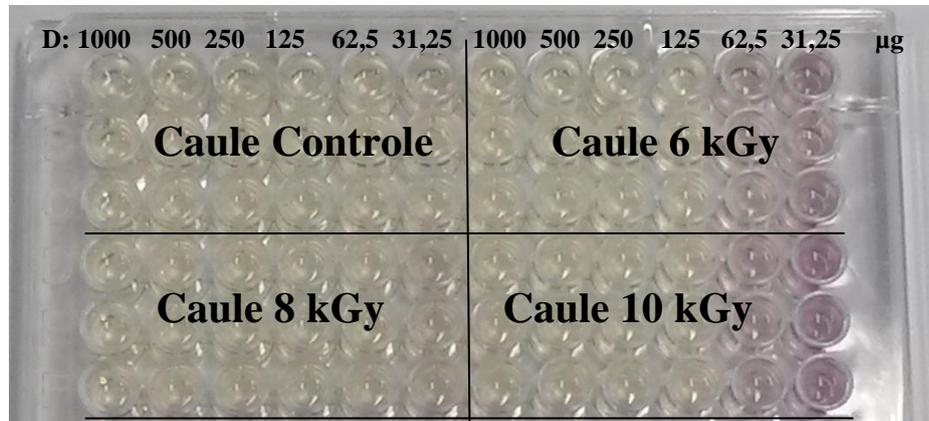
Nas Figuras 32 e 33, é possível visualizar as imagens das microplacas, no momento da realização dos ensaios de DPPH para a avaliação qualitativa dos extratos de raiz e caule. A cor amarela indica a alta atividade do extrato no sequestro de radicais livres, enquanto que a lilás demonstra a fraca atividade.

Figura 32. Placa multipoços com os resultados da atividade antioxidante pelo método do DPPH de extrato de raiz controle e irradiados. D = concentração do extrato. A cor amarela representa a forte atividade antioxidante dos extratos analisados, a lilás, pouca atividade.



Fonte: A Autora

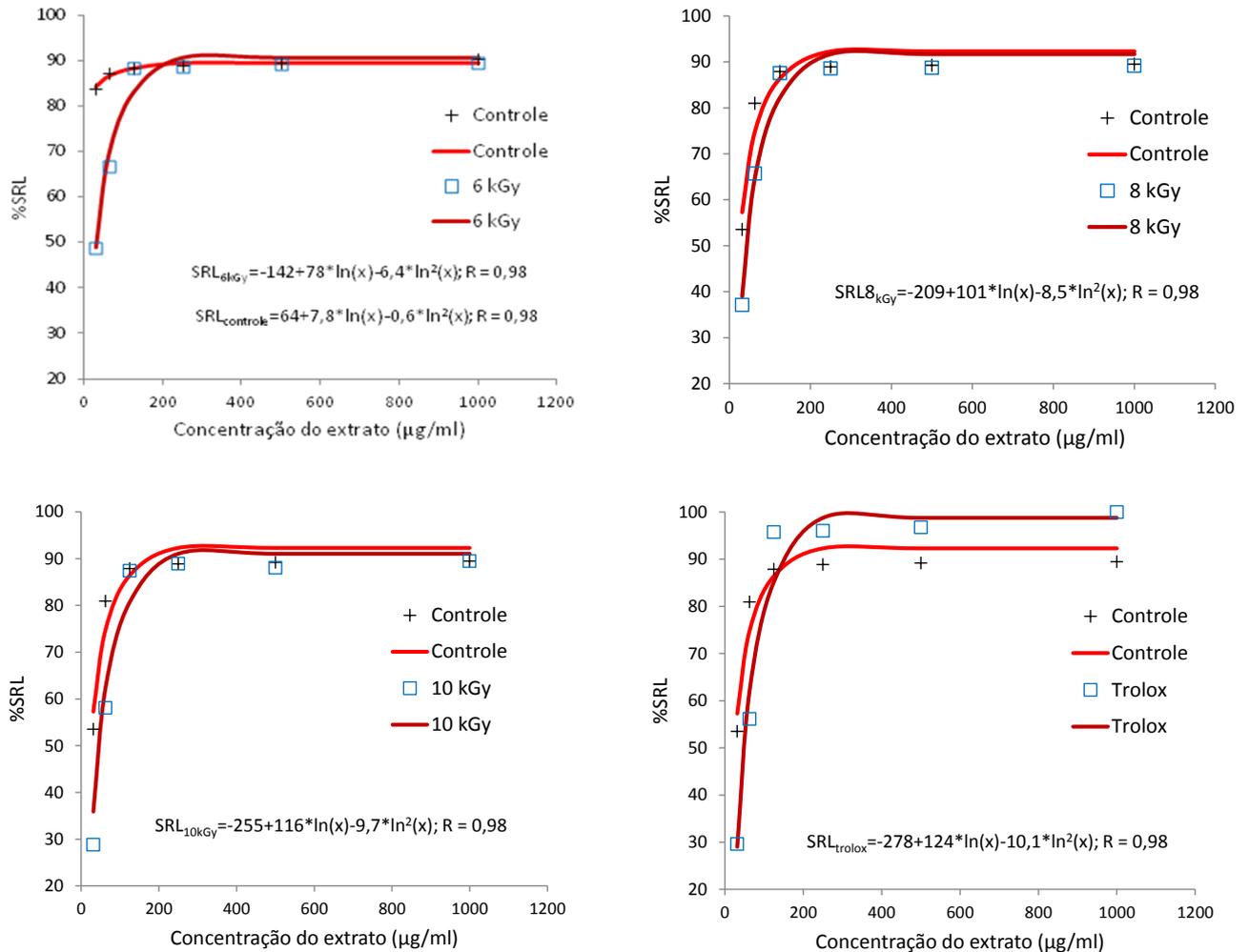
Figura 33. Placa multipoços com os resultados da atividade antioxidante pelo método do DPPH de extrato de caule controle e irradiados de *S. cumini*. D = concentração do extrato. A cor amarela indica o poder oxidante dos extratos, a lilás, fraca atividade.



Fonte: A Autora

Os resultados da atividade antioxidante pelo método de DPPH dos extratos de raiz e caule controle e irradiados estão representados nas Figuras 34 e 35, em que foram realizados ajustes não lineares para a análise estatística a partir do método dos quadrados mínimos. Nos extratos irradiados, na menor concentração, em comparação com o extrato controle, houve uma diminuição na SRL%. A partir das alíquotas de 250 µg/mL de extrato, não houve diferença estatística de modo que o aumento da alíquota não influenciou no aumento da SRL%. Assim, foi possível concluir que o extrato raiz controle na menor concentração (31,25 µg/mL) obteve porcentagem melhor (53,49%) no sequestro dos radicais de DPPH, sendo melhor também, que o controle positivo do experimento que obteve 29,62% na mesma concentração (Figura 34).

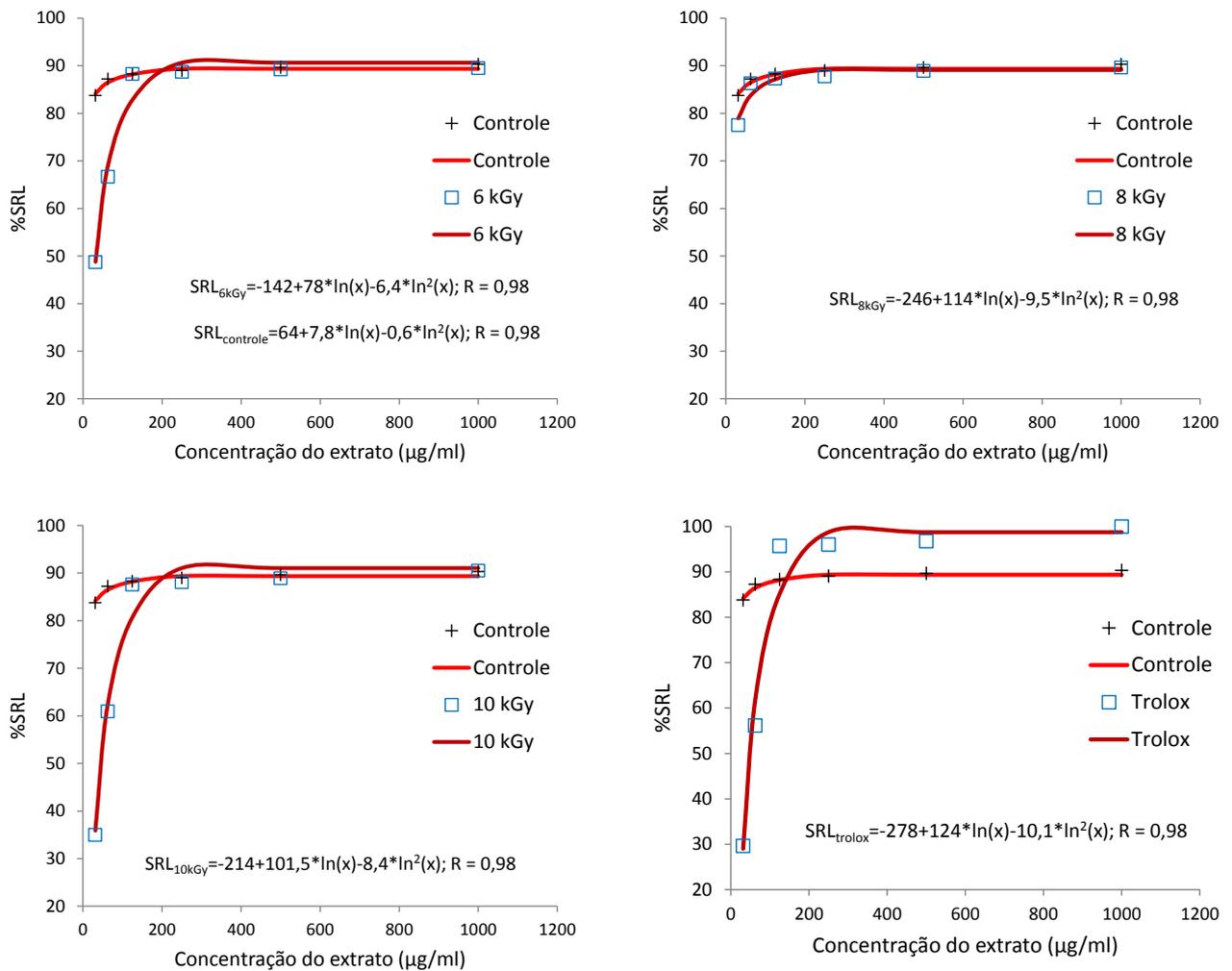
Figura 34. Porcentagem de Sequestro de Radicais Livres – SRL% dos extratos irradiados de raiz de *S cumini* e trolox



Fonte: A autora.

Para os extratos de caule (Figura 35), pela análise dos valores expostos nos gráficos, a radiação teve influência significativa no sequestro do radical 2,2-difenil 1- picrilhidrazil, reduzindo a SRL% nas doses de 6 e 10 kGy. O extrato irradiado com 8 kGy obteve percentual próximo ao encontrado no extrato controle. Como ocorrido para os extratos de raiz, as maiores diferenças foram encontradas para concentrações menores que 250 µg/mL. Esses resultados mostram radiorresistência (mostraram que não são sensíveis à radiação) dos extratos de raiz e caule de *S. cumini*.

Figura 35. Porcentagem de Sequestro de Radicais Livres – SRL% dos extratos irradiados de caule de *S. cumini* e trolox



Fonte: A autora.

