



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

CAIO CÉSAR DE ANDRADE RODRIGUES SILVA

**OBTENÇÃO DE FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA (COMPRIMIDO) À BASE DE
Syzygium cumini (L.) SKEELS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA O
TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR MICRORGANISMOS**

Recife

2019

CAIO CÉSAR DE ANDRADE RODRIGUES SILVA

**OBTENÇÃO DE FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA (COMPRIMIDO) À BASE DE
Syzygium cumini (L.) SKEELS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA O
TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR MICRORGANISMOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Recife

2019

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Caio César de Andrade Rodrigues

Obtenção de forma farmacêutica sólida (comprimido) à base de *Syzygium cumini* (L.) Skeels como alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por microrganismos / Caio César de Andrade Rodrigues Silva. - 2019.

169 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Plantas medicinais. 2. Farmacologia. 3. Agentes anti-infecciosos. I. Rolim Neto, Pedro José (orientador). II. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-118

CAIO CÉSAR DE ANDRADE RODRIGUES SILVA

**OBTENÇÃO DE FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA (COMPRIMIDO) À BASE DE
Syzygium cumini (L.) SKEELS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA O
TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR MICRORGANISMOS**

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

Aprovada em: 28/08/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Karina Perreli Randau (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Alexandre Couto Carneiro Vieira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

Ao **SENHOR JESUS**, meu único **DEUS**, por ter me ajudado em todo o projeto e por ter colocado pessoas muito importantes em meu caminho que estiveram comigo nos momentos bons e me fortaleceram quando estava prestes a desistir.

À minha amada esposa **Aline Andrade** por compartilhar as minhas alegrias, também minhas tristezas, por ter tido paciência frente às ausências por conta do trabalho e pelo apoio para seguir em frente. Certamente, essa vitória também é sua minha princesa.

Aos meus pais **João Rodrigues** e **Idenise Andrade** por me apoiarem incentivando a seguir em frente mesmo quando estava disposto a desistir e por sempre se preocuparem comigo. Por essas e outras, são os melhores pais que um filho poderia ter, amo vocês. Também aos meus irmãos **Cristóvão Andrade** e **Cahú Andrade**.

À **Universidade Federal de Pernambuco** e ao **Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**, e as pessoas que o compõem em especial a **Paulo Germano** pelo profissionalismo e gentileza, prestados a todos os alunos.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Pedro Rolim** por ter me dado a oportunidade de ser seu aluno e poder contemplar tanto profissionalismo e dedicação para com a pesquisa e seus alunos. Agradeço por todo o apoio e orientação que me deu para conclusão deste projeto, pois sem a compreensão e motivação que demonstrou para comigo, certamente teria desistido pelo caminho. Nunca irei esquecer o que fez por mim.

A minha amiga **Camila Luiz Gomes** que foi meu braço direito em todo o projeto e além disso, me fortaleceu nos momentos difíceis me dando forças e coragem para continuar. Camila, fui muito abençoado em ter tido você como mestranda no meu projeto, de coração, muito obrigado!!

Aos meus amigos **Camila Melo**, **Lucas Danda**, **Profa. Dra. Larissa Rolim** e **Profa. Dra. Rosali Silva** por todo apoio e auxílio nos experimentos, como também nos planejamentos e redação dos artigos.

Ao **Laboratório de Produtos Naturais – LAPRONAT**, particularmente aos meus amigos **Bruno Andrade** e **Allan Chernichiarro** pelo auxílio teórico no início do projeto.

Ao **Laboratório de Farmacognosia (UFPE)**, em especial a **Magda Ferreira** e ao **Prof. Dr. Luíz Soares**, pelo apoio nos ensaios de fitoquímica da planta.

Ao **Laboratório de Micologia Médica (UFPE)**, principalmente a **Dra. Ana Maria** por toda contribuição nos ensaios antigúngicos.

Ao **Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (UFPE)**, sobretudo a **Profa. Dra. Eulália Ximenes** pelo auxílio nos experimentos antibacterianos.

À família de pesquisa **LTM**, pois cada aluno em maior ou menor grau contribuiu de alguma forma com esse trabalho.

Ao **CETENE** pelo suporte tecnológico disponibilizado.

