



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

CAMILA LUIZ GOMES

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA E ANTIBACTERIANA DO EXTRATO
SECO PADRONIZADO À BASE DE *SYZYGIUM CUMINI* (L.) SKEELS**

Recife

2018

CAMILA LUIZ GOMES

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA E ANTIBACTERIANA DO
EXTRATO SECO PADRONIZADO À BASE DE *SYZYGIUM CUMINI* (L.) SKEELS**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Recife

2018

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Gomes, Camila Luiz

Obtenção e avaliação antifúngica e antibacteriana do extrato seco padronizado à base de *Syzygium cumini* (L.) Skeels/ Camila Luiz Gomes- 2018.

114 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Pedro José Rolim Neto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Inovação Terapêutica. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Fitoquímicos 2. Matéria médica vegetal 3. Taninos I. Rolim Neto, Pedro José (orient.) II. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-110

CAMILA LUIZ GOMES

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA E ANTIBACTERIANA DO
EXTRATO SECO PADRONIZADO À BASE DE *SYZYGIUM CUMINI* (L.) SKEELS**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 09/03/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Rolim José Neto/ Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim/ Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Rhayanny Assunção Ferreira/ Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, por ter me proporcionado mais essa conquista e guiado meus passos para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu querido orientador, *Professor Dr. Pedro Rolim*, que acreditou na minha capacidade e me ajudou na concretização deste trabalho, pela amizade, apoio e ensinamentos.

A minha família, *Roseli Aparecida Luiz Gomes, Alfredo Gomes Filho, Roberta de Cássia Gomes e Felipe Luiz Gomes*. Muito obrigada por tudo!

Ao meu namorado, *Denis Romero Machado Arruda*, por todo companheirismo, incentivo, amor e dedicação para comigo.

A todos meus familiares, pela solidariedade e amizade.

A todos meus amigos, obrigada pelo apoio, confiança e carinho. Em especial a *Clovis Macêdo, Jade Maria de Oliveira e Lorena Gonçalves*. Amo vocês!

Ao *Laboratório de Tecnologia de Medicamentos - LTM*, pela oportunidade de realizar este trabalho e a *todos os seus integrantes* pela aprendizagem diária regada a muitas risadas, em especial, *Caio Cesar Andrade Rodrigues Silva, Rosali Maria Ferreira da Silva, Camila Gomes de Melo, Leslie Raphael Moura Ferraz e José Lourenço Neto*.

Ao *Laboratório de Farmagognosia* na figura do *Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares* e principalmente a *Prof^a. Dr^a. Magda Rhayanny Assunção Ferreira*, pelo auxílio nas análises fitoquímicas, por todo apoio e paciência.

Ao *Laboratório de Química Farmacêutica* na figura da *Prof. Dra. Elba Lúcia* pela disponibilização de seus equipamentos e laboratório.

A *Prof. Dra. Ana Maria Rabelo*, pelo carisma e auxílio nas análises da atividade antifúngica.

A *Prof. Dra. Eulália Ximenes*, pelo suporte, atenção e empenho nas análises da atividade antibacterianas.

A *Goretti Farias, Georgia Vasconcelos Galuppo, Jaqueline Vasconcelos, Zayanna Ribeiro, Érica Pimentel* e toda sua equipe pelo apoio, carinho e compreensão.

À *Universidade Federal de Pernambuco* e ao *Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica*, pela estrutura disponibilizada para condução das atividades.

A *CAPES e CNPq* pelo auxílio financeiro no desenvolvimento deste projeto, bem como pela bolsa de estudo fornecida para realização deste mestrado.

A *todos* que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A utilização de plantas para o tratamento de doenças tem sido uma alternativa terapêutica muito importante, principalmente em países em desenvolvimento. *Syzygium cumini* (L.) Skells faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), possui como sinonímia: *Eugenia cumini* Druce. É popularmente conhecida como azeitona preta, amplamente utilizada por possuir atividade antidiabética, anti-inflamatória e antibacteriana já comprovadas cientificamente. Este trabalho teve como objetivo a obtenção e avaliação antimicrobiana do extrato seco padronizado à base de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. A droga vegetal foi caracterizada através dos ensaios farmacopéicos e fitoquímico. A solução extrativa foi obtida por micro-ondas e a escolha do solvente extrator foi feita com base na melhor resposta antifúngica dos extratos liofilizados. Depois de escolhido o solvente, a solução extrativa foi doseada por fenóis e taninos totais pela metodologia desenvolvida no estudo e comparada com os teores da solução extrativa obtida por banho-maria com agitação utilizando o mesmo solvente. Posteriormente, foi realizado a otimização da extração por planejamento fatorial pelo desenho Box-Behnken; o método analítico validado quanto aos parâmetros exigidos pela RDC 166/2017 e o extrato seco padronizado. A atividade antimicrobiana do extrato seco padronizado foi determinada a partir da concentração inibitória mínima, concentração fungicida mínima e bactericida mínima pela técnica de microtitulação plana de 96 poços. O ensaio de toxicidade do extrato padronizado foi realizado pela metodologia em invertebrados em larvas de *Tenébrio Molitor*. Os resultados demonstraram que a droga vegetal possui 0,1% de óleos voláteis, 4,53% de cinzas totais, 6,71% de água, presença de polifenóis, taninos condensados, flavonoides, saponinas, açúcares redutores, terpenos e esteróides. O extrato com melhor ação farmacológica foi o obtido com etanol: água (1:1, v/v) e a técnica de extração por micro-ondas foi a mais eficiente para extração de fenóis e taninos totais. A metodologia analítica se mostrou específica, linear, robusta, precisa e exata. Na otimização da extração as melhores condições foram: tempo de 10 min, potência 300 W, proporção droga solvente (1/40), solvente etanol/água 35/65 v/v. Todas as cepas de fungos e bactérias foram sensíveis ao extrato seco padronizado, bem como baixa toxicidade. Os resultados obtidos contribuem com a literatura no sentido do potencial antimicrobiano da espécie *S. cumini*, como também apontam a técnica de micro-ondas como mais eficiente na obtenção de maiores teores dos metabólitos de interesse.

Palavras-chave: Extrato. Micro-ondas. Taninos.

ABSTRACT

The use of plants for the treatment of diseases has been a very important therapeutic alternative, especially in developing countries. *Syzygium cumini* (L.) Skeels is part of the National List of Medicinal Plants of Interest to the Unified Health System (SUS), has as synonym: *Eugenia cumini* Druce. It is popularly known as black olives, widely used for possessing antidiabetic, anti-inflammatory and antibacterial activity already proven scientifically. The objective of this work was to obtain and antimicrobial evaluation of the standardized dry extract based on *Syzygium cumini* (L.) Skeels. The plant drug was characterized by pharmacopoeial and phytochemical tests. The extractive solution was obtained by microwave and the choice of the extracting solvent was made based on the best antifungal response of the lyophilized extracts. After the solvent was chosen, the extractive solution was dosed by total phenols and total tannins by the methodology developed in the study and compared with the contents of the extractive solution obtained by digestion using the same solvent. Afterwards, the optimization of the extraction by factorial design by the Box-Behnken design was carried out; the validated analytical method for the parameters required by RDC 166/2017 and the standardized dry extract. The antimicrobial activity of the standardized dry extract was determined from the minimum inhibitory concentration, minimum fungicidal concentration and minimal bactericide concentration by the 96-well flat microtiter technique. The toxicity test of the standardized extract was carried out by the methodology in invertebrates in larvae of *Tenebrio Molitor*. The results showed that the plant drug has 0.1% of volatile oils, 4.53% of total ashes, 6.71% of water, presence of polyphenols, condensed tannins, flavonoids, saponins, reducing sugars, terpenes and sterolides. The best pharmacological action was obtained with ethanol: water (1: 1, v / v) and the microwave extraction technique was the most efficient for extraction of total phenols and tannins. The analytical methodology proved to be specific, linear, robust, accurate and accurate. In the optimization of the extraction the best conditions were: time of 10 min, potency 300 W, ratio drug solvent (1/40), solvent ethanol / water 35/65 v / v. All strains of bacterial and fungi were sensitive to standardized dry extract as well as low toxicity. The results obtained contribute to the literature in the sense of the antimicrobial potential of *S. cumini* species, as well as the microwave technique as more efficient in obtaining higher levels of the metabolites of interest.

Keywords: Extract. Microwaves. Tannins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Histograma de distribuição granulométrica e curvas de retenção e passagem.	60
Figura 2 - Curvas TG/DTG e DTA.	61
Figura 3 - Resultados obtidos no estudo de sazonalidade de flavonóides e polifenóis. ...	63
Figura 4 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando-se 500 ppm de Folin-Ciocalteu.....	69
Figura 5 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando-se 600 ppm de Folin-Ciocalteu.....	70
Figura 6 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando 700ppm de Folin-Ciocalteu.	71
Figura 7 - Curva de calibração dos fenois residuais utilizando-se 700 ppm de Folin-Ciocalteu.....	71
Figura 8 - Curva de calibração lida após 30, 60, 120, 180 e 240 minutos.	74
Figura 9 - Média das curvas de calibração utilizadas na avaliação das soluções reagentes.....	76
Figura 10 - Valores de fenóis totais nos tempo 0, 2 e 4 h.	77
Figura 11 - Espectros de varredura obtidos na análise de especificidade com e sem adição de Folin-Ciocalteu para determinação de polifenóis para <i>S.cumini</i>	79
Figura 12 - Linearidade da curva padrão para fenois totais.....	80
Figura 13 - Linearidade da solução extrativa para fenois totais.....	80
Figura 14 - Plotagem de resíduo para fenois totais da curva padrão	81
Figura 15 - Plotagem de resíduo da curva padrão da solução extrativa para fenois totais	81
Figura 16 - Comparativo entre os resultados das concentrações de taninos totais feito com a solução extrativa de <i>S. cumini</i> e com ácido tânico.....	82
Figura 17 - Linearidade realizada para solução padrão e para solução extrativa.....	83
Figura 18 - Plotagem de resíduo da curva padrão para taninos totais.....	83
Figura 19 - Plotagem de resíduo da curva padrão da solução extrativa para fenois totais	84
Figura 20 - Contornos das superfícies de respostas obtidos para fenóis totais (A, B e C) e taninos totais (D, E e F). Fatores ausentes em cada gráfico encontram-se no nível +1....	90
Figura 21 - Imagem macroscópica do extrato seco de <i>S. cumini</i>	92
Figura 22 - Curva TG/DTG e DTA do extrato seco de <i>S. cumini</i>	93

Figura 23 - Avaliação da toxicidade do extrato seco padronizado de *S. cumini* em larvas *Tenébrio molitor*. 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental Box-Behnken para o incremento de fenóis totais e taninos totais da solução extrativa das folhas de <i>S.cumini</i>	50
Tabela 2 - Índice pluviométrico anual em mm da região do Cabo de Santo Agostinho..	63
Tabela 3 - Atividade antifúngica de extratos secos vegetais obtidos de <i>S. cumini</i>	64
Tabela 4 - Valores de pH das soluções extrativas das folhas de <i>S. cumini</i> extraídos pelas técnicas de microondas e digestão	66
Tabela 5 - Valores da densidade relativa das soluções extrativas das folhas de <i>S. cumini</i> extraídos pelas técnicas de micro-ondas e digestão.	66
Tabela 6 - Valores do resíduo seco das soluções extrativas das folhas de <i>S. cumini</i> extraídos pelas técnicas de microondas e digestão	66
Tabela 7 - Teor de fenóis e taninos totais das folhas de <i>S. cumini</i> extraídos pelas técnicas de micro-ondas e digestão	67
Tabela 8 - Valores da triplicata das absorbâncias do padrão ácido tânico aplicando 500ppm do reagente de Folin-Ciocalteu	68
Tabela 9 - Valores da triplicata das absorbâncias do padrão ácido tânico aplicando 600ppm do reagente de Folin-Ciocalteu	69
Tabela 10 - Valores da triplicata das absorbâncias do padrão ácido tânico aplicando 700ppm do reagente de Folin-Ciocalteu	70
Tabela 11 - Avaliação das concentrações de caseína sobre o doseamento de taninos totais de <i>S. cumini</i>	72
Tabela 12 - Avaliação dos tempos de complexação da caseína com fenóis totais sobre o doseamento de taninos totais de <i>S. cumini</i>	73
Tabela 13 - Valores de absorvância da curva de calibração lida após 30, 60, 120, 180 e 240 minutos	74
Tabela 14 - Valores de absorvância obtidas na avaliação da estabilidade das soluções reagentes após 1º, 2º 3º 14º e 49º dia	75
Tabela 15 - Resultados da avaliação dos teores de taninos totais e fenóis totais de <i>S. cumini</i> no estudo de estabilidade do extrato sem refrigeração.....	77
Tabela 16 - Avaliação dos teores de taninos totais e fenóis totais de <i>S. cumini</i> no estudo de estabilidade do extrato sob refrigeração	78
Tabela 17 - Análise de robustez.....	85

Tabela 18 - Análise da precisão intermediária para fenois totais.....	85
Tabela 19 - Análise da precisão intermediária para taninos totais	86
Tabela 20 - Teste de recuperação para fenois totais	86
Tabela 21 - Teste de recuperação para taninos totais.....	86
Tabela 22 - Fatores, níveis e resposta obtidos do planejamento Box-Behnken para otimização da extração de fenois totais e taninos totais de das folhas de <i>S. cumini</i>	87
Tabela 23 - Efeitos estimados por regressão de mínimos quadrados e ANOVA do planejamento experimental Box-Behnken. Valores significativos ($p < 0,05$) estão marcados em negrito	89
Tabela 24 - Valores estimados pela função desejabilidade e observados experimentalmente na condição de $X_1, X_2, X_3 = +1$ e $X_4 = -0,5$	91
Tabela 25 - Propriedade de compactação do extrato seco de <i>S. cumini</i>	94
Tabela 26 - Atividade antifúngica do extrato padronizado de <i>S. cumini</i>	96
Tabela 27 - Sensibilidade antifúngica dos extratos secos vegetais com e sem otimização obtidos de <i>S. cumini</i> frente a isolados clínicos de <i>Candida</i>	96
Tabela 28 - Atividade antibacteriana do extrato padronizado de <i>S. cumini</i>	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Uso popular de <i>Syzygium Cumini</i>	23
Quadro 2 - Diferentes atividades farmacológicas <i>S. cumini</i>	24
Quadro 3 - Lista de agentes patogênicos prioritários da OMS para a P&D de novos antibióticos	30
Quadro 4 - Padrões, sistemas e reagentes específicos utilizados para cada identificação dos metabolitos.....	39
Quadro 5 - Padrões, sistemas e reagentes específicos utilizados para pesquisa de sazonalidade para cada metabolito.	40
Quadro 6 - Interpretação do Índice de Carr (IC) para a fluidez de pós	53
Quadro 7 - Classes pesquisadas nos meses de novembro/2015 e junho/2016.	62

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ATCC	- American Type Culture Collection
CBM	- Concentração Bactericida Mínima
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CE ₅₀	- Concentração efetiva 50%
CFM	- Concentração Fungicida Mínima
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CT	- Cinzas Totais
CV	- Coeficiente de variação
Dap	- Densidade aparente
DP	- Desvio padrão
DTA	- Análise térmica diferencial
DTG	- Termogravimetria derivada
EAT	- Equivalente de cido Tânico
IC50	- ndice de morte celular 50%
Mdc	- Massa do densímetro cheio
Mdv	- Massa do densímetro vazio
NEU	- Solução 1% de difenilboriletoxietilamina
PEG	- Polietilenoglicol
PPM	- Partes por milhão
RPM	- Rotação por minuto
SDA	- Sabouraud Dextrose Agar
SUS	- Sistema nico de Sade
TG	- Análise Termogravimétrica
UV	- Ultravioleta
Vd	- Volume do densímetro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.2	OBJETIVOS	20
1.2.1	Objetivo Geral.....	20
1.2.2	Objetivos Específicos	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	<i>SYZYGIVM CUMINI</i>	21
2.1.1	Aspectos botânicos	21
2.1.2	Propriedades farmacológicas.....	22
2.1.3	Perfil fitoquímico	25
2.1.4	Aspectos toxicológicos	26
2.2	DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS	27
2.3	DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS E BACTÉRIAS	28
2.4	TERAPIA E RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA	29
2.5	TERAPIA E RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA	29
2.6	METABÓLITOS VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	31
2.7	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	35
3.1.1	Obtenção da droga vegetal (estabilização, secagem e pulverização)	35
3.1.2	Caracterização físico-química da droga vegetal	35
3.2	TRIAGEM FITOQUÍMICA DA DROGA VEGETAL	38
3.2.1	Preparo das amostras	38
3.3	AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE.....	39
3.3.1	Preparo das amostras	39
3.3.2	Pesquisa de sazonalidade de flavonoides e taninos	40
3.4	DEFINIÇÃO DE SOLVENTE EXTRATOR A PARTIR DE RESPOSTA FARMACOLÓGICA	40
3.4.1	Obtenção das soluções extrativas por micro-ondas.....	40
3.4.2	Obtenção dos extratos secos.....	41
3.4.3	Teste de sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos secos de <i>S. cumini</i>	41

3.5	DEFINIÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO VISANDO MAIOR TEOR DE TANINOS TOTAIS	42
3.5.1	Obtenção das soluções extrativas	42
3.5.2	Caracterização da solução extrativa	43
3.6	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE TANINOS TOTAIS DAS FOLHAS DE <i>S. CUMINI</i>	44
3.6.1	Matérias-primas.....	44
3.6.2	Adaptação para leitura de fenois e taninos totais	44
3.6.3	Definição da concentração de caseína	45
3.6.4	Avaliação do tempo de complexação da caseína	45
3.7	AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE	45
3.7.1	Avaliação da cinética da curva de calibração	45
3.7.2	Avaliação da estabilidade das soluções reagentes.....	46
3.7.3	Estabilidade da solução extrativa.....	46
3.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	46
3.8.1	Especificidade.....	47
3.8.2	Linearidade, limites de detecção e quantificação para fenois totais	47
3.8.3	Linearidade, limites de detecção e quantificação para taninos totais.....	47
3.8.4	Robustez.....	48
3.8.5	Precisão.....	48
3.8.6	Exatidão.....	48
4.9	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO	49
4.9.1	Planejamento fatorial	49
3.9	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S.CUMINI</i>	50
3.9.1	Obtenção do extrato seco padronizado de <i>S. cumini</i>	50
3.10	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO OTIMIZADO DE <i>S.CUMINI</i>	51
3.10.1	Descrição macroscópica	51
3.10.2	Determinação de pH	51

3.10.3	Determinação da área superficial específica e porosidade do extrato seco otimizado de <i>S. cumini</i>	51
3.10.4	Caracterização térmica	51
3.10.5	Determinação de fenois e taninos totais.....	52
3.10.6	Avaliação das propriedades de compactação.....	52
3.10.7	Avaliação do ângulo de repouso e tempo de escoamento.....	53
3.11	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	53
3.12	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	54
3.13	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1	MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	57
4.1.1	Caracterização físico-química da droga vegetal	57
4.2	TRIAGEM FITOQUÍMICA DA DROGA VEGETAL	61
4.3	AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE.....	62
4.4	DEFINIÇÃO DE SOLVENTE EXTRATOR A PARTIR DE RESPOSTA FARMACOLÓGICA	63
4.4.1	Teste de sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos secos de <i>S. cumini</i>	63
4.5	DEFINIÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO VISANDO MAIOR TEOR DE TANINOS TOTAIS	65
4.5.1	Caracterização da solução extrativa	66
4.6	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE TANINOS TOTAIS DAS FOLHAS DE <i>S. CUMINI</i>	67
4.6.1	Adaptação para leitura de taninos e polifenóis.....	67
4.6.2	Definição da concentração de caseína.....	71
4.6.3	Avaliação do tempo de complexação da caseína.....	72
4.7	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE.....	73
4.7.1	Avaliação da cinética da curva de calibração	73
4.7.2	Avaliação da estabilidade das soluções reagentes.....	75

4.7.3	Estabilidade da solução extrativa	76
4.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	78
4.8.1	Especificidade	78
4.8.2	Linearidade, limites de detecção e quantificação de fenois totais e taninos totais	79
4.8.3	Robustez	84
4.8.4	Precisão	85
4.8.5	Exatidão	86
4.9	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO	86
4.9.1	Planejamento fatorial	86
4.10	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO OTIMIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	91
4.10.1	Descrição macroscópica	91
4.10.2	Determinação de pH do extrato seco otimizado de <i>S. cumini</i>	92
4.10.3	Determinação da área superficial específica e porosidade do extrato seco	92
4.10.4	Caracterização térmica	93
4.10.5	Determinação de fenois totais e taninos totais	93
4.10.6	Avaliação das propriedades de compactação, ângulo de repouso e tempo de escoamento	93
4.11	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	94
4.12	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	96
4.13	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	98
5	CONCLUSÃO	101
	REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

O consumo dos medicamentos fitoterápicos, nutracêuticos, fitocosméticos se mostra crescente tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento devido o retorno às terapias que utilizam recursos naturais. Isso tem sido possível pelo estabelecimento de tecnologias modernas de pesquisa, desenvolvimento e inovação dos medicamentos através do estudo do conhecimento popular sobre as plantas medicinais e pelo estabelecimento de marcos regulatórios governamentais (SANTOS et al., 2011; MELO, 2014).

Mesmo com o grande avanço do conhecimento científico, como também da tecnologia médica, as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo continuam sendo as doenças infecciosas. Estas respondem por cerca de metade de todos os óbitos em países tropicais (TEKWU; CONSTANTE; BENG, 2012).

Há algum tempo a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário, tendo em conta que 80% da população mundial utiliza estas plantas ou preparações destas no que se refere à atenção primária de saúde (NICOLETTI, 2009).

No Brasil, o Ministério da Saúde a partir da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, desenvolveu a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS (RENISUS), que é uma lista onde constam 71 espécies vegetais que apresentam potencial para gerar fitoterápicos que poderão ser disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Dentre as plantas divulgadas na RENISUS, encontra-se a espécie *Syzygium jambolanum* DC., sinonímia de *Syzygium cumini* (L.) SKEELS, popularmente conhecida como azeitona preta, jambolão, jamelão ou jalão (ALBERTO et al., 2001), uma espécie amplamente utilizada por possuir atividade antidiabética, anti-inflamatória e antibacteriana (SAMADDER et al., 2011).

Este trabalho aborda o tema da pesquisa voltado para obtenção e avaliação antifúngica e antibacteriana do extrato seco à base de *Syzygium cumini* em condições para que em pesquisas futuras seja veiculado em uma forma farmacêutica e também possa servir de base para sugerir alternativas para o tratamento de doenças oriundas de infecções microbianas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Obtenção e avaliação antifúngica e antibacteriana do extrato seco padronizado à base de *Syzygium cumini* (L.) Skeels.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar físico-química e perfil fitoquímico do pó das folhas de *S. cumini*.
- b) Obter e caracterizar as soluções extrativas de *S. cumini*.
- c) Realizar teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* dos extratos secos de *S. cumini*;
- d) Dosear a solução extrativa detentora da melhor ação farmacológica;
- e) Avaliar a estabilidade da solução extrativa e das soluções reagentes;
- f) Validar o método analítico;
- g) Otimizar o método extrativo;
- h) Obter e caracterizar o extrato seco de *S. cumini* detentor da melhor resposta farmacológica;
- i) Realizar teste de sensibilidade antibacteriana *in vitro* do extrato seco padronizado e otimizado de *S. cumini*;
- j) Realizar teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* do extrato seco padronizado e otimizado de *S. cumini*;
- k) Realizar teste de toxicidade *in vivo* do extrato seco padronizado e otimizado de *S. cumini*

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *SYZYGIUM CUMINI*

A família Myrtaceae, compreende em torno de 100 gêneros e 3.000 espécies espalhadas por praticamente todo o globo, mas com maior concentração geralmente nas Américas e Austrália, dentre as quais encontra-se *Syzygium cumini* (L.) Skeels (JOLY, 1975; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012) uma árvore oriunda da Ásia tropical, produtora de frutos comestíveis com sabor adstringente e dotados de coloração roxa ao amadurecer (ROIG; MESA, 1945; ALICE et al., 1995).

Popularmente conhecida como jamelão (PIO CORRÊIA, 1984), jambolão ou jalão (PIO CORRÊIA, 1984; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012), a espécie é portadora de algumas sinomínias: *Syzygium jambolanum* DC., *S. caryophyllifolium* DC., *Eugenia corticosa* Lour., *E. frondosa* Wall., *E. jambolifera* Roxb., *E. moorei* Muell., *E. obtusifolia* Roxb., *E. glomerata* Sieber., *Calyptantes caryophyllifolia* Wild., *C. jambolana* Willd., *C. cumini* Pers., *Jambolifera pedunculata* Gaertn., *E. cumini* Druce., *Myrtus cumini* L. (JACKSON; HOOKER, 1960), *Eugenia cumini* (Linn) Druce., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC., *Syzygium jambolana* DC., *Calyptanthes jambolana* Willd., *Myrtus cumini* Linn., *Eugenia djouant* Perr. (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012), *Eugenia jambolana* Lam., *Eugenia caryophyllifolia* Lam. (JACKSON; HOOKER, 1960; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012).

De acordo com os relatos históricos, a espécie *S. cumini* esteve presente em várias regiões do sul asiático, tais como: Indonésia, Sri Lanka, Paquistão, Nepal, Birmânia, Bangladesh e Índia (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012). Além disso, a espécie possui grande facilidade de adaptação, pois ao ser introduzida na Malásia, esta se espalhou com facilidade pela região (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012).

2.1.1 Aspectos botânicos

A espécie *S. cumini* (L.) Skeels é uma árvore de grande porte podendo alcançar em média 6 metros de altura com 3 a 4 metros de diâmetro. Considerando a projeção da copa, apresenta uma grande quantidade de folhas, resultando em uma copa amplamente verde, além de dispor de um caule aéreo, ereto, tipo tronco, lenhoso, cilíndrico com ramificação simpodial (ALBERTON et al., 2001) possui uma casca grossa marrom acinzentada esfoliante em escalas lenhosas (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012). A madeira, por sua vez, é esbranquiçada,

estreita e rígida, podendo ser utilizada para extração de um corante marrom e uma goma conhecida como “Kino” (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012). A espécie dispõe de ramos retorcidos com folhas dispostas em filotaxia opostas. No que se refere às folhas, estas são simples, pecioladas, lanceoladas, com margem de inteira a ondulada, ápice cuspidado e base cuneada, a nervação é penínérvea, com nervura marginal (nervuras soldadas em bordo). As flores são verificadas em inflorescências axilares, racemosas, plurifloras, compostas, são hermafroditas, possuindo cálice gamossépalo e corola dialipétala. O androceu é dialisêmone e polistêmone, possuem anteras globosas que estão dispostas no filete dorsiventralmente e apresentam deiscência longitudinal. O gineceu contém ovário ínfero, gamocarpelar, bicarpelar, bilocular com placentação axial (ALBERTON et al., 2001). Os frutos possuem pericarpo com coloração roxa escura ou quase pretos, sendo comestíveis, saborosos e carnudos, elípticos medindo entre 1,5 e 3,5 centímetros, contendo apenas uma única semente por fruto (ALBERTON et al., 2001; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012). O mesocarpo é sucoso e carnosos com sabor característico de ácido a adocicado, resultando em certa adstringência (ALBERTON et al., 2001).

2.1.2 Propriedades farmacológicas

Várias partes de *Syzygium cumini* (folhas, casca, sementes, fruto, flores e raízes) são amplamente utilizadas na medicina popular. Seu uso intenso estimulou a pesquisa científica, identificando indicações terapêuticas devido às inúmeras ações farmacológicas do jambolão como: antidiabética, hipotensiva, diuréticas, antiinflamatória, antifúngica, anticonvulsivantes entre outras discriminadas no Quadro 1 (BALDISSERA, 2015; SRIVASTANA; CHANDRA, 2013).

Quadro 1 - Uso popular de *Syzygium Cumini*

Parte da Planta	Uso popular	Referência
Folhas	diabetes, ação hipotensiva, diuréticas, adstringência, obstipação, leucorréia, estômago, cataplasma em doenças de pele, acalmar prurido, antiinflamatória, antimicrobiana.	Ross,1999; Morton,1987; Alberton et al.,2001; Zanoello et al.,2002, Schapoval et al.,1988
Casca	atividade antidiarréica, ação inibitória contra atividade do HIV - 1 protease, hipoglicemiante, adstringência e obstipação, e é utilizada no tratamento de hemorragias e leucorréia, diabetes e úlcera venérea, indigestão e purificação do sangue, disenteria, dispepsia, anti-séptico, adstringente em ulcerações bucais, gengivas esponjosas e estomatite, inflamações locais	Ross,1999; Morton,1987; Alberton et al.,2001; . Pepato et al., 2001
Sementes	anticonvulsivante, hipoglicemiante, adstringente e obstipação, atividade eupéptica, anti-hemorrágica, para alterações no estômago, antiinflamatória, bactericida, diarréia, diabetes, disenteria e hipertensão.	Ross,1999; Morton,1987; Alberton et al.,2001; Damasceno, et al.,2002; Pepato et al., 2001
Frutos	hipoglicemia, adstringência e obstipação, diuréticos e estomáticos, tratamento gastrintestinal, adstringente e oralmente para úlcera de estômago, redução de acidez e diabetes, carminativo, antiescorbútico e diurético, diarréia aguda e crônica, retenção urinária, gargarejo para irritações da garganta, loção descamação do couro cabeludo, antiinflamatório, antipirético, adstringente, no tratamento de disenteria, diarréia e diabetes.	Ross,1999; Morton,1987; Timbola et al.,2002; Sharma et al.,2003, Bhatia & Bajaj, 1975
Flores	Antibióticas	Morton,1987
Raiz	antiemético, aumentar a lactação em lactantes	Ross,1999

As pesquisas comprovaram varias ações farmacológicas (Quadro 2) entre elas, atividade antidiabética, anti-hiperlipidêmica, antioxidante, antiulcerosa, hepatoprotetora, antialérgica, antiartrítica, antibacteriana, radioprotetora, sedativa, antidiarreica,

nefroprotectora, antiinflamatória, antifertilidade, antiulceroso, antimicrobiana e antiviral. (SRIVASTANA; CHANDRA, 2013, RAVI et al., 2005; REKHA et al., 2008).