Rodrigues et al. (2011), para a atividade antioxidante de extratos de caule de *Senna obtusifolia*, com concentração de 500 µg/mL de extrato encontraram valores de 17,9%. Com essa quantidade de extrato, foi obtido em média 89% de sequestro do radical DPPH para os extratos controle e irradiados. Para os extratos metanólicos de sementes *S. cumini*, a concentração aproximada de 0,1 mg/mL do extrato proporcionou valor de SRL de aproximadamente 97% (SAHA et al., 2013).

O extrato de acetato de etila do caule de *Calamintha baetica* inibiu 20% dos radicais livres com a concentração de 0,75 mg /mL, enquanto que na concentração de 1,5 mg/mL houve estabilização no sequestro desses radicais (AZEVEDO, 2014). No extrato controle deste trabalho, na concentração de 31,25 µg/mL de extrato de caule inibiram 83,75% do radical DPPH.

Estudo realizado por Sousa et al. (2007) com cascas de caule de *T. brasiliensis* e com raiz de *C. prunifera*, encontrou valores de 70% de inibição dos radicais DPPH com 50 µg/mL e 90% com 100 µg/mL para extratos de caule além de 15% e 20% para extratos de raiz nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, respectivamente. Por outro lado, Chaves et al. (2010) encontraram que o extrato etanólico das cascas do caule apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos e percentual de atividade antioxidante.

Assim como verificado anteriormente para o ensaio do radical DPPH não houve evidências que comprovem o efeito negativo da radiação gama sobre a capacidade de sequestro de radicais livres de extratos de caule e raiz de acordo com os resultados.

4.7 Método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)

Na Tabela 13 estão representados os valores em porcentagem de inibição do radical ABTS dos extratos controle e irradiados de raiz e caule. No ensaio, extratos na concentração de 1000 µg/mL foram utilizados para avaliar a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (antioxidante sintético similar à vitamina E), que foi usado como controle do experimento. Com os valores mostrados na Tabela 14, foi possível constatar que a radiação aumentou a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) para o extrato de raiz irradiado com 10 kGy, não havendo aumento do TEAC nas doses de 6 e 10 kGy para o extrato de caule.

Tabela 13. Porcentagem de inibição do radical ABTS

Extratos	% Inibição ABTS	
	Raiz	Caule
0 kGy	80,19%	97,22%
6 kGy	84,48%	60,24%
8 kGy	79,08%	92,52%
10 kGy	96,39%	60,94%

Fonte: A autora.

Tabela 14. Capacidade antioxidante equivalente a Trolox - TEAC

Doses	TEAC	
	Raiz (μmol)	Caule (μmol)
0 kGy	1.730	2.140
6 kGy	1.840	1.250
8 kGy	1.710	2.030
10 kGy	2.120	1.270

Fonte: A autora.

Ao analisar a fração de acetato de etila do extrato de casca de caule de *Ficus microcarpa*, Ao et al. (2008) encontraram fortes efeitos antioxidantes e alta quantidade de compostos fenólicos totais, em que os valores de DPPH e de radical ABTS^{•+} foram 4,83 $\mu\text{g/mL}$ e 1,62 $\mu\text{g/mL}$. Esses resultados são bastante inferiores ao encontrados nesse estudo.

Em um estudo da atividade antioxidante de cascas de caule de *Rhododendron yedoense* var. *Poukhanense*, Lee et al. (2011) encontraram valores de 95,5 % \pm 0,9% de inibição do radical ABTS com concentração do extrato com cerca de 230 $\mu\text{g/mL}$. O resultado foi considerado melhor do que o encontrado para o extrato controle de raiz e próximo ao encontrado para o extrato não irradiado de caule analisados neste estudo. Um efeito inibitório significativo do radical ABTS dos extratos de raiz de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers foi encontrado por Roy et al. (2011) com valor de 0.026 \pm 0.94 mg/mL para 50% de inibição dos radicais. Os valores de inibição do radical ABTS encontrados foram menores que aqueles encontrados neste trabalho.

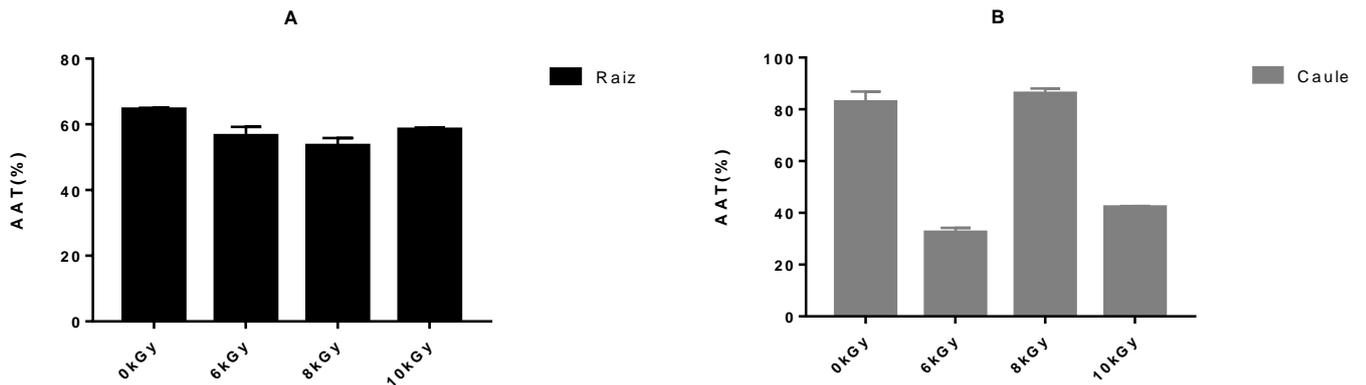
De acordo com os resultados encontrados, o método ABTS comprovou as mudanças ocasionadas a partir da irradiação gama de extratos de raiz e caule de *S. cumini*, em que as características antioxidantes dos extratos irradiados nas doses de 10 kGy para os extratos de raiz e de 8 kGy para o extrato de caule foram aumentadas em comparação com os extratos não irradiados.

4.8 Ensaio de Fosfomolibdênio

O ensaio do fosfomolibdênio indica a atividade antioxidante total (AAT) do extrato comparado ao Ácido Ascórbico. Os resultados encontrados variaram de 64,6 % \pm 0,5 % a 58,4 % \pm 0,6 % para os extratos controle e irradiados de raiz e 83 % \pm 4 % a 42,2 % \pm 0,4 %

para os extratos de caule (Figura 36). É possível notar que os maiores valores de AAT foram encontrados no extrato de caule irradiado com 8 kGy com valores bastante próximos àqueles do extrato controle. Houve redução na AAT para o extrato de caule irradiado a 6 kGy, indicando a complexidade dos efeitos da radiação gama sobre extratos naturais de plantas.

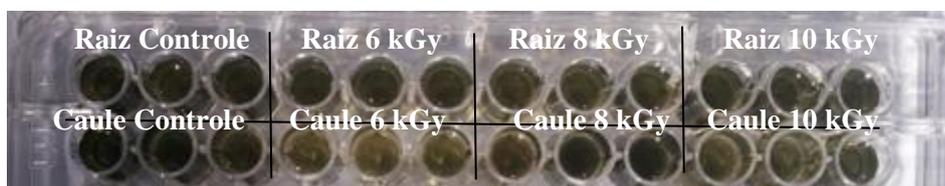
Figura 36. AAT em % dos extratos irradiados de raiz (A) e caule (B) de *S. cumini*



Fonte: A Autora

Na Figura 37 está ilustrada a placa multipoços com o conjunto extrato-solução do reagente para a verificação qualitativa dos resultados encontrados. A tonalidade da cor verde é diretamente proporcional à AAT%, ou seja, tonalidade mais escura indica maior AAT% dos extratos.

Figura 37. Imagem da placa multipoços com o conjunto extrato-solução de reagente da esquerda para direita: extratos de raiz controle e irradiados e na segunda linha extratos de caule. A tonalidade da cor verde representa a intensidade da AAT.



Fonte: A Autora

Estudo realizado com a fração acetato de etila do extrato de *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., encontrou valor de AAT de 25,7 % \pm 1,2% (KRAUSE, 2013), valor bem abaixo do encontrado nessa pesquisa. Homem (2015), avaliou a atividade antioxidante de extrato e

frações de folhas e caules de *Mollinedia clavigera* Tul., obtendo na fração de acetato de etila do caule, percentual de 33,5% de AAT. Mareček et al. (2016) estudaram cinco variedades de batata quanto à atividade antioxidante sendo que as variedades Agria, Red Anna e Princess continham as maiores atividades antioxidantes (19; 23 e 23 mg de TEAC por 100 g de matéria seca).

Como anteriormente ressaltado, são escassos os trabalhos sobre a atividade antioxidante total de extratos irradiados, demonstrando o ineditismo desta pesquisa científica. A irradiação notadamente aumentou as características específicas dos extratos quanto à atividade antioxidante a partir dos ensaios de DPPH e ABTS sem prejudicar a AAT dos extratos irradiados.

4.9 Avaliação das propriedades antioxidantes dos extratos irradiados

Na Tabela 15 está apresentada a compilação dos resultados obtidos nos ensaios realizados com os extratos irradiados dos extratos de raiz e caule de *S. cumini*, enquanto que a Figura 38 mostra o comportamento dos extratos de raiz (Figura 38a) e de caule (Figura 38b) com relação aos valores encontrados e as doses estudadas.

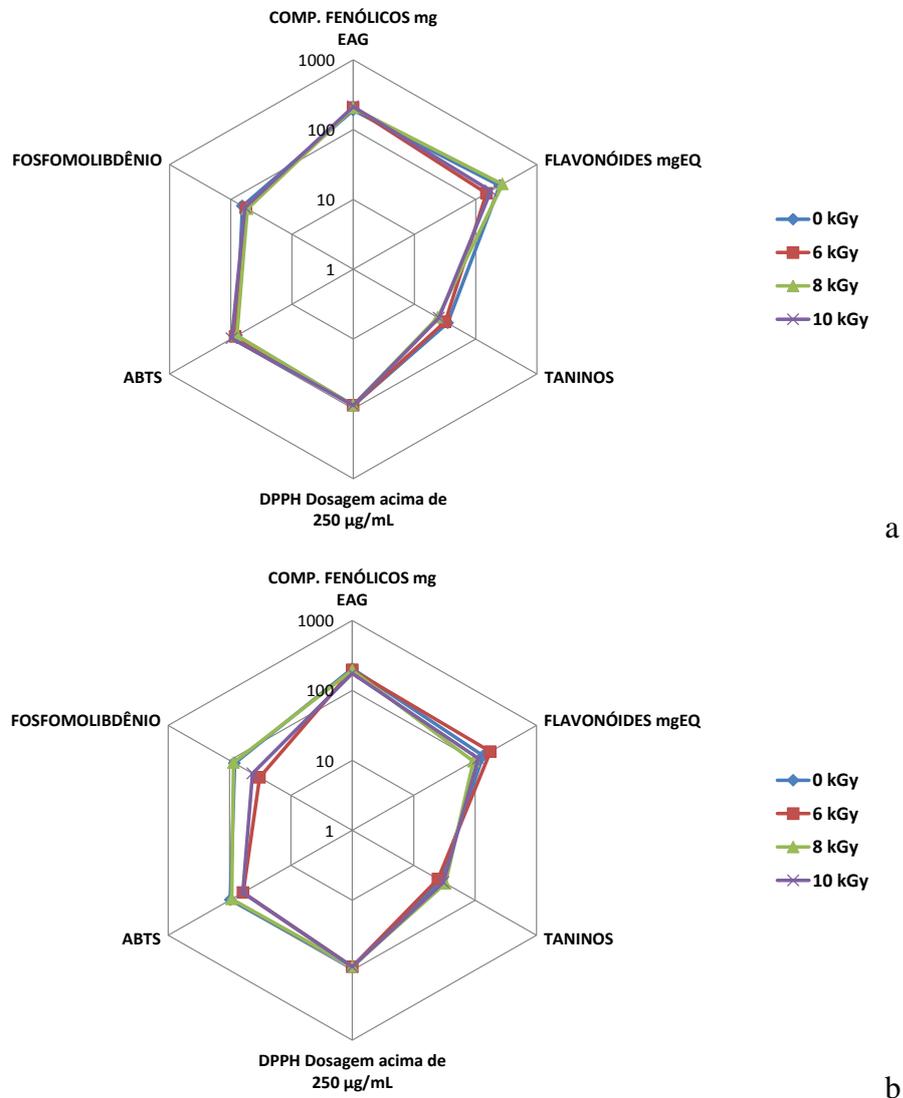
Tabela 15. Compilação dos resultados quanto à atividade antioxidante dos extratos irradiados de raiz e de caule de *S. cumini*

Extrato	Dose (kGy)	Compostos fenólicos (mg EAG)	Flavonóides (mg EQ)	Taninos (mg catequina)	DPPH* (%)	ABTS (%)	Fosfomolibdênio (AAT%)
Raiz	0	189	247	34,9	89,2	80,2	64,56
	6	207	150	31,8	89,3	84,5	56,52
	8	204	273	24,1	88,8	79,1	53,51
	10	213	176	25,0	89,1	96,4	58,43
Caule	0	205	135	27,3	89,6	97,2	82,76
	6	197	177	24,9	89,1	60,2	32,49
	8	194	94	32,8	88,8	92,5	86,16
	10	174	113	30,5	89,2	60,9	42,24

*Valor médio para concentrações acima de 250 µg/mL

Fonte: A Autora.