Por fim, a todos que ajudaram de forma direta ou indireta o desenvolvimento desse trabalho.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

RESUMO

A resistência de bactérias e fungos patogênicos a antibióticos é atualmente uma problemática reconhecida e novas alternativas para o tratamento de cepas resistentes são de interesse comum. O presente estudo consistiu em obter formas farmacêuticas sólidas à base de *Syzygium cumini* (L.) Skeels para o tratamento de infecções causadas por microorganismos. A droga vegetal (folha) foi caracterizada através dos ensaios farmacopéicos. 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, as soluções extrativas obtidas por banho-maria com agitação e microondas utilizando o mesmo solvente foram doseadas por polifenóis totais e taninos totais pela metodologia desenvolvida no estudo e os teores obtidos foram comparados. Posteriormente, foi realizada a otimização da extração por planejamento experimental pelo desenho Box-Behnken; o método analítico foi validado segundo a RDC 166/2017 e o extrato seco foi 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 *Tenebrio molitor*. Em seguida, foi realizado o estudo de compatibilidade extrato seco-excipiente, através da técnica de termogravimetria. Por fim, os comprimidos foram obtidos por técnica de compressão direta. 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 polifenóis totais e taninos totais. A metodologia analítica cumpriu os requisitos da RDC 166/2017. Na otimização da extração as condições ótimas foram: tempo de 8 min, potência 300 W, proporção droga:solvente (1:34, g/mL), solvente etanol:água (38:62, v/v), uma concentração de polifenóis totais de $87,37 \pm 1,85$ e concentração de taninos totais de $79,68 \pm 1,64$ mg por g de extrato bruto. Todos os microorganismos testados foram sensíveis ao extrato seco padronizado, além de apresentar baixa toxicidade. Foram obtidos comprimidos dentro das especificações de controle de qualidade. Os resultados obtidos comprovaram o 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 seco. Micro-ondas. Taninos. Azeitona preta. Antibacteriana. Antifúngica.

ABSTRACT

The resistance of pathogenic bacteria and fungi to antibiotics is currently a recognized issue and new alternatives for the treatment of resistant strains are of common interest. The present study consisted of obtaining solid dosage forms based on *Syzygium cumini* (L.) Skeels for the treatment of infections caused by microorganisms. The plant drug (leaf) was obtained by microwave and the extraction solvent was chosen based on the best antifungal response of the lyophilized extracts. After choosing the solvent, the extractive solutions obtained by stirring and microwave water bath using the same solvent were dosed by total polyphenols and total tannins by the methodology developed in the study and the obtained contents were compared. Subsequently, extraction was optimized by experimental design using the Box-Behnken design; The analytical method was validated according to RDC 166/2017 and the dry extract was standardized. The antimicrobial activity of the standardized dry extract was determined from the minimum inhibitory concentration, minimum fungicidal concentration and minimum bactericidal concentration by the 96-well flat microtiter technique. The toxicity test of the standardized extract was carried out by the invertebrate methodology in *Tenebrio molitor* larvae. Then, the dry-exipient extract compatibility study was performed using the thermogravimetry technique. Finally, the tablets were obtained by direct compression technique. The results showed that the vegetable drug has 0,1% volatile oils, 4,53% total ash, 6,71% water, presence of polyphenols, condensed tannins, flavonoids, saponins, reducing sugars, terpenes and steroids. The extract with 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 polyphenols and total tannins. The analytical methodology met the requirements of RDC 166/2017. In the extraction optimization the optimal conditions were: 8 min time, power 300 w, solvent drug:ratio (1:34, g/mL), ethanol:water solvent (38:62, v/v), a total polyphenol concentration of $87,37 \pm 1,85$ and total tannin concentration of $79,68 \pm 1,64$ mg per g crude extract. All microorganisms tested were sensitive to the standardized dry extract and presented low toxicity. Tablets were obtained within the quality control specifications. The results confirmed the antimicrobial potential of the *S. cumini* species, as well as the microwave technique as more efficient in obtaining higher levels of metabolites of interest.