Quadro 2 - Diferentes atividades farmacológicas *S. cumini*

<i>Syzygium cumini</i> extrato	Efeito (s)	Referência
Extrato em pó de sementes (etanólico)	Efeito anti-hiperlipidêmico	Ravi et al, 2005
Extrato da casca (aquoso)	Efeito anti-hiperlipidêmico	Rekha & Balaji 2008
Extrato em pó de sementes (aquoso)	Efeito antioxidante;	Ravi et al., 2004
Extrato em pó de sementes (etanólico)	Efeito antiulceroso	Chaturvedi et al., 2007
Extrato de casca (etanólico)	Efeito hepatoprotetor	Das & Sarma, 2009
Extrato em pó de sementes (metanólico)	Efeito antiartrítico	Kumar et al., 2008
Extrato de casca aquosa e acetona	Efeito antibacteriano	Djipa et al., 2000
Extrato de pó de sementes hidroalcoólicas	Efeito radioprotetor	Abalea et al., 1999
Extrato de acetato de etilo e pó de sementes metanólico	Efeito do sistema nervoso central	Kumar et al, 2007
Extrato de casca (etanólico)	Efeito antidiarreico	Mukherjee et al., 1998
Isolado a partir de extrato da casca aquosa	Atividade nefroprotetora	Tanwar et al., 2010
Extrato de acetato de etilo e pó de sementes metanólico	Efeito anti-inflamatório	Kumar et al., 2008
Ácido oleanólico isolado de flores	Efeito da antifertilidade	Rajasekaran et al., 1998

As folhas têm sido amplamente estudadas, são usadas para fortalecer dentes e gengivas, tratar diabetes, constipação, leucorréia, gastropatia, dermatopatia e inibir descarga sanguínea nas fezes (JAGETIA; BALIGA, 2002; MITRA et al., 1995).

Pizzale et al., (2002) comprovou que o extrato metanólico da folha possui atividade antioxidante *in vitro* de redução de radicais livres e de redução de ferro na concentração de $(0,015-0,25) \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$. Já Brito et al., (2007) constatou atividade antialérgica do extrato aquoso das folhas na concentração de $0,1 \text{ g kg}^{-1}$ PC via oral. Poongunran et al., (2017) revelou fortes efeitos inibitórios de α -amilase e α -glucosidase de ácido ursólico e ácido oleanólico isolados de folhas de *S. cumini*, validando seu uso na terapia antidiabética.

Alem disso as folhas possuem atividade leishmanicida moderada (BEZERRA et al., 2006), antibacteriana tanto para espécies Gram positivas quanto Gram negativas, muitas das quais resistentes a antibióticos (MICHELIN et al., 2005; LOGUERCIO et al., 2005). Dessa forma, foi evidenciado que os extratos de folhas de *S. cumini* possuem um amplo espectro de ação tanto contra fungos como para bactérias e estudos sugerem que tal ação seja decorrente da alta concentração de taninos presentes na espécie e de outros metabólitos que possam estar envolvidos (MICHELIN et al., 2005; CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004).

2.1.3 Perfil fitoquímico

O jambolão é rico em compostos contendo antocianinas, glicosídeo, ácido elágico, isoquercetina, canferol e mirecetina (MUNIAPPAN; PANDURANGAN, 2012). Por ser uma espécie bastante explorada, todas as suas partes (casca, flores, frutos, sementes e raízes) possuem fitoquímica avaliada cientificamente.

Estudos mostram que a casca do caule é rica em ácido betulínico, friedelina, epifriedelanol, B-sitosterol, eugenina, quercetina, miricetina, ácido gálico e ácido elágico, flavonóides e taninos (SENGUPTA; DAS, 1965, BHARGAVA et al., 1974, BHATIA; BAJAJ, 1975). Já as flores são ricas em campferol, quercetina, miricetina, isoquercetina, dihidromiricetina, ácido oleanólico, acetil ácido oleanólico, eugenol-triterpenoide A e eugenoltriterpenoide (MUNIAPPAN; PANDURANGAN, 2012; NAIR; SUBRAMANIAN, 1962). As raízes se mostraram ricas em flavonóides e glicosídeos (VAISHNAVA; TRIPATHY 1992) e os frutos, em rafinose, glicose, frutose, ácido cítrico, ácido málico, ácido gálico e antocianinas (MORTON, 1987; JAIN; SESHADRI, 1975).

Nas folhas por sua vez foram encontrados: ácido clorogênico, ácido elágico, ácido gálico, metilgalato, 3- O ácido -metilelagico, miricetina 3- O - (4 "- O -acetil) - α -L

rhamnopiranosídeos (myricetrin 4''- O acetato de metilo), caempferol, caempferol 3- o - β -D -glucurono piranosídeo, mearnsetin 3-O-(4''- O- acetil) - α - L- rhamnopiranosídeo, miricetina, miricetina éter 4'-3- O - α - L rhamnopiranosídeo, miricetrina, miricetrina 4''- O- acetil-2 ''- O-galato quercetina 3- o - α - L -rhamnopiranosídeo e quercetrina 4'', nilocitina, taninos condensados e hidrolisados, aos quais foi associada a ação antioxidante para flavanoides e sugeriu-se uma ação sinérgica desses com os taninos para justificar sua potente atividade antimicrobiana (KETTELIN et al., 2013; MONTEIRO et al., 2005; TIMBOLA et al., 2002; MAHMOUD et al., 2001)

Além disso, também foi citada presença de ácido betulínico nas folhas que mostrou participar de ação antitumoral, antiretroviral e antiinflamatório, β -sitosterol um esteroide com ação bactericida, antiviral, fungicida e antiinflamatória, e, escopoletina, uma cumarina que possui ação antibacteriana, antioxidante e inibidora da enzima acetilcolinesterase (VANOLLI et al., 2009; BHATIA et al., 1974; GUPTA; SHARMA, 1974).

2.1.4 Aspectos toxicológicos

Apesar do vasto uso de *S. cumini* e das inúmeras comprovações científicas de suas atividades farmacológicas utilizando diversas partes do vegetal, não há muitos estudos toxicológicos na literatura.

Turatti (2008) avaliou a citotoxicidade por hemólise do extrato de frutos secos da espécie e observou que o índice de morte celular (IC_{50}) do óleo essencial das folhas de *S. cumini* ocorre na concentração de 400 μ g/mL. Rodrigues (2013) avaliou a citotoxicidade também por hemólise do óleo essencial das folhas de *S. cumini* demonstrando que não houve toxicidade relevante, uma vez que o percentual de hemólise foi de 11,3% na maior concentração testada (800 μ g/mL).

Cartaxo (2014) estudou a citotoxicidade do extrato etanólico (70%) das folhas de *S. cumini* e comparou seus resultados com o trabalho desenvolvido por Turatti (2008) utilizando a mesma metodologia, concluindo então que o extrato se mostrou menos tóxico que o extrato do fruto seco da espécie uma vez que foi necessária uma concentração de 2 mg/mL do extrato etanólico das folhas para provocar 50% de morte da população celular, favorecendo assim o uso das folhas de *S. cumini* devido sua maior segurança.

2.2 DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS

Os fitoterápicos, dentre os medicamentos, são aqueles obtidos com o emprego exclusivo de extratos vegetais como princípio ativo e possuem a sua eficácia, segurança e qualidade validadas. (BRASIL, 2010).

Ao longo da história as doenças sempre afligiram a raça humana e em diversas localidades as pessoas tentaram formas de promover a cura ou simplesmente prevenir as enfermidades e não foi diferente no Brasil. Da mesma forma, a população nativa tornou-se detentora de um conhecimento tradicional que foi acumulado ao longo de gerações, capaz de entender e muitas vezes aplicar o elevado potencial da biodiversidade natural visando aliviar os sofrimentos resultantes de muitas doenças (FERNANDES et al., 2013).

Logo, com a utilização de espécies vegetais por muitas comunidades, surgiram muitos estudos visando fundamentar a eficiência dessas espécies, como também sugerir parâmetros de qualidade para a utilização correta destas. Pois, desde trabalhos de revisão das propriedades das espécies (MARQUES, et al., 2013; ALVES, et al., 2014; MARQUES et al., 2015) até estudos experimentais seriamente conduzidos (FIGUEIRÊDO et al., 2015; FIGUEIRÊDO et al., 2014; MARQUES et al., 2014) elevada importância têm sido dada às plantas medicinais com o objetivo de alcançar comprovação científica acerca de suas variadas atividades.

Os estudos científicos evidenciam que as ações terapêuticas das plantas medicinais geralmente são decorrentes da presença de metabólitos secundários que se mostram como boas oportunidades de descobertas de novas moléculas para servir de base no desenvolvimento de medicamentos inovadores. Diante disso a busca de metodologias confiáveis e de rápida execução para o desenvolvimento de fitoterápicos vem se tornando um desafio para os pesquisadores. (MACIEL et al., 2008).

Neste sentido, para preparação de um fitoterápico com qualidade se faz necessário desenvolver uma metodologia para a extração dos metabólitos de interesse, secagem para melhorar a estabilidade do extrato, caracterizações física, química e biológica da droga vegetal, bem como padronização do extrato, aplicação de metodologias analíticas para o doseamento e os controles de qualidade cabíveis para cada tipo de forma farmacêutica. Além de comprovar eficácia e segurança. (CORREIA et al., 2015).

Por certo, se faz necessário que se tenha o apoio tanto de pesquisadores quanto de instituições para acelerar a produção de fitoterápicos em toda a sua esfera. Inclusive, em escala internacional. A própria Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta a normalização

da fitoterapia em serviços de saúde estimulando estudos sobre segurança, eficácia e qualidade das drogas vegetais (OMS, 2002).

No Brasil também são promovidos incentivos governamentais através de regulamentações e políticas voltadas para a produção de fitoterápicos. Isto é, ações como a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, além do Programa Nacional de Plantas Medicinais aplicadas no Sistema Único de Saúde (SUS), visando garantir o acesso seguro, como também o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (MARQUES et al., 2013).

2.3 DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS E BACTÉRIAS

Existem cerca de 230 mil tipos de fungos, mas apenas 100 tipos aproximadamente causam infecção. E estas, são provenientes de fungos que buscam locais quentes e úmidos no corpo para se desenvolverem. Além disso, o processo infeccioso causado pelos fungos é caracterizado como micose e estas, a depender do tipo de fungo ou região afetada, podem ser classificadas como micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas e por fim, oportunistas (RODRIGUES et al., 2010).

As micoses superficiais são comuns em países tropicais como o Brasil, em geral ocasionadas por dermatófitos e restritas à camada córnea da pele, estas são classificadas em pitiríase versicolor, piedra branca e piedra negra (CRIADO et al., 2011).

A candidíase é causada por leveduras do gênero *Candida*, em especial pela espécie *C. albicans*. Elas são hóspedes normais do trato gastrintestinal do homem e fazem parte da microbiota de determinadas regiões do tegumento cutâneo. Porém as leveduras podem atingir mucosas, tecido cutâneo e em alguns casos pode ser sistêmica. As manifestações clínicas apresentam grande diversidade de quadros, podendo ser divididas em três grandes grupos: Candidíase cutâneo-mucosa, Candidíase sistêmica e candidíase alérgica. As principais espécies patogênicas são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* (ALMEIDA, 2003).

Já as doenças causadas por bactérias são inúmeras, o ministério da saúde destaca no guia de vigilância em saúde (2016) as enfermidades de maior importância na saúde pública do país, das quais, 20 das 38 principais doenças, são ocasionadas por bactérias no Brasil. São citadas: Meningite Meningocócica, Meningite por *Haemophilus influenzae*, Meningite pneumocócica, Meningite pneumocócica, Meningite por outras bactérias, Coqueluche, Difteria, Tétano acidental, Tétano Neonatal, Botulismo, Cólera, Doenças Diarreicas Agudas,

Febre Tifoide, Sífilis, Hanseníase, Tuberculose, Febre Maculosa Brasileira, Tracoma, Leptospirose, Peste. (BRASIL, 2016; PFALLER, 2014).

2.4 TERAPIA E RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA

As opções de tratamento para infecções fúngicas estão se ampliando, mas ainda de forma lenta. Os principais focos de atuação de antifúngicos são a inibição da síntese de ácidos nucleicos, mitose, síntese e estabilidade das membranas e da síntese da parede celular (OLIVEIRA, 2016; FIGUEIREDO, 2008).

No aspecto microbiológico, uma cepa é considerada resistente a um antifúngico quando a concentração inibitória mínima é mais elevada que a habitual do medicamento frente à espécie. Pode-se observar três diferentes tipos de resistências: a intrínseca, é dita quando nenhum membro de uma espécie é sensível ao fármaco; primária, ocorre quando dentro de uma espécie, normalmente sensível a determinado antifúngico, encontra-se uma cepa com resistência natural a ele, sem necessidade de contato prévio com a droga; e a secundária que ocorre quando uma cepa, previamente sensível, desenvolve resistência a droga após ter sido exposta a ela colaterais (REZENDE et al., 2017; GONÇALVES, 2011).

A resistência antifúngica, intrínseca ou adquirida, tornou-se um problema relevante no tratamento dessas doenças, evidenciando-se um sensível aumento de espectro de fungos patogênicos e da sua incidência na prática clínica, sobretudo em pacientes imunodeficientes e imunossuprimidos. Os principais mecanismos de resistência produzidos pelos fungos são: redução da captação da droga; modificação ou degradação metabólica apresentando dificuldade na interação droga-sítio alvo; aumento do efluxo pelo bombeamento ativo do antifúngico. (PITTOL, 2013; TAPIA, 2012).

2.5 TERAPIA E RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA

Os antibacterianos correspondem a uma classe de fármacos que é consumida freqüentemente em hospitais e na comunidade. Entretanto, são os únicos agentes farmacológicos que não afetam somente os pacientes que os utilizam, mas também interferem de forma significativa no ambiente hospitalar por alteração da ecologia microbiana (BRASIL, 2007).

O uso de antimicrobianos promove a adaptação ou a morte dos micro-organismos, em um fenômeno conhecido como pressão de seleção. Os microrganismos que sobrevivem

possuem genes de resistência, que podem ser transmitidos a outros microrganismos da mesma espécie ou até mesmo, de outras espécies (BRASIL, 2008).

A resistência a drogas antimicrobianas pode ser classificada como: resistência constitutiva no qual o microorganismo pode ser resistente a certos antibióticos porque os mecanismos celulares necessários para a sensibilidade antibiótica estão ausentes na célula e por resistência adquirida que pode ocorrer por mutação nas sequências de DNA cromossômico pela presença de antibióticos; transformação que ocorre pela transferência genética no qual um DNA puro passa de uma célula para outra, alterando o genótipo do receptor; conjugação pela qual é caracterizada como um processo comum de transferência genética onde uma bactéria doadora sintetiza uma fímbria sexual, que se liga a uma bactéria receptora em um processo de acasalamento e transfere cópias de genes plasmidiais para os receptores; transdução, processo pelo qual o DNA de um plasmídeo é incorporado por um vírus bacteriano e então transferido para outra bactéria; e a transposição ocorre quando sequências curtas de DNA, conhecidas como transposons, podem transpor de um plasmídeo para um cromossomo e vice-versa (BAPTISTA, 2013; VAZ, 2009).

A Organização Mundial da Saúde publicou no dia 27 de fevereiro de 2017 sua primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos. Um catálogo de 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana (Quadro 3).

Quadro 3 - Lista de agentes patogênicos prioritários da OMS para a P&D de novos antibióticos

Prioridade	Agente patogênico	Resistência
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenema
Crítica	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenema
Crítica	<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenema
Alta	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
Alta	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vancomicina
Alta	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
Alta	<i>Campylobacter spp</i>	Fluoroquinolonas
Alta	<i>Salmonellae</i>	Fluoroquinolonas
Alta	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fluoroquinolonas
Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
Média	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
Média	<i>Shigella spp</i>	Fluoroquinolonas

Fonte: OMS, 2017

A lista foi elaborada numa tentativa de orientar e promover a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos antibióticos, como parte dos esforços da OMS para

enfrentar a crescente resistência global aos medicamentos antimicrobianos. Essas bactérias têm capacidades inatas de encontrar novas formas de resistir ao tratamento e podem transmitir material genético que permite a outras bactérias se tornarem também resistentes aos fármacos.

Os antibacterianos podem ser classificados de diversas maneiras, considerando seu espectro de ação, o tipo de atividade antimicrobiana, o grupo químico ao qual pertencem e o mecanismo de ação. Contudo mesmo com o grande número de compostos disponíveis, os sítios de ação são limitados, as principais classes de antibióticos inibem quatro alvos principais: biossíntese da parede bacteriana, biossíntese de proteínas, biossíntese de ácidos nucleicos, metabolismo do ácido fólico e membrana celular. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; BRASIL, 2007).

2.6 METABÓLITOS VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A problemática da resistência de micro-organismos patogênicos a inúmeras drogas é atualmente reconhecida, sendo a procura de novos antibióticos a partir de espécies vegetais, uma das medidas mais indicadas para solucionar este impasse. Muitos centros de pesquisa em todo o mundo vêm desenvolvendo estudos sobre atividades de produtos naturais, visando principalmente a atividade destes sobre micro-organismos (PEDROSA, 2012; PERON et al., 2008).

Apesar das indústrias farmacêuticas produzirem um expressivo número de novos antibióticos nas últimas três décadas, a resistência microbiana a essas drogas também aumentou. De acordo com a OMS (2014) a resistência a antibióticos é uma "ameaça global" à saúde pública, segundo um relatório no qual avaliou 114 países e afirmou que essa resistência está ocorrendo "em todas as regiões do mundo". Acrescentou também que caminhamos rumo a uma "era pós-antibiótico", em que pessoas morrem de infecções simples que são tratáveis há décadas e que provavelmente haverá consequências "devastadoras" a não ser que medidas sejam tomadas com urgência.

Existem vários registros históricos sobre a utilização das plantas para tratamento de doenças desde 4.000 a.C.. O primeiro registro médico depositado no Museu da Pensilvânia é datado de 2.100 a.C. e inclui uma coleção de fórmulas de trinta diferentes drogas de origem vegetal, animal ou mineral (HELFAND; COWEN, 1990) São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, de fontes naturais, especialmente de plantas, incluindo a morfina, pilocarpina, digitálicos, curares, quinina, artemisinina, escopolamina, entre outros (GOLÇALVES, 2007).

Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: substâncias fenólicas e polifenóis, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides, óleos essenciais, alcaloides, lectinas e polipeptídios. Assim, quando determinadas espécies vegetais são agredidas por bactérias, fungos, parasitas, vírus ou outros agentes agressores, rapidamente sintetizam substâncias de defesa, como resultado da interação entre os sistemas metabólicos do hospedeiro e do parasito. Essas substâncias, as fitoalexinas, não existem nas plantas antes da infecção, são produzidas logo após a penetração do invasor e possuem a capacidade de inibir seu crescimento ou ação microbicida sobre o mesmo (GONÇALVES, 2007).

Dentro da classe dos polifenóis, encontram-se os taninos e os flavonoides, os quais compõem inúmeros estudos constatando atividades antimicrobianas, antioxidantes e que na maioria das vezes agem como sinérgicos no combate de doenças causadas por infecções. Diversos estudos sobre atividade dos taninos evidenciaram importante ação antimicrobiana. Tais efeitos dependem da dose, tipo de tanino ingerido e período de ingestão. 6 atividades bactericidas e fungicidas ocorrem por três características gerais comuns aos dois grupos de taninos (condensados e hidrolisados): complexação com íons metálicos; atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; habilidade de complexar com outras moléculas, principalmente proteínas e polissacarídeos (CASTEJON, 2011; MELLO; SANTOS, 2017).

2.7 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

O termo extração significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa contida na droga vegetal, utilizando, para isso, um líquido ou mistura de líquidos apropriados e toxicologicamente seguros (SIMOES et al., 2010).

Os fatores relacionados aos métodos de extração dizem respeito à agitação, temperatura e ao tempo necessário para executá-los, dentre as técnicas de extração existem as convencionais classificadas como extrações a frio (turbolização, maceração e percolação), extrações a quente de sistema fechado (arraste por vapor d'água e soxhlet), extrações a quente de sistema aberto (infusão e decocção) e ainda existe as não convencionais (extração por micro-ondas, ultrassons, extração por fluido supercrítico e a microextração por fase sólida) (SIMOES et al., 2010; NAVARRO, 2005)

Além dos diversos métodos extrativos, são muitos os fatores que influenciam na extração, como por exemplo, a parte do material vegetal utilizada, o grau de processamento, o

tamanho da partícula, o solvente utilizado, o tempo de extração, temperatura, polaridade e concentração do solvente (TIWARI et al., 2011). O solvente utilizado e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é aspecto-chave na extração de polifenóis e conseqüentemente na capacidade farmacológica (ROCKENBACH et al., 2008). Muitos estudos vêm demonstrando a influência da extração no teor de metabólitos secundários (BAMPOULI et al, 2014; VONGSAK et al, 2013)

Oliveira et al. (2016) avaliou a capacidade de extração de polifenóis, flavonoides, proantocianidinas e esteroides por diferentes técnicas de extração, incluindo ultrassom, turbólise, maceração, infusão, decocção e soxhlet, além de testar além as atividades antioxidantes pelos métodos DPPH e redução do complexo fosfomolibdênio. Utilizando etanol e solvente hidroalcoólico (70%). As extrações por decocção e turbólise utilizando solvente hidroalcoólico foram as que apresentaram melhores resultados nos teores totais e na atividade antioxidante.

Sanvido et al., (2015) estudou duas técnicas extrativas: a extração com CO₂ supercrítico e a maceração com metanol com objetivo de avaliar qual método extrativo potencializa a obtenção de flavonoides e sua atividade antioxidante. Os resultados mostraram que o extrato obtido por maceração foi a que apresentou o melhor resultado.

Tsukui e Rezende (2014) através de um estudo de revisão de trabalhos envolvendo a extração de produtos naturais por microondas, constataram que a partir das diversas publicações de artigos científicos que a extração por micro-ondas vem ganhando destaque por apresentar alto rendimento de produto extraído, curto tempo de extração e redução dos resíduos gerados.

O mecanismo de aquecimento pelas micro-ondas ocorre de maneira diferente e contrária do aquecimento convencional (condução, irradiação e convecção), é possível decorrente a rotação de dipolo e condução iônica. A condução de íons está relacionada com a migração eletrosférica dos íons e elétrons sobre a influência de um campo magnético produzido pela radiação. A rotação de dipolo é um movimento ordenado das moléculas polares de modo que se alinhem ao campo elétrico para que esse evento ocorra é necessário que a molécula possua um momento dipolar. Com a retirada do campo elétrico as moléculas retornam para seu estado desordenado e a energia que foi absorvida durante a orientação de dipolos (alinhamento) é dissipada em forma de calor, havendo conseqüentemente aquecimento do meio (TSUKUI; REZENDE, 2014; CAMEL, 2000)

A extração por micro-ondas pode ser realizada em sistema fechado (sob pressão e temperatura controlada) ou aberto (sob pressão atmosférica), chamados de PMAE

(Pressurized Microwave-assited Extration) e FMAE (Focused Pressurized Microwave-assited Extration) respectivamente. O PMAE oferece extração rápida e eficiente, com o menor consumo de solvente, mas susceptível a perdas de analitos por volatilização. O FMAE supre algumas deficiências do sistema fechado, uma delas é a segurança dos ensaios sendo também considerado mais apropriado para extração de substâncias termolábeis (CAMEL, 2000)

Durante a extração assistida por micro-ondas focalizada, a radiação eletromagnética é aplicada diretamente na mistura amostra-solvente, devido a matriz vegetal possuir quantidade significativa de água, esta absorve grande quantidade de microondas, havendo superaquecimento interno ocasionando rompimento da célula e facilitando a extração. Por sua vez a migração de íons dissolvidos aumenta a penetração do solvente na matriz aumentando o rendimento da extração (ARMENTA; GARRIDES; GUARDIA, 2008)

Os principais fatores comuns que afetam o processo de extração são propriedades da matriz, solvente, temperatura, pressão e tempo de análises. Os compostos fenólicos são muito sensíveis ao calor, dando a esta técnica uma grande vantagem, por ser necessário um curto tempo de extração reduzindo os efeitos de degradação (HERNANDEZ et al., 2009).

Routray e Orsat (2014) compararam a extração de compostos fenólicos de mirtilo pela extração por micro-ondas com a extração convencional por solvente e com a extração por ultrassom. Os resultados mostraram teores muito maiores de fenóis totais para o extrato obtido por micro-ondas.

Reis, Branco e Santos (2017) compararam os métodos de extração utilizando ultrassom e micro-ondas focalizado frente aos teores de compostos fenólicos e flavonoides da aroeira vermelha. Os ensaios obtidos pela extração por micro-ondas apresentaram melhores teores de compostos fenólicos e flavonoides que os ensaios obtidos pela extração por ultrassom.

Os estudos verificaram que a extração por microondas diminuiu o tempo de extração, a utilização de solventes e aumentou a quantidades dos compostos fenólicos extraídos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

Ramos floridos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels foram coletados no município do Cabo de Santo Agostinho (8°29'86,07"S e 35°06'45,29"W) e encaminhados ao Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA, onde foram identificados pela curadora do herbário (Dra Rita de Cássia Pereira) sob o número de tombamento 90672. As amostras foram coletadas nas 4 estações do ano (primavera, verão, outono e inverno) de 5 indivíduos diferentes.

3.1.1 Obtenção da droga vegetal (estabilização, secagem e pulverização)

As amostras das folhas da planta foram tratadas com álcool a 70% (v/v), em seguida, foram conduzidas para a estufa de ar circulante (Ethiktechnology[®]) por 40h a 40°C. Após secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas (SL-31, Solab[®]) com tamis de 20 mesh (0,84 mm), pesado e acondicionado em recipiente de vidro, devidamente vedado e mantido em ausência de luz.

3.1.2 Caracterização físico-química da droga vegetal

A seguir estão descritos os ensaios para caracterização físico-química que foram aplicados à droga vegetal. Vale salientar que todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.1.2.1 Determinação de óleos voláteis

O teor de óleos voláteis presentes na droga vegetal oriunda das folhas de *S. cumini* foi determinado pelo processo de destilação por arraste de vapor utilizando-se o aparelho de Clevenger, de acordo com o descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição. Após a montagem da aparelhagem necessária, foram introduzidos em um balão de fundo chato de 1 L, 100 g da droga vegetal e 500 mL de água destilada. Na abertura K do aparelho foi adicionado 0,5 mL de xileno P.A e realizado a destilação por um período de 4 horas com velocidade de 3 mL por minuto (BRASIL, 2010).

3.1.2.2 Densidade aparente

A densidade aparente da droga vegetal pulverizada foi realizada através de um densímetro calibrado 1 cm³ (Powdermix[®]) de acordo com o descrito na Farmacopeia Brasileira, 5^a edição. O densímetro foi pesado vazio e com a amostra do material vegetal em uma balança analítica calibrada (FA 2104N, Bioprecisa[®]) o resultado foi determinado segundo a equação 1:

$$Dap = Mdc - Mdv / V_d \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que: Dap = densidade aparente; Mdv = massa do densímetro vazio; Mdc = massa do densímetro cheio; Vd = volume do densímetro.

3.1.2.3 Determinação de cinzas totais

A determinação do teor de cinzas totais da droga vegetal foi realizada de acordo com o descrito na Farmacopeia Brasileira, 5^a edição. Aproximadamente 3 g da amostra foram distribuídos em cadinhos devidamente calcinados e pesados, posteriormente foram levados à mufla para incineração em gradiente de temperatura até que se atingisse 600 °C e todo carvão fosse consumido: 30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C (BRASIL, 2010). Os resultados foram expressos em percentual de resíduo de massa, pela média de três determinações, segundo a equação 2:

$$CT = \left(\frac{C1 - C2}{Pa} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

3.1.2.4 Determinação de perda por dessecação

A determinação de perda por dessecação da droga vegetal foi determinada pelo método gravimétrico de acordo com o descrito na Farmacopeia Brasileira, 5^a edição. Aproximadamente 1 g da amostra foi transferido para um pesa-filtro previamente dessecado, depois este sistema foi conduzido para uma estufa de ar circulante (Ethicktechnology[®]) a 105 °C onde, com a tampa do recipiente semiaberta. (BRASIL, 2010).

3.1.2.5 Determinação de água

A determinação de água da droga vegetal foi feita pelo método direto de Karl Fischer de acordo com o descrito na Farmacopeia Brasileira, 5^a edição. Após a padronização da água, foi pesado 0,2 g da droga vegetal e adicionou-se 30 mL de metanol anidro ao recipiente do equipamento. A titulação foi realizada com o reagente de Karl Fischer (BRASIL, 2010).