Figura 38. Comportamento dos extratos de raiz (a) e caule (b) com relação aos valores encontrados e as doses estudadas



Fonte: A Autora.

De maneira geral, a irradiação dos extratos de raiz afetou positivamente os resultados dos ensaios realizados, em que houve aumento no teor de flavonóides para as doses de 8 kGy, sendo que os teores de taninos foram superiores nas doses de 6 kGy. A irradiação não proporcionou efeitos negativos consideráveis com relação ao extrato de raiz não irradiado (Figura 38a).

Para os extratos de caule, os melhores resultados foram encontrados para a dose de 8 kGy para a atividade antioxidante total e de 6 kGy para flavonóides (Figura 38b). Assim como ocorreu para os extratos de raiz, a irradiação não afetou negativamente os resultados,

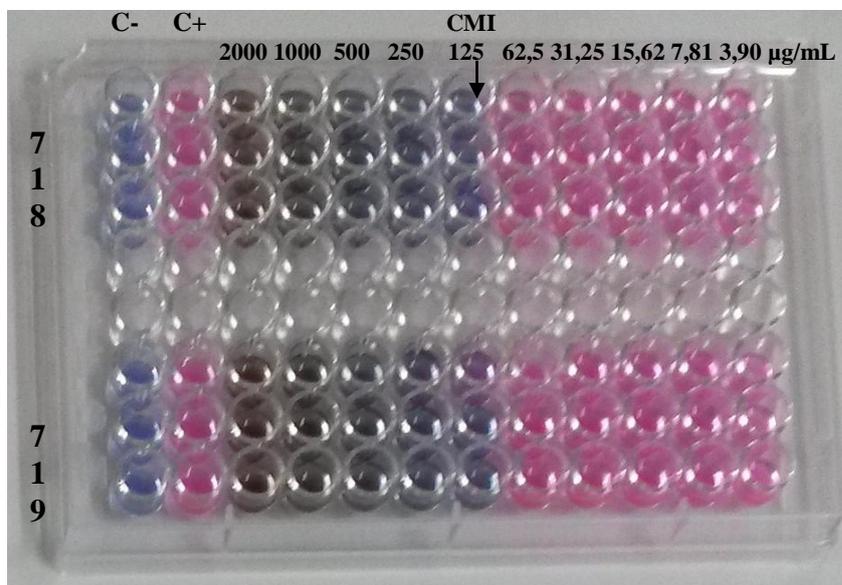
indicando sua potencialidade para aprimorar e/ou manter as características antioxidantes dos extratos de plantas de *S. cumini*.

4.10 Concentração Mínima Inibitória - CMI e Concentração Mínima Bactericida - CMB

A técnica de microdiluição tem sido muito utilizada para avaliar quantitativamente a atividade antimicrobiana de plantas. Apresenta alto rendimento porque possibilita a análise de pequenas amostras quando se trata de extratos vegetais. Com ela é possível analisar mais de uma amostra e utilizar diferentes micro-organismos no mesmo ensaio (ELOFF et al., 1998; PALOMBO, 2011).

Na avaliação da CMI e CMB, os valores encontrados para o extrato de acetato de etila de raiz controle (0 kGy) variaram de 500 a 2000 µg/mL para a CMI e de 500 a > 2000 µg/mL para CMB frente a *S. aureus*. Para *P. aeruginosa*, os valores foram de 1000 a > 2000 µg/mL para CMI e de 2000 a > 2000 µg/mL para CMB para o extrato controle. Com relação ao extrato irradiado com 6 kGy, os valores de CMI e CMB foram 500-1000 µg/mL e 1000-2000 µg/mL para *S. aureus*, respectivamente. Diante de *P. aeruginosa* os valores de CMI variaram de 1000 a 2000 µg/mL e CMB 1000 a > 2000 µg/mL. Na dose de 8 kGy, foram encontrados valores entre 125 - 2000 µg/mL e 125 - > 2000 µg/mL para CMI e CMB, respectivamente, para *S. aureus*. Os valores de CMI e CMB variaram de 500 a 2000 µg/mL, respectivamente, para *P. aeruginosa*. Os melhores valores encontrados foram nos extratos irradiados com 10 kGy com CMI de 125 a 500 µg/mL (Figura 39) e CMB de 125 a 1000 µg/mL para *S. aureus*. A resposta na presença de *P. aeruginosa* ficou com valores entre 500 a 2000 µg/mL de extrato para CMI e CMB, respectivamente, como representado na Tabela 16.

Figura 39. Imagem da placa multipoços para os ensaios CMI e CMB de extratos de raiz irradiados de *S. cumini* com 10 kGy com CMI de 125 µg/mL para o micro-organismo 718 e 250 µg/mL para o micro-organismo 719. A cor roxa representa o não crescimento do micro-organismo, enquanto que a rosa o crescimento.



Fonte: A autora.

Tabela 16. Valores de CMI e CMB para extratos irradiados e controle de raiz de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Micro-organismos	Extrato de Acetato de Etila de Raiz							
	Extrato Controle		Extrato 6kGy		Extrato 8kGy		Extrato 10kGy	
	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
670	500	1000	500	1000	500	1000	500	1000
671	500	500	1000	2000	2000	>2000	500	500
672	1000	2000	500	1000	500	1000	500	1000
679	1000	>2000	1000	2000	250	250	250	250
691	1000	2000	500	500	500	500	500	500
700	2000	2000	2000	2000	500	500	250	250
707	1000	1000	1000	1000	250	250	125	125
711	1000	1000	500	1000	250	250	125	125
718	1000	2000	500	1000	250	250	125	125
719	1000	2000	1000	2000	500	500	250	250
725	1000	2000	500	1000	125	125	125	125
728	2000	>2000	1000	2000	500	500	125	125
729	1000	2000	1000	2000	250	250	125	125
730	1000	2000	1000	2000	500	500	125	125
731	1000	2000	1000	1000	1000	1000	500	500
732	1000	2000	1000	1000	125	125	125	125
64	2000	2000	1000	1000	2000	2000	2000	2000
261	2000	2000	2000	2000	1000	1000	500	1000
262	1000	2000	1000	1000	500	500	500	500
Pseudo 1	2000	>2000	2000	>2000	2000	2000	2000	2000
Pseudo 2	1000	>2000	1000	2000	1000	1000	500	1000
Pseudo 3	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000

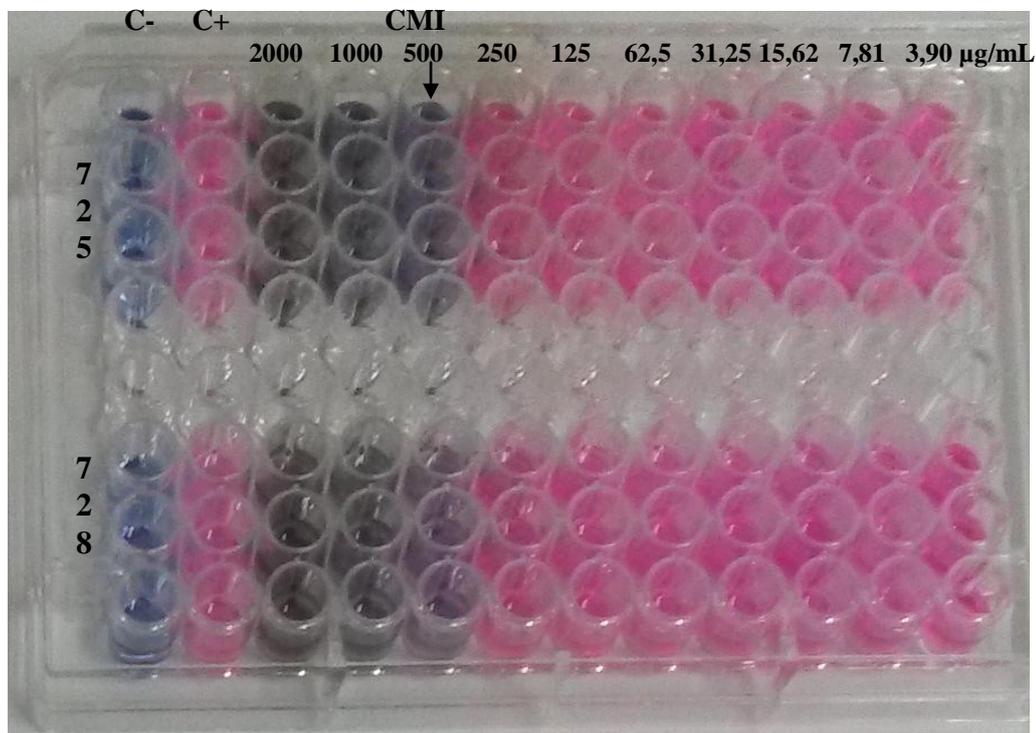
670 - 732: *Staphylococcus aureus* isolados clínicos; 64- Pseudo Hospitalar(3): *Pseudomonas aeruginosa* isolados clínicos; CMI: Concentração Mínima Inibitória; CMB: Concentração Mínima Bactericida; µg/mL: microgramas de extrato por mililitros. Cores: verde: atividade moderada; marrom: atividade fraca; vermelha: inatividade do extrato.

Neste estudo, o extrato controle de raiz atuou em 87,5% das cepas de *S. aureus* com CMI entre 500 e 1000 µg/mL e em 33,3 % das *P. aeruginosa* com 1000 µg/mL. Para o extrato com 6 kGy, 93,75% das linhagens de *Staphylococcus aureus* e 50% das linhagens de *P. aeruginosa* tiveram CMI entre 500-1000 µg/mL. O extrato com 8 kGy teve os mesmos valores em porcentagem tanto para as cepas de *S. aureus* quanto para as *P. aeruginosa*, só que com valores de 125-1000 µg/mL e 500-1000 µg/mL, respectivamente. O extrato irradiado com 10 kGy obteve os melhores valores, 100% com CMI entre 125-500 µg/mL para as bactérias Gram positivas e 50% para as Gram negativas com CMI de 500 µg/mL. À medida que a dose de radiação aumentou, o valor de CMI diminuiu.