Keywords: Dry extract. Microwaves. Tannins. Black olive. Antibacterial. Antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Syzigium cumini</i> (L.) Skeels utilizada no estudo, localizada no município do Cabo de Santo Agostinho-PE.....	49
Figura 2 - Folhas de <i>S. cumini</i> tratadas com álcool 70% após coleta.....	50
Figura 3 - Droga vegetal de <i>S. cumini</i> após secagem em estufa de ar circulante e pulverização em moinho de facas.	51
Figura 4 - Balões volumétricos com concentrações crescentes de ácido tânico utilizados para obtenção da curva de calibração.....	62
Figura 5 – Aspecto da complexação dos taninos totais após adição da caseína.....	63
Figura 6 -Histograma de distribuição granulométrica e curvas de retenção e passagem.	82
Figura 7 -Curvas TG/DTG e DTA do pó das folhas de <i>S. cumini</i>	83
Figura 8 - Resultados obtidos no estudo de sazonalidade de flavonóides e polifenóis.	85
Figura 9 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando-se 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu.....	92
Figura 10 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando-se 600 µL de reagente de Folin-Ciocalteu.....	92
Figura 11 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando-se 700 µL de reagente de Folin-Ciocalteu.....	93
Figura 12 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando-se 700 µL de reagente de Folin-Ciocalteu, aplicada no estudo de definição da massa de caseína para complexação dos taninos.	94
Figura 13 - Curva de calibração lida após 30, 60, 120, 180 e 240 minutos.	97
Figura 14 - Média das curvas de calibração utilizadas na avaliação das soluções reagentes...99	
Figura 15 - Valores de polifenóis totais doseados do extrato de <i>S. cumini</i> após 0, 2 e 4 h de extração.....	100
Figura 16 - Espectros de varredura obtidos na análise de especificidade com e sem adição de Folin-Ciocalteu para determinação de polifenóis para <i>S. cumini</i>	102
Figura 17- Linearidade da curva padrão para polifenóis totais.	103
Figura 18 - Linearidade da solução extrativa para polifenóis totais.....	103
Figura 19- Plotagem de resíduo para polifenóis totais da curva padrão.....	104
Figura 20 - Plotagem de resíduo da curva padrão da solução extrativa para polifenóis totais.	105

Figura 21 - Comparativo entre os resultados das concentrações de taninos totais feito com a solução extrativa de <i>S. cumini</i> e com ácido tânico.	106
Figura 22 -Linearidade realizada para solução padrão e para solução extrativa.	107
Figura 23 - Plotagem de resíduo da curva padrão para taninos totais.	108
Figura 24 - Plotagem de resíduo da curva padrão da solução extrativa para taninos totais. ...	108
Figura 25 -Contornos das superfícies de respostas obtidas para otimização de extração de polifenóis e taninos totais de folhas de <i>S. cumini</i> por EAM. As cores de contorno estão associadas a desejabilidade global entre 0 e 1.	116
Figura 26 - Imagem macroscópica do extrato seco de <i>S. cumini</i>	118
Figura 27 - Curva TG/DTG e DTA do extrato seco de <i>S. cumini</i>	119
Figura 28 - Avaliação da toxicidade do extrato seco padronizado de <i>S. cumini</i> em larvas <i>Tenebrio molitor</i>	127
Figura 29-Curvas TG do extrato seco, do Aerosil® e da mistura binária (1:1)	128
Figura 30 – Curvas DTG do extrato seco, do Aerosil® e da mistura binária (1:1).....	128
Figura 31 - Curvas TG do extrato seco, da Croscarmelose e da mistura binária (1:1).....	129
Figura 32 - Curvas DTG do extrato seco, da Croscarmelose e da mistura binária (1:1).....	129
Figura 33 - Curvas TG do extrato seco, da Crospovidona e da mistura binária (1:1).....	130
Figura 34 - Curvas DTG do extrato seco, da Crospovidona e da mistura binária (1:1).....	130
Figura 35 - Curvas TG do extrato seco, do talco e da mistura binária (1:1)	131
Figura 36 - Curvas DTG do extrato seco, do talco e da mistura binária (1:1)	131
Figura 37 - Curvas TG do extrato seco, da Estearato de Magnésio e da mistura binária (1:1)	132
Figura 38 - Curvas DTG do extrato seco, da Estearato de Magnésio e da mistura binária (1:1)	132
Figura 39 - Curvas TG do extrato seco, da Celulose Microcristalia 200 e da mistura binária (1:1)	133
Figura 40 - Curvas DTG do extrato seco, da Celulose Microcristalia 200 e da mistura binária (1:1)	133
Figura 41 - Curvas TG do extrato seco, da Starch 1500® e da mistura binária (1:1).....	134
Figura 42 - Curvas DTG do extrato seco, da Starch 1500® e da mistura binária (1:1).....	134
Figura 43 - Curvas TG do extrato seco, da Tabletose 100® e da mistura binária (1:1).....	135
Figura 44 - Curvas DTG do extrato seco, da Tabletose 100® e da mistura binária (1:1).....	135
Figura 45 – Curvas TG do extrato seco, da Compremix® e da mistura binária (1:1).	136
Figura 46 – Curvas DTG do extrato seco, da Compremix® e da mistura binária (1:1).....	136