3.1.2.6 Determinação de substâncias extraíveis por álcool

A determinação de substâncias extraíveis por álcool da droga vegetal foi feita pelo método de extração por Soxhlet de acordo com o descrito na Farmacopeia Brasileira, 5^a edição. Dois gramas da droga vegetal foram exatamente pesados e transferidos para um cartucho de celulose, previamente tarado e seco. Ao balão do extrator foram adicionados 0,2 g de hidróxido de sódio P.A e etanol absoluto P.A em quantidade suficiente. A extração perdurou por 5 h e ao final do processo, o cartucho contendo o resíduo, foi levado à estufa de ar circulante (Ethicktechnology[®]) onde permaneceu por 30 minutos, sob a temperatura de 105°C. Ao final do processo, o resíduo seco foi pesado, fornecendo dados para o cálculo do teor de substâncias extraíveis por etanol (BRASIL, 2010).

3.1.2.7 Determinação do índice de espuma

Para determinação do índice de espuma da droga vegetal, foi realizado o método descrito na Farmacopeia Brasileira, 5^a edição, no qual 1 g de pó fino obtido através de tamisação foi transferido para um erlenmeyer contendo 50 mL de água em estado de ebulição, permanecendo neste por 30 minutos, sob fervura. Após resfriamento, o conteúdo foi filtrado e transferido para um balão volumétrico de 100 mL, tendo o volume completado com água destilada. A solução obtida foi distribuída em 10 tubos de ensaio, tendo seu volume segregado de modo que o tubo 1 contivesse 1 mL de conteúdo, o tubo 2 contivesse 2 mL, até que no tubo 10, houvesse 10 mL deste conteúdo. Os tubos de 1 a 9 tiveram seus volumes completados para 10 mL com a adição de água destilada. Os 10 tubos foram tampados, agitados com movimentos verticais por 15 segundos e deixados em repouso por 15 minutos. Os halos de espuma que permaneceram foram aferidos com auxílio de um paquímetro automático (BRASIL, 2010).

3.1.2.8 Determinação granulométrica do pó

A determinação da granulometria do pó da droga vegetal foi feito de acordo com o método descrito na Farmacopeia Brasileira, 5^a edição. Foram pesados 25 g do pó da droga vegetal e transferidos para o tamis superior do agitador de peneiras (Bertel[®]) onde o pó foi submetido à vibração durante 15 min com os seguintes tamises de abertura de malhas de 850, 600, 425, 250, 75 μ m correspondentes a 20, 30, 40, 60 e 200 mesh, respectivamente. O tamanho médio das partículas foi calculado através de curvas de passagem e retenção (BRASIL, 2010).

3.1.2.9 Análise térmica

Para a determinação do perfil térmico foram utilizadas as técnicas de termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG) e análise térmica diferencial (DTA). A análise térmica foi realizada no equipamento DTG-60H (Shimadzu[®]), foi utilizado aproximadamente $2,9 \pm 0,5$ mg da droga vegetal pulverizada, com a razão de aquecimento de 5 °C, sob uma faixa de temperatura de 20 a 600 °C, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹ utilizando-se recipiente específico de alumínio.

3.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA DA DROGA VEGETAL

3.2.1 Preparo das amostras

Foi pesado 1 g de amostra e adicionados 25 mL de metanol P.A. A mistura (droga + solvente) foi levada à decocção durante 5 minutos. A solução foi resfriada à temperatura ambiente e em seguida filtrada em papel de filtro.

A triagem fitoquímica foi feita através da técnica de cromatografia em camada delgada, a amostra e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F₂₅₄ (Macherey-Nagel[®], Germany). As placas foram desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel (Quadro 5). A cuba foi saturada durante 30 minutos, aproximadamente, à temperatura ambiente. As bandas foram aplicadas com largura de 5 mm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 5 mm. O tamanho da largura e do comprimento das placas cromatográficas foi de 5 cm. As amostras foram aplicadas a 5 mm da origem e com término 5 mm do final da placa.

Após a eluição das placas, as mesmas foram secas à temperatura ambiente, e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível em seguida foram digitalizadas. Na sequência, foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito (Quadro 4). As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

Quadro 4 - Padrões, sistemas e reagentes específicos utilizados para cada identificação dos metabolitos.

Classe de Metabólito	Sistema	Revelador	Padrão
Polifenóis (Taninos Hidrolisáveis)	90:5:5	NEU + PEG	Ác. gálico e Ác. Elágico
Taninos condensados	90:5:5	Vanilina clorídrica	Catequina
Flavonoides	90:5:5	NEU + PEG	Quercetina e Rutina
Derivados Cinâmicos	90:5:5	NEU + PEG	Ác. Cafeico e Ác. Clorogênico
Terpenos e Esteroides	70:30	Lieberman-Burchard + Δ	β -Sitosterol
Cumarinas	50:50:50	KOH + Δ	Cumarina
Saponinas	100:11:11:26	Lieberman-Burchard+ Δ	Escina
Açúcares redutores	50:20:10:10	Timol + H ₂ SO ₄ 10% + Δ	D-frutose
Alcaloides	50:6,75:5	Dragendorff	Nitrato de pilocarpina
Antraquinonas	50:6,75:5	HNO ₃ + KOH10%	Senosídeo A

Fonte: Autor; Legenda: 90:5:5 – Acetato de etila: ácido fórmico: água/ 70:30 – Tolueno: acetato/ 50:50:50 – Éter etílico: acetato de etila: ácido acético 10% (saturação)/ 100:11:11:26 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água/ 50:20:10:10 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água/ 50:6,75:5 - Acetato de etila: metanol: água/NEU: Solução 1% de difenilboriletoxiethylamina/ PEG: polietilenoglicol/ KOH: hidróxido de potássio/ H₂SO₄: ácido sulfúrico/ HNO₃: ácido nítrico/ Δ : aquecimento

3.3 AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE

3.3.1 Preparo das amostras

Foi pesado 1 g de amostra e adicionados 25 mL de metanol P.A. A mistura (droga + solvente) foi levada à decocção durante 5 minutos. A solução foi resfriada à temperatura ambiente e em seguida filtrada em papel-filtro

A sazonalidade foi feita através do método de cromatografia em camada delgada, as bandas foram aplicadas, em aplicador semi-automático Linomat V (Camag®) utilizando

seringa de 100 µL. Foram aplicados 10 µL das amostras e padrões, com largura de 10 mm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 5 mm. O tamanho da largura e do comprimento das placas cromatográficas foi de 10 x 10 cm. As amostras foram aplicadas a 5 mm da origem e com término 5 mm do final da placa. Após a eluição das placas, as mesmas foram secas à temperatura ambiente, foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm, em seguida, foram digitalizadas. As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

3.3.2 Pesquisa de sazonalidade de flavonoides e taninos

Em uma mesma cromatoplaça, após revelação com NEU (Solução 1% de difenilboriletoxietilamina) mais PEG (polietilenoglicol), procedeu-se a observação no UV (365 nm), bandas de fluorescência azul ou arraste esverdeado foram usados para atestar a presença de taninos hidrolisáveis, surgimento de bandas com fluorescência laranja ou amarela foi usada como indicativo de presença de flavonoides. Foi usado como padrão quercetina e rutina para flavonoides e ácido gálico e ácido elágico, para taninos (Quadro 5).

Quadro 5 - Padrões, sistemas e reagentes específicos utilizados para pesquisa de sazonalidade para cada metabólito.

Case de Metabólito	Sistema	Revelador	Padrão
Taninos	90:5:5	NEU + PEG	Ác. gálico e Ác. Elágico
Flavonoides	90:5:5	NEU + PEG	Quercetina e Rutina

Fonte: Autor; Legenda: 90:5:5 – Acetato de etila: ácido fórmico: água/ NEU: Solução 1% de difenilboriletoxietilamina/ PEG: polietilenoglicol

3.4 DEFINIÇÃO DE SOLVENTE EXTRATOR A PARTIR DE RESPOSTA FARMACOLÓGICA

Para definição de solvente extrator, avaliou-se a resposta antifúngica dos extratos aquoso, etanólico absoluto P.A., etanol:água (1:1, v/v) e metanol:água (2:10, v/v) obtidos através de extração por micro-ondas e secagem por rotaevaporação, conforme descrito a seguir:

3.4.1 Obtenção das soluções extrativas por micro-ondas

A obtenção das soluções extrativas foi adaptada de Dahmoune (2015). Utilizando-se um reator por micro-ondas (Discover system, CEM[®]) foram aplicados os seguintes parâmetros: potência de 200 W, tempo de extração 2 minutos e temperatura máxima de 30°C. Os solventes empregados foram água destilada, etanol absoluto e metanol absoluto, sendo preparados os seguintes extratos: aquoso, etanol:água (1:1, v/v), etanólico absoluto e metanol:água (2:10, v/v), empregando-se a proporção de 1 g de droga vegetal para 20 mL de solvente, a partir de 16 g de droga vegetal para cada extrato. Para conseguir realizar 2 minutos de extração e não ultrapassar a temperatura limite, as extrações foram realizadas em ciclos de 4 tempos com duração de 30 segundos cada. Ao término de cada ciclo, as soluções extrativas foram levadas à geladeira para esfriamento até chegar em 25 °C. Após o término, os extratos foram filtrados em algodão.

3.4.2 Obtenção dos extratos secos

3.4.2.1 Liofilização

O álcool presente nos extratos etanol:água (1:1, v/v), etanólico e metanol:água (2:10, v/v), foram removidos em evaporador rotativo (MA-120, Marconi), em temperatura não superior a 50 °C. Em seguida, os extratos foram submetidos à liofilização, utilizando-se equipamento Liotop[®] L101, a uma pressão negativa de 29×10^{-6} mmHg e temperatura de 60°C, durante 100 horas.

3.4.3 Teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* dos extratos secos de *S. cumini*

Os extratos secos obtidos por liofilização foram submetidos aos testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* conforme descrito a seguir.

A metodologia empregada foi de acordo com o protocolo descrito no documento M27-A3 (CLSI, 2008). Como controle foi utilizado duas leveduras, padrão American Type Culture Collection (ATCC): *Candida krusei* 6528 ATCC e *C. parapsilosis* ATCC 22019 com perfil sensível. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich[®], EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$; Sigma-Aldrich[®]). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore[®], Darmstadt, Alemanha). Os extratos aquoso e etanol:água (1:1, v/v) foram diluídos em água e as concentrações testadas foram 4092 $\mu\text{g/mL}$, 2046 $\mu\text{g/mL}$, 1023

$\mu\text{g/mL}$, 511,5 $\mu\text{g/mL}$, 256 $\mu\text{g/mL}$, 128 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$ e 8 $\mu\text{g/mL}$, porém os extratos etanólico e metanol:água (2:10, v/v) foram testados nas concentrações 64 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e 0,125 $\mu\text{g/mL}$.

Foram usados para teste isolados clínicos de sangue de pacientes internados em Unidade de Terapia intensiva (UTI) do Hospital das Clínicas de Pernambuco resistentes a equinocandidas, são elas: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. tropicalis*. Os quais foram mantidos em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e incubados a 35 °C por 48 h. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2-5 \times 10^3$ céls/mL.

Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos foram realizadas com 100% de inibição em relação ao poço controle. A CFM foi confirmada pela ausência de crescimento fúngico.

3.4.3.1 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA *one way*, seguido pelo teste *t-Student-Newman-Keuls*. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Os valores da concentração efetiva 50% (CE_{50}) foram obtidos por regressão não linear utilizando o programa GraphPad 5.01[®]. Todos os testes foram feitos em triplicata.

3.5 DEFINIÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO VISANDO MAIOR TEOR DE TANINOS TOTAIS

3.5.1 Obtenção das soluções extrativas

As soluções extrativas foram obtidas a partir das técnicas de manho-maria com agitação e micro-ondas, a fim de se avaliar qual método extrativo resulta em maiores teores de taninos totais.

3.5.1.1 Extração

Para obtenção da solução extrativa por banho-maria com agitação, foi empregada a metodologia convencional adaptada de Aspé, (2011) e Dahmoune, (2015) no qual foi utilizado 1 g de droga vegetal para 50 mL de etanol:água (1:1, v/v) a 60° C (banho-maria Novatecnica[®]) com 200 ppm de rotações por minuto (agitador mecânico Marconi[®]) durante 2h.

3.5.1.2 Extração por micro-ondas

Para a obtenção da solução extrativa por micro-ondas foi utilizada a metodologia descrita no item 3.4.1 utilizando etanol: água (1:1, v/v)

3.5.2 Caracterização da solução extrativa

As soluções extrativas obtidas pelos dois métodos de extração foram submetidas aos ensaios de caracterização físico-química presentes na Farmacopeia Brasileira, 5^a edição (BRASIL, 2010). Ademais, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5.2.1 Determinação de pH

O pH foi medido a 25 °C em pHmetro Micronal[®] calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0, utilizando-se cerca de 20 mL de solução extrativa.

3.5.2.2 Determinação de densidade relativa

A solução extrativa foi colocada em picnômetro de 25,0 mL previamente pesado e calibrado com água. O peso da água e da solução extrativa foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. O resultado foi determinado pela razão entre a massa da solução extrativa e a massa da água.

3.5.2.3 Determinação de resíduo seco

Uma alíquota de 2,0 mL da solução extrativa foi transferida para pesa-filtro previamente dessecado e pesado, sendo evaporada até a secura em banho-maria, sob agitação ocasional. Após evaporação, a placa de Petri contendo a amostra foi dessecada em estufa de ar circulante (Ethiktechnology®) a 105 °C durante 3 h e transferidos para dessecador para resfriamento. O resíduo seco foi calculado em percentagem sobre o volume.

3.5.2.4 Determinação de taninos totais

Foi realizado o doseamento de acordo com o descrito por Amorim, (2008) para ambas as soluções extrativas e realizado o comparativo do poder de extração de taninos totais em cada metodologia.

3.6 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE TANINOS TOTAIS DAS FOLHAS DE *S. CUMINI*

3.6.1 Matérias-primas

Foram utilizados: Ácido tânico puríssimo Vetec® (0,1 mg/mL, p/v) como padrão, reagente de Fenol Folin-Ciocalteu ELL® (10%, v/v), Carbonato de sódio Na₂CO₃ P.A Dinâmica® (7,5%, p/v), Caseína P.A Dinâmica® 1g.

3.6.2 Adaptação para leitura de fenois e taninos totais

Para a leitura de taninos totais e polifenóis totais foi desenvolvida, uma curva de calibração com 8 pontos com concentrações de 5, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 ppm de ácido tânico, na qual continha um ponto médio referente à concentração de polifenóis totais e outro referente à concentração de polifenóis residuais.

Para o desenvolvimento da curva padrão, foi feita uma curva-teste com 8 pontos nas seguintes concentrações, 5, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ppm de ácido tânico e avaliada a quantidade de reagente de Folin-Ciocalteu necessária para obter uma leitura linear de polifenóis totais. Foram usados 500, 600 e 700 ppm de Folin-Ciocalteu para o teste.

Após ter definida a concentração ideal de Folin-Ciocalteu para obtenção da curva de calibração, foi ajustada a alíquota do extrato para 0,03 mL afim de obter-se uma absorvância entre 500 a 550 nm para polifenóis.

Após definida a alíquota do extrato, foi feita a leitura de polifenóis residuais do extrato utilizando a mesma alíquota utilizada para a leitura de fenóis totais com o objetivo de obter a absorvância média em espectrofotômetro (UV/Vis-mini-1240, Shimadzu[®]) originada do complexo dos polifenóis totais do extrato com a caseína.

3.6.3 Definição da concentração de caseína

Foram realizados doseamentos com concentração de caseína de 100, 250, 500, 750, 1000 e 1100mg mantendo os outros parâmetros. Os resultados foram comparados com os valores de doseamento obtidos com 1g de caseína e 3h de complexação (Amorim, 2008), utilizando-se uma alíquota de 0,03 mL e 700ppm de Folin- Ciocautau para realização da leitura.

A concentração de caseína foi definida pelo doseamento que necessitou de uma menor quantidade de reagente, sem que houvesse diminuição significativamente estatística entre os resultados dos testes.

3.6.4 Avaliação do tempo de complexação da caseína

Foram realizados 3 doseamentos com 3 h, 1:30 h e 30 min de tempo de complexação utilizando 1 g de caseína, em triplicata. Os resultados obtidos para cada tempo de complexação citado foram comparados com os valores de doseamento obtidos com 1 g de caseína e 3 h de complexação, utilizando-se uma alíquota de 0,03 mL e 700 ppm de Folin-Ciocautau para realização da leitura.

A escolha do tempo de complexação com caseína foi definida pelo doseamento que necessitou de um menor intervalo de complexação sem que houvesse diferença estatisticamente significativa entre os resultados das complexações com os tempos menores e os obtidos pelo doseamento aplicando-se 3 h de complexação.

3.7 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE

3.7.1 Avaliação da cinética da curva de calibração

Para a avaliação da cinética da curva de calibração foi feita uma curva em balões de 50 mL seguindo as mesmas proporções conforme descrito no método por Amorim, 2008 e lida no espectrofotômetro a 760 nm em intervalos de tempo de 30 min, 1 h, 8 h, 24 h, 48 h.

3.7.2 Avaliação da estabilidade das soluções reagentes

Para avaliação de estabilidade das soluções reagentes, foram feitas soluções de Ácido tânico (0,1 mg/mL, p/v), Folin-Ciocalteu (10%, v/v) e Carbonato de sódio Na₂CO₃ P.A (7,5%, p/v) e acondicionadas em balões volumétricos vedados, envolvidos em papel alumínio e armazenados em geladeira, posteriormente foram feitas curvas de calibração com tempos de 1º, 2º, 3º, 14º e 49º dia, a fim de avaliar a estabilidade das mesmas.

3.7.3 Estabilidade da solução extrativa

3.7.3.1 Temperatura ambiente

Para a avaliação da estabilidade da solução extrativa em temperatura ambiente, foram avaliados os teores de fenóis totais e taninos totais empregando-se a metodologia já otimizada de acordo com o item 4.5.1.2 em intervalos de tempo 0, 2 e 4 h.

Para tal, a solução extrativa foi acondicionada em balão volumétrico vedado, envolvido em papel alumínio e mantida em temperatura ambiente para posterior análise.

3.7.3.2 Sob refrigeração

Para a avaliação da estabilidade da solução extrativa sob refrigeração, foi feito o doseamento de taninos totais empregando a metodologia já otimizada de acordo com o item 11 em intervalos de tempo de 4h até ser notado a desestabilização no doseamento.

A solução extrativa foi acondicionada em balão volumétrico vedado, envolvido em papel alumínio e mantida na geladeira. Foi realizado o doseamento após 0 h, 6 h e 12 h de armazenamento.

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Para validação do método foram avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, e robustez, de acordo com a RDC 166/2017. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a confiabilidade dos parâmetros foi verificada pelo coeficiente de variação percentual (CV%), não admitindo valores superiores a 15%, como determinando na legislação para material vegetal (BRASIL, 2014). Adicionalmente, os resultados foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) *One-Way* ou *Two-Way*, quando aplicável, com um nível de significância de 95%.

3.8.1 Especificidade

A especificidade do método foi verificada através da sobreposição dos espectros das amostras da solução padrão e da solução extrativa com e sem adição do reagente Folin-Ciocalteu, obtidos no intervalo de comprimento de onda compreendido de 500 a 900 nm.

3.8.2 Linearidade, limites de detecção e quantificação para fenois totais

A linearidade foi verificada para solução extrativa e para solução padrão, a partir da análise de três curvas autênticas. Para a solução extrativa e para solução padrão, três curvas foram construídas em sete níveis de concentração: 3; 4,8; 5,4; 6; 6,6; 7,2 e 9 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a um intervalo de 50 a 150%.

As curvas foram construídas empregando-se os valores médios da absorvância em função da concentração. Os resultados foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação (R^2), adotando $R^2 > 0,98$ como valor mínimo para aceitação (BRASIL, 2014).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as equações $LD = DP_a \times 3/IC$ e $LQ = DP_a \times 10/IC$, onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y, obtido das três curvas de linearidade e IC é a média dos coeficientes angulares (inclinação da reta) das respectivas curvas (BRASIL, 2017).

3.8.3 Linearidade, limites de detecção e quantificação para taninos totais

A solução padrão para taninos totais foi desenvolvida através de uma curva de concentração conhecida do próprio extrato de *S. cumini* corrigida pela curva de ácido tânico

para fenois totais e seu comportamento comparado com uma curva feita exatamente com as mesmas concentrações de ácido tânico. A linearidade dos resultados foi verificada para solução extrativa e para solução padrão, a partir da análise de três curvas autênticas. Para a solução extrativa e para solução padrão, três curvas foram construídas em sete níveis de concentração: 3,54; 4,72; 5,25; 5,74; 6,42; 6,78 e 7,98 µg/mL.

As curvas foram construídas empregando-se os valores médios da absorvância em função da concentração. Os resultados foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação (R^2), adotando $R^2 > 0,98$ como valor mínimo para aceitação (BRASIL, 2014).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as equações $LD = DP_a \times 3/IC$ e $LQ = DP_a \times 10/IC$, onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y, obtido das três curvas de linearidade e IC é a média dos coeficientes angulares (inclinação da reta) das respectivas curvas (BRASIL, 2017).

3.8.4 Robustez

O ensaio para determinação da robustez do método espectrofotométrico para fenois totais e taninos totais foi realizado a partir da variação da marca do espectrofotômetro (Shimadzu® e Micronal®) e da concentração de carbonato de sódio de 10% para 15%

3.8.5 Precisão

A precisão para fenois totais e taninos totais foi avaliada pela repetitividade, precisão intracorrída, na qual foram examinadas em um único dia, por um operador, seis determinações para amostras a 100% da concentração teste obtidas a partir de seis soluções extrativas diferentes. E pela precisão intermediária, precisão intercorrída, a qual foi determinada por dois analistas, cada um fez três determinações para amostras a 100% da concentração teste obtidas a partir de três soluções extrativas diferentes.

3.8.6 Exatidão

A exatidão para fenois totais e taninos totais foi avaliada por ensaios de recuperação, através da adição de 1 µg/mL de ácido tânico às amostras contendo 4,8; 6,0 e 7,2 µg/ml de fenois totais e 4,2; 5,1 e 6 µg/mL de taninos totais, equivalentes a 80, 100 e 120% da

concentração respectivamente, com três réplicas cada. Os valores de recuperação, expressos em porcentagem, foram determinados através da razão entre as concentrações médias determinadas experimentalmente com as concentrações teóricas correspondentes (BRASIL, 2017).

4.9 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO

4.9.1 Planejamento fatorial

Um desenho experimental foi planejado para otimizar a extração de fenóis totais e taninos totais das folhas de *S. cumini* através de micro-ondas. Os fatores independentes de tempo de extração (X_1), potência do micro-ondas (X_2), proporção de droga vegetal/solvente (X_3) e proporção de etanol/água (X_4) foram elegidos para o estudo, considerando suas importâncias descritas para o processo de extração. Os fatores foram estudados em três níveis, em um desenho do tipo Box-Behnken (Tabela 1) com 27 experimentos individuais, onde foi analisado o impacto dos fatores sob a concentração de fenóis (Y_1) e taninos (Y_2) totais, medidos em mg/g de droga vegetal. Os níveis foram selecionados com base em estudos anteriores envolvendo extrações semelhantes ao do estudo (MEDOUNI-ADRAR et al., 2015; RHAZI et al., 2015). Os efeitos foram estimados por regressão de mínimos quadrados e avaliados por análise da variância (ANOVA, nível de significância de 95%), observando a influência linear (L) e quadrática (Q) dos fatores sob as respostas, onde buscou-se uma maior recuperação dos metabólitos no extrato fluido a partir das condições testadas.

Tabela 1 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental Box-Behnken para o incremento de fenóis totais e taninos totais da solução extrativa das folhas de *S.cumini*.

		Códigos	Fatores	Níveis		
				Menor (-1)	Médio (0)	Maior (1)
Variáveis independentes	X₁		Tempo de extração (min)	1	5	10
	X₂		Potência do micro-ondas (w)	50	150	300
	X₃		Proporção droga/solvente (g/mL)	1/10	1/25	1/40
	X₄		Proporção água/etanol (mL)	80:20	50:50	20:80
Respostas	Y₁		Fenóis totais (mg/g)			
	Y₂		Taninos totais (mg/g)			

Fonte: Autor

A melhor condição de extração foi selecionada com base na predição de respostas pela função desejabilidade, dando preferência à concentração de taninos totais, visto que diversos estudos evidenciaram importante ação antimicrobiana sobre atividade dos taninos (CASTEJON, 2011; MELLO; SANTOS, 2001).

3.9 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *S.CUMINI*.

O extrato seco de *S. cumini* foi obtido através de liofilização e, em seguida, caracterizado através de diferentes métodos, conforme descrito a seguir:

3.9.1 Obtenção do extrato seco padronizado de *S. cumini*

O extrato seco de *S. cumini* foi obtido por liofilização a partir da solução extrativa (1:20 p/v); solvente etanol: água (35/65 v/v) ; tempo de 10 min; potência 300 W. A solução foi primeiramente congelada em freezer comum a $-6^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 48 h, e em seguida, liofilizada (Liotop[®]) sob pressão de 24 μmm de Hg; vácuo 220 ± 2 Vca. por 72 h. O produto foi acondicionado em placa de petri fechados e armazenados em dessecador de vidro sob vácuo. O rendimento de secagem foi avaliado através da razão entre massa do extrato seco obtido e o volume da solução extrativa utilizada.

3.10 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO OTIMIZADO DE *S. CUMINI*

3.10.1 Descrição macroscópica

O extrato seco otimizado de *S. cumini* foi visualizado a olho nu, sobre uma placa de Petri para verificação do aspecto e cor.

3.10.2 Determinação de pH

Cerca de 0,5 g do extrato seco otimizado de *S. cumini* foram pesados e dispersos em 15 mL de água destilada. O pH foi medido a 25 °C em pHmetro Micronal[®] calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0 (SPANIOL, 2007).

3.10.3 Determinação da área superficial específica e porosidade do extrato seco otimizado de *S. cumini*

O extrato seco otimizado de *S. cumini* foi pesado (428 mg) a amostra foi desgaseificada por 12 h a 110°C para remover qualquer material adsorvido no interior dos poros e na superfície do material. As análises foram realizadas obtendo-se as isotermas de adsorção e dessorção, aplicando-se os modelos apropriados para o ajuste dos pontos experimentais. A isoterma de adsorção/dessorção foi obtida pela adsorção física progressiva de nitrogênio a 77 K sobre o material, e subsequente dessorção (SANTOS, 2013). A medida da área superficial específica foi obtida por adsorção física de nitrogênio sobre o material, pelo método *Brunauer-Emmett-Teller* (BET) e a determinação da porosidade (tamanho de poro e volume total de poros) pelo o método de *Barret-Joyner-Halenda* (BJH). Para a realização destes ensaios, foi utilizado um analisador de área superficial e tamanho de poros ASAP2440 micromeritics[®], munido de software para determinar a área superficial e porosidade.

3.10.4 Caracterização térmica

As curvas de termogravimetria (TG) foram obtidas por meio de termobalança Shimadzu[®], modelo DTG 60 H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo

a massa do extrato seco de *S. cumini*, em torno de 3 mg ($\pm 0,5$), acondicionadas em cadinho de alumina, nas razões de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, até $600\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS[®] (*Thermal Analysis*) versão 2.20 da Shimadzu[®].

3.10.5 Determinação de fenois e taninos totais

O teor de fenois totais e taninos totais foram determinados pelo método desenvolvido no trabalho descrito no item 4.6.

3.10.6 Avaliação das propriedades de compactação

As propriedades de compactação do extrato seco de *S. cumini* foram obtidas através da determinação de densidade aparente (d_{AP}), densidade de compactação (d_{CP}), Fator de Hausner (FH) e Índice de Carr (índice de compressibilidade – IC, Quadro 6). O ensaio foi realizado com 2 g do extrato em um compactador automático (*Tap Density*, Varian[®]) provido de uma proveta normatizada. O equipamento promove uma compactação do pó através de movimentos verticais repetidos na proveta. O volume inicial ocupado pelo extrato foi medido, com posterior medição após 10 compactações, necessárias para acomodação do pó (V_{10}) e 1250 compactações (V_{1250}). Ao final das compactações, foi possível avaliar a capacidade de compactação pela subtração de $V_{10} - V_{1250}$. A relação entre a massa do extrato e o volume ocupado pelo pó antes e após a compactação determinou a d_{AP} e d_{CP} , respectivamente (ALVES et al., 2008). Já a compressibilidade do pó foi avaliada através do FH e IC, de acordo com as equações 4 e 5, respectivamente (PETROVICK; PETROVICK; BASSANI, 2010; ALVES et al., 2008).

$$\text{FH} = \frac{d_{CP}}{d_{AP}} \text{ (Eq. 4)} \quad \text{IC} = \frac{(d_{CP} - d_{AP})}{d_{CP}} \cdot 100 \text{ (Eq. 5)}$$

Onde: FH = Fator de Hausner; IC – Índice de Carr; d_{CP} = densidade de compactação (g/mL);
 d_{AP} = densidade aparente (g/mL).

Quadro 6. Interpretação do Índice de Carr (IC) para a fluidez de pós

IC (%)	Fluidez
05 a 15	Excelente
12 a 16	Boa
18 a 21	Moderada
23 a 35	Pobre
33 a 38	Muito pobre
> 40	Muito muito pobre

Fonte: WELLS, apud ANDRADE, 2009; Legenda: IC = Índice de Carr.