Segundo Holetz et al. (2002) e Regasini et al. (2010), extratos de plantas com atividade antimicrobiana com valores de CMI e CMB entre 100-500 µg/mL possuem atividade moderada, entre 500 e 1000 µg/mL, a atividade é considerada fraca. Por outro lado, Eloff (1998) utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais, incluindo os de folhas, o que demonstrou inconvenientes da técnica, pois os compostos presentes em alguns extratos precipitavam e a coloração verde da clorofila em concentração muito alta interferia na análise.

Avaliando a CMI e a CMB para o extrato de acetato de etila de caule, os melhores valores encontrados foram para o extrato controle que variaram de 250 a 1000 µg/mL com relação à CMI e de 500 a 2000 µg/mL para CMB frente a *S. aureus* (Figura 40) com 13 cepas (81,25%) correspondendo a 500 µg/mL para CMI e 6 cepas (43,75%) para CMB. Para *P. aeruginosa*, os valores foram 1000 a 2000 µg/mL para CMI e 1000 a > 2000 µg/mL para CMB. No extrato irradiado com 6 kGy, os valores variaram de 250 - >2000 µg/mL - CMI e 500 - >2000 µg/mL - CMB para *S. aureus*. Os valores de CMI para *P. aeruginosa* variaram de 1000 a 2000 µg/mL e CMB 2000 a > 2000 µg/mL. Na dose de 8 kGy, foram encontrados valores entre 250 - 2000 µg/mL e 250 - > 2000 µg/mL para CMI e CMB, respectivamente para *S. aureus*, e valores que variaram de 1000 a 2000 µg/mL - CMI e 2000 a > 2000 µg/mL - CMB para *P. aeruginosa*. Os valores de CMI encontrados para os extratos irradiados com 10 kGy foram 1000 a 2000 µg/mL e CMB 1000 a >2000 µg/mL para *S. aureus* e valores de 1000 a 2000 µg/mL para CMI e CMB 2000 a >2000 µg/mL para *P. aeruginosa* como representados na Tabela 17.

Figura 40. Imagem da placa multipoços com CMI e CMB de extratos de caule controle de *S. cumini* com CMI e CMB de 500 µg/mL para os micro-organismos 725 e 728. A cor roxa representa o não crescimento do micro-organismo e a rosa o crescimento.



Fonte: A Autora

Neste estudo, o extrato controle de caule apresentou CMI entre 250- 1000 µg/mL para 100% das linhagens de *S. aureus* e CMI de 1000 µg/ mL para 66,67 % das *P. aeruginosa*. Para o extrato com 6 kGy, 68,75% das linhagens de *Staphylococcus* tiveram CMI entre 250 e 1000 µg/mL e 16,67 % das linhagens de *P. aeruginosa* tiveram CMI de 1000 µg/mL. Os valores de CMI na presença de *S. aureus* do extrato irradiado com 8 kGy variaram de 250- 1000 µg/mL, correspondendo a 56,25% das linhagens testadas. O extrato irradiado com 10 kGy atuou em 18,75 % das cepas de *S. aureus* e obteve CMI de 1000 µg/mL e 33,34% para as *P. aeruginosa* com CMI de 1000 µg/mL. O extrato de 10 kGy foi considerado inativo (HOLETZ et al., 2002), devido ao maior número de linhagens em que a CMI obteve valores entre 2000 µg/mL ou >2000 µg/mL (Tabela 17).

Tabela 17. Valores de CMI e CMB para extrato de acetato de etila de caule de *S. cumini* (L.) Skeels

Micro-organismos	Extrato de Acetato de Etila de Caule							
	Extrato Controle		Extrato 6kGy		Extrato 8kGy		Extrato 10kGy	
	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
670	500	1000	500	1000	500	1000	2000	>2000
671	500	500	1000	2000	2000	>2000	2000	>2000
672	1000	2000	500	1000	500	1000	2000	>2000
679	500	1000	250	500	250	500	1000	1000
691	500	500	1000	2000	1000	2000	2000	2000
700	500	1000	250	500	2000	>2000	2000	>2000
707	500	1000	500	1000	250	250	2000	>2000
711	500	1000	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000
718	500	1000	1000	2000	1000	2000	2000	>2000
719	500	1000	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000
725	500	500	1000	2000	1000	2000	1000	2000
728	500	500	2000	2000	2000	>2000	2000	>2000
729	500	1000	500	1000	1000	1000	2000	>2000
730	1000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	>2000
731	500	500	2000	>2000	1000	>2000	2000	2000
732	250	500	500	1000	250	250	1000	2000
64	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000
261	1000	1000	2000	>2000	2000	>2000	1000	2000
262	1000	1000	2000	>2000	2000	>2000	2000	2000
Pseudo 1	2000	2000	1000	2000	1000	2000	2000	>2000
Pseudo 2	1000	1000	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000
Pseudo 3	1000	1000	2000	>2000	2000	>2000	1000	2000

670 - 732: *Staphylococcus aureus* isolados clínicos; 64- Pseudo Hospitalar (3): *Pseudomonas aeruginosa* isolados clínicos; CMI: Concentração Mínima Inibitória; CMB: Concentração Mínima Bactericida; µg/mL: microgramas de extrato por mililitros. Cores: verde: atividade moderada; marrom: atividade fraca; vermelha: inatividade do extrato.

Santos et al. (2010) avaliaram o efeito da radiação em extratos de folhas e cascas de caule de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan com doses de 5; 7,5 e 10 kGy frente a diversos micro-organismos, obtendo halos de 17,33 mm (D.P.: 1,53) e CMI de 100 µg/mL com os extratos irradiados com 10 kGy de cascas de caule para *S. aureus*. Esses resultados foram diferentes àqueles encontrados no presente trabalho, em que o extrato de caule mostrou inatividade frente 81,25% dos *S. aureus* quando irradiado com a mesma dose.

Solidônio et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos com os solventes ciclohexano, acetato de etila e etanólico irradiados e não irradiados de camomila contra *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* e outros micro-organismos. *Staphylococcus aureus* foi inibido por extratos etanólicos do controle, 8 kGy e 10 kGy com halos entre 9 e 9,7 ($\pm 0,6$). Não houve a formação de halos de inibição dos extratos de ciclohexano, acetato de etila e metanólico controle e irradiados contra *P. aeruginosa* em nenhuma das amostras de chá testadas.

Os resultados obtidos neste estudo permitem afirmar que a grande diversidade de moléculas encontradas nos extratos de plantas, neste caso, *Syzygium cumini* (L.) Skeels, promove seus empregos como fontes promissoras de novos agentes antimicrobianos e antioxidantes, principalmente ao serem submetidos à fonte de radiação ionizante, destacando os extratos irradiados de raiz que apresentaram os melhores resultados.

5 CONCLUSÕES

A partir deste estudo de citotoxicidade, propriedades antioxidantes e avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana após irradiação gama dos extratos, foi concluído que:

- Os extratos irradiados de acetato de etila de raiz e caule apresentaram atividade hemolítica com porcentagens próxima a zero, o que caracterizou a não citotoxicidade dos extratos.
- Para a atividade citoprotetora ou anti-hemolítica, os melhores valores foram obtidos para os extratos controle e irradiados nas menores concentrações.
- Na prospecção fitoquímica, foram encontrados flavonóides, derivados cinâmicos, triterpenos, esteróides, mono e sesquiterpenos e, por fim, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas nos extratos controle e irradiados.
- Os compostos fenólicos foram enriquecidos no extrato de raiz irradiado com 10 kGy. Para os extratos de caule, foi observada a redução de compostos fenólicos nos extratos irradiados.
- A radiação gama possibilitou aumento no teor de flavonóides nos extratos de raiz irradiados com 8 kGy e nos de caule irradiados com 6 kGy.
- Na quantificação de taninos, não foram observados valores maiores para os extratos de raiz irradiados. Para os extratos de caule, a irradiação permitiu a melhoria na concentração de taninos nas doses de 8 e 10 kGy.
- Para a atividade antioxidante com o radical DPPH, os extratos irradiados de caule e raiz obtiveram valores muito próximos quanto à porcentagem de sequestro de radicais livres para as concentrações acima de 250 µg/mL.
- A partir dos resultados do radical ABTS, a atividade antioxidante foi melhorada para o extrato irradiado com 10 kGy de raiz e o extrato de caule irradiado com 8 kGy.
- De modo geral, a irradiação gama não proporcionou o aumento da atividade antioxidante total, indicando radiorresistência dos extratos de *S. cumini*.
- A irradiação proporcionou melhor atividade antimicrobiana frente os isolados clínicos de *S. aureus* para os extratos de acetato de etila de raiz irradiados com 10 kGy. Contudo, os extratos irradiados apresentaram atividade fraca para as cepas de *P. aeruginosa*.
- Os extratos controle do caule mostraram melhor atividade antimicrobiana contra os isolados de *S. aureus* e fraca atividade para *P. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS

- ABOU-ARAB, A.A. K.; KAWTHER, M.S.; TANTAWI, M.E.E.I.; BADEAA, R.I.; KHAYRIA, N. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. **Food Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 357–363, 1999.
- AFIFY, A.M.R.; FAYED, S. A.; SHALABY, E.A.; EL-SHEMY, H.A. *Syzygium cumini* (pomposia) active principles exhibit potent anticancer and antioxidant activities. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 7, p. 948-956, 2011.
- AHMAD, I.; BEG, AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p.113-23, 2001.
- ALBERTON, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L.V.S; FRANCO, S.L. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 37-50, 2001.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p.325– 354, 2007.
- ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. v. 03, p. 10-15, 2001.
- AMAROWICZ, R.; DYKES, G.A.; PEGG, R.B. Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. **Fitoterapia**, v. 79, p. 217–219, 2008.
- ANDRIOLO, A. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar**. São Paulo: Editora Manole, 2005. 256p.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 21: Regulamento Técnico para irradiação de alimentos. Diário Oficial da União, Brasília. 2001.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48: Registro de Medicamentos Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília. 2004.
- AO, C.; LI, A.; ELZAAWELY, A.A.; XUAN, T.D.; TAWATA, S. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. Extract. **Food Control**, v. 19, p. 940-948, 2008.
- AOUIDI, F.; AYARI, S.; FERHI, H.; ROUSSOS, S.; HAMDI, M. Gamma irradiation of air-dried olive leaves: Effective decontamination and impact on the antioxidative properties and on phenolic compounds. **Food Chemistry**, v.127, p. 1105–1113, 2011.

ARAUJO, A.L.A.; OHARA, M.T.; Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas em feira livre de São Paulo e infusos derivados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.36, n.1, p.129-37, 2000.

ARTHUR, V., WALDER, J.M.M., DOMARCO, R.E., WIENDL, F.M., SILVA, A.C. LEME, M.H.A. Desinfestação de *Eugenia uvalha*, infestadas por *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Dip. Tephritidae), através da radiação gama, **Energia Nuclear e Agricultura**, v. 10, p. 97–111, 1989.

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

AZEVEDO, H.I.V. **Composição química da folha e do caule de *Calamintha baetica*. Efeito do solvente na extração de compostos antioxidantes.** Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. 83p., 2014.

BAI, L.Y. ; LIN, W.Y.; CHIU, C.F.; WENG, J.R. Anti-tumor activities of triterpenes from *Syzygium kusukusense*. **Natural Product Communications**, n. 9, v.11, p.1557-8, 2014.

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. **Manual of Clinical Microbiology**, 8. ed. Washington, DC: ASM Press, v.1, p. 384-404, 2003.

BATISTA, M.T.A.; RODRIGUES, H.G.; FONSECA, L.C.; BONETTI, A.M.; PENHA-SILVA, N.; NERES, A.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3. n.2, p. 22-24, 2007.