Figura 47 – Curvas TG do extrato seco, da PVP-K30 e da mistura binária (1:1).	137
Figura 48 - Curvas DTG do extrato seco, da PVP-K30 e da mistura binária (1:1).....	138
Figura 49 - Comprimidos de <i>S. cumini</i> obtidos por compressão direta.....	140
Figura 50 - Comprimido de <i>S. cumini</i> sendo submetido a ensaio de dureza em durômetro. .	141
Figura 51 - Comprimidos de <i>S. cumini</i> quebrados após serem submetidos o ensaio de dureza.	141

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Uso popular de partes da espécie vegetal <i>Syzygium cumini</i>	35
Quadro 2 - Diferentes atividades farmacológicas de <i>Syzygium cumini</i>	36
Quadro 3 - Lista de agentes patogênicos prioritários da OMS para a P&D de novos antibióticos.	43
Quadro 4 - Padrões, sistemas e reagentes específicos utilizados para cada identificação dos metabolitos.	56
Quadro 5 - Padrões, sistemas e reagentes específicos utilizados para pesquisa de sazonalidade para cada metabolito.....	57
Quadro 6. Relação do Índice de Carr (IC) para a fluidez de pós.....	72
Quadro 7 -Classes pesquisadas nos meses de novembro/2015 e junho/2016.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores e níveis independentes empregados no planejamento experimental de Box-Behnken para otimização da Concentração de Polifenóis Totais (CPFT) e Concentração de Taninos Totais (CTT) da solução extrativa das folhas de <i>S. cumini</i> por Extração Assistida por Micro-ondas (EAM).	69
Tabela 2 - Relação dos excipientes avaliados no estudo de compatibilidade com o extrato seco de <i>S. cumini</i>	76
Tabela 3 – Composição do LB para obtenção de comprimidos de 150 mg à base de <i>S. cumini</i> por técnica de compressão direta.....	76
Tabela 4 - Índice pluviométrico anual em mm da região do Cabo de Santo Agostinho - PE..	85
Tabela 5 -Atividade antifúngica dos extratos secos obtidos de <i>S. cumini</i>	86
Tabela 6 - Valores de pH das soluções extrativas das folhas de <i>S. cumini</i> extraídos pelas técnicas de microondas e digestão.....	88
Tabela 7 - Valores da densidade relativa das soluções extrativas das folhas de <i>S. cumini</i> extraídos pelas técnicas de micro-ondas e digestão.....	88
Tabela 8 - Valores do resíduo seco das soluções extrativas das folhas de <i>S. cumini</i> extraídos pelas técnicas de microondas e digestão.....	89
Tabela 9 -Teor de polifenóis e taninos totais das folhas de <i>S. cumini</i> extraídos pelas técnicas de micro-ondas e digestão.	89
Tabela 10 - Valores da triplicata das absorvâncias do padrão de AT aplicando-se 500 µL do RFC.....	90
Tabela 11 - Valores da triplicata das absorvâncias do padrão AT aplicando 600 µL do RFC.	91
Tabela 12 - Valores da triplicata das absorvâncias do padrão de AT aplicando-se 700 µL do RFC.....	93
Tabela 13 - Avaliação da influência do quantitativo de caseína sobre o doseamento de taninos totais de <i>S. cumini</i>	95
Tabela 14 - Avaliação dos tempos de complexação da caseína com taninos totais sobre o doseamento de taninos totais de <i>S. cumini</i>	96
Tabela 15 - Valores de absorvância da curva de calibração lida após 30, 60, 120, 180 e 240 minutos.	97
Tabela 16 - Valores de absorvância obtidas na avaliação da estabilidade das soluções reagentes após 1º, 2º 3º 14º e 49º dia.....	98