3.10.7 Avaliação do ângulo de repouso e tempo de escoamento

O ângulo de repouso foi determinado através do escoamento livre de cerca de 5 g do extrato seco de *S. cumini* através de um funil de dimensões padronizadas, cuja abertura de saída encontrava-se a 10 cm de altura sobre uma superfície plana, contendo uma folha de papel milimetrado; onde foi formado um cone de pó. O ângulo formado entre o cone e a superfície é chamado de ângulo de repouso, sendo obtido pelo cálculo de sua tangente através da relação entre a altura (h) e o raio (r) do cone formado. Paralelamente ao ângulo de repouso, foi determinado o tempo necessário para o escoamento livre do extrato através do funil (tempo de escoamento), utilizando-se um cronômetro digital, onde resultados acima de 10 segundos são considerados com tempo de escoamento infinito (ALVES et al., 2008).

3.11 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *S. CUMINI*.

A metodologia empregada foi de acordo com o protocolo descrito no documento M27-A3 (CLSI, 2008). Como controle foi utilizado duas leveduras, padrão American Type Culture Collection (ATCC): *Candida krusei* 6528 ATCC e *C. parapsilosis* ATCC 22019 com perfil sensível. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich[®], EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH 7,0 ± 0,1, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; 0,165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich[®]). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0,22 µm (Millipore[®], Darmstadt, Alemanha). Os extratos foram diluído em água e as concentrações testadas foram 640 µg/mL, 320 µg/mL, 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL e 1,25 µg/mL.

Foram usados para teste leveduras de isolados clínicos de sangue de pacientes internados na UTI do Hospital das Clínicas de Pernambuco com perfil de resistências a equinocandinas, são elas: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropical* e também dermatófitos de isolados clínicos de escamas epidérmicas de pacientes do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, são eles: *Trichophyton mentagrophytes* 6272 (isolado clínico de escamas epidérmicas da região inguinal e vulva) e *Trichophyton rubrum* 5413 (isolado clínico de escamas epidérmicas).

As leveduras e dermatófitos foram mantidas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), as leveduras foram incubadas a 35 °C por 48 h, já os dermatófitos foram incubados por 25 °C por 7 dias. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2-5 \times 10^3$ céls/mL.

Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos foram realizadas com 100% de inibição em relação ao poço controle. A CFM foi confirmada pela ausência de crescimento fúngico.

3.12 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *S. CUMINI*.

Para o teste de sensibilidade antibacteriana foram utilizadas cinco cepas de *Staphylococcus aureus*: LFBM OXA1, LFBM 17 (isolados clínicos de hemocultura) LFBM 16 (isolado clínico de escarro), LFBM 31 (isolado clínico de urina) e LFBM 18 (isolado clínico de secreção íliaca). E cinco cepas de *Enterococcus faecalis* (LFBM 918, LFBM 189, LFBM 335, LFBM 421, LFBM 240) isoladas de amostras clínicas de hemocultura.

As quais foram identificadas e mantidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de micro-organismo do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. O fenótipo de resistência a agentes antimicrobianos a β -lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas foi previamente determinado pelo método de difusão em meio sólido bem como a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da oxacilina para as cepas de *Staphylococcus aureus* e vancomicina para *Enterococcus*

faecalis. Foi utilizado como padrão *Stahylococcus aureus* ATCC 335921 e ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e ATCC 27212 com um perfil de resistência e sensibilidade respectivamente foram inseridos nesse estudo.

Os micro-organismos foram mantidos sob óleo mineral e reativados pela transferência de parte da cultura para tubos contendo caldo Mueller-Hinton e incubadas a 37 °C por 24 horas, as culturas foram semeadas em Agar Mueller -Hinton e re-incubadas a 37 °C por 24 horas. Com o auxílio de uma alça calibrada, 2 colônias de aproximadamente 2mm de diâmetro foram inoculadas em 10mL de caldo Mueller-Hinton e os tubos incubados a 37° C por 24 horas. As culturas foram diluídas e sua turbidez comparada ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland, o que corresponde a 10⁸ UFC/mL. Em seguida uma diluição (1:100) foi realizada de forma a obter um inóculo de 10⁶ UFC/mL.

O extrato de *S. cumini* foi pesado analiticamente e solubilizado em um sistema composto por etanol/água destilada (4/6) de forma a obter uma solução padronizada em 2560µg/mL. Essa solução estoque foi esterilizada por filtração sob membrana Milipore® de 0,22 µm de porosidade. Uma avaliação antimicrobiana do sistema etanol/ água, foi incluído para assegurar que este sistema não possui atividade intrínseca sobre os micro-organismos.

Para determinação da CIM do extrato padronizado de *S. cumini* foi utilizado o método de microdiluição em placa de 96 poços preconizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015), com algumas modificações. Para isso, 100 µL da solução do extrato foi dispensados nos poços de 1 a 7 da linha A na concentração de 2560 µg/mL. Os demais poços foram pipetados com 100 µL de caldo Mueller- Hinton. Uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada poço da linha A foi transferido para linha B e o procedimento foi repetido até a linha H. Dessa forma as concentração do extrato variaram de 1280 a 20 µg/mL. Posteriormente, um volume de 5 µL (10⁴ UFC/mL), das culturas padronizadas dos microrganismos foi inoculado em todos os poços. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano expresso em micrograma/mililitro capaz de impedir o crescimento da bactéria.

3.13 Avaliação de toxicidade *in vivo* do extrato seco padronizado de *S. cumini*.

O ensaio de toxicidade do extrato de *S. cumini* foi avaliado em modelo invertebrado *in vivo* em larvas de *Tenébrio molitor* em três experimentos independentes em triplicata. 10 larvas foram selecionadas aleatoriamente e divididas em quatro grupos experimentais (n =

10/grupo). Cada larva recebeu doses variáveis dos extratos, 1280 mg/kg, 160 mg/kg, 80 µg/kg e o grupo controle recebeu apenas PBS (phosphate buffered saline). Todas foram mantidas em temperatura ambiente. A mortalidade foi observada e os mortos contados até o sétimo dia (168 h) após a inoculação do extrato. (LIMA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

4.1.1 Caracterização físico-química da droga vegetal

4.1.1.1 Determinação de óleos voláteis

Os óleos essenciais são definidos como compostos orgânicos voláteis, sendo caracterizados principalmente devido ao seu forte sabor e intenso aroma. (SILVA, OLIVEIRA; SOUZA, 2011). Estes óleos possuem grande importância industrial e são empregados nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentícia e farmacêutica, sendo geralmente os componentes de ação terapêutica de plantas medicinais (TRANCOSO, 2013). O volume de óleo encontrado foi de 0,1 mL em 100 g de droga vegetal, sendo equivalente a uma concentração de 0,1 % de óleo volátil por grama de droga vegetal.

4.1.1.2 Densidade aparente

A determinação da densidade aparente é importante para estabelecer sua melhor utilização e esta relacionada com o volume ocupado por uma determinada massa. A densidade aparente do material vegetal foi de 0,307333 g/mL ($\pm 0,005$) mostrando-se menor que a da água. Uma quantidade de 100 g de material vegetal ocupa um volume de 333,33 mL.

4.1.1.3 Determinação de cinzas totais

O teor de cinzas totais encontrados em drogas vegetais pode-se referir tanto aos sais minerais (cinzas fisiológicas) presentes na planta como à presença de impurezas de natureza inorgânica e não voláteis (SIMEI et al., 2014). Mais uma vez, não foram encontrados dados referentes a esta análise farmacopeica para a espécie vegetal. O valor encontrado nos experimentos foi de 4,53% ($\pm 0,03$) que, se comparado às especificações de *Eugenia uniflora* L. que é da mesma família que a *S. cumini* abordadas na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (até 11%), tem-se um resultado dentro do intervalo aceitável.

4.1.1.4 Determinação de perda por dessecação

Além de fornecer informações importantes acerca das condições de armazenamento da droga vegetal, a perda por dessecação também é um importante parâmetro a ser estudado, uma vez que o teor de umidade encontrado está diretamente ligado à estabilidade microbiológica da droga, mostrando sua suscetibilidade ou não ao surgimento e desenvolvimento de fungos e bactérias (SIMEI et al., 2014).

Não foram encontrados na literatura limites específicos acerca do percentual aceitável de umidade para o pó oriundo de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, demonstrando a importância deste trabalho na padronização da droga vegetal. Tomando por base dados da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição e uma publicação de Couto em 2009 referentes a outras 2 espécies da família Myrtaceae (da qual faz parte *Syzygium cumini* (L.) Skeels), observou-se que *Eugenia uniflora* L. e *Eugenia dysenterica* DC. devem apresentar, respectivamente, o teor máximo de 10% e 8% de umidade. Levando em consideração as semelhanças taxonômicas das espécies, podemos inferir que a média dos resultados obtidos neste estudo, que foi de 9,37% ($\pm 0,05$), é aceitável mostrando que o baixo conteúdo de umidade representa a eficiência do processo de secagem.

4.1.1.5 Determinação de água

A média dos resultados foi de 6,71% ($\pm 0,11$). Não foram encontrados na literatura limites específicos acerca do percentual aceitável de umidade para o pó oriundo de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Tomando por base dados da Farmacopeia Brasileira (5ed) observou-se que *Eugenia uniflora* L. e *Eugenia dysenterica* DC. devem apresentar, respectivamente, o teor máximo de 10% e 8% de umidade. Levando em consideração as semelhanças taxonômicas das espécies, podemos inferir que o resultado obtido neste estudo é aceitável, mostrando que o baixo conteúdo de umidade representa a eficiência do processo de secagem.

4.1.1.6 Determinação de substâncias extraíveis por álcool

Diversas drogas vegetais podem ter sua qualidade definida a partir do rendimento obtido ao final de uma extração com solvente (s) de polaridade (s) conhecida (s). Tais ensaios

funcionam como ferramentas para determinar se o material vegetal é apto ou não para ser empregado em processos produtivos (SIMÕES et al., 2003; BRASIL 5, 2010).

A partir das massas obtidas, foi possível calcular o percentual de substâncias extraíveis por álcool em relação à droga vegetal seca. Este teor foi calculado foi de 13,07% ($\pm 1,51$) aproximadamente.

4.1.1.7 Determinação do índice de espuma

Conceitualmente, o índice de espuma é a determinação da maior diluição em que 1 g de uma dada droga vegetal é capaz de formar 1 cm de espuma em determinadas condições experimentais. Através do valor obtido, pode-se inferir qualitativamente ou semi-quantitativamente a presença de saponinas na amostra analisada (BRASIL 5, 2010).

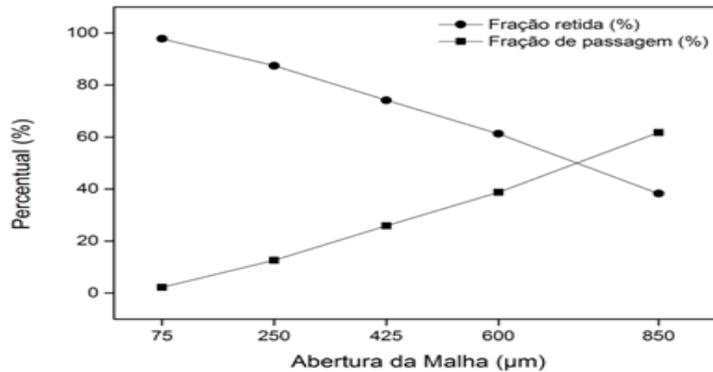
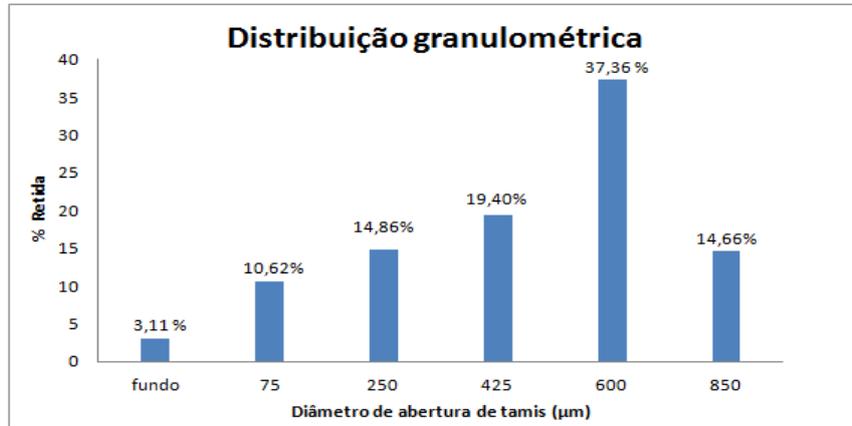
Os ensaios realizados com *Syzygium cumini* (L.) Skeels demonstraram que os índices de espuma referentes à droga vegetal não ultrapassaram 1cm em nenhum dos tubos, sendo 8,72 mm o valor máximo atingido nas aferições (tubo 10, contendo o decocto não diluído). Desse modo, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (5^a ed), o índice de espuma encontrado é inferior a 100, o que indica um baixo teor de saponinas na espécie vegetal.

4.1.1.8 Determinação granulométrica do pó

Através do histograma obtido (Figura 1^a), relacionando a distribuição granulométrica da droga sobre os tamises, observou-se que as partículas do material vegetal encontraram-se predominantemente retidas nos tamises de abertura 850 e 600 μm , representando 38,25 e 23,02%, respectivamente.

A partir da interseção das curvas de retenção e passagem da droga vegetal pelos tamises utilizados (Figura 1^b), pôde-se obter o tamanho médio das partículas, que foi de 723 μm . De acordo com os critérios farmacopeicos, o pó obtido foi classificado como grosso. Tal resultado constitui um fator importante na conservação da droga vegetal, pois tamanhos pequenos de partícula implicam em maior superfície de contato, gerando eventuais problemas de estabilidade em detrimento da adsorção de umidade.

Figura 1 - Histograma de distribuição granulométrica e curvas de retenção e passagem.



Fonte: Dados da pesquisa.

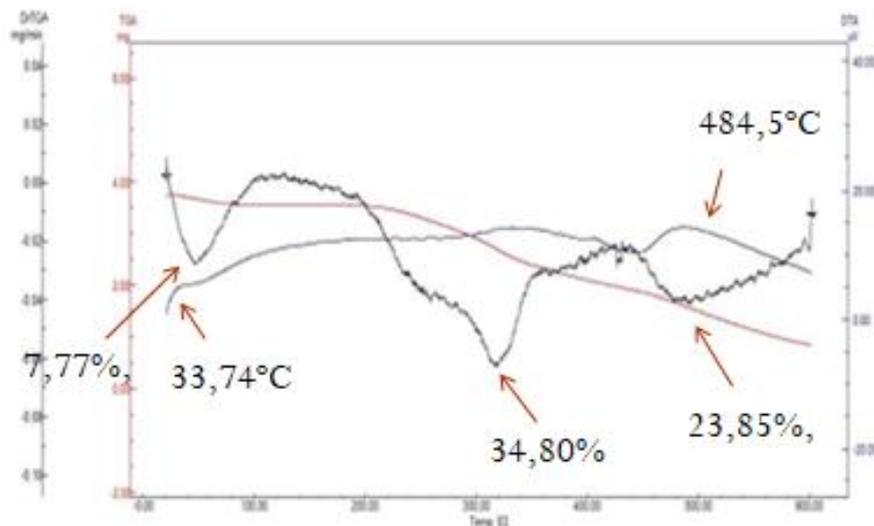
4.1.1.9 Análise térmica

Na Figura 2, pode-se observar que as curvas TG/DTG demonstraram a presença de três eventos de perda de massa, com os percentuais de 7,77%, 34,80% e 23,85%, ocorridas entre 36,49 °C e 492°C. A primeira diminuição está provavelmente relacionada com a dessorção de umidade e de compostos voláteis que são sensíveis à presença de calor. Os outros dois momentos de perda, que já ocorrem acima dos 200 °C, podem estar associados com a degradação dos diversos componentes da droga vegetal, até a formação de cinzas devido à exposição excessiva a elevadas temperaturas.

A utilização destes recursos analíticos permite um delineamento do comportamento da droga vegetal diante da exposição ao calor contribuindo, por exemplo, para a adequação das condições de extração do material, evitando problemas de degradação dos metabólitos secundários.

Na curva DTA (azul escuro), foi constatada ainda a presença de dois eventos exotérmicos com picos em 33,74°C e 484,5°C associados, respectivamente, à primeira e à terceira etapas de degradação da amostra presentes nas curvas TG/DTG. Este comportamento térmico pode estar associado com a formação de polímeros entre os constituintes da amostra (1º evento), bem como com a decomposição destes (2º evento).

Figura 2 - Curvas TG/DTG e DTA.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA DA DROGA VEGETAL

Taninos hidrolisáveis, taninos condensados, flavonoides, terpenos e esteroides, saponinas e açúcares redutores foram observados nos ensaios realizados. Os demais metabólitos, como derivados cinâmicos, cumarinas, alcaloides e antraquinonas não foram detectados na droga vegetal em estudo (Quadro 7).

Estudos fitoquímicos anteriores realizados com as folhas de *S. cumini* corroboram com os resultados aqui expostos na identificação desses metabólitos secundários (BHATIA et al., 1974; GUPTA E SHARMA, 1974; MAHMOUD et al., 2001; VANOLLI et al., 2009). No entanto, no estudo realizado por Timbola e colaboradores (2002) foi verificada a presença de quercetina nas folhas de *S. cumini*, diferentemente do que foi verificado neste trabalho, uma vez que flavonoides não foram evidenciados.

Quadro 7 - Classes pesquisadas nos meses de novembro/2015 e junho/2016.

Classe de Metabólito	Padrão	Resultado
Polifenóis (Taninos Hidrolisáveis)	Ác. gálico e Ác. Elágico	+
Taninos condensados	Catequina	+
Flavonoides	Quercetina e Rutina	+
Derivados Cinâmicos	Ác. Cafeico e Ác. Clorogênico	-
Terpenos e Esteroides	β -Sitosterol	+
Cumarinas	Cumarina	-
Saponinas	Escina	+
Açúcares redutores	D-frutose	+
Alcaloides	Nitrato de Pilocarpina	-
Antraquinonas	Senosídeo A	-

Fonte: Autor; Legenda: (+) Presença da classe de metabólitos; (-) ausência da classe de metabólitos.

4.3 AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE

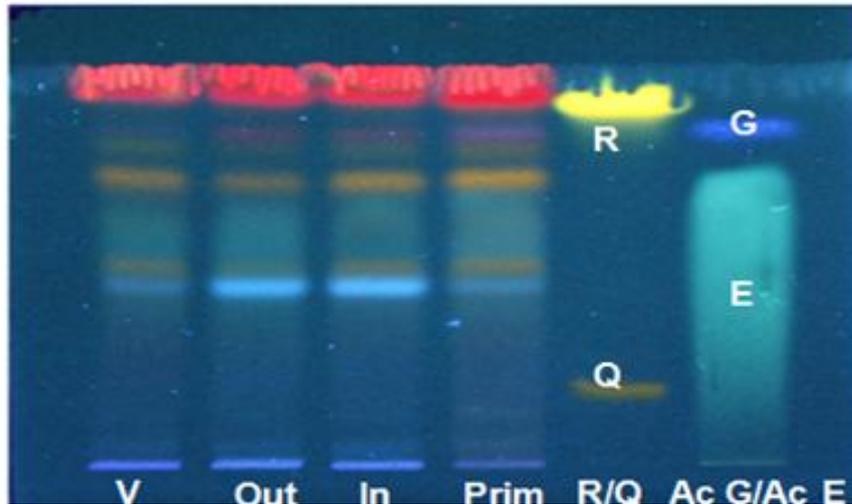
Uma vez que a influência da sazonalidade pode interferir na resposta biológica devido à diferença de concentrações dos metabólitos secundários necessários para atividade, neste estudo foi analisada a diferença sazonal dos flavonoides e taninos os quais são os responsáveis pela atividade antimicrobiana.

Na primavera foi observada uma maior quantidade de bandas coradas evidenciando uma maior variedade polifenóis quando comparado com as outras estações do ano (Figura 3). Resultados já esperado, uma vez que em situações de estresse o vegetal pode modificar sua rota biossintética e produzir substâncias de defesa como respostas às mudanças de seu ambiente (DICKE; HILKER, 2003). Corroborando com o estudo de Figueiredo et al., (2014) no qual avaliou-se a sazonalidade dos metabólitos secundários da *Thuja occidentalis* Linn. (cupressaceae) e verificou-se que o índice pluviométrico foi um fator crucial para ocorrência de variação fitoquímica durante o ano.

Estudos, por outros autores, afirmam que condições ambientais descritas como favoráveis para produção de flavonoides é na estação seca, conforme descrito por Alves et al., (2011), em um trabalho realizado com 20 plantas medicinais da Savana no qual apresentou maior rendimento de flavonóides durante a estação seca. Sendo reafirmada no presente estudo (Figura 3), uma vez que na primavera (Novembro/2015) e no inverno (Dezembro 2016) foram o período com menos índice pluviométrico na região (Tabela 2).

Apesar dos estudos mostrarem que os taninos estão em mais abundâncias nos períodos secos (DICKE; HILKER, 2003). Neste estudo foi verificado o inverso, que nas estações com maiores índices pluviométricos (Tabela 2) houve uma maior incidência de taninos derivados do ácido gálico (Figura 3), sendo necessários estudos mais aprofundados para justificar o comportamento dessa espécie coletada no Cabo de Santo Agostinho já que outros fatores também podem influenciar na produtividade dos taninos. Castro et al., (2005) também avaliou a sazonalidade de fenóis e taninos totais da caca de *Byrsonima verbascifolia* e observou que os teores de taninos totais nas estações secas foram menores que nas estações chuvosas e que os níveis de fenóis totais se permaneceram constante durante as 4 estações do ano.

Figura 3 - Resultados obtidos no estudo de sazonalidade de flavonóides e polifenóis.



Fonte: Autor; Legenda: V: verão; Out: outono; In: inverno; Prim: primavera; R/Q: padrões rutina e quercetina; Ac G/Ac E: padrões de Ácido Gálico e Ácido Elágico; R: rutina; Q: quercetina; G: ácido gálico; E: ácido elágico

Tabela 2 - Índice pluviométrico anual em mm da região do Cabo de Santo Agostinho.

Código	Posto	Novembro/2015	Junho/2016	Setembro/2016	Dezembro/2016
301	Cabo	6,2 mm	164,1 mm	58,7 mm	14,0 mm

Fonte: APAC

4.4 DEFINIÇÃO DE SOLVENTE EXTRATOR A PARTIR DE RESPOSTA FARMACOLÓGICA

4.4.1 Teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* dos extratos secos de *S. cumini*

Com o intuito de direcionar o estudo para padronizar a melhor solução extrativa obtida das folhas de *S.cumini*, foi avaliada a atividade antifúngica de quatro extratos oriundos de solventes diferentes. Os resultados obtidos para cada um deles estão descritos a seguir (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade antifúngica de extratos secos vegetais obtidos de *S. cumini*.

Isolado fúngico	EA (µg/mL)	EEt (µg/mL)	EHEt (µg/mL)	EMEt (µg/mL)
<i>Candida albicans</i>	R	R	512	R
<i>C. glabrata</i>	R	R	128	R
<i>C. parapsilosis</i>	R	R	1024	R
<i>C. guilliermondii</i>	R	R	512	R
<i>C. orthopsilosis</i>	R	R	128	R
<i>C. tropicalis</i>	R	R	512	R

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: R (resistente, não houve inibição do crescimento)

Entre os extratos secos vegetais provenientes de *S. cumini* apenas o hidroetanólico 50% apresentou atividade antifúngica, com destaque para os isolados de *C. glabrata* e *C. orthopsilosis* que apresentaram CIM e CFM de 128 µg/mL. Contudo, os extratos etanólico e metanólico (20%) apesar de não terem apresentado resultados na inibição do crescimento fúngico não podem ser desconsiderados, uma vez que foram avaliados com concentrações bastante baixas quando comparado ao extrato hidroetanólico 50%, necessitando assim, de estudos futuros com concentrações maiores, a fim de comprovar a ação.

Além disso, os resultados provenientes dos extratos etanólico e metanólico (20%) demonstraram que a remoção dos solventes orgânicos ocorre de forma efetiva no processo de secagem, evitando assim que houvesse interferência nas propriedades antifúngicas dos extratos por presença dos solventes (MICHELIN et al., 2005).

Adicionalmente, os resultados obtidos positivamente para o extrato hidroetanólico 50% (v/v) revelaram-se opostos aos apresentados no estudo realizado por Michelin e colaboradores (2005), pois no trabalho citado, o extrato seco hidroetanólico 50% de *S. cumini* não foi efetivo frente à *C. albicans* na concentração de 60 mg/mL. Por outro lado, os dados obtidos neste estudo corroboram com os apresentados por Pereira e colaboradores (2016), pois estes verificaram que o extrato hidroetanólico 70% de *S. cumini* obteve CIM de 125 µg/mL frente a isolados de *C. albicans* e que esta ação possivelmente está associada a

interrupção da permeabilidade da membrana celular promovida pela complexação do ergosterol.

Ademais, as manifestações clínicas da candidíase vêm se tornando uma condição clínica importante, sobretudo em imunocomprometidos, sendo estas leveduras responsáveis por um amplo espectro de manifestações clínicas, desde superficiais, profundas ou sistêmicas (LIM et al., 2012).

Anfotericina B e fluconazol são as duas drogas mais comumente utilizadas para o tratamento de infecções invasivas por leveduras do gênero *Candida*. No entanto, o uso rotineiro de agentes antifúngicos empiricamente tem sido associado ao desenvolvimento de espécies de *Candida* resistentes e aumentado às infecções por espécies de *Candida* não-*albicans*. Estimando-se que cerca de 10% dos isolados de *C. albicans* provenientes de amostras de sangue são resistentes ao fluconazol (FERREIRA et al., 2012).

A anfotericina B é considerada o padrão ouro para o tratamento de infecções sistêmicas por espécies de *Candida* (BOUZA; MUÑOZ, 2008). No entanto, a emergência de espécies de *Candida* resistentes a este fármaco é um fato preocupante (ESPINEL-INGROFF et al., 2007).

Alguns autores relatam a ocorrência de resistência em isolados de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (PFALLER et al., 2002).

Na década de 80, os antifúngicos azólicos sistêmicos foram introduzidos no mercado como drogas alternativas para o tratamento das micoses invasivas, principalmente em indivíduos debilitados, cujo tratamento com anfotericina B não era possível devido a sua toxicidade (AKINS, 2005). Porém, uma preocupação em relação ao uso desta droga é o surgimento de resistência, entre essas espécies de *Candida* não-*albicans* como *C. glabrata* (SABATELLI et al., 2006).

A detecção de substâncias bioativas com atividade antifúngica é extremamente relevante, visto que a toxicidade bem como a resistência as drogas comercialmente disponíveis vem sendo cada vez mais relatadas (MANZONI et al., 2007).

Diante desse cenário, a investigação da atividade antifúngica do extrato seco alcoólico de *Syzygium cumini* (L.) Skeels é promissora e a possibilidade da futura produção de mais um fármaco para o tratamento das candidíases será impactante para a saúde humana e na redução dos custos com tratamentos onerosos e ineficazes.

4.5 DEFINIÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO VISANDO MAIOR TEOR DE TANINOS TOTAIS

4.5.1 Caracterização da solução extrativa

As soluções extrativas obtidas pelas técnicas de banho Maria com agitação e micro-ondas foram caracterizadas e seus resultados foram comparados como descritos a seguir.

4.5.1.1 Determinação de pH

Na Tabela 4, estão apresentados os valores de pH para cada uma das soluções.

Tabela 4 - Valores de pH das soluções extrativas das folhas de *S. cumini* extraídos pelas técnicas de microondas e digestão

Parâmetro	Digestão	Micro-ondas
pH	5,4567 ($\pm 0,011$)	5,4367 ($\pm 0,06$)

Fonte: Dados da pesquisa.

4.5.1.2 Determinação de densidade relativa

Os valores de densidade relativa estão apresentados abaixo na Tabela 5, se mostrando menos denso que a água e com resultados parecidos com a densidade das tinturas e extratos descritos na Farmacopéia 5^a ed.

Tabela 5 - Valores da densidade relativa das soluções extrativas das folhas de *S. cumini* extraídos pelas técnicas de micro-ondas e digestão.

Parâmetro	Digestão	Microondas
Densidade relativa	0,9589 ($\pm 0,0003$)	0,9415 ($\pm 0,0006$)

Fonte: Dados da pesquisa

4.5.1.3 Determinação de resíduo seco

O teor de resíduo seco para cada uma das técnicas utilizadas está apresentado a seguir na Tabela 6, estando também com valores bem próximos aos especificados para outras plantas descritas na Farmacopéia 5^a ed.

Tabela 6 - Valores do resíduo seco das soluções extrativas das folhas de *S. cumini* extraídos pelas técnicas de microondas e digestão

Parâmetro	Digestão	Microondas
Resíduo seco	0,95% ($\pm 0,06$)	0,83% ($\pm 0,05$)

Fonte: Dados da pesquisa

4.5.1.4 Determinação de taninos totais

A determinação de taninos totais nos extratos avaliados foi realizada utilizando a técnica de Folin-Ciocalteu que é amplamente difundida na literatura. No comparativo entre as extrações percebe-se que tanto o teor de taninos totais, quanto o de fenóis totais na extração por microondas foram significativamente superiores aos obtidos pela técnica de digestão (Tabela 7), observa-se a eficiência na extração por microondas pelo fato desta resultar em um teor 14,25% e 6,44% superior de fenóis totais e taninos totais, respectivamente, ao obtido pela técnica de digestão. Tais dados corroboram com os estudos realizados por Aspé e Fernández, (2012), pois realizaram ensaios comparativos entre diversas técnicas de extração e observaram que o método mais efetivo, quando relacionados a teores de extração de fenóis totais e taninos, foi a técnica por micro-ondas.