BERŁOWSKI, A., ZAWADA, K., WAWER, I.; PARADOWSKA, K. Antioxidant properties of medicinal plants from Peru. **Food and Nutrition Sciences**, v.4, p. 71-77, 2013.

BHAT, R., SRIDHAR, K.R.; TOMITA-YOKOTANI, K. Effect of ionizing radiation on antinutritional features of velvet bean seeds (*Mucuna pruriens*). **Food Chemistry**, v. 103, p.860–866, 2007.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W.R.; GOLDBERG, A.; GRUENWALD, J.; HALL, T.; RIGGINS, W.; RISTER, R.S. “The complete German Commission e monographs: therapeuticguide to herbal medicines. Austin: American Botanical Council”, en :**Integrative Medicine Communications**, Boston, p. 79- 154, 1998.

BOBBIO, F.O. ; DRUZIAN, J.I.; ABRAO, P.A. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açazeiro (*Euterpe oleracea*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n.3, p. 388-390, 2000.

BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, p. 256- 265, 2013.

BOTSARIS, A. **Cresce o interesse pela fitoterapia.** Disponível em [http://www.nucleoalquimico.com.br/pdf/artigos/cresce interesse pela fitoterapia.pdf](http://www.nucleoalquimico.com.br/pdf/artigos/cresce%20interesse%20pela%20fitoterapia.pdf). Acesso em : 30 de abril de 2016.

BRASIL. **Portal Saúde.** Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>. Acesso em: fevereiro de 2015.

BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: le melange diphenylborate d'aminoethanol -PEG 400. **Journal of Chromatography**, v. 351, p.351-355, 1986.

BRAUNWALD, E.; KASPER, D.L.; FAUCI, A.S.; JAMESON, J.L.; LONGO, D.L.; HAUSER, S. **Medicina Interna de Harrison.** Artmed Editora - Grupo A Educação S/A. 18ªed., v. 1 e 2, 3048p., 2013.

BREITFELLNER, F.; SOLAR, S.; SONTAG, G. Effect of gamma irradiation on flavonoids in strawberries. **European Food Research and Technology**, v.215, p.28–31, 2002.

BRIGIDE, P.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Antinutrients and “in vitro” availability of iron in irradiated common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**, v. 98, p.85–89, 2006.

BRUNETON, J.; **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia.** AS/Espanha: Ed. Acribia, 1991. 594p.

BUELGA, C.C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.7, p.1094–1117, 2000.

BUGNO, A.; BUZZO, A.A.; NAKAMURA, C.T.; PEREIRA, T.C.; MATOS, D.; ANDREOLI PINTO, T. J. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 4, p. 491-497, 2005.

BURT, S.A.; REINDER, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* 0157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.36:p.162-167, 2003.

BUSTAMANTE, K.G.L.; FIGUEIREDO, A.D.L.; SOARES, M.L.; BARA, M.T.F.; FERREIRA, H.D.; REZENDE, M.H.; PIMENTA, F.C.; PAULA, J.R. Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana da casca de *Pterodon emarginatus* Vog. (Fabaceae). **In: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG-CONPEEX, 2.,**

Anais eletrônico do II Seminário de Pesquisa e Pós-Graduação (CD-ROM), Goiânia: UFG, 2005.

CABRAL, D.L.V. **Potencial antimicrobiano de plantas da caatinga utilizadas na medicina tradicional como anti-inflamatórias**. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco. 2014.79p.

CAIO, L.; WU, C.D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. **Journal of Natural Products**, v.59, p. 987-990, 1996.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.2,p.179-89, 2000.

CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A.L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿ indicadores de dependência o factores de desarrollo? **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.22, n. 3, p. 265-278, 2003.

CARSON, C.F.; MEE, B.J. ; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, Lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,v.46, n. 6, p.1914-1920, 2002.

CARVALHO, C.; BEREZIN, E. N.; PISTELLI, I.P.; MÍMICA, L.; CARDOSO, M.R.A. Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CARVALHO, C.R.D. **Relação entre parâmetros ecofisiológicos e a produção de óleo essencial em espécies arbóreas**. Dissertação (Mestrado).UniversidadeFederal de Sergipe. 2013. 56p.

CASSETTARI, V.C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E.A. *S. Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de Fisiologia Vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: *Editora Agronômica Ceres*. v. 1, p.640, 2005.

CAVALCANTI, S.; FRANÇA, E.R.; CABRAL, C.; VILELA, M.A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D.; MEDEIROS, A.C.R. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 5663, 2005.

CERQUEIRA, C.N.; SANTOS, D.A.P.; MALAQUIAS, K.S.; LIMA, M. M. C.; DA SILVA, M.F.G.F.; FERNADES, J.B.; VIEIRA, P.C. Novas *N*-benzoiltiraminas de *Swinglea glutinosa* (Rutaceae). **Química Nova**, v.35, n.11. p. 2181-2185, 2012.

CHAVES, M.H.; CITÓ, A.M.G.L; LOPES, J.A.D. ; COSTA, D.A.; DE OLIVEIRA, C.A.A.; COSTA, A.F.; JÚNIOR, F.E.M.B. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de farmacognosia**. v.20, n.1. p. 106-112, 2010.

CHIRIAC, C.I.; TANASA, F.; ONCIU, M. A novel approach in cinnamic acid synthesis: direct synthesis of cinnamic acids from aromatic aldehydes and aliphatic carboxylic acids in the presence of boron tribromide. **Molecules**, v. 10, p. 481-487, 2005.

CLARK, A. Natural Products In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5. Ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 24-36, 2002.1361p.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Wayne, PA. 23rd informational supplement, M100-S23, 2013.

COCK, I.E. Antimicrobial activity of *Syzygium australe* and *Syzygium luehmannii* leaf methanolic extracts. **Pharmacognosy Communications**, v.2, p. 71-77, 2012.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 453 p., 2006.

CONSELHO REGIONAL DE FÁRMACIA DO ESTADO DE SÃO PAULO (CRF-SP). **Plantas medicinais e fitoterápicos**. Julho/2012. Disponível em: www.portal.crfsp.org.br/publicacoes-2/cartilhas-por-area.html. Acesso em 30/09/2015.

CORRALES, M.; HAN, J.H.; TAUSCHER, B. Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 425-433, 2009.

COSTA, A.J. **Avaliação fitoquímica e potencial toxicológico do caule de *Calotropis procera* (ait.) Ait.f. (Apocynaceae)**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, 2015.30p.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, p.1318-1322, 1999.

COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, n.12. p. 564-582,1999.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, p. 511-516, 2003.

DAMASCENO, D.C., LIMA, P.H.O; GALHIANE, M.S. ; VOLPATO, G.T.; RUDGE, M.V.C. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s,v.4, p.46-54, 2002.

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

DANTAS, V. Proteção por Radiação, **Brasil Nuclear**, v. 17, p.22–23,1998.

DE OLIVEIRA, R.N.; DIAS, I.J.M.; CÂMARA, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.1, p. 39-43, 2005.

DE PAIVA, L.B.; GOLDBECK, R.; DOS SANTOS, W.D.; SQUINA, F.M. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.49, p.395-411, 2013.

DE, P.; BALTAS, M.; BELVAL, F.B. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents – A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, p.1672-1703, 2011.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**.Chichester, 2ª edição.ed. John Willey & Sons.p.5-6.2001.487p.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**, Ed. UNESP, 2a edição, São Paulo, p.323-324. 2002.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Advances in genetics**,v.28, p.165-234, 1990.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v.88, p.308-316, 2000.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, n. 7, 2006.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P.M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, p.06-08, 2004.

DURÃES, F.A.; LOPES, J.H; OLIVEIRA, A.E.M. de; GUIMARÃES, H.C.; ROCHA, C.C. P.; AZEVÊDO, L. C. Quantificação de antocianinas e componentes nutricionais na azeitona roxa (*Syzygium cumini* Lamark.). In: **CONNEPI**, 2009, Belém.

EISENBERG, D.M.; DAVIS, R.B.; ETTNER, S.L.; APPEL, S.; WILKEY, S.; ROMPAY, M.V.; KESSLER, R. Trends in alternative medicine use in United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. **JAMA**, n. 280, p.1569- 1575, 1998.

ELISABETSKY, E. Da observação de campo à patente: vale a pena na academia? **In: XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2010.

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

ELSOHLY,H.N.; DANNER,S.; LI, X.C.; NIMROD,A.C.; CLARK,A.M.. New antimycobacterial saponin from *Colubrina retusa*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p.1341-1342,1999.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**,v.75.p.141-164, 2001.

FELDMAN, E.B. Fruits and vegetables and the risk of stroke. **Nutritional Review**, v.59, p.24-27, 2001.

FERNANDES, A.T.; FERNADES, M.O.V.; RIBEIRO FILHO, N.; GRAZIANO, K.U.; CAVALCANTE, N.J.F.; LACERDA, R.A. As bases do hospital contemporâneo: a enfermagem, os caçadores de micróbios e o controle de infecção. **Infecções hospitalares e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu; 2000.953p.

FIRMINO, C.B. **Influência da idade de doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia,Brasil,b2007.89p.

FIRMO, W.C.A.; DE MENEZES, V.J.M.; PASSOS, C.E.C.; DIAS, C.N.; ALVES, L.P.L.; DIAS, I.C.L.; NETO, M.S.; OLEA, R.S.G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**,v.18,p. 90-95, 2011.

GINDRIA,A.L.;SILVA,M.;DE MARCHI,M.B.;BRUM,L.S. ; ATHAYDE, M.L.;HOELZEL,S. C. S. M. Análise fitoquímica das cascas e do miolo da raiz de *Urera baccifera* (L.) *Gaudich* (Urticaceae). **Saúde**, v.36, p.63-69, 2010.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical infectious diseases**, v.46, p.350-359, 2008.

GOVINDARAJAN,M.; BENELLI,G. α -Humulene and β -elemene from *Syzygium zeylanicum* (Myrtaceae) essential oil: highly effective and eco-friendly larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v.115.p.1-8, 2016.

GUAJARDO-FLORES, D.;GARCÍA-PATIÑO, M.;SERNA-GUERRERO, D.;GUTIÉRREZ-URIBE, J.A.; SERNA-SALDÍVAR, S.O.Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. **Food Chemistry**,v.134,p.1312–9,2012.

HARBORNE, J.B.; **Phytochemical methods**. 3^a ED. LONDRES: CHAPMAN & HALL, 1998.278p.

HELFAND, W.H.; COWEN, D.L. **Pharmacy: an Illustrated History**. New York: Harry N. Abrams, 1990.272p.

HÖFLING, J.F.; ANIBAL, P.C.; OBANDO-PEREDA, G.A.; PEIXOTO, I.A.T.; FURLETTI, V.F.; FOGLIO, M.A.; GONÇALVES, R.B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**,v.70.p.1065-1068.2010.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS-FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**,v.97, p.1027-1031, 2002.

HOMEM, I.C.M. **Estudos fitoquímicos, ensaios de toxicidade, atividade larvicida, antimicrobiana e antioxidante das folhas e caules de *Mollinedia clavigera* Tul. (MONIMIACEAE)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2015.109p.

HUSSEIN, S.A.M.; HASHEM, A.N.M.; SELIEM, M.A.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M.A.M. Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry**,v.64.p.883-889,2003.

ICON GROUP INTERNATIONAL, Inc. **The 2013 Report on Herbal Supplements and Remedies: World Market Segmentation by City**. Paperback, 2013.Disponível em: http://www.strategyr.com/MarketResearch/Herbal_Supplements_and_Remedies_Market_Trends.asp, acesso em 10/12/2016.