Tabela 17 - Resultados da avaliação dos teores de taninos totais e polifenóis totais de <i>S. cumini</i> no estudo de estabilidade do extrato sem refrigeração.	100
Tabela 18 - Avaliação dos teores de taninos totais e polifenóis totais de <i>S. cumini</i> no estudo de estabilidade do extrato sob refrigeração.	101
Tabela 19 - Análise de robustez.	109
Tabela 20 - Análise da precisão intermediária para polifenóis totais.	110
Tabela 21 - Análise da precisão intermediária para taninos totais.	110
Tabela 22 - Teste de recuperação para polifenóis totais.	111
Tabela 23 - Teste de recuperação para taninos totais.	111
Tabela 24 - Respostas obtidas do planejamento experimental de Box-Behnken para otimização da EAM de polifenóis totais e taninos totais das folhas de <i>S. cumini</i>	112
Tabela 25 - Efeitos estimados por regressão de mínimos quadrados e ANOVA do delineamento experimental de Box-Behnken para otimização de CPFT e CTT presentes na solução extrativa obtida por EAM. Valores significativos ($p < 0,05$) estão marcados em negrito.	114
Tabela 26 - Valores estimados pela função desejabilidade comparados aos resultados experimentais ($n = 3$) na condição otimizada onde $X_1 = 0.6$ (8 min), $X_2 = 1$ (300 w), $X_3 = 0.6$ (1/34 g/mL) e $X_4 = -0.4$ (38%). O nível de confiança foi estabelecido em 95%.	117
Tabela 27 - Propriedade de compactação do extrato seco de <i>S. cumini</i>	120
Tabela 28 - Atividade antifúngica do extrato padronizado de <i>S. cumini</i>	122
Tabela 29 - Sensibilidade antifúngica dos extratos secos vegetais com e sem otimização obtidos de <i>S. cumini</i> frente a isolados clínicos de <i>Candida</i>	123
Tabela 30 - Atividade antibacteriana do extrato padronizado de <i>S. cumini</i>	124
Tabela 31 - Propriedade de compactação do LB.	139
Tabela 32 - Resultados obtidos no controle de qualidade físico-químico do LB.	140

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AT	Ácido Tânico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
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
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPFT	Concentração de Polifenóis Totais
CT	Cinzas Totais
C1	Cadinho cheio antes da incineração
C2	Cadinho cheio após a incineração
CTT	Concentração de Taninos Totais
CV	Coefficiente de Variação
D _{ap}	Densidade Aparente
DP	Desvio Padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
D/S	Proporção Droga:Solvente
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
EA	Extrato Aquoso
EAM	Extração Assistida por Micro-ondas
EAT	Equivalente de Ácido Tânico
EEt	Extrato Etanólico
EHEt	Extrato Hidroetanólico
EHMt	Extrato Hidrometanólico
IC50	Índice de morte Celular 50%
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
LB	Lote de Bancada

M _{dc}	Massa do Densímetro Cheio
M _{dv}	Massa do Densímetro Vazio
Min	Minutos
MOPS	Morfolino Propano Sulfônico
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NEU	Solução 1% de difenilboriletoxietilamina
Pa	Peso da amostra
PEG	Polietilenoglicol
PVP K30	Polivinilpirrolidona K30
RFC	Reagente de Folin-Ciocauteu
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SEM	Solução Extrativa Mãe
SUS	Sistema Único de Saúde
TG	Análise Termogravimétrica
TPP	Techno Plastic Products
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV	Ultravioleta
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
V _d	Volume do densímetro.
X ₁	Tempo de extração (min)
X ₂	Potência do micro-ondas (w)
X ₃	Proporção droga vegetal/solvente (g/mL)
X ₄	Concentração etanólica (%)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
±	Mais ou menos, aproximadamente
≥	Maior ou igual a
®	Marca Registrada
°C	grau Celsius
g/mL	Gramas por Mililitro
h	Horas
Kg	Quilograma
L	Litro
(L)	Influência linear do fator sob as respostas do planejamento experimental
mg	Miligrama
mg/g	Miligrama por grama
mg/kg	Miligrama por Quilograma
mg/mL	Miligrama por Mililitro
mg/mL/kg	Miligrama por Mililitro por Quilograma
mL	Mililitro
mL/g	Mililitro por Grama
Nm	Nanômetros
p/p	Peso/Peso
p/v	Peso/Volume
pH	Potencial Hidrogeniônico
(Q)	Influência quadrática do fator sob as respostas do planejamento experimental
r ²	Coeficiente de correlação linear
T	Temperatura
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta Visível
V _d	Volume do densímetro
v/v	Volume/Volume
µg	Microgramas
µcg/kg	Microgramas por Quilograma (sigla mais utilizada para comunicações)

médicas recomendada pela Food and Drug Administration (FDA))