Tabela 7 - Teor de fenóis e taninos totais das folhas de *S. cumini* extraídos pelas técnicas de micro-ondas e digestão

Parâmetros	Micro-ondas	CV	Digestão	CV
	(mg EAT/g) ± dp	(%)	(mg EAT/g) ± dp	(%)
Fenóis Totais	2,2597 ± 0,002	0,10	1,9377 ± 0,002	0,10
Taninos Totais	0,6395 ± 0,004	0,67	0,5983 ± 0,006	0,98

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: dp – desvio padrão; CV – Coeficiente de variação; EAT – Equivalente de Ácido Tânico.

4.6 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE TANINOS TOTAIS DAS FOLHAS DE *S. CUMINI*

4.6.1 Adaptação para leitura de taninos e polifenóis

Na comparação entre os métodos extrativos, foi utilizada uma curva de calibração seguindo os parâmetros apresentados por Amorim, (2008), porém observou-se a necessidade de com uma mesma curva de calibração, efetuar o doseamento tanto de fenóis totais quanto de taninos totais e para tal, sabendo-se que o teor de taninos totais é obtido pela diferença entre fenóis totais e fenóis residuais após a complexação com caseína, se fez necessário obter-se uma curva de calibração com uma distribuição de pontos capaz de tornar possível tal ação. A partir disto, foram realizadas curvas de calibração aplicando-se 8 pontos com concentrações

crecentes de padrão, além do aumento da concentração do reagente de Folin-Ciocalteu de 500 para 600 ppm, como observados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Valores da triplicata das absorvâncias do padrão ácido tânico aplicando 500ppm do reagente de Folin-Ciocalteu

Ácido Tânico ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias \pm dp		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,5	0,048 \pm 0,001	0,048 \pm 0,001	0,049 \pm 0,001
2,0	0,132 \pm 0,069	0,132 \pm 0,001	0,133 \pm 0,002
4,0	0,245 \pm 0,001	0,245 \pm 0,001	0,246 \pm 0,001
6,0	0,333 \pm 0,001	0,333 \pm 0,002	0,333 \pm 0,001
8,0	0,411 \pm 0,001	0,412 \pm 0,002	0,412 \pm 0,001
10,0	0,473 \pm 0,001	0,573 \pm 0,002	0,474 \pm 0,001
12,0	0,480 \pm 0,001	0,481 \pm 0,002	0,482 \pm 0,002
14,0	0,510 \pm 0,001	0,511 \pm 0,002	0,511 \pm 0,001

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: dp – desvio padrão

Os valores de absorvância obtidas nas três curvas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, conforme demonstrado pelo teste ANOVA, com $F_{\text{calculado}}$ (0,00826) $<$ F_{tabelado} (3,098391). Contudo, a concentração de 500 e 600 ppm de Folin-Ciocalteu não foi satisfatória, uma vez que as curvas de calibração não apresentaram linearidade por possuírem valores de R^2 inferiores a 0,99 como evidenciado nas Figura 4 e 5 que representam a média das três curvas de calibração obtidas.

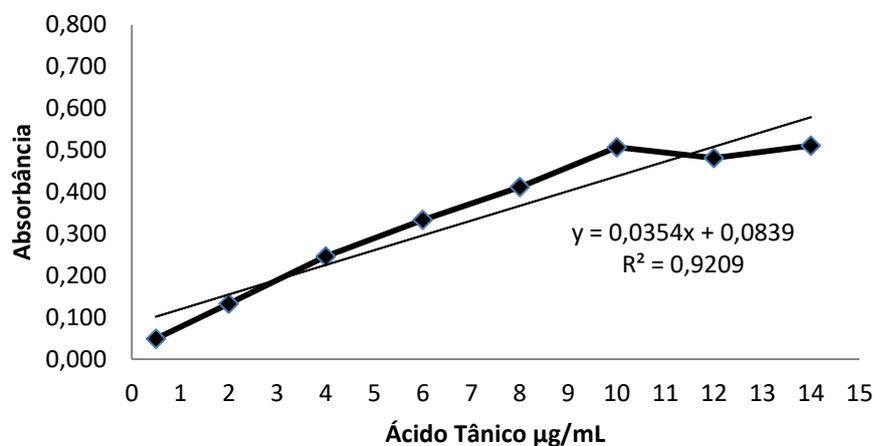
Tabela 9 - Valores da triplicata das absorvâncias do padrão ácido tânico aplicando 600ppm do reagente de Folin-Ciocalteu

Ácido Tânico (µg/mL)	Absorvâncias ± dp		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,5	0,040 ± 0,001	0,038 ± 0,001	0,039 ± 0,001
2,0	0,093 ± 0,069	0,124 ± 0,001	0,120 ± 0,002
4,0	0,255 ± 0,001	0,255 ± 0,001	0,254 ± 0,001
6,0	0,380 ± 0,001	0,377 ± 0,002	0,378 ± 0,001
8,0	0,487 ± 0,001	0,480 ± 0,002	0,478 ± 0,001
10,0	0,561 ± 0,001	0,562 ± 0,002	0,562 ± 0,001
12,0	0,604 ± 0,001	0,600 ± 0,002	0,598 ± 0,002
14,0	0,646 ± 0,001	0,644 ± 0,002	0,644 ± 0,001

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: dp – desvio padrão.

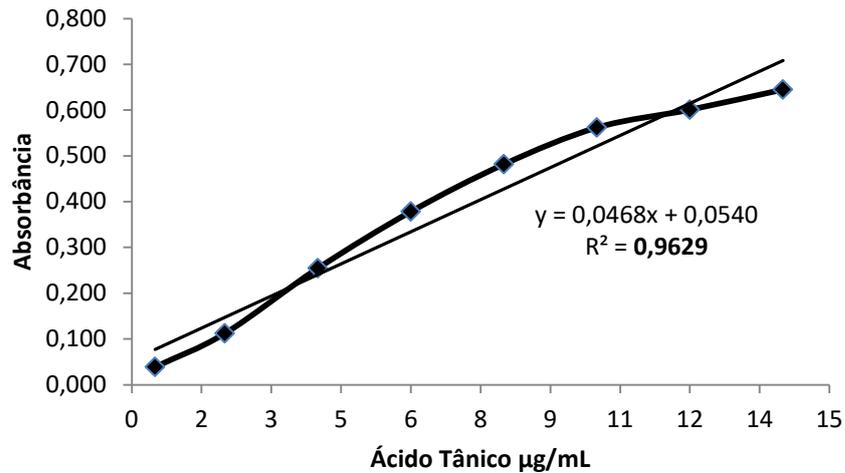
Os valores de absorvância obtidas nas três curvas para as concentrações de 500ppm e 600ppm de Folin-Ciocalteu não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, conforme demonstrado pelo teste ANOVA respectivamente com, $F_{\text{calculado}} (0,00826) < F_{\text{tabelado}} (3,098391)$ e $F_{\text{calculado}} (0,0001) < F_{\text{tabelado}} (3,4668)$. Contudo, não foi satisfatória, uma vez que as curvas de calibração não apresentaram linearidade por possuírem valores de R^2 inferiores a 0,99 como evidenciados nas Figura 4 e 5 que representam a média das três curvas de calibração obtidas.

Figura 4 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando-se 500 ppm de Folin-Ciocalteu.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando-se 600 ppm de Folin-Ciocalteu.



Fonte: Dados da pesquisa

Diante dos resultados obtidos com as curvas de calibração aplicando-se 600 ppm de Folin-Ciocalteu, decidiu-se elevar a concentração para 700 ppm em virtude de possivelmente haver ocorrido uma saturação do reagente e por isso, a curva não ter apresentado-se linear. As novas absorvâncias obtidas estão demonstradas na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores da triplicata das absorvâncias do padrão ácido tânico aplicando 700ppm do reagente de Folin-Ciocalteu

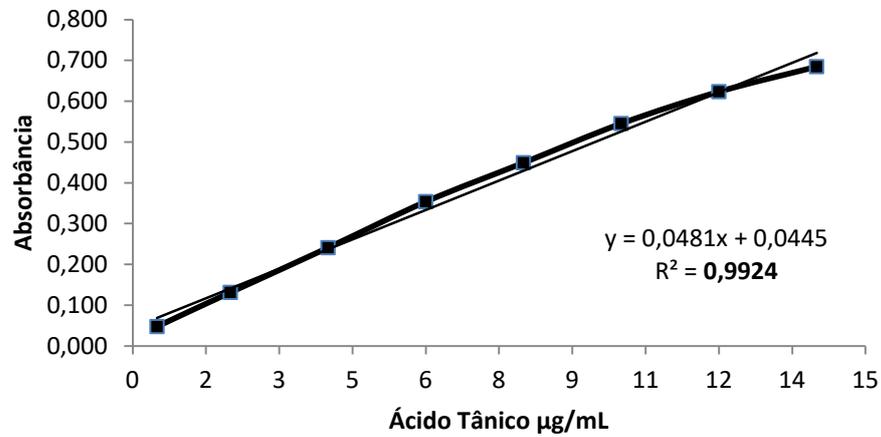
Ácido Tânico (µg/mL)	Absorvâncias ± dp		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,5	0,063 ± 0,001	0,040 ± 0,002	0,040 ± 0,002
2,0	0,130 ± 0,001	0,128 ± 0,002	0,136 ± 0,002
4,0	0,245 ± 0,002	0,241 ± 0,002	0,237 ± 0,002
6,0	0,362 ± 0,001	0,349 ± 0,001	0,351 ± 0,001
8,0	0,466 ± 0,002	0,443 ± 0,002	0,438 ± 0,025
10,0	0,548 ± 0,001	0,540 ± 0,002	0,548 ± 0,001
12,0	0,630 ± 0,002	0,617 ± 0,002	0,623 ± 0,001
14,0	0,687 ± 0,001	0,683 ± 0,002	0,684 ± 0,002

Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados das três curvas de calibração não apresentaram valores de absorbância com diferenças estatisticamente significativas entre si, de acordo com o teste ANOVA, com F calculado (0,005) < F tabelado (3,467). Além disso, as curvas de calibração demonstraram-se

lineares resultando no gráfico apresentado na Figura 6 que compreende a média das três curvas, sendo definida pela equação da reta $y = 0,0481x + 0,0445$, com $R^2 = 0,9924$.

Figura 6 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando 700ppm de Folin-Ciocalteu.

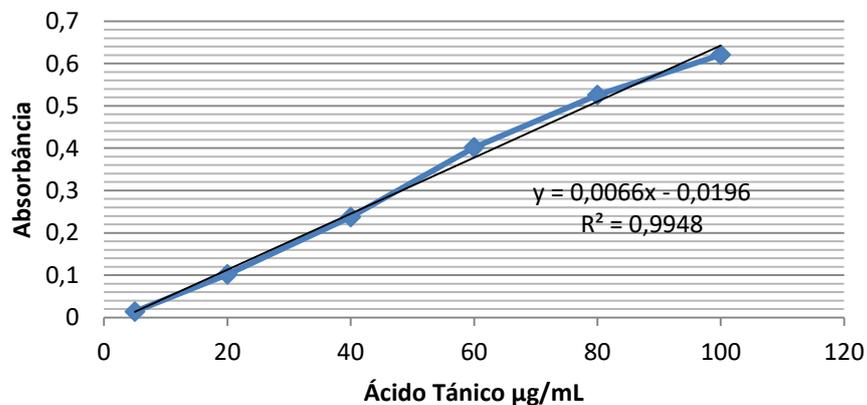


Fonte: Dados da pesquisa

4.6.2 Definição da concentração de caseína

Após definida a concentração ideal do reagente de Folin-Ciocalteu, o passo seguinte foi verificar a menor concentração possível de caseína para executar a complexação dos fenóis totais para posterior leitura do sobrenadante do extrato. Para tanto, foi obtida uma curva de calibração utilizando 700 ppm do reagente de Folin-Ciocalteu, conforme a Figura 7 que resultou na equação da reta $y = 0,0066x - 0,0196$, com $R^2 = 0,9948$.

Figura 7 - Curva de calibração dos fenóis residuais utilizando-se 700 ppm de Folin- Ciocalteu.



Fonte: Dados da pesquisa

Tendo obtida a curva de calibração para avaliação do comparativo entre as concentrações de caseína 100, 250, 500, 750, 1000 e 1100mg, foi realizado o experimento com as concentrações citadas e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 11 apresentada abaixo:

Tabela 11 - Avaliação das concentrações de caseína sobre o doseamento de taninos totais de *S. cumini*.

Parâmetros	Taninos Totais ($\mu\text{g EAT/mL}$) \pm dp	CV (%)
Caseína 100 mg	38,83 \pm 0,003	4,93
Caseína 250 mg	39,00 \pm 0,005	2,39
Caseína 500 mg	41,95 \pm 0,003	3,22
Caseína 750 mg	43,60 \pm 0,002	4,30
Caseína 1000 mg	46,68 \pm 0,003	2,55

Fonte: Dados da pesquisa

Os dados da Tabela 11 demonstram que os teores de taninos totais resultantes da complexação com 100, 250, 500 e 750 mg de caseína não foram semelhantes quando comparados com a concentração de 1g, uma vez que apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo como teste ANOVA em que o $F_{\text{calculado}}$ foi infinitamente maior que o F_{tabelado} , evidenciando decaimento de concentração de taninos ao aumentar a concentração de caseína, indicando saturação da caseína. Devido a isso elegeu-se a concentração de 1000mg de caseína na condução dos experimentos resultando em respostas seguras.

4.6.3 Avaliação do tempo de complexação da caseína

Com a definição da menor concentração de caseína capaz de complexar os fenóis totais de forma efetiva, prosseguiu-se com o estudo visando obter o menor tempo de complexação possível e para tal, foram avaliados os tempos de 3h, 1:30h e 30min. Estes resultados estão descritos na Tabela 12 abaixo:

Tabela 12 - Avaliação dos tempos de complexação da caseína com fenóis totais sobre o doseamento de taninos totais de *S. cumini*

Parâmetros	Taninos Totais (mg EAT/g) ± dp	CV (%)
30min	4,946 ± 0,014	0,28
1:30h	3,926 ± 0,013	0,33
3h	4,625 ± 0,014	0,30

Fonte: Dados da pesquisa

De acordo com a Tabela 12, os resultados obtidos foram semelhantes quando comparado os tempos 1:30h e 30min com 3h para taninos totais. Sendo confirmado pelo teste ANOVA onde para taninos totais para o tempo de 30min o $F_{\text{calculado}} (0,842989) < F_{\text{tabelado}} (7,708647)$ e para o tempo de 1:30h o $F_{\text{calculado}} (4,519188) < F_{\text{tabelado}} (7,708647)$, provando não haver diferença estatisticamente significativa entre os tempos avaliados. Assim sendo, o tempo de 30min de complexação de caseína com os fenóis totais foi o escolhido para dar prosseguimento aos experimentos, resultando em ganho de tempo significativo para resposta analítica.

4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

4.7.1 Avaliação da cinética da curva de calibração

Devido à necessidade de haver uma reação entre o reagente de Folin-Ciocalteu com o Ácido tânico para quantificação dos polifenóis totais no espectrofotômetro. Analisamos a cinética de reação ao longo do tempo de 30 a 240 min. Na Tabela 13 estão representados os valores de absorvância obtidos para cada curva.

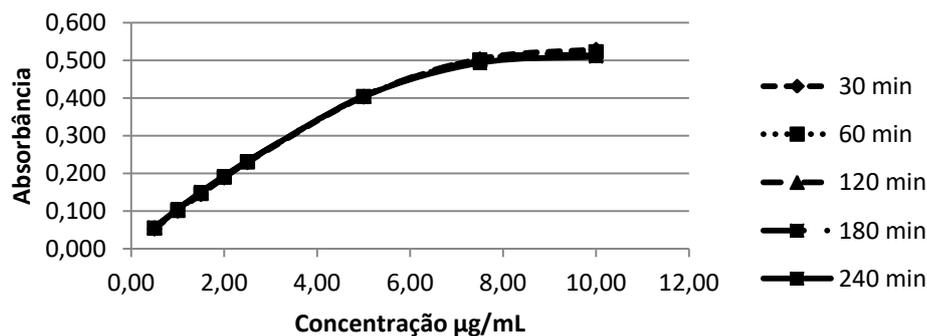
Tabela 13 - Valores de absorbância da curva de calibração lida após 30, 60, 120, 180 e 240 minutos

Ácido Tânico ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias				
	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min
0,5	0,052	0,055	0,055	0,057	0,056
1,0	0,100	0,102	0,102	0,105	0,105
1,5	0,144	0,147	0,148	0,151	0,151
2,0	0,188	0,190	0,191	0,193	0,193
2,5	0,229	0,231	0,231	0,233	0,232
5,0	0,403	0,404	0,404	0,405	0,404
7,5	0,503	0,501	0,503	0,496	0,493
10,0	0,529	0,523	0,514	0,513	0,510

Fonte: Dados da pesquisa

De acordo com a tabela 13 os dados para todas as concentrações e tempos avaliados apresentaram-se bastante semelhantes, sendo confirmados pelo teste ANOVA com $F_{\text{calculado}} (0,0001) < F_{\text{tabelado}} (2,6415)$ em que os dados não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre si, comprovando a estabilidade da curva de calibração aplicada. Além disso, é possível observar na Figura 8 o comportamento semelhante das curvas avaliadas.

Figura 8 - Curva de calibração lida após 30, 60, 120, 180 e 240 minutos.



Fonte: Dados da pesquisa

Portanto, os resultados obtidos demonstram que as curvas de calibração obtidas permanecem estáveis por até 4 horas, sendo tempo suficiente para a realização da avaliação de taninos totais, sem que esta venha proporcionar resultados duvidosos em função de uma possível desestabilização.

4.7.2 Avaliação da estabilidade das soluções reagentes

Foi efetuada a avaliação das estabilidades das soluções reagentes, utilizadas para o preparo das curvas de calibração utilizadas no estudo. Os dados da investigação estão sumarizados na Tabela 14 a seguir.

Tabela 14 - Valores de absorvância obtidas na avaliação da estabilidade das soluções reagentes após 1º, 2º 3º 14º e 49º dia

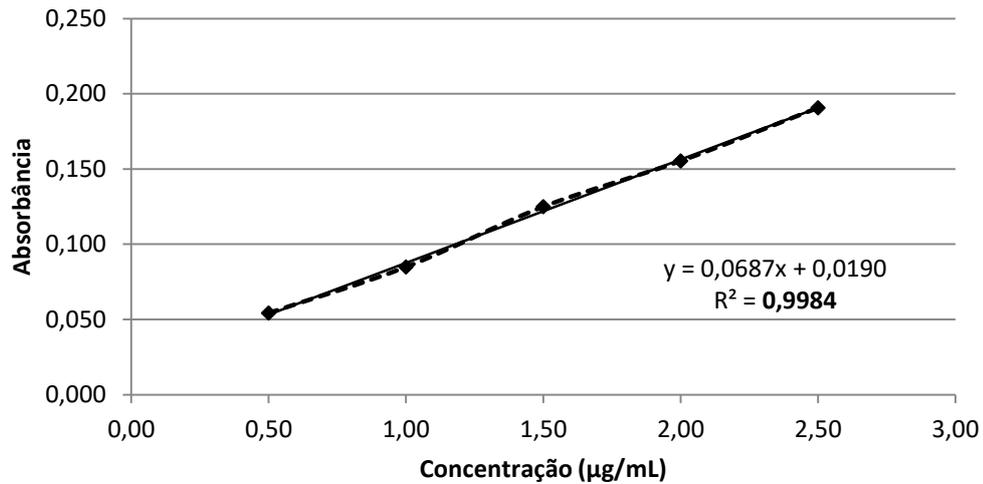
Ácido Tânico (µg/mL)	Absorvâncias				
	1º dia	2º dia	3º dia	14º dia	49º dia
0,5	0,047	0,074	0,053	0,048	0,049
1,0	0,081	0,085	0,088	0,077	0,093
1,5	0,121	0,126	0,125	0,117	0,135
2,0	0,156	0,157	0,157	0,141	0,165
2,5	0,195	0,193	0,193	0,168	0,205

Fonte: Dados da pesquisa

A partir dos dados observados na Tabela 14 pode-se verificar que mesmo com um período longo de armazenamento das soluções, estas ainda permaneceram estáveis resultando em valores de absorvância semelhantes entre si para as diferentes concentrações aplicadas. Ademais, tais conclusões são fundamentadas pelo teste ANOVA em que o $F_{\text{calculado}}$ (0,094) < F_{tabelado} (2,866) confirmando que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as absorvâncias das curvas avaliadas.

Adicionalmente, na Figura 9 que representa a curva de calibração obtida pelas médias das curvas avaliadas e que é definida pela equação da reta $y = 0,0687x + 0,0190$, com $R^2 = 0,9984$.

Figura 9 - Média das curvas de calibração utilizadas na avaliação das soluções reagentes.



Fonte: Dados da pesquisa

Diante disso, os dados expostos corroboram para a confirmação da estabilidade das soluções reagentes utilizadas e garantem que os teores de fenóis e taninos totais obtidos das folhas de *S. cumini* são fidedignos. Além disso, tais comprovações de estabilidade das soluções proporcionaram economia no que se refere ao gasto com reagente e maior agilidade na execução dos experimentos em função de não ter que dispor de tempo para preparo destas soluções.

4.7.3 Estabilidade da solução extrativa

Após a adaptação do método para doseamento de taninos e fenóis totais, foi avaliada a estabilidade dos extratos em temperatura ambiente e sob refrigeração. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

4.7.3.1 Temperatura ambiente

O conhecimento do tempo em que um extrato vegetal se mantém estável é de suma importância, pois facilita e promove segurança quanto ao desenvolvimento de experimentos e controle de qualidade das amostras. Na Tabela 15 estão relatados os resultados obtidos na avaliação da estabilidade do extrato etanol:água (1:1, v/v) de *S. cumini*.

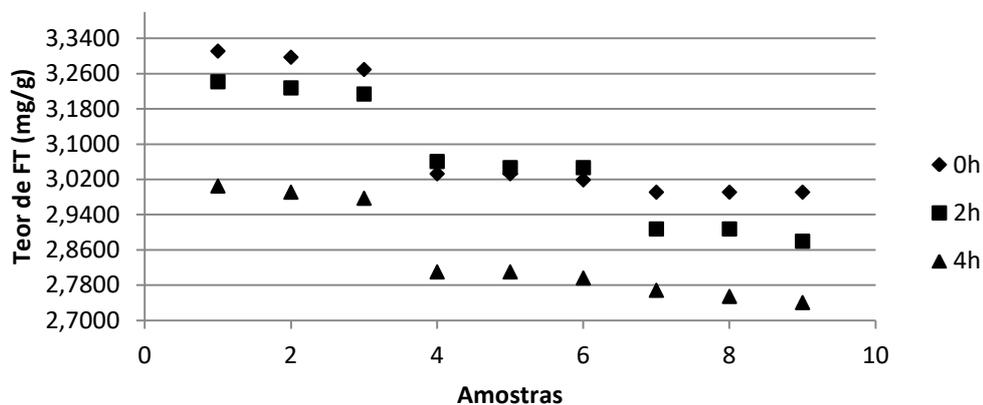
Tabela 15 - Resultados da avaliação dos teores de taninos totais e fenóis totais de *S. cumini* no estudo de estabilidade do extrato sem refrigeração

Parâmetros	Taninos Totais (mg EAT/g) ± dp	CV (%)	Fenóis Totais (mg EAT/g) ± dp	CV (%)
0h	1,713 ± 0,008	0,49	3,104 ± 0,010	0,30
2h	1,736 ± 0,014	0,79	3,059 ± 0,013	0,42
4h	1,691 ± 0,012	0,71	2,850 ± 0,012	0,42

Fonte: Dados da pesquisa

De acordo com o demonstrado na Tabela 15 o tempo de 4h apresentou menores valores de teor tanto para taninos quanto para fenóis totais, contudo não foi suficiente para resultar em diferenças estatisticamente significativas entre si, uma vez que pelo teste ANOVA o $F_{\text{calculado}} (0,223) < F_{\text{tabelado}} (3,403)$ para taninos totais e o mesmo aconteceu para fenóis totais que tiveram $F_{\text{calculado}} (2,365) < F_{\text{tabelado}} (5,143)$. Deste modo, é possível concluir que os extratos sem refrigeração podem ser utilizados até um período de 4 horas após obtidos, sem que isto venha interferir negativamente nos teores finais dos metabólitos de interesse, porém é necessário levar-se em consideração que ao longo do tempo os teores de taninos e fenóis totais apresentaram decaimento gradativo de seus teores ao longo do tempo, em especial quando comparados os tempos 0h com 4h principalmente para fenóis totais, conforme apresentado na Figura 10 abaixo.

Figura 10 - Valores de fenóis totais nos tempo 0, 2 e 4 h.



Fonte: Dados da pesquisa

4.7.3.2 Sob refrigeração

Avaliou-se a estabilidade dos extratos sob refrigeração, a fim de verificar se o fator temperatura teria impacto sobre os teores de metabólitos do extrato de *S. cumini*. Os resultados das avaliações estão apresentados na Tabela 16 a seguir.

Tabela 16 - Avaliação dos teores de taninos totais e fenóis totais de *S. cumini* no estudo de estabilidade do extrato sob refrigeração

Parâmetros	Taninos Totais (mg EAT/g) ± dp	CV (%)	Fenóis Totais (mg EAT/g) ± dp	CV (%)
0h	3,455 ± 0,011	0,31	5,182 ± 0,007	0,14
6h	3,094 ± 0,011	0,34	4,909 ± 0,007	0,15
12h	2,843 ± 0,019	0,66	4,831 ± 0,017	0,35

Fonte: Dados da pesquisa

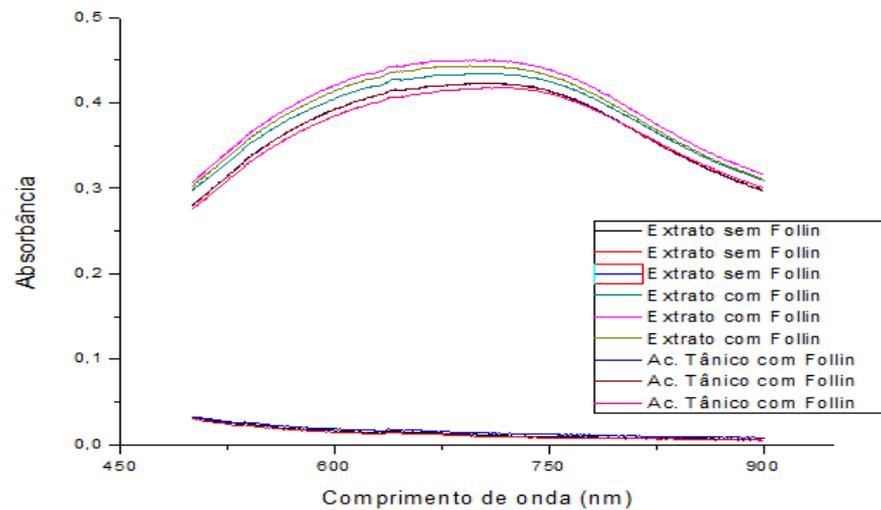
De acordo com a Tabela 16 houve bastante variação entre as respostas obtidas na avaliação da estabilidade do extrato de *S. cumini*, uma vez que apenas os teores de fenóis totais não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si de acordo com o teste ANOVA que resultou em $F_{\text{calculado}} (3,229) < F_{\text{tabelado}} (5,143)$. Porém para taninos totais os teores apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, demonstrando que tais metabólitos precisam ser acompanhados cuidadosamente visando obter valores próximos da realidade. Dessa forma, a semelhança de como foi conduzido o experimento sem refrigeração, para uma condição com refrigeração se faz necessário avaliar com intervalos de tempo menores a fim de conhecer melhor o extrato de *S. cumini* no que se refere a estabilidade.

4.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

4.8.1 Especificidade

Considerar um método específico significa que ele possui a capacidade de medir exatamente complexos específico, independente da matriz da amostra e de suas impurezas. Na Figura 11 estão apresentados os espectros de varredura obtidos para as amostras do extrato de *S. cumini* com e sem adição do reagente Folin-Ciocalteu, em comparação com os espectros dos padrões de ácido tânico, após adição do reagente. Observa-se que não há absorbância quando não é adicionado o reagente no intervalo de comprimento de onda escolhido, entretanto há similaridade de espectro na presença do Folin, demonstrando a especificidade do método para polifenóis sendo seu pico de máxima absorbância em 706nm.

Figura 11 - Espectros de varredura obtidos na análise de especificidade com e sem adição de Folin-Ciocalteu para determinação de polifenóis para *S.cumini*.