IHA, S.M.; MIGLIATO; K.F.; VELLOSA, J.C.R.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C. L.R.; ISAAC, V.L.B.; BRUNETTI, I.L.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocósmica. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v.18, p. 387-393, 2008.

ITO, T.; OKUMA, K.; MA, X.X.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotics resistense of *Staphylooccus aureus* from its whole genome: genetic island SCC. **Drug Resistance Updates**, v. 6, p. 41-52, 2003.

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of Dermatological Science**, v.42, p. 203-14, 2006.

JIANG, R.W.; LAU, K.M.; HON, P.M.; MAK, T.C.W.; WOO, K.S.; FUNG, K.P. Chemistry and Biological Activities of Caffeic Acid Derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. **Current Medicinal Chemistry**,v. 12, p. 237-246, 2005.

JONES, P.J.; RAEINI-SARJAZ, M.; NTANIOS, F.Y. Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. **Journal of Lipid Research**, v.41, p. 697-704, 2000.

JULIÃO, L.S.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.13.n.1. p.36-38, 2003.

KASOTE, D.M.; KATYARE, S.S.; HEDGE, M.V.; BAE, H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International Journal of Biological Sciences**, v.11. p. 982-991, 2015.

KHATTAK, K.F.; SIMPSON, T.J.; IHASNULLAH. Effect of gamma irradiation on the microbial load, nutrient composition and free radical scavenging activity of *Nelumbo nucifera* rhizome. **Radiation Physics and Chemistry**, v.78, p.206–212, 2009.

KIFFER, C.; HSIUNG A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; MENDES, C.; MYSTIC BRAZIL GROUP- Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTYC Program Brazil 2003. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9,p.216-224, 2005.

KO, R.J. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v.37,p.697-708, 1999.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL, V.R. **Diagnóstico Microbiológico**. 6ª Edição, D. F.: Ed. Médica Panamericana S.A., 2012. 1565p.

KOSEKI, P.M.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H; BRITO, M.S.; NAHME, L.C.; SEBASTIAO, K.I.; RELA, P.R.. Effects of irradiation in medicinal and eatable herbs. **Radiation Physics and Chemistry**, v.63, p.681–684, 2002.

KRAUSE, M.S. **Estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule de *Zanthoxylum rhoifolium* lam. (Rutaceae)**. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2013.104p.

LANDMAN, D., BRATU, S.; KOCHAR ,S. Evolution and antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p.78-82, 2007.

LEE, N.Y.; JO, C.; SOHN, S.H.; KIM, J.K.; BYUN, M.W. Effects of gamma irradiation on the biological activity of green tea byproduct extracts and a comparison with green tea leaf extracts. **Journal of Food Science**, v.71, p.269–274, 2006.

LEE, S.H.; SANCHETI, S.A.; BAFNA, M.R.; SANCHETI, S.S.; SEO, S.Y. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Rhododendron yedoense* var. *Poukhanense* bark. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5. p. 248-254, 2011.

LEE, Y.; KUO, H.; CHU, C.; WANG, C.; LIN, W.; TSENG, T. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cell. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 2281-2289, 2003.

LERNER, K.L.; LERNER, B.W. **World os microbiology and immunology**. p. 411-412. EUA: Gale Group, 2002.699p.

- LI, X.; ZHANG, L.; POOLE, K. Interplay between the MexA-MexB OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.45, p.433–436, 2000.
- LICHTENTHALER, H. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annual review of plant biology**, v.50, p.47-65, 1999.
- LIM, D.; STRYNADKA, N.C. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.9, p.870–876, 2002.
- LIVERMORE, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Disease**, v.34, p.634-640, 2002.
- LOCHER, C.P.; BURCH, M.T.; MOWER, H.F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extract obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.49, p.23-32, 1995.
- LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, p.371-376, 2005.
- LOPES, N.P. Estudo do metabolismo de produtos naturais e sua aplicação em estudos pré-clínicos e disposição cinética. In: **Anais do XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2010.249p.
- LOPES, N.P.; GOBBO-NETO, L. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v.3, p. 374-381, 2007.
- LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, p.1265-1273, 2003.
- MACHI, S. Prospects for the application of radiation processing and the activities of the IAEA. **Radiation Physics and Chemistry**, v.52, p. 591–597, 1998.
- MAHMOUD, I.I.; MARZOUK, M.S.A.; MAHARRAM, F.A.; EL-GINDI, M.R.; HASSAN, A.M.K.. **Phytochemistry**, v.58, p.1239-44, 2001.
- MAREČEK, J.; IVANIŠOVÁ, E.; FRANČÁKOVÁ, H.; MUSILOVÁ, J.; KRAJČOVIČ, T.; MENDELOVÁ, A. Evaluation of primary and secondary metabolites in selected varieties of potatoes (*Solanum tuberosum* L.). **Potravinárstvo**, v. 10, p. 145-151, 2016.
- MARTINS, C.C.; ALVES, L.F.A.; MAMPRIM, A.P.; Effect of plant extracts and a disinfectant on biological parameters and pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota: Cordycipitaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v.76, p.420-427, 2016.
- MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4. ed. Fortaleza: UFC, 2002, 267p.

MCDONALD, S.; PRENZLER, P.D.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Phenolics content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemistry**, v.73, p.73-84, 2001.

MCGOWAN, J.E. Resistance in nonfermenting Gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **The American journal of medicine**, v.119, p.29-36, 2006.

MECHI, R., CANIATTI-BRAZACA, S.G.; ARTHUR, V. Avaliação química, nutricional e fatores antinutricionais do feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.109-114, 2005.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/ Ed.UFSC, 2001.1104p.

MENDES, C.L.A. Triterpenóides e a sua actividade anti-inflamatória. **Informativo da Universidade Nova de Lisboa**. 2004.8p.

MEXIS, S.F.; BADEKA, A.V.; CHOULIARA, E.; RIGANAKOS, K.A.; KONTOMINAS, M.G. Effect of γ -irradiation on the physicochemical and sensory properties of raw unpeeled almond kernels (*Prunus dulcis*). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, p. 87-92, 2009.

MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, p.94-101, 2007.

MIGLIATO, K.F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M.V.R.; CORRÊA, M.A.; LUIS, V. S.; SACRAMENTO, L.V.S.; SALGADO, H.R.N. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.25, p. 310-4, 2006.

MIRANDA, M.B.; HORII, J.; ALCARDE, A.R. Estudo do efeito da irradiação gama (^{60}Co) na qualidade da cachaça e no tonel de envelhecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p.772-778, 2006.

MISHRA, P.; DAS, A.K.; CHAUDHARY, N.K. Isolation, spectroscopic characterization of two novel compounds obtained from leaf of *Syzygium cumini* (jambolana) and its study the antibacterial activity. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v.2, p.2018-2030.2013.

MOLLER, C.; HANSEN, S.H.; CORNETT, C. Characterisation of tannin-containing herbal drugs by HPLC. **Phytochemical analysis**, v. 20, p. 231-9, 2009.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U. O.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química a ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

MORTON, J. (1987) Jambolan. In: **Fruit of warm climates**. <http://newcrop.hort.purdue.edu/newcrop/morton/jambolan.htm>. Acesso em: 20/12/2014.

MOTA, R. Caracterização do suco de amora-preta elaborado em extrator caseiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 303-308, 2006.

MOUSSAID, M.; LACROIX, M.; NKETSIA-TABINI, J.; BOUBEKRI, C. Phenolic compounds and the colour of oranges subjected to a combination treatment of waxing and irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v.57, p. 273–275, 2000.

MUNIAPPAN, A.; PANDURANGAN, S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v.2, p. 240-246, 2012.

MURRAY, R. D. H. **Naturally occurring plant coumarins**. 1978. 316p.

MUTHUSAMY, V.S.; ANAND, S.; SANGEETHA, K.N.; SUJATHA, S.; ARUN, B.; LAKSHMI, B. S. Tannins present in *Cichorium intybus* enhance glucose uptake and inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through PTP1B inhibition. **Chemico-Biological Interactions**, v.174, p.69–78, 2008.

NAJAFABADI, N.S.; SAHARI, M.A.; BARZEGAR, M.; ESFAHANI, Z.H. Effect of gamma irradiation on some physicochemical properties and bioactive compounds of jujube (*Ziziphus jujuba* var *vulgaris*) fruit. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 130, p. 62-68, 2017.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NOVAIS, T.S.; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R.; Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.13, p. 05-08, 2003.

OCAMPOS, F.M.M.; MIGUEL, O.G.; OLIVEIRA, D.M. S. Parâmetros de controle de qualidade de *Sapium glandulosum* (L.) morong (Euphorbiaceae): umidade, cinzas totais e prospecção fitoquímica. **Visão Acadêmica**, v.14, p.5-13, 2013.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012–2031, 2005.

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes. Acidente radiológico de Goiânia. **Estudos avançados**, v.27, p. 185-199, 2013.

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E.M. Física das radiações. 2010.296p.

OLIVEIRA, A.C.P.; ENDRINGER, D.C.; AMORIM, L.A.S.; BRANDÃO, M.G.L.; COELHO, M.M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p.465-469, 2005.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 178p.

OLIVEIRA, G.A.; OKADA, S.S.; GUENTA, R.S.; MAMIZUKA, E.M. Avaliação da tolerância à vancomicina em 365 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v.37, p. 239-246, 2001.

OLIVEIRA, Y.L.C.; SILVA, L.C.N.; SILVA, A.G.; MACEDO, A.J.; ARAÚJO, J.M.; CORREIA, M.T.S.; SILVA, M.V. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoideae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, p.1-6, 2012.

OMS/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Pautas generales para las metodologías de investigación de la medicina tradicional. Ginebra, 2000. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js4930s/>. Acesso em: 15/10/2015.

PAES, L.S.; MENDONÇA, M.S.; CASAS, L.L. Aspectos Estruturais e Fitoquímicos de partes vegetativas de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (Costaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, p.380-390, 2013.

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, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI P.L.; MORELLI, I. - *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 9, p.165-168, 2002.

PANSERA, M.R.; SANTOS, A.C.A.; PAESE, K.; WASUN, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L.D.; PAULETTI, G.F.; SERAFINI, L. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.27-32, 2003.

PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v.1, p.7-12, 2003.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M.C.; MUÑOZ, J.D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.37-40, 2001.

PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.10p.

PICOLI, S.U. Metalo- β -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40, p.273-277, 2008.

PINTO, P.A. **Noções de botânica aplicada à farmácia**, Ed. Científica, 1956.298p.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2. ed. Atheneu Editora, 2003.325p.

PIRES, V.S.; TAKETA, A.T.C.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Saponins and saponinins from *Brachiaria decumbens* Stapf. **Journal of the Brazilian Chemical Society**,v.13, p.135-139, 2002.

PONCE, A.G.; FRITZ,R.; DEL VALLE, C.; ROURA,S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **LWT - Food Science and Technology**. V. 36, p.679–684, 2003.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p.337-341, 1999.

QUÍMICA NOVA INTERATIVA – QNINT. **Taninos hidrolisáveis**. Disponível em: http://qnint.sbq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php. Acesso em: 12/2016.

RAO, V.R.S., SURESH, G., BABU, K.S., RAJU, S.S., VISHNU VARDHAN, M.V.P.S., RAMAKRISHNA, S., RAO, J.M. Novel dimeric amide alkaloids from *Piper chaba* Hunter: isolation, cytotoxic activity, and their biomimetic synthesis. **Tetrahedron** ,v.67, p.1885-1892, 2011.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.v.11, p.57-69, 2001.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; Yang, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABST radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REGASINI, L.O.; PIVATTO, M.; SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; GIANNINI, M.J.S.M.; BARREIRO, E. J.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p.706-711, 2010.