$\mu\text{g}/\text{mL}$

Micrograma por Mililitro

$\mu\text{g}/\text{mL}/\text{kg}$

Micrograma por Mililitro por Quilograma

$\mu\text{L}/\text{mL}$

Microlitro por Litro

°

Graus

w

Potência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVO GERAL	31
2.1.1	Objetivos Específicos	31
3	REFERENCIAL TEÓRICO	33
3.1	<i>SYZYGIUM CUMINI</i> (L.) SKEELS	33
3.1.1	Aspectos botânicos	33
3.1.2	Propriedades farmacológicas.....	34
3.1.3	Perfil fitoquímico	38
3.1.4	Aspectos toxicológicos	39
3.2	DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS.....	39
3.3	DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS E BACTÉRIAS	41
3.4	TERAPIA E RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA	41
3.5	TERAPIA E RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA	42
3.6	METABÓLITOS VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	44
3.7	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	49
4.1.1	Obtenção da droga vegetal (estabilização, secagem e pulverização)	50
4.1.2	Caracterização físico-química da droga vegetal	51
4.1.2.1	Determinação de óleos voláteis	51
4.1.2.2	Densidade aparente	52
4.1.2.3	Determinação de cinzas totais	52
4.1.2.4	Determinação de perda por dessecação	52
4.1.2.5	Determinação de água.....	53
4.1.2.6	Determinação de substâncias extraíveis por álcool	53
4.1.2.7	Determinação do índice de espuma	54
4.1.2.8	Determinação granulométrica do pó.....	54
4.1.2.9	Análise térmica	54

4.2	TRIAGEM FITOQUÍMICA DA DROGA VEGETAL	55
4.2.1	Preparo das amostras	55
4.3	AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE.....	56
4.3.1	Preparo das amostras	56
4.3.2	Pesquisa de sazonalidade de flavonoides e taninos	57
4.4	ENSAIO FARMACOLÓGICO PARA DEFINIÇÃO DE MELHOR SOLVENTE EXTRATOR.....	57
4.4.1	Obtenção das soluções extrativas por micro-ondas.....	57
4.4.2	Obtenção dos extratos secos.....	58
4.4.2.1	Liofilização	58
4.4.3	Teste de sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos secos de <i>S. cumini</i>	58
4.4.3.1	Análise estatística.....	59
4.5	DEFINIÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO VISANDO MAIOR TEOR DE TANINOS TOTAIS	59
4.5.1	Obtenção das soluções extrativas	59
4.5.1.1	Extração por técnica de digestão	60
4.5.1.2	Extração por técnica de micro-ondas.....	60
4.5.2	Caracterização da solução extrativa	60
4.5.2.1	Determinação de pH	60
4.5.2.2	Determinação de densidade relativa	60
4.5.2.3	Determinação de resíduo seco	60
4.5.2.4	Determinação de taninos totais	61
4.6	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO SIMULTÂNEO DE POLIFENÓIS E TANINOS TOTAIS DAS FOLHAS DE <i>S. CUMINI</i>	61
4.6.1	Matérias-primas.....	61
4.6.2	Obtenção da solução extrativa.....	61
4.6.3	Adaptação para leitura de polifenóis e taninos totais.....	62
4.6.4	Definição da quantidade de caseína para complexação dos taninos totais.....	63

4.6.5	Avaliação do tempo de complexação da caseína com os taninos totais	64
4.7	AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE	64
4.7.1	Avaliação da cinética da curva de calibração	64
4.7.2	Avaliação da estabilidade das soluções reagentes.....	64
4.7.3	Estabilidade da solução extrativa.....	64
4.7.3.1	Temperatura ambiente	65
4.7.3.2	Sob refrigeração.....	65
4.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS E TANINOS TOTAIS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DE <i>S. CUMINI</i>	65
4.8.1	Preparo da solução extrativa mãe	66
4.8.2	Especificidade.....	66
4.8.3	Linearidade, limites de detecção e quantificação para polifenóis totais.....	66
4.8.4	Linearidade, limites de detecção e quantificação para taninos totais.....	66
4.8.5	Robustez.....	67
4.8.6	Precisão.....	67
4.8.7	Exatidão.....	67
4.9	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO	68
4.9.1	Planejamento experimental	68
4.10	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO OTIMIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	69
4.10.1	Obtenção do extrato seco padronizado de <i>S. cumini</i>	69
4.10.2	Descrição macroscópica	70
4.10.3	Determinação de pH do extrato seco otimizado de <i>S. cumini</i>.....	70
4.10.4	Determinação da área superficial específica e porosidade do extrato seco otimizado de <i>S. cumini</i>	70
4.10.5	Caracterização térmica	71
4.10.6	Determinação de polifenóis e taninos totais	71
4.10.7	Avaliação das propriedades de compactação.....	71
4.10.8	Avaliação do ângulo de repouso e tempo de escoamento.....	72