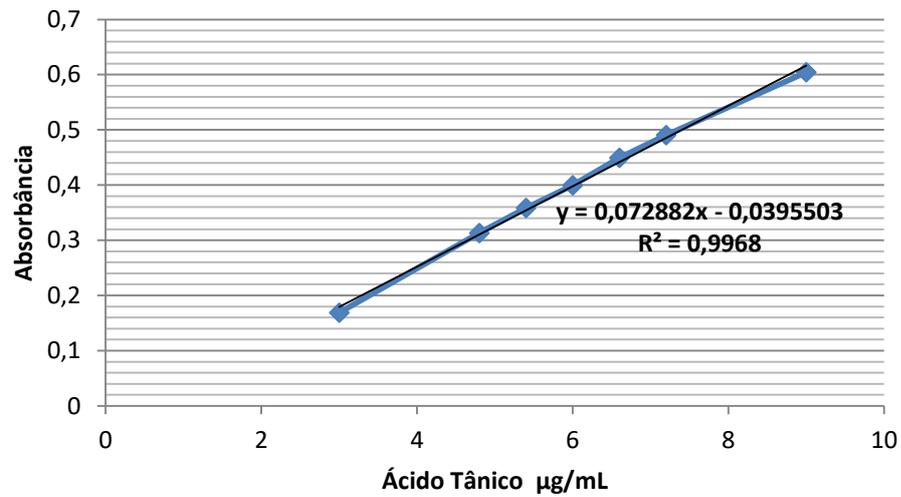
Fonte: Dados da pesquisa

4.8.2 Linearidade, limites de detecção e quantificação de fenóis totais e taninos totais

A linearidade de um método demonstra que o valor de absorvância obtido, correlaciona dependência da resposta espectrofotométrica com a variação da concentração da amostra. O resultado para polifenóis totais foi obtido através da média de três curvas de polifenóis totais (PFT) (solução extrativa) com sete concentrações, 3; 4,8; 5,4; 6; 6,6; 7,2 e 9 $\mu\text{g/mL}$. Os dados da regressão obtidos pelo método dos mínimos quadrados apresentaram valores de coeficientes de determinação (R^2) de 0,9968 e 0,9982 para a solução padrão e solução extrativa, respectivamente, denotando que mais de 99% (99,68 e 99,82%, respectivamente), da variabilidade experimental é explicada satisfatoriamente pelas equações propostas ($y = 0,072882x - 0,0395503$, para a solução padrão, e $y = 0,0642x + 0,0172$, para solução extrativa), comprovando a relação linear entre o aumento da concentração do analito e a resposta espectrofotométrica (Figura 12 e 13).

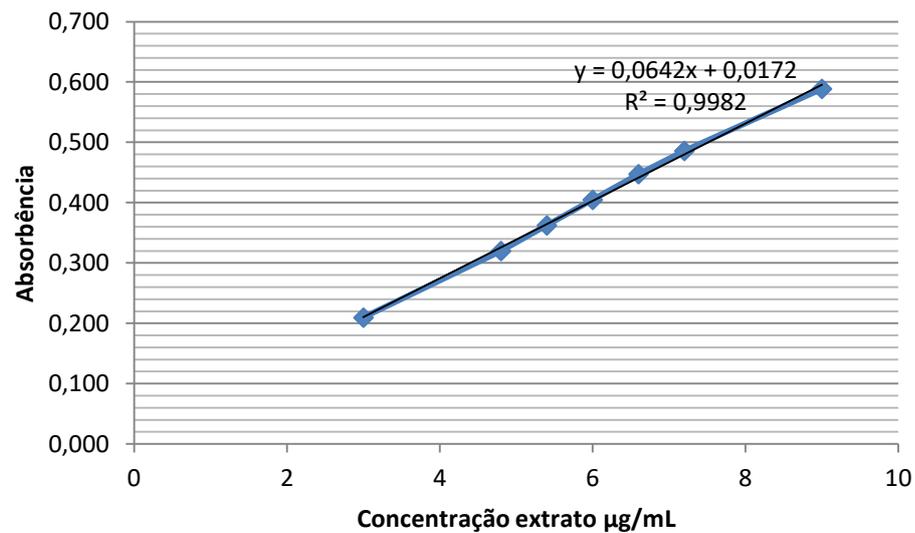
Os dados permitiram afirmar que o desempenho do método atende aos requisitos preconizados para análise desse parâmetro. Considerando os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), os resultados encontrados foram 0,083 e 0,275 $\mu\text{g/mL}$, e 0,314 e 1,046 $\mu\text{g/mL}$ para solução padrão e solução extrativa, respectivamente. Com esses resultados, verificou-se que os procedimentos proporcionaram resposta espectrofotométrica com sensibilidade para detecção e quantificação dos polifenóis totais de *S. cumini* com a confiabilidade desejada.

Figura 12 - Linearidade da curva padrão para fenois totais.



Fonte: Dados da pesquisa

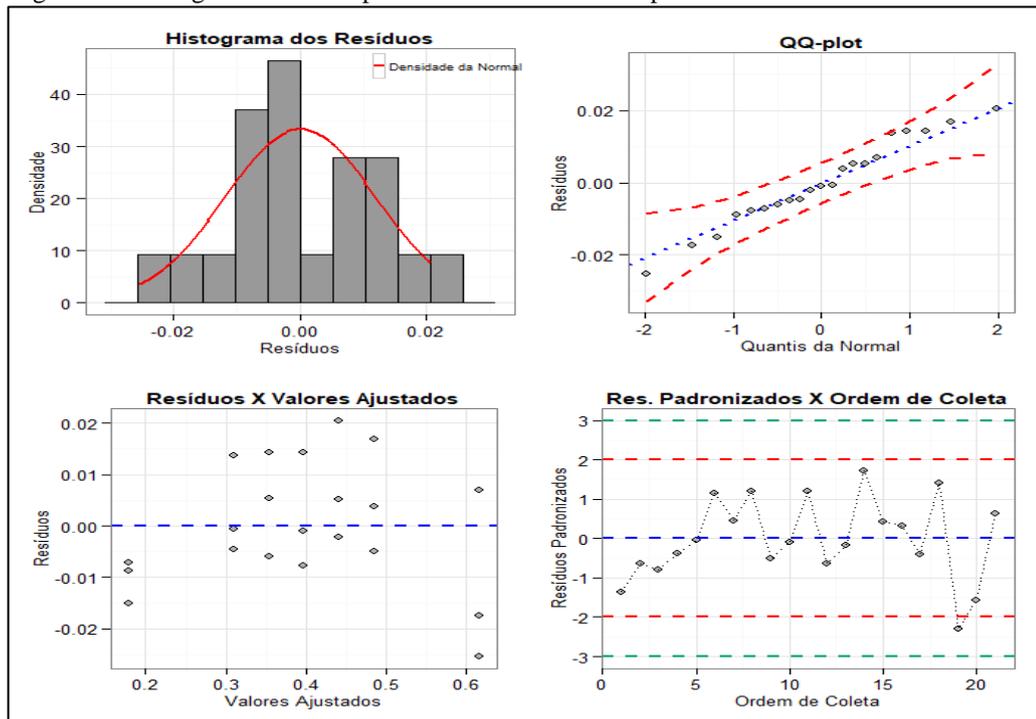
Figura 13 - Linearidade da solução extrativa para fenois totais



Fonte: Dados da pesquisa

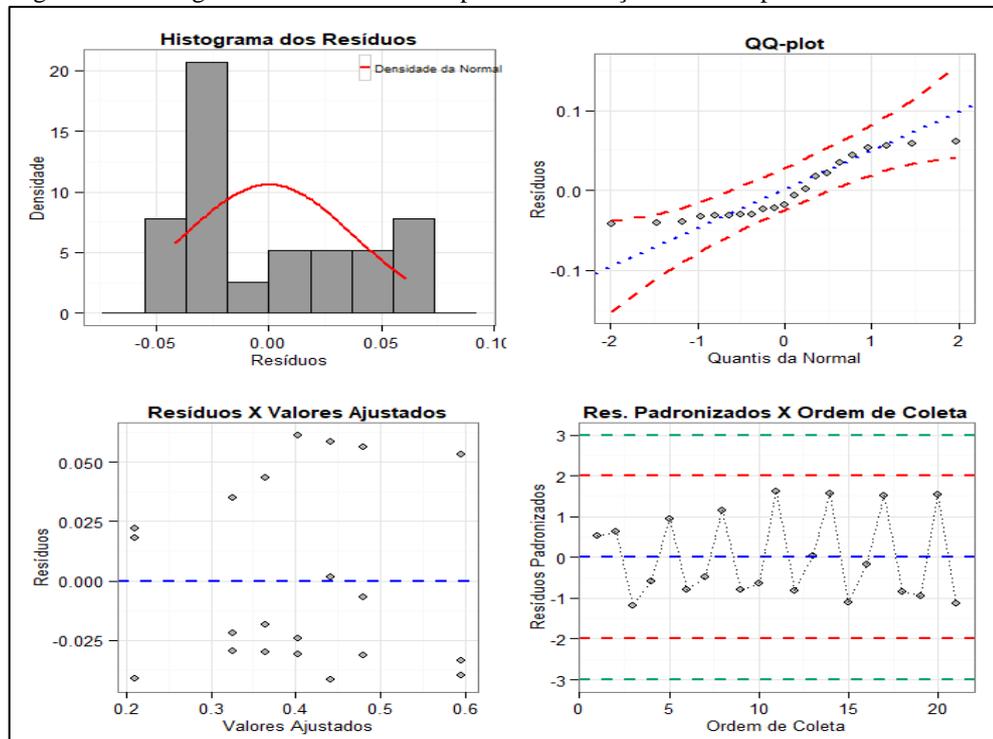
O método se mostrou homocedástico ao nível de significância de 5% para fenois totais de acordo com o teste de Cochran que resultou p-valor (0,6742) para a curva realizada com o padrão e p-valor (1) para a curva realizada com a solução extrativa. (Figura 15 e 16).

Figura 14 - Plotagem de resíduo para fenois totais da curva padrão



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 15 - Plotagem de resíduo da curva padrão da solução extrativa para fenois totais

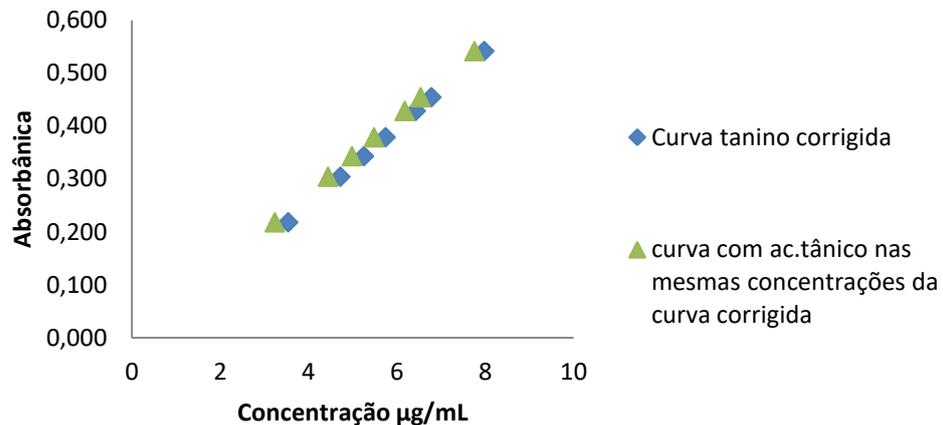


Fonte: Dados da pesquisa

Para o desenvolvimento da solução padrão para taninos totais foi feita uma curva de

concentrações conhecidas de tanino total do extrato corrigida pela curva de ácido tânico para fenóis totais dando as seguintes concentrações: 3,54; 4,72; 5,25; 5,74; 6,42; 6,78 e 7,98 $\mu\text{g/mL}$, depois de verificar as concentrações de cada alíquota seu comportamento de absorvância foi comparado com uma curva de ácido tânico feita com as mesmas concentrações. A Figura 16 mostra a correlação das concentrações entre as amostras quando comparado com as absorvâncias, identificando que não há diferença significativa entre elas de acordo como teste ANOVA em que o $F_{\text{calculado}} (1,3460) < F_{\text{tabelado}} (4,7472)$, esse comportamento pode ser justificado pela majoritariedade de taninos nas folhas de *S. cumini* e por conta do método de extração que possui grande eficácia na extração desses metabolitos.

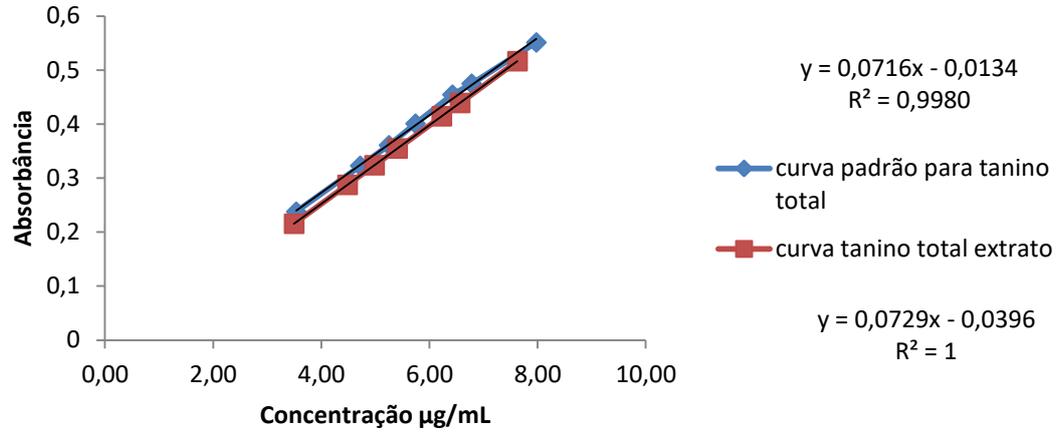
Figura 16 - Comparativo entre os resultados das concentrações de taninos totais feito com a solução extrativa de *S. cumini* e com ácido tânico.



Fonte: Dados da pesquisa

A linearidade para taninos totais foi verificada para solução extrativa e para solução padrão, a partir da análise de três curvas autênticas. Para a solução extrativa e para solução padrão, três curvas foram construídas em sete níveis de concentração: 3,54; 4,72; 5,25; 5,74; 6,42; 6,78 e 7,98 $\mu\text{g/mL}$. Através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi gerada uma reta com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9980 e 1 para curva padrão e para a solução extrativa respectivamente, apresentadas na Figura 17. Este valor significa que 99,8% e 100% da variação experimental é explicada pela equação da reta ($y = 0,0716x - 0,0134$) e ($Y=0,0729x - 0,0396$) para solução padrão e solução extrativa respectivamente, comprovando a correlação linear entre a resposta espectrofotométrica e a concentração da amostra.

Figura 17 - Linearidade realizada para solução padrão e para solução extrativa.

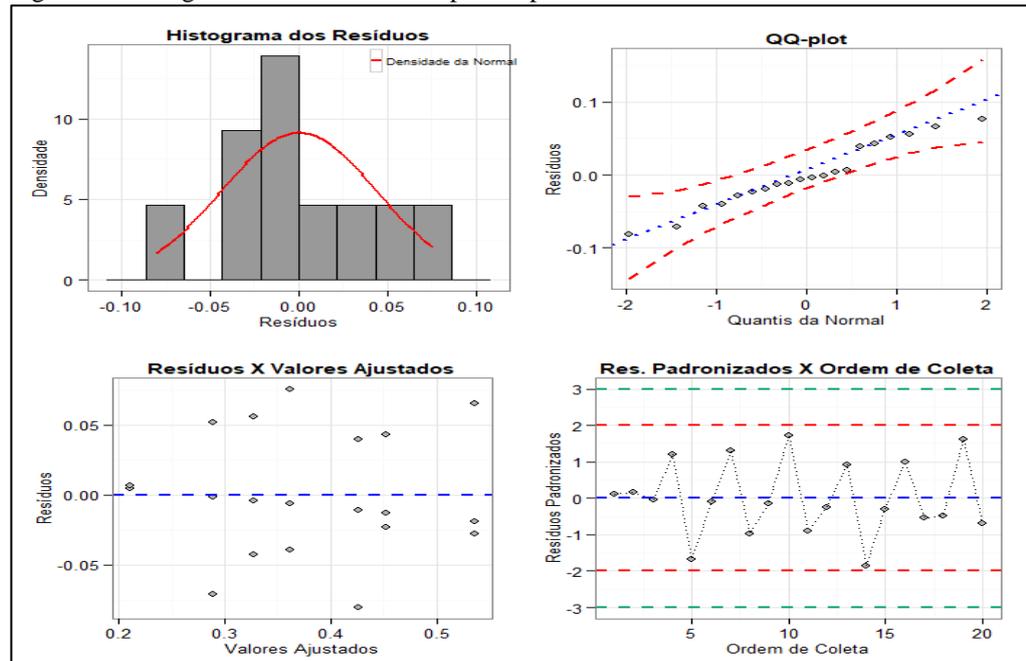


Fonte: Dados da pesquisa

Os valores dos limites de detecção e de quantificação foram 0,100 e 0,894 µg/mL para solução padrão e 0,102 e 0,912 µg/mL para solução extrativa, respectivamente. Esses resultados apontam a sensibilidade que o método tem para detectar e quantificar os taninos totais, sem interferências do equipamento.

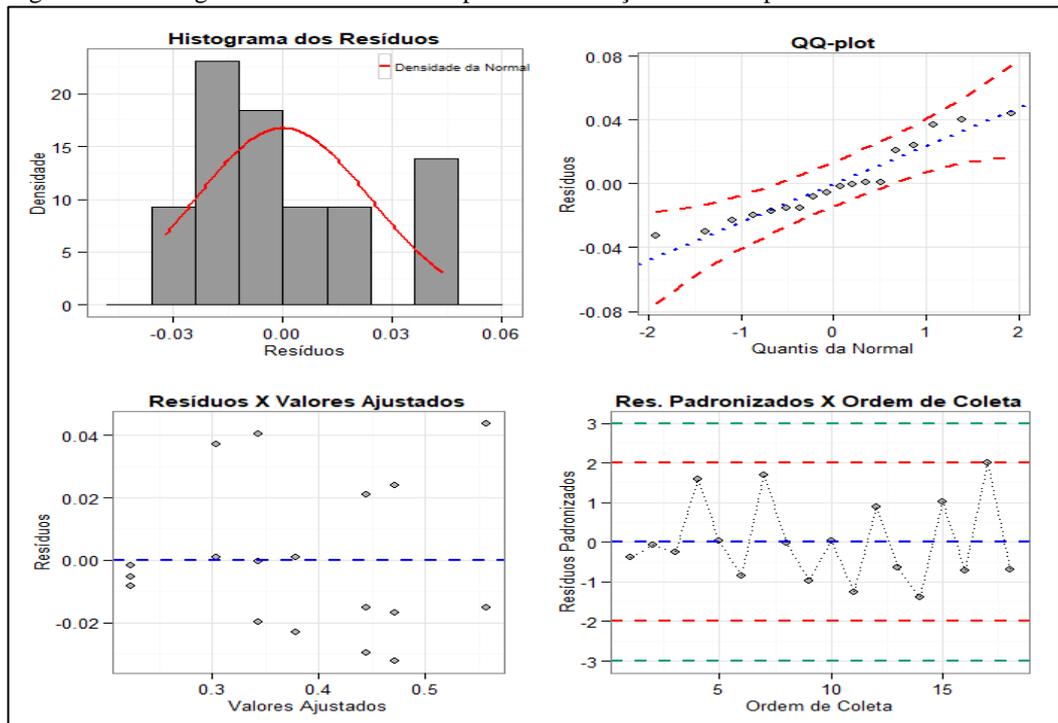
O método se mostrou homocedástico ao nível de significância de 5% para taninos totais de acordo com o teste de Cochran que resultou p-valor (1) para a curva realizada com o padrão e p-valor (0,7096) para a curva realizada com a solução extrativa (Figura 18 e 19).

Figura 18. Plotagem de resíduo da curva padrão para taninos totais



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 19 - Plotagem de resíduo da curva padrão da solução extrativa para fenois totais



Fonte: Dados da pesquisa

4.8.3 Robustez

Ao analisar a robustez do método, verifica-se a sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, indicando assim, sua confiança durante o processo. Esta verificação é importante para identificar quais condições ou etapas analíticas devem ser melhor controladas. Diante dos resultados apresentados na Tabela 17, observa-se que o método foi robusto quanto à pequena variação na concentração do carbonato de sódio de 10% para 15%, pois o F calculado foi inferior ao F tabelado através de ANOVA *One-Way* para quantificação de fenois totais e para taninos totais. Para variação da marca do equipamento o método também se mostrou robusto para fenois totais e taninos totais, pois o $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ através de ANOVA *One-Way*.

Tabela 17 - Análise de robustez

Parâmetros	Teor FT $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$	Teor TT $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$	F. calculado FT/TT	F. tabelado FT/TT
Carbonato de Sódio 10%	6,194 \pm 0,009	5,777 \pm 0,118	1,189/ 1,997	5,318/ 5,591
Carbonato de Sódio 15%	6,266 \pm 0,146	5,652 \pm 0,140		
Equipamento Shimadzu [®]	6,365 \pm 0,472	6,334 \pm 0,212	3,572/1,847	7,709/ 7,709
Equipamento Micronal [®]	6,732 \pm 0,162	6,615 \pm 0,289		

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: FT= Fenois totais; TT = Taninos totais; DP = Desvio padrão

4.8.4 Precisão

Um método é preciso quando demonstra proximidade entre os resultados obtidos em diferentes circunstâncias, mas em condições experimentais iguais. A precisão do método foi avaliada através da repetitividade e da precisão intermediária. No ensaio de repetitividade a solução extrativa apresentou um teor médio de fenois totais de 6,642 $\mu\text{g/mL} \pm 0,858$ (12,91%) e taninos totais de 6,621 $\mu\text{g/mL} \pm 0,829$ (13,24%). Para o ensaio de precisão intermediária, os dados foram avaliados estatisticamente através de ANOVA *One-Way*, e os resultados demonstraram que o método é preciso quando as análises são realizadas por um único analista em dias diferentes e por analistas diferentes em um mesmo dia para fenois totais (Tabela 18) e para taninos totais (Tabela 19).

Tabela 18 - Análise da precisão intermediária para fenois totais

Parâmetros	FT $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$ (CV%) (1)	FT $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$ (2)	F tabelado	F calculado
Dias 1 e 2	7,169 \pm 0,708 (9,87%)	7,211 \pm 0,119 (1,65%)	5,317	1,222
Analistas 1 e 2	6,233 \pm 0,072 (1,16%)	6,151 \pm 0,103 (1,68%)	3,466	0,020

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: FT= Fenois totais; DP = Desvio padrão; CV= Coeficiente de variação

Tabela 19. Análise da precisão intermediária para taninos totais

Parâmetros	TT µg/mL ± DP (CV%) (1)	TT µg/mL ± DP (2)	F tabelado	F calculado
Dias 1 e 2	6,280 ± 0,113 (1,80%)	6,261 ± 0,829 (13,24%)	5,317	0,001
Analistas 1 e 2	5,695 ± 0,091 (1,59%)	5,858 ± 0,080 (1,37%)	7,708	5,467

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: TT= Taninos totais; DP = Desvio padrão; CV= Coeficiente de variação

4.8.5 Exatidão

A exatidão representa a capacidade do método de ser coerente entre o resultado obtido e o valor esperado. Obteve-se uma média percentual de recuperação de 99,07% para fenóis totais e de 100% para taninos totais, com confiança de 95% (Tabela 20 e 21). Estes dados confirmam que a taxa de recuperação do método está dentro das exigências sanitárias (de 80 a 120%), permitindo afirmar que se trata de um procedimento exato (BRASIL, 2017).

Tabela 20 - Teste de recuperação para fenóis totais

Solução extrativa + Ác.Tânico (µg/mL)	Valor teórico (fenóis totais µg/mL)	Valor real ± DP (fenóis totais µg/mL)	Recuperação %
4,8 µg/mL + 1	5,80	5,771±0,002	99,498
6,0 µg/mL + 1	7,00	6,967±0,005	99,534
7,2 µg/mL + 1	8,20	8,051±0,002	98,192

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: DP = Desvio padrão

Tabela 21 - Teste de recuperação para taninos totais

Solução extrativa + Ác.Tânico (µg/mL)	Valor teórico (taninos totais µg/mL)	Valor real ± DP (taninos totais µg/mL)	Recuperação %
4,20 µg/mL + 1	5,20	5,200±0,017	99,995
5,14 µg/mL + 1	6,14	6,150±0,019	100,16
6,05 µg/mL + 1	7,05	7,0510,019	100,01

Fonte: Dados da pesquisa; Legenda: DP = Desvio padrão

4.9 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO

4.9.1 Planejamento fatorial

Na Tabela 22 traz os valores de reposta obtidos no planejamento Box Behnken para otimização da extração de fenóis totais e taninos totais das folhas de *S. cumini*.

Tabela 22 - Fatores, níveis e resposta obtidos do planejamento Box-Behnken para otimização da extração de fenóis totais e taninos totais de das folhas de *S. cumini*

Amostra ^a	Fatores codificados ^b				Respostas	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Fenóis totais (mg/g)	Taninos totais (mg/g)
1	-1	-1	0	0	28,9523	25,3930
2	1	-1	0	0	57,8202	53,5398
3	-1	1	0	0	51,8741	48,8469
4	1	1	0	0	76,3192	68,7275
5	0	0	-1	-1	31,0562	24,6902
6	0	0	1	-1	56,8358	50,1279
7	0	0	-1	1	31,3865	27,3168
8	0	0	1	1	30,4087	25,7978
9	0	0	0	0	63,3809	58,0808
10	-1	0	0	-1	39,5953	36,1469
11	1	0	0	-1	53,6872	48,6968
12	-1	0	0	1	12,2060	9,57010
13	1	0	0	1	42,8798	38,7276
14	0	-1	-1	0	31,5194	27,8737
15	0	1	-1	0	35,0371	8,39150
16	0	-1	1	0	48,6883	45,2234
17	0	1	1	0	65,3020	60,8490
18	0	0	0	0	55,1706	53,7903
19	-1	0	-1	0	32,5047	30,8097
20	1	0	-1	0	35,2996	18,5142
21	-1	0	1	0	10,2922	10,3011
22	1	0	1	0	45,3859	45,3293
23	0	-1	0	-1	50,7380	50,5696
24	0	1	0	-1	59,8093	59,8121
25	0	-1	0	1	24,4435	24,4353
26	0	1	0	1	38,5407	38,5734
27	0	0	0	0	58,2157	58,2277

^a Os experimentos foram efetivamente misturados e realizados de maneira aleatória

^b Fatores reais e suas unidades encontram-se na Tabela 1.

Fonte: Dados da pesquisa

É possível observar que a condição da amostra 4 ($X_1 = +1$, $X_2 = +1$, $X_3 = 0$, $X_4 = 0$) resultou no maior valor absoluto de recuperação de fenóis totais (76,32 mg/g) e taninos totais (68,73 mg/g). Esta condição representa os maiores valores testados de tempo (10 min) e potência (300 w) e médios de proporção droga/solvente (1/25 g/mL) e etanol/água (50/50). A condição da amostra 17 ($X_1 = 0$, $X_2 = +1$, $X_3 = 1$, $X_4 = 0$) foi a segunda melhor para ambos os grupos de metabólitos, obtendo valores de 65,30 e 60,85 mg/g de fenóis totais e taninos totais, respectivamente. As piores condições foram as das amostras 12 ($X_1 = -1$, $X_2 = 0$, $X_3 = 0$, $X_4 = 1$) e 21 ($X_1 = -1$, $X_2 = 0$, $X_3 = 1$, $X_4 = 0$), sendo ambas executadas com menor tempo de extração (1 min) e potência média (150 w). Estes resultados estão em concordância com

trabalhos anteriores que avaliaram condições semelhantes (MEDOUNI-ADRAR et al., 2015; RHAZI et al., 2015)

Os sinais e efeitos dos coeficientes foram avaliados por mínimos quadrados, onde foi possível concluir uma significância (nível de 95%) de todos os fatores nos níveis testados para ambos os metabólitos (Tabela 23). Adicionalmente, a ANOVA estimou uma falta de ajuste não significativa, indicando que o modelo proposto foi adequado para o estudo. O coeficiente de determinação (R^2) variou entre 0,86 para fenóis totais e 0,85 para taninos totais, indicando uma forte correlação entre os fatores independentes e as respostas.

O efeito positivo mais relevante foi o tempo de extração (X_1), com maiores recuperações dos metabólitos sendo atingidas em maior tempo. É bastante frequente que o tempo de extração melhore a recuperação de analitos, geralmente havendo limites onde há exaustão ou perda por degradação (DAHMOUNE et al., 2015). Valores superiores aos testados não foram avaliados por limitações da técnica, onde há bastante perda do solvente extrator devido à evaporação.

A potência do micro-ondas (X_2) mostrou ser relevante para maior concentração de metabólitos, sendo a maior potência associada de maneira linear com maiores recuperações. De maneira semelhante ao tempo, potências maiores não foram testadas pela evaporação de solvente, além da limitação do equipamento. Ainda, é provável que uma maior potência pudesse reduzir o tempo necessário para recuperar os metabólitos.

A proporção droga/solvente foi revelada como fator positivo, sendo os melhores resultados obtidos quando houve mais solvente em relação à massa de droga (40 mL/g). Isto pode estar associado ao gradiente entre os analitos e líquido extrator, que costuma auxiliar no processo de extração (TSUKUI; REZENDE, 2014; CAMEL, 2000). Efeitos de segunda ordem significativos foram observados quando houve a combinação de maior proporção droga/solvente e maior tempo, potência ou proporção etanol/água na extração de taninos totais (Y_2). Considerando a maior quantidade de líquido extrator, é esperado que haja necessidade, também, de maior tempo e potência para que ocorra a irradiação. Já a proporção etanol/água foi negativa ao combinar-se com maior proporção droga/solvente, indicando que a maior quantidade de etanol foi desfavorável para a extração. Ainda, ao comparar o efeito da combinação entre X_3 e X_4 , observa-se que o valor do coeficiente é menor que X_4 (L) isolado, sendo possível afirmar que o etanol, em maior volume (em maior proporção droga/solvente), teve seu efeito negativo reduzido.

A proporção de etanol/água no solvente extrator teve comportamentos distintos no modelo linear e quadrático. De maneira linear, o aumento de etanol acima de 50% causou

redução na extração dos metabólitos, sendo a proporção 50/50 a que produziu os melhores resultados de recuperação. Entretanto, ao considerar a diferença no sinal do coeficiente, notou-se que valores dentro do intervalo dos níveis testados poderiam produzir resultados positivos, sendo esta condição expandida na próxima sessão.