RESINUS. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>. Acesso em: 15/02/2015.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**.1996.337p.

ROBERTS, E.A.H.; CARTWRIGHT, R.A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. i. fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v.8, p.72-80, 1957.

ROCHA, L.O.; SOARES, M.M.S.R.; CORRÊA, C.L. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-

Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, p. 521-527, 2004.

ROCHA, L.F. ; LEMES, N. A.; BRASILEIRO, M.E. A Atuação da Comissão de Controle de Infecção em Serviços de Saúde na Unidade 15 de Terapia Intensiva: O que fazer?. **Revista Eletrônica de Enfermagem do Centro de Estudos de Enfermagem e Nutrição**, v.1, p.1-16, 2010.

RODRIGUES, A.C.F.; COSTA, J.F.; SILVA, F.R.G.; AZEVEDO, R.R.S.; NASCIMENTO, E.P.; SILVA, A.L.; DE SOUZA, L.I.O.; DOS SANTOS, A.F. Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de *Senna obtusifolia*. **Revista Semente**, v.6, p.250-257, 2011.

RODRIGUES, C.G.; FERREIRA P.R.B.; OLIVEIRA C.S.M.; JÚNIOR R.R.; VALÉRIO H.M.; BRAMDI I.V.; OLIVEIRA D.A. Antibacterial activity of tanins from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**, v.8, p.1-5, 2014.

ROSATO, A.E.; KREISWIRTH, B.N.; CRAIG, W.A.; EISNER, W.; CLIMO, M.W.; GORDON L. Archer mecA-blaZ corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.1460-1463, 2003.

ROSS, I.A. **Medicinal Plants of the World: chemical constituents, traditional and modern uses**, 1999. 508p.

ROY, P.; AMDEKAR, S.; KUMAR, A.; SINGH, V. Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **The official journal of the International Society for Complementary Medicine Research (ISCMR)**.v.11, p.1-8, 2011.

SÁ, A. P. C. S. **Potencial antioxidante e aspectos químicos e físicos das frações comestíveis (polpa e cascas) e sementes de Jamelão (*Syzygium cumini* L. Skeels)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.88p.

SAHA, R.K.; ZAMAN, N.M.; ROY, P. Comparative evaluation of the medicinal activities of methanolic extract of seeds, fruit pulps and fresh juice of *Syzygium cumini* in vitro. **Journal of Coastal Life Medicine**, v.1, p.300-308, 2013.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, p.413-423, 2007.

SANTOS, G.H.F. **Influência da radiação gama em extratos vegetais ricos em taninos**. Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Energia Nuclear, UFPE. 2008.90p.

SANTOS, G.H.F.; SILVA, E.B.; SENA, K.X.F.R.; SILVA, B.L.; LIMA, C.S.A. The influence of ⁶⁰Co gamma radiation on the action of phenolic compounds of *Anadenanthera*

colubrina (Vell.) Brenan in the microbiological control of crude extracts. **Internacional Journal of Low Radiation**, v.7, p.223-234, 2010.

SATHYAPRABHA, G.; KUMARAVEL, S.; PANNEERSELVAM, A. Analysis of antioxidant activity, total phenol, total flavonoid and screening of phytochemicals in *Pleurotus platypus* and *Pleurotus eous*, **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, p.1-6, 2011.

SATOMI, L.C.; SORIANI, R.R.; PINTO, T.J.A. Descontaminação de drogas vegetais empregando irradiação gama e óxido de etileno: aspectos microbianos e químicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 445-450, 2005.

SCHIAR, V.P.P.; DOS SANTOS, D.B.; LÜDTKE, D.S.; VARGAS, F.; PAIXÃO, M.W.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v.21, p. 139–145, 2007.

SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 403-423, 2011.

SHARMA, S.B.; NASIR, A.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S.; DEV, G. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v.85, p.201-206, 2003.

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.S.; NUNES, I.F.S.; SOUSA, F.C.F.; Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 455-462, 2006.

SILVA, G.S. **Estudo da ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies de Candida de interesse médico**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.22f.

SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.4, p.572-577, 2007.

SILVA, M.J.D.; ENDO, L.H.; DIAS, A.L.T.; SILVA, G.A.; SANTOS M.H.; SILVA, M.A. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Mimosaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, p.267-274, 2012.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da Universidade Federal de Santa Catarina. 2000.1104p.

SIMÕES, C.M.O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy Research**, v.13, p.323-328, 1999a.

SIQUEIRA, C.F.Q. **Teores de taninos e flavonóides em plantas medicinais da Caatinga: Avaliando estratégias de Bioprospeção**. Dissertação de mestrado apresentado no programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPE. 2011.70p.

SMITH, J.S.; PILLAI, S. Irradiation and food safety. **Food Technology**, v.58, p.48-55, 2004.

SOLIDÔNIO, E.G.; BURLE, Y. S.; SILVA, P.A.; VICALVI, M.C.V.; SOUZA, I.F.A. C.; SILVA, G.R.; Sena, K.X.F.R. ; Colaço, W. Evaluation of antimicrobial activity of extracts of chamomile (*Matricaria recutita* L.) obtained from irradiated and non-irradiated samples. In: A. Méndez-Vilas. (Org.). **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs**, v.1,p.151-156, 2015.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v.30, p. 351-355, 2007.

SOUSA, S. M. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados**. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2005.94p.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, p.27-36, 2005.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, p.435-440, 2010.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.12, p.749-767, 2012.

SRIVASTANA, H.C. Paper chromatography of fruit juices. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.12, p.363-365, 1953.

STAJNER, D.; MILOSEVIC, M.; POPOVIC, B.M. Irradiation effects on phenolic content, lipid and protein oxidation and scavenger ability of soybean seeds, **International Journal of Molecular Sciences**, v.8,p.618–627, 2007.

STATSOFT. **Statistica 7.0**. Tulsa: StatSoft, 2004.

STOVER, C.K.; PHAM, X.Q.; ERWIN, A.L.; MIZOGUCHI, S.D.; WARRENER, P.; HICKEY, M.J.; BRINKMAN, F.S.L.; HUFNAGLE, W.O.; KOWALIK, D.J; LAGROU, M.; GARBER, R.L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, L.L.; COULTER, S.N.; FOLGER, K.R.; KAS, A.; LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G.K.S.; WU, Z.; PAULSEN, I.T.; REIZER, J.; SAIER, M.H.; HANCOCK, R.E.W.; LORY, S.; OLSON, M.V. Complete genome sequence

of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v.406, p. 959-964, 2000.

SUMITHRA, N.; KUMAR, S.R. Antimicrobial activity of *Syzygium calophyllifolium* walp leaf extract. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p.408-410, 2016.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*.I.-The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p.63-68, 1959.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ª. edição. Porto Alegre: Artmed, 2004.954p.

TAN, M.A.; KITAJIMA, M.; KOGURE, N.; NONATO, M.G.; TAKAYAMA, H. Isolation and total syntheses of two new alkaloids, dubiusamines-A, and -B, from *Pandanus dubius*. **Tetrahedron**, v.66, p. 3353-3359, 2010.

THE BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA. **The British Herbal Medicine Association**, Bournemouth, p. 204-205, 1983.

THE PLANT LIST (2013). Disponível em: <http://www.theplantlist.org/>. Acesso em: 08/12/2016.

TIMBOLA, A.K.; SZPOGANICZ, A.B.; MONACHE, F.D.; PIZZOLATTI, M.G. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v.73, p.174-176, 2002.

TOLEDO, T.C.F.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; ARTHUR, V.; PIEDADE, S.M.S. Effects of gamma radiation on total phenolics, trypsin and tannin inhibitors in soybean grains, **Radiation Physics and Chemistry**, v.76, p.1653-1656, 2007.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. São Paulo: Ed. Atheneu, 3ª edição. 2005. 586p.

TSAKALA, T.M.; PENGE, O.; JONH, K. Screening of in vitro antibacterial activity from *Syzygium guineense* (Willd) hydro soluble dry extract. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v.54, p. 276-279, 1996.

TURINA, A.D.V.; NOLAN, M.V.; ZYGADLO, J.A.; PERILLO, M.A. Natural terpenes; self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v.122, p.101-103, 2006.

TYLER, V.E. Natural products and medicine: an overview. **Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health**. New York: Columbia University Press, p.3-10, 1996.

VALADARES, S.N.S.; QUEIROZ, L.P.; CARDOSO, D.B.O.S.; PERALTA, E.D.; LUCCHESI, A.M. Comparação da atividade antioxidante, teor de fenólicos e flavonoides de caule e folhas de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke. **Anais II Simpósio da Rede de Recursos Genéticos Vegetais do Nordeste**, Fortaleza. 2015.2p.

VEIGA- JÚNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.2, p.308-313, 2008.

VENDRUSCOLO , G.S.; RATES , S.M.K.; MENTZ, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, p.361-372, 2005.

VENTUROSOSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v.37, p.18-23, 2011.

VIEGAS, J.M.; NARAYAN, M.S.; LAXMAN, P.M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini*. **Food Chemistry**, v.105, p. 619-627, 2007.

VIEIRA, R.A. Validação científica de plantas medicinais como fator catalisador no desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. **Revista Saúde e Ambiente**,v.2, p.57-64, 2001.

VILLAVICENCIO, A.L.C.H.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCÉE, H.; GREINER, R. Effect of irradiation on anti-nutrients (total phenolics, tannins and phytate) in Brazilian beans', **Radiation Physics and Chemistry**, v.57, p.289–293, 2000.

VINHA, A.F.; COSTA, A.; SOARES, M.; PIRES, P.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Atividade antioxidante de extratos aquosos de *Cochlospermum angolense* (Borututu). **Anais 11º Encontro de Química dos Alimentos**. 2012.4p.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis- A thin layer chromatography**. 2ª ed. Munich. 1996. 384p.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The Impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant productions: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8093-8105, 2005.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v.37, p.99-105, 1998.

WRIGHT, M.H.; LEE, C.J.; POLLOCK, C.E.; GREENE, A.C.; COCK, I.E. Growth inhibitory activity of selected high antioxidant australian *Syzygium* species against the food poisoning and tissue necrotic pathogen *Clostridium perfringens*.**Pharmacognosy Communications**, v.6, p.93-99, 2016.

XU, Q.M.; SHU, Z.; HE, W.J.; CHEN, L.W.; YANGA, S.L.; YANG, G.; LIU, Y.L.; LI, X.R. Antitumor activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells *in vitro* and *in vivo*. **Phytomedicine**,v.19, p.293-300, 2012.

YALCIN, H.; OZTURK, I.; HAYTA, M.; SAGDIC, O.; GUMUS, T. Effect of gamma-irradiation on some chemical characteristics and volatile content of linseed. **Journal of Medicinal Food**, v.14, p.1223-1228, 2011.

YAMADA, C.S.B. O crescente papel das plantas medicinais nos cuidados de saúde na Europa. **Revista Racine**, v.43, p.50-51, 1998.

YANG, Z.G.; SUN, H.X.; FANG, W.H. Haemolytic activities and adjuvant effect of *Astragalus membranaceus* saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice. **Vaccine**, v.23, p.5196-5203, 2005.

ZANOELLO, A.M.; MAZZANTI, C.M.; GINDRI, J.K.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; CECIM, M. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, p. 31-6, 2002.

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa **Avaliação da atividade citotóxica, antioxidante e quantitativa da atividade antimicrobiana do *Syzygium cumini* (Lamark.) após a irradiação com ⁶⁰Co** vinculada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco (PROTEN/UFPE). O motivo é pesquisar se a radiação tem ação de aumentar ou diminuir a atividade antimicrobiana, antioxidante, hemolítica e anti- hemolítica do extrato de caule e raiz.