4.11	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	72
4.12	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	73
4.13	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	75
4.14	ESTUDO DE COMPATIBILIDADE DO EXTRATO SECO DE <i>S. CUMINI</i> :EXCIPIENTES	75
4.15	OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS À BASE DE <i>S. CUMINI</i> POR TÉCNICA DE COMPRESSÃO DIRETA.....	76
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
5.1	MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	79
5.1.1	Caracterização físico-química da droga vegetal	79
5.1.1.1	Determinação de óleos voláteis	79
5.1.1.2	Densidade aparente	79
5.1.1.3	Determinação de cinzas totais	79
5.1.1.4	Determinação de perda por dessecação	80
5.1.1.5	Determinação de água.....	80
5.1.1.6	Determinação de substâncias extraíveis por álcool	80
5.1.1.7	Determinação do índice de espuma	81
5.1.1.8	Determinação granulométrica do pó.....	81
5.1.1.9	Análise térmica	82
5.2	TRIAGEM FITOQUÍMICA DA DROGA VEGETAL	83
5.3	AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE.....	84
5.4	ENSAIO FARMACOLÓGICO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR SOLVENTE EXTRATOR.....	85
5.4.1	Teste de sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos secos de <i>S. cumini</i>	85
5.5	DEFINIÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO VISANDO MAIOR TEOR DE TANINOS TOTAIS	88
5.5.1	Caracterização da solução extrativa	88
5.5.1.1	Determinação de pH	88

5.5.1.2	Determinação de densidade relativa	88
5.5.1.3	Determinação de resíduo seco	89
5.5.1.4	Determinação de taninos totais	89
5.6	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO SIMULTÂNEO DE POLIFENÓIS E TANINOS TOTAIS DAS FOLHAS DE <i>S. CUMINI</i>	90
5.6.1	Adaptação para leitura de taninos e polifenóis.....	90
5.6.2	Definição da quantidade de caseína para complexação dos taninos totais.....	94
5.6.3	Avaliação do tempo de complexação da caseína com os taninos totais	95
5.7	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE	96
5.7.1	Avaliação da cinética da curva de calibração	96
5.7.2	Avaliação da estabilidade das soluções reagentes.....	98
5.7.3	Estabilidade da solução extrativa.....	99
5.7.3.1	Temperatura ambiente	99
5.7.3.2	Sob refrigeração.....	101
5.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS E TANINOS TOTAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS DE <i>S. CUMINI</i>	101
5.8.1	Especificidade.....	101
5.8.2	Linearidade, limites de detecção e quantificação de polifenóis totais e taninos totais.....	102
5.8.3	Robustez.....	109
5.8.4	Precisão.....	109
5.8.5	Exatidão.....	110
5.9	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO	111
5.9.1	Planejamento experimental	111
5.9.1.1	Superfície de resposta e função desejabilidade	115
5.10	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO OTIMIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	117
5.10.1	Obtenção do extrato seco padronizado de <i>S. cumini</i>	117

5.10.2	Descrição macroscópica	118
5.10.3	Determinação de pH do extrato seco otimizado de <i>S. cumini</i>	118
5.10.4	Determinação da área superficial específica e porosidade do extrato seco otimizado de <i>S. cumini</i>	118
5.10.5	Caracterização térmica	119
5.10.6	Determinação de polifenóis totais e taninos totais	120
5.10.7	Avaliação das propriedades de compactação, ângulo de repouso e tempo de escoamento.....	120
5.11	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	121
5.12	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	123
5.13	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>S. CUMINI</i>	125
5.14	ESTUDO DE COMPATIBILIDADE DO EXTRATO SECO DE <i>S. CUMINI</i> :EXCIPIENTES	127
5.15	OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS À BASE DE <i>S. CUMINI</i> POR TÉCNICA DE COMPRESSÃO DIRETA.....	138
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	144
7	PERSPECTIVAS.....	147
	REFERÊNCIAS	149
	ANEXO A – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS.....	163
	ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS.....	164
	ANEXO C – TRABALHO APRESENTADO NO 1º SIMPÓSIO BRASIL – FRANÇA DE QUÍMICA MEDICINAL	165
	ANEXO D – TRABALHO APRESENTADO NO VIII SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS E III SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE INVESTIGAÇÃO EM CÂNCER.....	166

ANEXO E – TRABALHO APRESENTADO NO VIII SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS E III SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE INVESTIGAÇÃO EM CÂNCER.....	167
ANEXO F – TRABALHO APRESENTADO NO VIII SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS E III SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE INVESTIGAÇÃO EM CÂNCER.....	168
ANEXO G – TRABALHO APRESENTADO NO VIII SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS E III SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE INVESTIGAÇÃO EM CÂNCER.....	169