Tabela 23 - Efeitos estimados por regressão de mínimos quadrados e ANOVA do planejamento experimental Box-Behnken. Valores significativos ($p < 0,05$) estão marcados em negrito

Fatores	Coeficientes	
	(Y ₁) Fenóis totais (mg/g)	(Y ₂) Taninos totais (mg/g)
Intercepto	35,39154	29,89255
(X₁) Tempo (min)	11,33061	9,37228
(X₁) Tempo (min)	4,94169	5,30938
(X₂) Potência (w) (L)	7,06006	4,84714
(X ₂) Potência (w) (Q)	-0,19753	0,45735
(X ₃) Proporção D/S	5,00912	8,33603
(X₃) Proporção D/S	7,01044	9,02052
(X₄) Proporção A/E	-9,32137	-8,80187
(X₄) Proporção A/E	5,89353	5,31803
X ₁ (L) × X ₂ (L)	-1,10572	-2,06654
X ₁ (L) × X ₃ (L)	8,07468	11,83094
X ₁ (L) × X ₄ (L)	4,14548	4,15190
X ₂ (L) × X ₃ (L)	3,27400	8,77698
X ₂ (L) × X ₄ (L)	1,25650	1,22392
X ₃ (L) × X ₄ (L)	-6,68935	-6,73917
ANOVA		
Erro puro	34,454	12,707
Falta de ajuste	892,253	1127,539
R²	0,86327	0,85082

Fonte: Dados da pesquisa

Retirando os efeitos não significativos no intervalo de confiança, a equação estimada pelo modelo para a quantificação de fenóis totais (Eq. 1) e taninos totais (Eq. 2) segue:

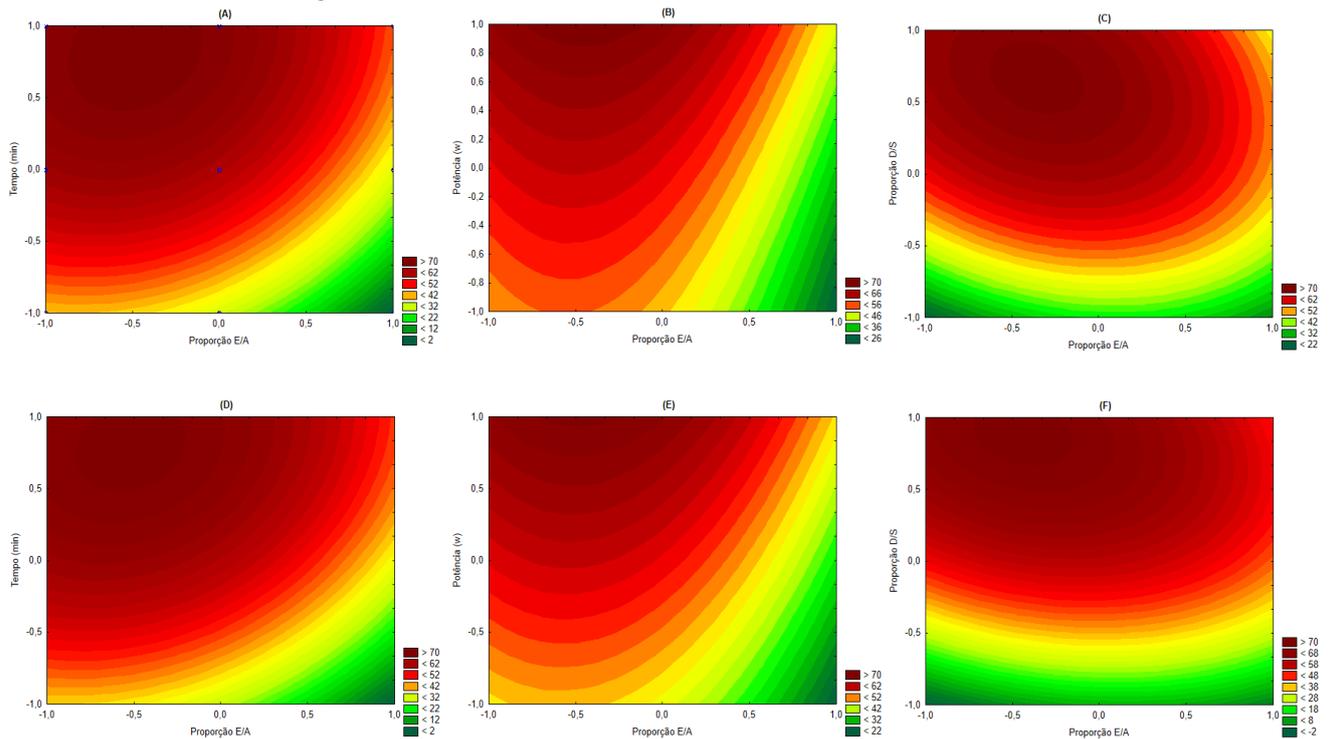
$$Y_1 = 35,39 + 11,33X_1 + 7,06X_2 - 9,32X_4 + 4,94X_1^2 + 7,01X_3^2 + 5,89X_4^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = 29,89 + 9,37X_1 + 4,85X_2 - 8,34X_3 - 8,80X_4 + 11,83X_1X_3 + 8,78X_2X_3 - 6,74X_4X_3 + 5,31X_1^2 + 9,02X_3^2 + 5,32X_4^2 \quad (2)$$

4.9.1.1 Superfície de resposta e função desejabilidade

Particularmente, a proporção de etanol/água como solvente extrator (X_3) demonstrou significância quadrática positiva, porém linear negativa, para as duas respostas. Isto significa que os valores extremos (-1, +1) produziram recuperações inferiores às condições com ponto central (0). Desta forma, superfícies de resposta foram investigadas em forma de gráficos de contorno para estimar a melhor condição dentro do intervalo testado em períodos de 0,5 níveis para as variáveis independentes, fixando a proporção etanol/água em função dos outros fatores independentes (Figura 20). Pode ser observado que o nível -0,5 de proporção etanol/água têm os maiores valores preditos pelo modelo, ao fixar as os outros fatores no máximo. Este nível representa uma proporção de 35/65 etanol/água.

Figura 20 - Contornos das superfícies de respostas obtidos para fenóis totais (A, B e C) e taninos totais (D, E e F). Fatores ausentes em cada gráfico encontram-se no nível +1.



Fonte: Autor

Em adição, considerando o desenho experimental Box-Behnken de 4 fatores com 27 experimentos, restam condições não testadas no intervalo estabelecido pelos níveis em todas as combinações possíveis para o desenho completo. No planejamento inicial, a condição que combina maior tempo, potência e proporção D/S (todos fatores positivos de maneira linear) não foi testada. Ao cruzar X_1 , X_2 e X_3 no nível +1 e X_4 no -0,5, a função desejabilidade

estimou melhores respostas para fenóis e taninos totais (Tabela 24). A estimativa dos valores conduziu ao experimento complementar nestes parâmetros de extração para tentar melhores resultados de metabólitos no extrato, o que de fato conduziu a resultado superior aos testados no planejamento inicial (Tabela 1). Esta foi a condição adotada para o método extrativo final, não havendo investigação posterior, uma vez que o grupo de pesquisa considerou os resultados satisfatórios.

Tabela 24 - Valores estimados pela função desejabilidade e observados experimentalmente na condição de X1, X2, X3 = +1 e X4 = -0,5

		Fenóis totais	Taninos totais
		(mg/g)	(mg/g)
Função	Predito	73,3958	70,6456
desejabilidade	+95% IC	85,6395	83,9338
	-95% IC	61,1520	57,3572
	Observado		
	1	85,2824	77,8440
(n=3)	2	87,9873	80,2108
	3	88,8325	80,9997
	Média	87,3674	79,6848
	DP	1,8545	1,6423
	D.P.R. (%)	2,1226	2,0610

Fonte: Dados da pesquisa

4.10 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO OTIMIZADO DE *S. CUMINI*

A partir do processo de secagem por liofilização da solução extrativa otimizada de *S. cumini* foi possível obter extrato seco com rendimento de secagem aproximado de 27,13%.

4.10.1 Descrição macroscópica

O extrato seco de *S. cumini* apresentou-se visualmente como pó marrom claro, com aspecto opaco e odor característico (Figura 21). Além disso, apesar de ser leve, não possui fácil aglomeração evidenciando pouca higroscopicidade.

Figura 21 - Imagem macroscópica do extrato seco de *S. cumini*



Fonte: Autor

4.10.2 Determinação de pH do extrato seco otimizado de *S. cumini*

O pH do extrato seco de *S. cumini* disperso em água foi $4,98 \pm 0,03$.

4.10.3 Determinação da área superficial específica e porosidade do extrato seco

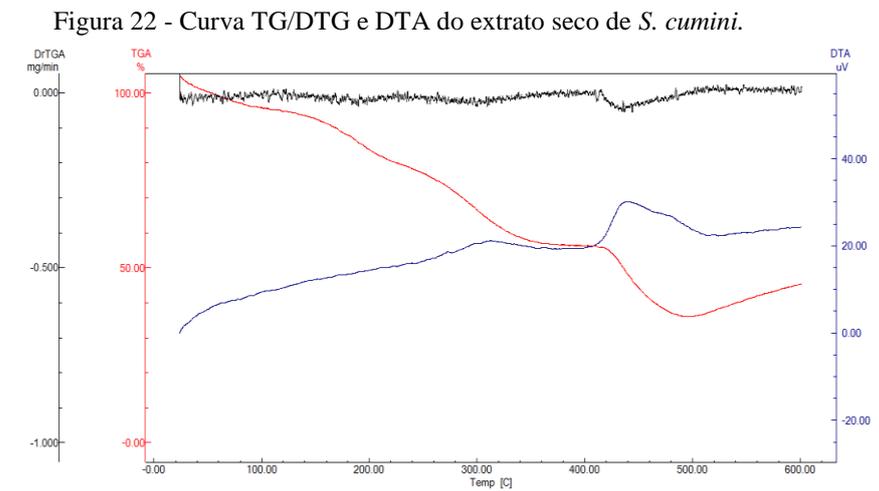
A determinação da área superficial específica, tamanho e volume de poros é bastante relevante para caracterização física dos materiais particulados (SANTANA et al., 2012). Na indústria farmacêutica, por exemplo, o controle da área figura superficial de fármacos é importante para obtenção de misturas homogêneas de grânulos e pós, assim como para obtenção das propriedades de fluxo necessárias para produção de cápsulas e comprimidos (SILVA, 2010). Por sua vez, a porosidade também exerce um grande efeito nas propriedades mecânicas dos materiais particulados (resistência à tensão, dureza e deformação); assim como influencia as suas características de dissolução e capacidade de retenção de água (SANTANA et al., 2012).

Levando em consideração a classificação dos poros da IUPAC [microporos ($< 20 \text{ \AA}$), mesoporos (entre 20 \AA e 500 \AA) e macroporos ($> 500 \text{ \AA}$)] (SANTANA et al., 2012), os resultados obtidos neste estudo para o extrato seco de *S. cumini* demonstram que o produto analisado possui mesoporos, com área superficial definida de $4,1808 \text{ m}^2/\text{g}$; volume e tamanho de poro de $0,01228 \text{ cm}^3/\text{g}$ e $270,076 \text{ \AA}$, respectivamente. Os valores entram em consonância com os resultados obtidos na investigação das propriedades reológicas, sugerindo que não há necessidade da adição de adjuvantes que promovam o incremento da área superficial.

4.10.4 Caracterização térmica

Na Figura 22, pode-se observar que as curvas TG/DTG e DTA demonstraram perda de massa constante de 42,387% até 350 °C. Houve presença de um evento de perda de massa equivalente a 17,695% entre 413,78 °C a 523,29 °C e um evento exotérmico na faixa de temperatura de 410,42 °C a 447,70 °C, corroborando com a mesma faixa da perda de massa evidenciando formação de material carbonáceo. O percentual de perda de massa total foi de 73,15% até a temperatura final de 600 °C.

Embora não tenha ocorrido pico de degradação até 350 °C os resultados evidenciam a necessidade do controle de temperatura acima de 100 °C para evitar possíveis degradações dos metabólitos secundários no processamento do extrato seco vegetal.



Fonte: Autor; Legenda: Preto: DTG; Azul: DTA; vermelho: TG

4.10.5 Determinação de fenois totais e taninos totais

O teor de fenois totais foi de $14,20 \pm 0,36$ mg/g de extrato seco e de taninos totais $12,89 \pm 0,43$ mg/g de extrato seco de *S. cumini* determinado pelo método de Folin-Ciocalteu descrito no item 4.6.

4.10.6 Avaliação das propriedades de compactação, ângulo de repouso e tempo de escoamento.

O extrato seco de *S. cumini* apresentou capacidade de compactação de 5 mL, indicando que o mesmo encontra-se adequado para manipulação de formas sólidas. Isto

porque valores acima de 20 mL dificultam enchimento de câmaras ou de cápsulas. Os índices, FH e IC, avaliados a partir da d_{AP} e d_{CP} (Tabela 25) demonstraram as deficientes propriedades reológicas do extrato seco. Pois o índice de Carr exprime em forma percentual a capacidade de compactabilidade e compressibilidade, valores superiores a 25% é considerado ruim, enquanto um índice inferior a 15% é excelente. Já para o Fator de Hausner, valores menores que 1,25 indicam bom fluxo; valores maiores que 1,5 indicam fluxo ruim; e valores entre 1,25 e 1,5 exigem a adição de lubrificantes para melhorar o escoamento (ALVES et al., 2008).

Tabela 25 - Propriedade de compactação do extrato seco de *S. cumini*

Propriedade	Média
Densidade aparente	0,051 g/ mL
Densidade compactada	0,097 g/mL
Fator de Hausner (FH)	1,88
Índice de Carr (IC)	46,96 %

Fonte: Dados da pesquisa

É importante destacar que estes índices são determinações pontuais, exprimindo apenas o potencial de compactação/compressão, e não a facilidade ou velocidade com que estas ocorrem. Para este tipo de avaliação, analisamos o ângulo de repouso e o tempo de escoamento. O ângulo de repouso é um parâmetro que tem como finalidade avaliar a dificuldade que um pó tem para fluir livremente através de um orifício para uma superfície livre (ALVES et al., 2008). O resultado encontrado para a tangente entre altura e raio formado pelo escoamento do pó formou um ângulo de $1,01^{\circ} \pm 0,04$, com tempo de escoamento 1,10 segundos. Estes valores indicam que o extrato apresenta boa propriedade de fluxo para desenvolvimento farmacotécnico. Pois, considera-se que um pó tem boas propriedades de escoamento quando possui ângulo de repouso igual ou inferior a 30° . (ALVES et al., 2008).

4.11 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *S. CUMINI*.

Os resultados das análises indicaram que todas as cepas testadas foram sensíveis ao extrato seco padronizado de *S. cumini*, tanto as leveduras quanto os dermatófitos (Tabela 26). Os resultados para CIM e CFM foram iguais, pois a mesma dosagem que inibiu o crescimento

dos fungos também os matou. No estudo foi possível obter resultados exatos da CIM e CFM, com excessão da *Candida tropicalis* que o resultado foi $\leq 10 \mu\text{g/mL}$.

Pouco é descrito na literatura sobre atividade antifúngica do extrato seco de *S. cumini* e na maioria deles é utilizado *candida albicans* para as realizações dos testes, embora outras espécies desse mesmo gênero e de gêneros diferentes também estejam entre as principais espécies patogênicas do Brasil, tais como: *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* (ALMEIDA, 2003). E também há *Candida haemulonii*, que é um agente patogênico emergente resistente a múltiplos fármacos, classificada como forte produtora de biofilme, um importante fator de virulência, que representa uma das causas de infecções graves, uma vez que tem sido verificada sua habilidade de resistir às defesas do sistema imune do hospedeiro e aumento da resistência antifúngica (BEM- AMI et. al., 2017). Diante disso, foram utilizadas essas cepas para os testes de sensibilidade antifúngica neste trabalho.

Aligiannis et al. (2001) sugerem uma classificação de Concentração Inibitória Mínima: CIM até $500 \mu\text{g/mL}$ são inibidores potentes; CIM entre 600 e $1500 \mu\text{g/mL}$ são inibidores moderados; CIM acima de $1600 \mu\text{g/mL}$ são inibidores fracos. Por isso, pode-se considerar que o extrato seco *S. cumini* apresentou-se como um forte inibidor de crescimento frente todas às espécies testadas, inclusive para a *Candida haemulonii*, pois os valor da CIM foram entre $1,25 \mu\text{g/mL}$ a $10 \mu\text{g/mL}$.

Xavier (2015) avaliou a atividade antifúngica das folhas de *S. cumini* frente à *Candida albicans*, utilizando um extrato etanólico 40% liofilizado, obtendo um resultado de CIM e CFM de $62,5 \mu\text{g/mL}$. Oliveira (2007) também testou a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico das folhas de jambolão frente à mesma espécie através da técnica de microdiluição em meio a Agar sólido (disco e poços), os resultados de CIM variaram entre 70 a $200 \mu\text{g/mL}$.

Os resultados dos estudos citados mostraram-se muito maiores do que os apresentados neste trabalho, enfatizando a eficácia do extrato seco padronizado a base de *S.cumini*, objetivando no futuro, o desenvolvimento de um fitoterápico adjuvante ao tratamento de infecções causada por fungos do gênero *Candida* e *Trichophyton*.

Adicionalmente, na Tabela 27, está exposta a diferença de concentrações CIM e CFM do EHE (extrato hidroetanólico) e EHEO (extrato hidroetanólico otimizado) das folhas de jambolão desenvolvidos neste trabalho frente aos isolados de *Candida*, no qual a CIM para o EHE e para o EHEO foi de $1024 \mu\text{g/mL}$ e $1,25 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, para *C. parapsilosis* mostrando um aumento de $819,2x$ na potencia da atividade biológica do extrato. Dessa

maneira fica evidente a importância da otimização do método extrativo em relação à atividade biológica.

Tabela 26 - Atividade antifúngica do extrato padronizado de *S. cumini*

	Espécies isoladas	CIM /CFM (µg/mL)		CIMs (µg/mL)	
		Extrato	Anidula	Caspo	Mica
M.A.A.F. 9415	<i>Candida glabrata</i>	1,25 /1,25	I. 0,25	S.0,031	S.0,031
473	<i>Candida haemulonii</i>	1,25/1,25	S<0,031	S<0,031	S<0,031
M.M.S. 7985	<i>Candida albicans</i>	1,25/1,25	S.0,031	S.0,031	S.0,031
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>	1,25/1,25	S.1	S.1	S.0,5
L.S.F. 5034	<i>Candida tropicalis</i>	≤ 10/≤ 10	R.8	R.1	R.4
6272	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	5,0/5,0	ND	ND	ND
5413	<i>Trichophyton rubrum</i>	1,25/1,25	ND	ND	ND

Concentração inibitória mínima CIM; concentração bactericida mínima CBM; American Type Culture Collection ATCC; Extrato *syzygium cumini*; I: intermediário; S: sensível; R: resistente; Critério de interpretação CIM: CLSI, 2012; Dados da pesquisa.

Tabela 27 - Sensibilidade antifúngica dos extratos secos vegetais com e sem otimização obtidos de *S. cumini* frente a isolados clínicos de *Candida*

Isolado fúngico	EHE (µg/mL)	EHEO (µg/mL)
<i>Candida albicans</i>	512	1,25
<i>C. glabrata</i>	128	1,25
<i>C. parapsilosis</i>	1024	1,25
<i>C. tropicalis</i>	512	≤ 10 µg/mL

Fonte: Dados da pesquisa

4.12 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *S. CUMINI*.

Vários são os estudos usando *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, devido o surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos. *E.faecalis* é uma bactéria Gram-positiva, oportunista, representando a segunda maior causa de infecções hospitalares a nível mundial. (BARROS, 2014).

Até o presente momento, oito tipos de resistência adquirida aos glicopeptídeos foram relatados com base em critérios fenotípicos e genotípicos (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG,

VanL, VanM e VanN). Os tipos VanA e VanB são os mais frequentemente detectados nos *enterococos* e raramente o operon vanA também tem sido detectado em *S. aureus* (KRCMÉRY, 2000). Isolados VanA e VanB positivos apresentam altos níveis resistentes indutíveis à vancomicina (CIM > 64 µg/mL e ≥16-32 µg/mL, respectivamente). Para a detecção da resistência em *S. aureus* cepas apresentam resistência à oxacilina, com concentração inibitória mínima (CIM) entre 4 e 32 µg/mL (BOYCE, 2003; RIBEIRO et al., 2005).

No presente estudo a leitura da CIM foi a menor concentração de antibiótico na qual não se observou visualmente o crescimento bacteriano. Os critérios de suscetibilidade e resistência adotados para cada antimicrobiano foram os recomendados pelo CLSI (2015).

De acordo com a Tabela 28 Todos os isolados de *E. faecalis* são bastante resistentes a vancomicina, exceto o ATCC 27212 no qual é um padrão sensível a esse fármaco. O extrato se mostrou sensível a todas as cepas, inclusive para o padrão positivo com CIM 640 µg/mL menor que o observado para o fármaco comercial. As CIM e CBM variaram entre 80 a 640 µg/mL e 160 a 1280 µg/mL, respectivamente. Resaltando o resultado para a cepa LFBM 918, no qual o extrato foi mais potente que a vancomicina.

Para os *Staphylococcus aureus*, o extrato também se mostrou sensível para todas as cepas, com CIM e CBM entre 160 a 320 µg/mL e 640 a 1280 µg/mL, respectivamente. Para os isolados LFBM OXA 1 e LFBM 16, a CIM do extrato foi de 160 µg/mL sendo inferior ao da oxacilina. Os resultados de CIM e CBM do extrato foram iguais para as cepas padrões sensíveis e resistentes ao fármaco comercial, evidenciando que as bactérias não possuem resistência aos componentes do extrato.

Poucas são as pesquisas realizadas com extrato seco de *S. cumini* para avaliação de sensibilidade bacteriana. Alguns trabalhos realizados com essa espécie corroboram com os resultados deste estudo. Loguercio et al. (2005) mostrou a atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico (etanol 70% na proporção de 10% m.v⁻¹) e folhas de *Syzygium cumini* sobre 17 isolados bacterianos, entre eles *Staphylococcus aureus*, concluindo também que não houve diferença de sensibilidade entre microorganismos Gram positivos e Gram negativos.

Albuquerque, Soares e Oliveira (2017) analisaram a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico das folhas do jambolão, verificada a partir do teste de difusão em Ágar Mueller-Hinton. Os resultados demonstraram ação contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* na concentração de 100 mg/mL.

Os resultados deste trabalho mostram o potencial do extrato hidroalcoólico liofilizado e otimizado das folhas de *S. cumini* de se tornar um fitoterápico para tratamento de infecções causadas por *E. faecalis* e *S. aureus* resistentes.

Tabela 28 - Atividade antibacteriana do extrato padronizado de *S. cumini*

MICRO-ORGANISMOS	CIM/CBM ($\mu\text{g/mL}$)		
	EXTRATO	OXACILINA*	VANCOMICINA*
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	640/ \geq 1280	ND	1024/ \geq 1024
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 27212	160/320	ND	4/8
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 918	80/160	ND	128/256
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM189	160/1280	ND	128/256
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 335	160/1280	ND	512/1024
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 421	160/1280	ND	128/256
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 240	160/1280	ND	128/256
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM OXA 1	160/640	256/ \geq 256	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 16	160/640	256/ \geq 256	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 17	320/1280	0,25/1,0	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 31	320/1280	16/16	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 18	160/640	128 / 256	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	160/640	0,125 / 0,25	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 335921	160/640	64/128	ND

Concentração inibitória mínima CIM; concentração bactericida mínima CBM; American Type Culture Collection ATCC; Extrato *syzygium cumini*; Critério de interpretação CIM: Oxacilina (\geq 4,0 Resistente) para *S. aureus*. Vancomicina \geq 32 Resistente) para *Enterococcus faecalis*. Fonte: CLSI, 2015; Dados da pesquisa.

- Valores previamente determinados.

4.13 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE *IN VIVO* DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *S. CUMINI*

Vários estudos empregam com sucesso modelos em invertebrados para examinar respostas imunológicas a agentes patogênicos, uma vez que, sistemas imunes são fundamentais para proporcionar resistência a parasitas e patógenos. Os invertebrados não possuem imunidade adquirida, apesar do fato de eles também enfrentarem maiores riscos de

reinfecção após a exposição primária. No entanto, quando submetidos a insulto imunológico, os insetos podem produzir respostas imunes que persistem durante longo prazo para fornecer profilaxia. Eles também não possuem imunidade específica (baseada em antígenos e anticorpos), mas fornecem uma resposta geral em relação a todo o material reconhecido como corpo-estranho (PRAJSNAR et. al, 2012; RATCLIFFE et al., 1985)

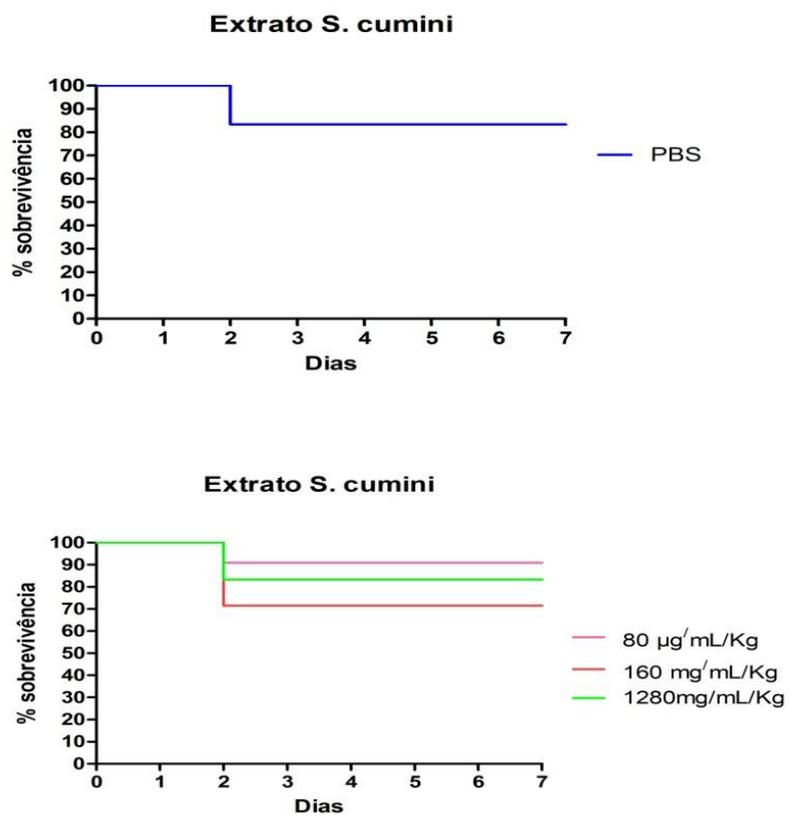
O extrato seco otimizado de *S. cumini* não se mostrou tóxico em nenhuma das concentrações testadas, uma vez que a maior concentração (1280 mg/kg) não causou morte significativa quando comparado com o controle, não sendo possível identificar a dose letal para 50% dos indivíduos (IC₅₀).

Nas primeiras 24h após a administração do extrato houve sobrevivência de 100% dos indivíduos testados. As mortes ocorreram após 48h da administração, ocasionando letalidade em 6%, 3,33%, 13,33%, 6% nos grupos controle, 80µg/mL/Kg , 160 mg/mL/Kg e 1280 mg/mL/Kg, respectivamente. A partir de 72h não houveram mais mortes em nenhum dos grupos, totalizando sobrevivência de 94%, 96,67%, 86,67, 94% dos indivíduos do grupos controle, 80µg/mL/Kg , 160 mg/mL/Kg e 1280 mg/mL/Kg, respectivamente (Figura 23).

A dose de 160 mg/mL/Kg foi mais tóxica que a maior dosagem, sugerindo que o extrato pode não ser dose-dependente. Também foi observado mudança de cor em algumas larvas, que indicam depósito de pró-fenoloxidasas, que desempenham um papel importante sobre o sistema imunológico da larva, as quais são enzimas importantes para a síntese de melanina que normalmente é depositada sobre os patógenos para formar encapsulados (VEGA et al., 2012)

Alguns estudos usando o mesmo modelo *in vivo* para avaliar a toxicidade de compostos naturais já foram realizados. O ministério da saúde (2014) avaliou a toxicidade aguda por via inalatória, do óleo essencial das folhas de *Lippia sidoides* (OE) e de alguns constituintes isolados, como timol, carvacrol e 1,8 cineol na espécie *Tenebrio molitor* (bicho da farinha). Após 24 h o óleo essencial foi letal na concentração de 8,04 µL/L e as substâncias isoladas se mostraram mais tóxicas que o OE. Silva, Navarro e Oliveira (2011) estudaram o efeito tóxico do composto antibiótico Lemicina e observaram que nas concentrações de 0.01 µg/larva e 0.1 µg/larva não apresentaram toxicidade para as larvas *Tenebrio molitor*, já em concentrações maiores a 2 µg/larva obteve toxicidade maior de 50% (CC50).

Os resultados deste trabalho foram promissores no teste de toxicidade *in vivo*. Além de apresentar um avanço pré-clínico na escolha do animal invertebrado, mostrando eficiência na avaliação tóxica do extrato.

Figura 23 - Avaliação da toxicidade do extrato seco padronizado de *S. cumini* em larvas *Tenébrio molitor*.