RISCOS E BENEFÍCIOS:A pesquisa fornece como benefícios, novos dados que podem ajudar na busca de agentes antimicrobianos capazes de auxiliar no tratamento de micro-organismos que causam um grande número de mortalidade em hospitais. Esses micro-organismos estudados apresentam resistência a maioria dos antimicrobianos usados na clínica hoje em dia, e se tornaram bactérias multirresistentes. Dentre os riscos envolvidos no estudo, o voluntário pode sentir um leve desconforto no momento da retirada do sangue.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada com o pesquisador e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL PELO (A) PARTICIPANTE:

Eu, _____, n° da Identidade (RG)_____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento que poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. A Doutoranda Maria Cláudia Valério Vicalvi Costa e seu professor orientador Dr Elvis Joacir De França, certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a doutoranda Maria Cláudia Valério Vicalvi nos telefones (81) 99991-4434 ou através do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Otávio de Freitas pelo telefone (81) 3182-8578. Declaro que concordo em

participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

RG	Nome e Assinatura do Pesquisador	Data
RG	Nome e Assinatura do Voluntário	Data
RG	Nome e Assinatura da Testemunha	Data
RG	Nome e Assinatura da Testemunha	Data

ANEXO A – Teste de susceptibilidade das cepas de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos de uso clínico.

Micro-organismos	Clindamicina	Eritromicina	Cefoxitina	Gentamicina	Oxacilina	Cloranfenicol	Vancomicina	Ciprofloxacino
670	R	R	S	S	S	S	S	S
671	R	R	R	R	R	S	S	R
672	R	R	S	S	S	S	S	S
679	R	R	S	S	S	S	S	S
691	R	R	S	S	S	S	S	S
700	R	R	S	S	S	S	S	S
707	R	R	S	R	S	S	S	R
711	S	S	S	S	S	S	S	R
718	S	S	S	S	S	S	S	R
719	R	R	R	R	R	R	S	R
725	R	R	S	R	S	S	S	I
728	R	R	S	R	S	I	S	R
729	R	R	S	S	S	S	S	S
730	R	R	S	S	S	S	S	S
731	S	S	S	S	S	S	S	S
732	R	R	R	R	R	S	S	R

670-732 cepas de isolados clínicos de *S. aureus*; R: resistente; I: resistência intermediária; S: sensível

ANEXO B -Teste de susceptibilidade das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos de uso clínico.

Micro-Organismos	Ceftazidima	Gentamicina	Amicacina	Aztreonam	Ciprofloxacino	Imipinem	Piperaciclina+Tazobactam	Cloranfenicol
64	S	S	S	S	S	R	S	I
261	S	S	S	S	S	S	S	R
262	S	S	S	S	S	S	S	S
Pseudo 1	S	S	S	S	S	S	S	S
Pseudo 2	S	S	S	S	S	S	S	R
Pseudo 3	S	S	S	S	S	S	S	R

64- Pseudo 3 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*; R: resistente; I: resistência intermediária; S: sensível

ANEXO C– Artigo publicado na Revista Experimental Pathology and Health Sciences

REVISTA EXPERIMENTAL PATHOLOGY AND HEALTH SCIENCES ISSN: 1646-8422

QUANTITATIVE ANTIMICROBIAL EVALUATION OF CONTROL AND IRRADIATED EXTRACTS OF *Syzygium cumini* (L.) Skeels AGAINST ISOLATED CLINICAL STRAINS OF *Staphylococcus aureus*

Vicalvi-Costa, M.C.V.^{1*}; Costa Júnior, C.E.O.²; Magalhães, L.P.M.¹; Oliveira, C.V.J.¹; Sena, K.X.F.R.¹; Colaço, W.¹

¹ Antibiotics Department, Federal University of Pernambuco

² Faculdade Integrada de Pernambuco (FACIPE)

* claudiavicalvi@hotmail.com

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* is the most common micro-organisms involved in the genesis of hospital infections as well as in community-acquired infections. Among the various species of plants used for medicinal purposes can be highlight the use of olive *Syzygium cumini* (L.) Skeels. The objective was to evaluate qualitative and quantitatively crude extract of ethyl acetate of root of *Syzygium cumini* (L.) Skeels against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Clinical isolates of *S. aureus*, most multidrug-resistant, were used. The analysis of the plant activity was determined by MIC in multiwell plates. For MIC, values were 2000 µg / mL and 125 µg / mL and MBC > 2000 µg / mL to 125 µg / mL for the control and the extract irradiated with 10 kGy, respectively. The results show that the dose of 10 kGy increased activity antimicrobial of the olive root extract.

Key words: *Staphylococcus aureus*, irradiation, plant activity

1. INTRODUCTION

The use of medicinal plants in therapeutic processes has been observed for many centuries (Yamada, 1998; MORAES; SANTANA, 2001). The species *Syzygium cumini* (L.) Skeels, a member from Myrtaceae family, is a tree native of the tropics, particularly India, Thailand, the Philippines and Madagascar (DANADIO et al., 1998). Olive related studies show that some parts have antimicrobial properties (ALBERTON et al., 2001). *S. aureus* is the most species of medical interest, especially in nosocomial environment that is often associated with various infections in humans (Cassettari et al., 2005, Koneman et al., 2012). In the pursuit of enhancing the antimicrobial action of various chemical components present in the plant, such as phenols, tannins, flavonoids, among others, various technologies have been applied, including the use of ionizing radiation. Studies show that radiation was able to

reduce or increase the amount of phenols, tannins or flavonoids according to the dose used in various plant species thus influencing their antimicrobial property (SATOMI et al., 2005).

2. MATERIAL AND METHODS

The plant material, root, of *S. cumini* (L.) Skeels, was collected at the Federal University of Pernambuco and after the voucher specimen was made with deposit number 52527. The drying of the material was made in an oven at 50 °C for seven days or even complete loss of moisture. Then, the root was milled for improved extraction of compounds. They were weighed 400 Grams and the sample added 1200 mL of solvent three times successively in the following order ethanol, ethyl acetate, hexane. The solution (plant-solvent) was taken to shaking table for 2 hours for each solvent addition made to optimize the removal of active ingredients. After maceration, the extracts were evaporated to dryness under pressure. Crude extracts of ethyl acetate were generated. The extracts were irradiated at doses of 6, 8 and 10 kGy in irradiator with a Co⁶⁰ source Gammacell with dose rate 2,934 kGy/h. For antimicrobial susceptibility testing were used 16 strains of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. The suspensions of microorganisms were standardized at 0.5 Mc Farland scale. The stock solution of the extracts had the initial concentration of 20,000 µg/mL. The determination of MIC and MBC was assessed according to the criteria adopted by the CLSI 2013.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In the evaluation of MIC and MBC, the values found for the control extract ranged from 500 to 2000 µg / mL for MIC and 500 to > 2000 µg / mL to MBC. For irradiated with 6kGy values were 500 -1000 µg / mL for MIC and 1000-2000 µg / mL for MBC. At the dose of 8kGy, values were found between 125-2000 µg / mL and 125 -> 2000 µg / mL for MIC and MBC, respectively. The best values were found for irradiated extracts with 10 kGy with MIC 125-500 mg / mL and MBC 125-1000 µg / mL (Table 1).

Table 1- MIC and MBC values for control and irradiated extracts of root of *Syzygium cumini* (L.) Skeels

ETHYL ACETATE EXTRACT OF ROOT OF <i>Syzygium cumini</i> (L.) skeels								
Micro-organisms	Control Extract		6kGy Extract		8kGy Extract		10kGy Extract	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
670	500	1000	500	1000	500	1000	500	1000
671	500	500	1000	2000	2000	>2000	500	500
672	1000	2000	500	1000	500	1000	500	1000
679	1000	>2000	1000	2000	250	250	250	250
691	1000	2000	500	500	500	500	500	500
700	2000	2000	2000	2000	500	500	250	250
707	1000	1000	1000	1000	250	250	125	125
711	1000	1000	500	1000	250	250	125	125
718	1000	2000	500	1000	250	250	125	125
719	1000	2000	1000	2000	500	500	250	250
725	1000	2000	500	1000	125	125	125	125
728	2000	>2000	1000	2000	500	500	125	125
729	1000	2000	1000	2000	250	250	125	125
730	1000	2000	1000	2000	500	500	125	125
731	1000	2000	1000	1000	1000	1000	500	500
732	1000	2000	1000	1000	125	125	125	125

Santos et al. (2010) evaluated the effect of radiation on *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan leaves extracts and stem bark with doses of 5, 7.5 and 10 kGy against many microorganisms, and obtained halos of 17, 33 mm (SD: 1.53) and MIC 100 µg / mL with extracts irradiated with 10 kGy of bark and leaves 14.67 mm (SD: 0.58) and 50 µg / mL for *S. aureus* results close to those found in this study.

Solidônio et al., (2015) evaluating the antimicrobial activity of extracts of cyclohexane, ethyl acetate and ethanol irradiated and non-irradiated of chamomile against *Staphylococcus aureus* with disk diffusion test found values between 11 (± 0) and 8.66 (± 0.57) to cyclohexane, 9 (± 0) to 9.66 (± 0.57) to ethyl acetate, except extracts obtained from samples irradiated with 10 kGy of the brand 3. *Staphylococcus aureus* was inhibited by ethanolic extracts of the control, 8 kGy and 10 kGy of mark 2 with halos between 9 (± 0) to 9.66 (± 0.57).

4. CONCLUSION

It can be concluded that the extract that has been irradiated with 10 kGy dose showed better antimicrobial activity against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Of the 16 microorganisms tested, 50% was inhibited with 125 µg / mL.

5. REFERENCES

1. ALBERTON, J.R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L.V.S; FRANCO, S.L. **Rev. Bras. Farmacog.** **11**: 37-50. 2001.
2. DANADIO, L.C., NACHTIGAL, J.C.; SACRAMENTO, C.K. "*Frutas exóticas*", Funep, Jaboticabal, págs. 119-120. 1998.
3. CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? **Braz. Journal Infect. Dis.** , v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005.
4. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** Wayne, PA. 23rd informational supplement, M100-S23, 2013.
5. SOLIDONIO, E. G. ; BURLE, Y.S. ; SILVA, P.A. ; VICALVI, M. C. V. ; SOUZA, I. F. A. C. ; SILVA, G. R. ; SENA, K. X. F. R. ; COLACO, W. . Evaluation of antimicrobial activity of extracts of chamomile (*Matricaria recutita* L.) obtained from irradiated and non-irradiated samples. In: A. Méndez-Vilas. (Org.). **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational ProGrams.** 1ed.: , 2015, v. 1, p. 151-156.
6. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL, V. R. et al. **Diagnóstico Microbiológico.** 6^a Edição, D. F.: Ed. Médica Panamericana S.A., 1565p. 2012.
7. MORAES, M.E.A.; SANTANA, G.S.M. Aroeira-do-sertão: um candidato promissor para o tratamento de úlceras gástricas. **Funcap**, v. 3, p. 5-6, 2001.
8. Santos, G.H.F.; Silva, E.B.; Sena, K.X.F.R.; B.L. Silva, B.L.; Lima, C.S.A.; The influence of ⁶⁰Co gamma radiation on the action of phenolic compounds of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the microbiological control of crude extracts. **Int. J. Low Radiation**, Vol. 7, No. 3, 2010.
9. SATOMI, L. C.; SORIANI, R. R.; PINTO, T. J. A. Descontaminação de drogas vegetais empregando irradiação gama e óxido de etileno: aspectos microbianos e químicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v. 41, n. 4, p. 445-450, 2005.
10. YAMADA, C.S.B. **Rev. Racine** **43**: 50-51, 1998.