Fonte: Autor

5 CONCLUSÃO

A atividade antifúngica comprovada no estudo corrobora para a utilização deste material vegetal na medicina popular, além de fornecer apoio às iniciativas do Estado Brasileiro no sentido de fortalecimento do SUS, por meio da ampliação do quantitativo de fitoterápicos que atualmente são financiados pelo governo federal. Em virtude da necessidade de alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças causadas por micro-organismos *S. cumini* é uma espécie vegetal com grande potencial de escolha.

Os resultados obtidos na caracterização do pó de *S. cumini* demonstraram que a droga vegetal cumpriu os parâmetros de qualidade preconizados na Farmacopéia Brasileira 5ª edição. Ademais, a prospecção fitoquímica demonstrou que as folhas de *S. cumini* possuem uma rica composição de metabólitos secundários e atrelado a isso, verificou-se que taninos sofrem variação sazonal, apresentando-se em maior proporção nas épocas em que os índices pluviométricos encontram-se mais elevados.

Foi escolhido como solvente extrator etanol:água (1:1, v/v), pois foi o que apresentou a melhor reposta antifúngica frente a todas as cepas analisadas. A técnica de extração por micro-ondas mostrou-se mais eficiente para obtenção de taninos totais, quando comparada à técnica convencional, além de necessitar de menos solvente e tempo para realização das extrações. Outrossim, a metodologia analítica desenvolvida foi validada de acordo com a RDC 166/2017 e permitiu no mesmo método o doseamento de fenóis e taninos totais e utilização de menor quantidade de reagentes com um menor intervalo de tempo, possibilitando leituras mais rápidas e limpas, além de apresentar melhor viabilidade econômica.

Em relação à avaliação da estabilidade os resultados foram bastante positivos, pois verificou-se que a curva de calibração permanece estável mesmo 4 horas após a sua obtenção e dessa forma garante que os fenóis totais sejam complexados de maneira efetiva para o doseamento correto dos taninos totais. Além disso, foi verificado que as soluções reagentes utilizadas no estudo permaneceram estáveis até 49º dia após sua obtenção, proporcionando então economia para realização dos estudos.

Os resultados da avaliação da estabilidade dos extratos em temperatura ambiente e sob refrigeração demonstraram que estes se desestabilizam rápido necessitando assim, serem obtidos e analisados no menor espaço possível de tempo a fim de obter resultados fidedignos.

O planejamento fatorial mostrou que o efeito positivo mais relevante foi o tempo de extração, com maiores recuperações dos metabólitos sendo atingidas em maior tempo, além

de fornecer um aumento em 53,43% na extração de taninos totais. A caracterização do extrato seco revelou que o liofilo apresenta-se como pó marrom claro, com aspecto opaco e odor característico, leve, de difícil aglomeração e de pH levemente ácido. Possui mesoporos, com área superficial definida de 4,1808 m²/g; volume e tamanho de poro de 0,01228 cm³/g e 270,076 Å, respectivamente. O TG/DTG/DTA mostrou estabilidade do extrato, sendo necessário altas temperatura para causar degradação no mesmo.

Sobre a reologia, o liofilo não possui boa capacidade de compactação, entretanto possui boa propriedade de escoamento. Na atividade biológica, o extrato foi sensível para todas as sete cepas testada em fungos, tanto leveduras quanto para dermatófitos. Também obteve excelentes resultados como bactericida para *E. faecalis* e *S. aureus* resistentes, sendo mais potente que o fármaco comercial, além de apresentar baixa toxicidade.

Diante dos resultados apresentados, verifica-se o grande potencial da espécie vegetal *S. cumini* como possível fitoterápico em cápsula ou comprimido para tratamento de infecções sanguíneas causadas por fungos do gênero *Candida* e bactérias das espécies *Enterococcus aureus* e *Staphylococcus faecalis*.

REFERÊNCIAS

- ABALEA, V.; CILLARD, J.; DUBOS, M. P.; SERGENT, O.; CILLARD, P.; MOREL, I. Repair of iron induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte culture. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1457–1466, 1999.
- AKINS, R. A. An update on antifungal agents and mechanism of resistance in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 42, p. 285-318, 2005.
- ALBERTO, N, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L. V. S.; FRANCO, S. L.; LIMA, M. A. P. Caracterização farmacognóstica do jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 1, p. 37-50, 2001.
- ALBUQUERQUE, F. H. C., SOARES, K. S., OLIVEIRA, M. A. S. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos das folhas de espécies da família Myrtaceae frente à cepas de bactérias de interesse. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 16, n. 2. p. 139-145, 2017.
- ALGIANNIS, N., KALPOTZAKIS, E., NITAKU, S., CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.40. p.4168-4170, 2001.
- ALICE, C. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L.A.; SILVA, G. A. A. B.; JOSÉ, K. F. D. Plantas medicinais de uso popular – **Atlas Farmacognóstico**. Canoas: ULBRA. p.205, 1995.
- ALMEIDA, S. R. **Apostila De Micologia Clínica. Faculdade Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo** [online]. 2003. Disponível em: <<https://www.portalbrasil.net/downloads/micoses.pdf>>. Acesso em 06 jan. 2018.
- ALVES, M. M.; PEREIRA, M. A. S.; PEREIRA, O. S.; FRANÇA, S. C.; BERTONI, B. W. Caracterização química de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada. **Scientia Plena**, v. 7, p. 1-8, 2011.
- AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. S.; ARAÚJO, T. A. S; ALBUQUERQUE, U. P. A Simple and Accurate Procedure for the Determination of Tannin and Flavonoid Levels and Some Applications in Ethnobotany and Ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.
- ANVISA. **Bases Teóricas e Uso Clínico**. [online]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm. 2007>. Acesso em: 06 fev. 2018.
- ANVISA. **Uso Racional de Antimicrobianos e Resistência Microbiana**. [online]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo1/cen_aumento.htm. 2008>. Acesso em: 06 fev. 2018.
- ARMENTA, S., GARRIDES, S. DE LA GUARDIA, M. Green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 27. n.6. p. 497-511, 2008.

ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 838–844, 2011.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012.

BAMPOULI, A., KYRIAKOPOULOU, K., PAPAEFSTATHIOU, G., LOULI, V., ALIGIANNIS, N., KROKIDA, M., MAGOULAS, K. Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**. v.1, n.3, p.81-91, 2014.

BAPTISTA, M. G. F. M. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. Dissertação de mestrado (Ciências da Saúde). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. Lisboa, 2013.

BARROS, M. V. Infecções Nosocomiais por *Enterococcus faecalis*. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2014.

BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; AMARAL, F. M. M. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 631-37, 2006.

BHARGAVA, K. K.; DAYAL, R.; SESHADRI, T. R. Chemical components of *Eugenia jambolana* stem bark. **Current Science**, v. 43, p. 645-646, 1974.

BHATIA, I. S., BAJAJ, K. L. Chemical constituents of the seeds and bark of *Syzygium cumini*. **Planta Médica**, v. 28, p. 347-352, 1975.

BHATIA, I. S., SHARMA, S. K., BAJAJ, K. L. Esterase and galloyl carboxylase from *Eugenia jambolana* leaves. **Indian Journal Experimental Biology**, v. 12, p. 550-552, 1974.

BOUZA, E., MUÑOZ, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 87-91, 2008.

BOYCE, J. M. Update on resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Clinical Infectious Diseases**. v. 6. n. 2. p. 1-4, 2003.

BRASIL, Resolução da diretoria colegiada nº 166, de 24 de julho de 2017. (DOU nº141, de 25 de julho de 2017- **Guia para Validação de métodos analíticos** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2017.

BRASIL, Instrução normativa nº 4, de 18 de junho de 2014 - **Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico** – ANVISA, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia brasileira. 5. ed.** Brasília, Distrito Federal: ANVISA, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União. Brasília. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. p.773. 2016.

BRASIL. **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente**. [online]. Disponível em: <<http://www.paho.org/bra/index.php?option=comcontent&view=article&id=5357:omspublica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid>>. Acesso em: 10 jan. 2018

BRASIL. **Para OMS, resistência de bactérias a antibióticos é 'ameaça global'**. 2014 [online]. Disponível em <http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2014/04/140430_resistencia_antibioticos_rb>. Acesso em: 21 jan. 2018.

BRITO, F. A.; LIMA, L. A.; RAMOS, M. F. S.; NAKAMURA, M. J.; CAVALHER-MACHADO, S. C.; SIANI, A. C. Estudo farmacológico da actividade anti-alérgica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels . **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 40, p. 105-115, 2007.

CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 19. p. 229-248, 2000.

CARTAXO, O. A. N. Estudos com *Syzygium cumini* (L.) Skeel: Caracterização da matéria-prima, perfil fitoquímico, citotoxicidade e atividade antimicrobiana sobre microorganismos associados ao biofilme dental. Dissertação de mestrado (Ciências da saúde) Programa de pós graduação em ciências farmacêuticas. Universidade estadual da Paraíba (UEPB), 2014.

CASTEJON, F. V. Taninos e Saponinas. Dissertação de mestrado (Medicina veterinária). Universidade Federal de Goiás, 2011.

CASTRO, A. H. F.; ALVARENGA, A. A.; SOARES, A. M.; YOUNG, M. C. M.; PURCINO, A. A. C. Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amoniase e dos teores de fenois e taninos totais em *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex. A. Juss.: uma espécie medicinal do cerrado. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**. v.7, n.3, p. 45-55, 2005.

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

CHATURVEDI, A.; KUMAR, M. M.; BHAWANI, G.; CHATURVEDI, H.; KUMAR, M.; GOEL, R. K. Effect of ethanolic extract of *Eugenia jambolana* seeds on gastric ulceration and secretion in rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 51, p. 131–140, 2007.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Document M100-S24. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement**. Wayne, PA, 2008.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Document M100-S24. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement**. Wayne, PA, 2015.

CRIADO, P. R.; OLIVEIRA, C. B.; DANTAS, K. C.; TAKIGUTI, F. A.; BENINI, L. V.; VASCONCELOS, C. Micoses superficiais e os elementos da resposta imune. **Revista Brasileira de Dermatologia**. V.86, n. 4, p: 726-31, 2011.

DAHMOUNE, F. NAYAK, B. MOUSSI, K., REMINI, H., MADANI, K. Optimization of microwave-assited extration of pholiphenois from *Myrtus communis* L. Leaves. **Food Chemistry**. v.166, p.585-595, 2015.

DAMASCENO, D. C.; LIMA, P. H. O.; GALHIANE, M. S.; VOLPATO , G. T.; RUDGE, M. V. C.. Avaliação do efeito hipoglicemiante da saponina extraída de sementes de *Eugenia jambolana* Lam. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, p. 46-54, 2002.

DICKE, M.; HILKER, M. Induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology. **Basic and Applied Ecology**, v. 4, p. 3-14, 2003.

DJIPA, C. D.; DELMEE, M.; QUETIN-LECLERCQ J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal Ethnopharmacology**, v. 71, p. 307–313, 2000.

ESPINEL-INGROFF, A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; IQBAL, N. Muticenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B and caspofungin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p.1811-1820, 2007.

FERREIRA, B. F. F.; RAGAZZINI, L. J.; ANDRADE, M. C. Investigação da Sensibilidade ao Fluconazol e Produção de Enzimas Hidrolíticas por *Candida* sp. Isoladas do Trato Respiratório de Pacientes Internados em um Hospital no Sul de Minas Gerais. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 2, p. 1-9, 2012.

FIGUEIREDO, C. B. M.; ALVES, L. D. S.; SILVA, C. C. A. R.; FERREIRA, P. A.; MARQUES, G. S.; SANTANA, A. S. C. O.; RANDAU, K. P.; PIMENTEL, R. M. M.; SILVA, R. M. F.; ROLIM – NETO, P. J. Physical-chemical Characterization, Anatomical and Seasonal Evaluation of *Thuja occidentalis*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, V. 5, N. 5, P. 1721-1731, 2014.

FIGUEIREDO, E. J. A. Uso De Antifúngicos em Terapia Intensiva - Estudo Prospectivo, Observacional E Multicêntrico. Dissertação de mestrado (Medicina). Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2008.

GONÇALVES, A. H. Mecanismo De Ação E Toxicidade Da Anfotericina B No Tratamento De Micoses. Trabalho para conclusão de curso de Especialização em Microbiologia – ICB Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2011.

GONÇALVES, A. L. Estudo da Atividade Antimicrobiana de Algumas Árvores Mediciniais Nativas com Potencial de Conservação/Recuperação de Florestas Tropicais. Tese de

doutorado (biociências). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro Estado de São Paulo, 2007.

GUIMARÃES, D. O., MOMESSO, L. S., PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas Para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p.667-679, 2010.

GUPTA, G. S.; SHARMA, D. P. Triterpenoid and other constituents of *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 13, p. 2013-2014, 1974.

HELFAND, W.H., COWEN, D.L. An illustrated history, Harry N. Abrams. **Pharmacy**. New York, 1990

HERNANDEZ, Y., LOBO, M. G., GONZALEZ, M. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. **Food Chemistry**. v.114, n.2, p.734-741, 2009.

JACKSON, B. D.; HOOKER, J. D. Index kewensis: an enumeration of the genera and species of flowering plants. Oxford: Clarendon Press. v.2, 1960.

JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S. *Syzygium cumini* (Jamun) reduz o dano de DNA induzido pela radiação nos linfócitos de sangue periférico humano cultivado: um estudo preliminar. **Toxicology Letters**, v. 132, p. 19-25, 2002.

JAIN, M. C.; SESHADRI, T. R. Anthocyanins of *Eugenia jambolana* fruits. **Indian Journal of Chemistry**, v. 3, p. 20-23, 1975.

KUMAR, A.; ILAVARASAN, R.; JAYACHANDRAN, T.; DEECARAMAN, M.; KUMAR, R. M.; ARAVINDAN, P. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* seed. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 941-943, 2008.

KUMAR, A.; PADMANABHAN, N.; KRISHANA, M. R. V. Central nervous system activity of *Syzygium cumini* seeds. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 6, p. 698-700, 2007.

KUMAR, E. K.; MASTAN, S. K.; REDDY, K. R.; REDDY, G. A.; RAGHUNANDAN, N.; CHAITANYA, G. Anti-arthritic property of methanolic extract of *Syzygium cumini* seeds. **International Journal of Integrative Biology**, v. 4, p. 55-61, 2008.

LIM, C. S. Y; ROSLI, R.; SEOW, H. F.; CHONG, P. P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 21-31, 2012.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. D. G.; MORAES, J. C.; CARVALHO, S. M.; RODRIGUES, V. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência e Agrotecnologia**. v.35 n.4. p. 664-671, 2011.

LOGUERCIO, A. P., BATTISTIN, A., VARGAS, A. C., HENZEL, A. H., WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**. v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

MACEDO, E. V.; GEMAL, A. L. A produção de fitomedicamentos e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 290-97, 2009.

MACHADO, J. A. C., OLIVEIRA, A. C. A., CANESINI, N. S., ROCHA, R., NEGRI, J. R. D. Quinolonas: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. ISSN: 1679-7353. v.7. n.12, 2009.

MACIEL, M. C. G.; FARIAS, J. C.; FRAZÃO, J. B.; MOMTCHILLO RUSSO, M.; GUERRA, R. N. M; NASCIMENTO, F. R. F. *Syzygium jambolanum* treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n.57, 2008.

MAHMOUD, I. I.; MARZOUK, M. S.; MOHARRAM, F. A.; EL-GINDI, M. R.; HASSAN, A. M. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolanaleaves*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 1239-1244, 2001.

MANZONI, P.; STOLFI, I.; PUGNI, L.; DECEMBRINO, L.; MAGNANI, C.; VETRANO, G. A multicenter, randomized trial of prophylactic fluconazole in preterm neonates. **New England Journal of Medicine**, v. 14, n. 24, p. 2483-2495, 2007.

MEDOUNI-ADRAR, S., BOULEKBACHE-MAKHLLOUFM L., CADOT, Y., MEDOUNI-HAROUNE, L. DAHMOUNE, F., MAKHOUKHE, A., MADANI, K. Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. **Industrial Crops and Products**, v.77, p.123-132, 2015.

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. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.

MENDES, C. A. C., BURDMANN, E. A. Polimixinas - revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**. p.55. n. 6. p.752-9, 2009.

MICHELIN, D. C., MORESCHI, P. E., LIMA, A. C., NASCIMENTO, G. G. F., PAGANELLI, M. O., CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, n.4, p. 316-320, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monografia da espécie *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta). Ação 20K5 (DAF/ SCTIE/ MS)/ 2012. Brasília, 2014.

MITRA, S. K., GOPUMADHAVAN, S., MURALIDHAR, T. S., ANTURLIKAR, S. D., SUJATHA, M. B. Efeito de D-400, uma preparação herbomineral no perfil lipídico, hemoglobina glicada e tolerância à glicose em diabetes induzida por estreptozotocina em ratos. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 33, p. 798-800, 1995.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, P. U.; ARAÚJO, L. E. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORTON, J. **Fruits of warm climates**. Miami: Julia Morton Winterville North Carolina; 1987, Miami págs. 375-378.

MUKHERJEE, P. K.; SAHA, K.; MURUGESAN, T.; MANDAL, S. C.; PAL, M.; SAHA, B. P. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 85–89, 1998.

NAIR, R. A. G., SUBRAMANIAN, S. S. Chemical examination of the flowers of *Eugenia jambolana*. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 21, n. B, p. 457-458, 1962.

NICOLETTI, M. A. Administração de medicamentos contendo drogas de origem vegetal e de plantas medicinais-importância da orientação correta para seu uso racional. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n.3, p. 264-271, 2009

NOGUEIRA, J. M. R. N., MIGUEL, L. F. S. **Bacteriologia**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2009. IN: Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. 221- 398 p.

OLIVEIRA, C. F., MOREY, A. T., GARBIN, R. P. B., PERUGINI, M. R. E., YAMAUCHI, L. M., OGATTA, S. F. Y. Emergência de *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos: um desafio contínuo. **Revista de Ciências Médicas de Biologia**. v. 13, n. 2, p. 242-247, 2014.

OLIVEIRA, C. S. Otimizando A Terapia Antifúngica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CONTROLE DE INFECÇÃO E EPIDEMIOLOGIA HOSPITALAR, 15, 2016, Belo Horizonte. **Resumos**. 9 a 12 de novembro.

OLIVEIRA, G. F., FURTADO, N. A. J. C., SILVA FILHO, A. A., MARTINS, C. H. G., BASTOS, J. K., CUNHA, W. R., SILVA, M. L. A. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38. n. 2, 2017.

OLIVEIRA, K. N. Síntese, Caracterização e Avaliação Biológica de Sulfonamidas e Sulfonilidrazonas. Dissertação de mestrado (Química). Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis, 2005.

OLIVEIRA, V. B., ZUCHETTO, M., OLIVEIRA, C. F., PAULA, C. S., DUARTE, A. F. S., MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clausura de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.18, n.1, p.230-239, 2016.

PALMEIRA, S. J. G. Micoses Sistêmicas. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas) Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, 2014.

PAPPA, W. P. M., ENDIMANI, A., TARACILA, M. A., BONOMO, R. A. Carbapenems: Past, Present and Future. **Antimicrobial Agents Chemother**. v.55. n. 11. p. 4943-4960. 2011.

PEDROSA, F. P. C. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Pertencentes a Cpma – Coleção De Plantas Medicinais e Aromáticas do Cpqba/Unicamp. Botucatu – SP. Monografia para conclusão de curso (Microbiologia). 2012. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2012.

PEPATO, M. T.; FOLGADO, V. B. B.; KETTELHUT, I. C.; BRUNETTI, I. L. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 389-95, 2001.

PEREIRA, J. V.; FREIRES, I. A.; CASTILHO, A. R.; DA CUNHA, M. G.; ALVES, H. S.; ROSALEN, P. L. Antifungal potential of *Sideroxylon obtusifolium* and *Syzygium cumini* and their mode of action against *Candida albicans*. **Pharmaceutical biology**, v.54, n.10, p. 2312-2319, 2016.

PEZZA, L., RIOS, A., NAZOL, L., ARCE, L., VALCÁRCEL, M. Determinação simultânea de resíduos de cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol em leite bovino por cromatografia eletrocínica micelar. **Química Nova**. v.29. n.5, 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3551-3557, 2002.

PFALLER, M. R.. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro. Elsevier. p. 817. 7ed, 2014.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF, 1984. v. 2, p. 429-430.

PITTOL, V. Solubilização de derivados azólicos utilizando saponinas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate): efeito na reversão da resistência antifúngica. IN: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 25, 2013. **Resumo**. Porto Alegre – RS, 2013.

PIZZALE, L.; BORTOLOMEAZZI R, V. I. C. H. I. S.; UBEREGGER, E. E.; CONTE, L. S. Atividade antioxidante de extratos de sálvia (*Salvia officinalis* e *S fruticosa*) e orégano (*Origanum onites* e *O indercedens*) relacionados ao seu conteúdo em compostos fenólicos . **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 1645-1651, 2002.

POONGUNRAN, J.; PERERA, H. K.; JAYASINGHE, L.; FERNANDO, T. I.; SIVAKANESAN, R.; ARAYA, H.; FUJIMOTO, Y. Bioassay-Guided Fractionation And Identification Of A-Amylase Inhibitors From *Syzygium Cumini* Leaves. **Pharmaceutical Biology**, V. 55, N. 1, P. 206-211, 2017

PRAJSNAR, T. K., HAMILTON, R., GARCIA-LARA, J., MCVICKER, G., WILLIAMS, A. A privileged intraphagocyte niche is responsible for disseminated infection of *Staphylococcus aureus* in a zebrafish model. **Cellular microbiology**. v.14. p.1600-1619, 2012.

RAJASEKARAN, M.; BAPNA, J. S.; LAKSHMANAN, S.; RAMCHANDRAN NAIR, A. G.; VELIATH, A. J.; PANCHANADAM, M. Antifertility effect in male rats of oleanolic

acid, a triterpene from *Eugenia jambolana* flowers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, n. 115–121, 1988.

RATCLILE, N. A., ROWLEY, A. F., FITZGERALD, S. W., RHODES, C. P. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent Advances. **International Review of Cytology**. v.97. p. 183-350, 1985.

RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Anti-hyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1433–1439, 2005.

RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. Protective effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 1212–1217, 2004.

REIS, L. C. A., BRANCO, A., SANTOS, C. T. Comparação dos métodos de extração usando ultrassom e microondas focalizado frente a avaliação da atividade antioxidante e anticolinesterásica de schinus terebinthifolius raddi. IN: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 21, 2017. **Resumo**. Bahia, 2017.

REKHA, N.; BALAJI, R.; DEECARAMAN, M, Effect of aqueous extract of *Syzygium cumini* pulp on anti-oxidant defense system in streptozotocin induced diabetic rats. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v. 7, n. 137–145, 2008.

RHAZI, N., HANNACHE, H., OUMAM, M., SESBOU, A., CHARRIER, B., PIZZI, A., CHARRIER-EL, F. B. Green extraction processo of tannins obtained from Moroccan Acacia mollissima barks by mirowave: Modeling and optimization of the process using the response surface methodology RSM. **Arabian Journal od Chemistry**, 2015.

REZENDE, C., SEGURA, R., RIVA, S. B. M., CASTRO, V. C. O. Mecanismos De Ação Dos Antifúngicos. **Revista unifev: ciência & tecnologia**. v.2. p.316, 2017.

RIBEIRO, A., DIAS, C., SILVA-CARVALHO, M. C., BERQUO, L., FERREIRA, F. A., SANTOS, R. N., FERREIRA-CARVALHO, B. T., FIGUEIREDO, A. M. First report of infection with community-acquired methicillinresistant Staphylococcus aureus in South America. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43. p.1985-8, 2005.

RODRIGUES, D. A., Marcos, J. T. C.; Mendonça, F. S. **Atlas de dermatologia em povos indígenas** [online]. São Paulo: Editora Unifesp, 2010. Doenças causadas por bactérias. ISBN 978-85-61673-68-0. Available from SciELO Books. 45-58 p.

RODRIGUES, K. A. D. F. R. Determinação das atividades anti-leishmania, citotóxica e de parâmetros de ativação de macrófagos dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia uniflora* L. e *Syzygium cumini* L skulls. 2013. 150 f. Dissertação de mestrado (ciências da saúde)- Programa de pós graduação em farmacologia. Universidade Federal do Piauí, 2013.

RODRIGUES, R. N. S., PIRES, M. C., GRUMACH, A. S. Macrolídeos tópicos: uma nova perspectiva para o tratamento da dermatite atópica. **Revista brasileira de alergologia e imunopatologia**. v. 27, n. 2, 2004.

ROIG, Y.; MESA, J. T. Plantas medicinais aromáticas e venenosas de Cuba. Havana: Cultural.p. 872, 1945.

ROSS, I. A. “Medicinal Plants of the World: Chemical constituents, Traditional and Modern Uses”, Human Press, **Totowa**, p. 283-289, 1945.

ROUTRAY, W., ORSAT, V. Mae of phenolic compounds from blueberry leaves and comparison with other extraction methods. **Industrial Crops And Products**. v. 58. p. 36-45, 2014.

SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P. A. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotheapy**, v. 50, p.2009-2015, 2006.

SAMADDER, A.; CHAKRABORTY, D.; DE, A.; BHATTACHARYYA, S. S.; BHADRA, K.; KHUDA-BUKHSH, A. R. Possible signaling cascades involved in attenuation of alloxan-induced oxidative stress and hyperglycemia in mice by ethanolic extract of *Syzygium jambolanum*: Drug-DNA interaction with calf thymus DNA as target. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, V. 44, P. 207–217, 2011.

SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; Portela, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.13, n.4, p. 486-491, 2011.

SANVIDO, M. E., SCOPEL1, J. M., CASSEL, E., LUCAS, A. M. Análise comparativa do teor de flavonoides e da atividade antioxidante de extratos de *baccharis uncinella* obtidos por extração supercrítica e maceração. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11, 2015. **Resumo**. Unicamp – campinas SP, 19 a 22 de julho, 2015.

SENGUPTA, P.; DAS, P. B. Terpenoids and related compounds part IV triterpenoids the stem-bark of *Eugenia jambolana* Lam. **Indian Chemical Society**, v. 42, p. 255-258, 1965.

SILVA, E.; PEDRO, M. A.; SOGAYAR, A. C. B.; CORÊA, A. D.; VIEIRA, P.C.B.; KNOBEL, E. Brazilian sepsis Epidemiological study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, p. 251-260, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC. p.1104, 2010.

SRIVASTANA, S.; CHANDRA, D. Potenciais Farmacológicos De *Syzygium Cumini* : Uma Revisão. **Journal Of The Science Of Food Agriculture**, V. 93, P. 2084–2093, 2013.

TANWAR, R. S.; SHARMA, S. B.; SINGH, U. R.; PRABHU, K. M. Attenuation of renal dysfunction by anti-hyperglycemic compound isolated from fruit pulp of *Eugenia jambolana* in streptozotocin induced diabetic rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 47, p. 83–89, 2010.

- TAPIA, C. Resistência aos medicamentos antifúngicos: mecanismos, epidemiologia e conseqüências para o tratamento. **Revista Chilena de Infectologia**. v.29. n.3. p. 3-13, 2012.
- TEKWU, E. M.; PIEME, A. C.; BENG, V. P. Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 265–273, 2012.
- TIMBOLA, A. K.; SZPOGANICZ, B.; BRANCO, A.; MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M. G. A new flavonoid from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 174-176, 2002.
- TIWARI, P., KUMMAR, B., KAUR, M., KAUR, G., KAUR, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p.98-106, 2011.
- TSUKUI, A., REZENDE, C. M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde. **Revista Virtual de Química**. v.6. n.6. p. 1713-1725, 2014.
- TURATTI, K. F. M. *Syzygium cumini* L skulls: avaliação da qualidade , estudo morfo-anatomico, estudo da atividade antimicrobiana, conservante, genotóxica, mutagência, citotóxica e incorporação em formulações cosméticas de uso tópico. Araraquara. 2008. 184 f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de ciências farmacêuticas, Araraquara, SP, 2008.
- VAISHNAVA, M. M.; TRIPATHY, A. K.; GUPTA, K. R. Flavonoid glycosides from roots of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v. 63, p. 259-260, 1992.
- VANOLLI, R.; AUGUSTINHO, T. G.; MATTOS, P. A.; MACHADO, M. S.; CECHINEL-FILHO, V.; MEYRE-SILVA, C. Isolamento e quantificação de escopoletina a partir das folhas de *Litchi chinensis*. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2009.
- VAZ, E. K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37. n. 1. p. 147-150, 2009.
- VEGA, F. E., MEYLING, N., LUANGSA-ARD, J., BLACKWELL, M. Fungal Entomopathogens. **Insect Pathology**. v.107. p.171-220, 2012.
- VONGSAK, B., SITHISARN, P., MANGMOOL, S. THONGPRADITCHOTE, S., WONGKRAJANG, Y., GRITSANAPAN, W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**. v.44, p.566–571, 2013.
- XAVIER, M. A. Estudo com extrato *Syzygium cumini* (L) Skeel: perfil fitoquímico e atividade antimicrobiana sobre *Candida albicans*. Monografia para conclusão de curso (Odontologia). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2015.
- YAO, L.; CAFFIN, N.; D'ARCY, B.; JIANG, Y.; SHI, J.; SINGANUSONG, R.; LIU, X.; DATTA, N.; KAKUDA, Y.; XU, Y. Seasonal variations of phenolic compounds in Australia-grown tea (*Camellia sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6477-6483, 2005.

ZANOELLO, A. M.; MAZZANTI, C. M.; GINDRI, J. K.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; CECIM, M. Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra *Diabetes melittus* induzido por aloxano em ratos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2002.

ZÖLLNER, T.; SCHWARZ, M. Herbal reference standards : applications , definitions and regulatory requirements. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 1–21, 2012.