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

A grande incidência de microrganismos patogênicos, resistentes aos fármacos disponibilizados à sociedade é um grave problema e tal fenômeno vêm sendo acompanhado pela comunidade científica (OMS, 2014; PADIYARA; INOUE; SPRENGER, 2018). Pesquisas tem sido desenvolvidas por diversos grupos em todo o mundo, os quais tem comprovado a eficácia da atividade antimicrobiana a partir de plantas medicinais, onde é possível verificar a relação entre os metabólitos secundários destas e sua atividade, em especial os polifenóis que são amplamente citados na literatura (AHMAD; AQIL, 2007; DE SOUZA et al. 2018). Dessa forma, esses metabólitos secundários podem funcionar como novos agentes antimicrobianos, reduzindo os efeitos colaterais que geralmente fazem parte da terapia antimicrobiana convencional.

Syzygium cumini (L.) Skeels (sinónímias: *Eugenia cumini* (L.) Druce, *Syzygium jambolanum* (DC)) pertencente à família Myrtaceae é popularmente conhecida como jambolana, jamun ou jambul na Índia, amora-preta na América e jambolão, jamelão ou azeitona preta no Brasil. *S. cumini* é amplamente reputada por apresentar muitas propriedades terapêuticas (SRIVASTAVA & CHANDRA, 2013). Entre elas, a atividade antimicrobiana tem sido bastante relatada recentemente principalmente associada ao seu conteúdo de polifenóis e taninos como metabólitos secundários (MIGLIATO et al., 2010; UGBABE et al., 2010; BAG et al., 2012; SINGH et al., 2016; KHAN et al., 2017), embora outros metabólitos também tenham sido apresentados como recursos antimicrobianos para espécie *S. cumini* (SHAFI et al., 2002).

Apesar do amplo conhecimento do potencial das plantas medicinais como alternativa para o tratamento de infecções causadas por microrganismos, atualmente os principais agentes terapêuticos ainda são sintéticos. Todavia, com a utilização de técnicas que potencializem a extração dos metabólitos de interesse, aliados a obtenção tecnológica de extratos secos viáveis para formulação de comprimidos, tais avanços podem favorecer o crescimento do uso de fitoterápicos na terapia antimicrobiana.

Nesse sentido, a extração assistida por micro-ondas (EAM) tem se destacado dentre outros métodos de extração, pois oferece algumas vantagens significativas, a saber: redução do tempo de extração, baixo consumo de solventes, altas taxas de extração de metabólitos secundários, melhores resultados biológicos com menores custos e desperdícios de produção (PANJA, 2018; DE HOYOS-MARTÍNEZ et al., 2019). No entanto, devido a existência de muitos parâmetros que influenciam a EAM, muitas vezes se faz necessário otimizar o

processo de extração, a fim de obter-se a quantidade máxima de compostos bioativos da droga vegetal (ANGOY et al., 2018; VÁZQUEZ-ESPINOSA et al., 2018).

A partir disso, a aplicação do planejamento experimental é uma alternativa benéfica para alcançar melhores resultados nos processos de extração de metabólitos secundários, isso porque é um método eficaz para otimização de procedimentos de extração, visto que pode combinar vários fatores independentes, levando em consideração possíveis inter-relações entre eles, diminuindo assim o número de testes experimentais necessários e permitindo uma redução considerável do custo e tempo operacional (DAS; MANDAL; MANDAL, 2014; RHAZI et al., 2015).

Considerando que a família Myrtaceae tem a vantagem de estar amplamente distribuída pelo globo e ser facilmente cultivada para fins fitoterápicos, o objetivo do presente trabalho foi obter formas farmacêuticas sólidas (comprimidos) à base de *Syzygium cumini* para tratamento de infecções causadas por microrganismos.

2. Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter forma farmacêutica sólida (comprimido) à base de *Syzygium cumini* (L.) Skeels como alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por microrganismos.

2.1.1 Objetivos Específicos

- a) Realizar caracterização físico-química e avaliar 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 para doseamento de polifenóis e taninos totais;
- g) Otimizar o método de obtenção da solução extrativa por micro-ondas;
- 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*;
- l) Realizar estudo de compatibilidade do extrato seco:excipientes, visando selecionar os excipientes que irão compor a forma farmacêutica sólida (comprimido);
- m) Obter forma farmacêutica sólida (comprimido) à base de *S. cumini* por técnica de compressão direta.

3. Referencial

Teórico

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Syzygium cumini* (L.) SKEELS

Syzygium cumini (L.) Skeels é uma espécie pertencente a família Myrtaceae que compreende cerca de 100 gêneros e 3.000 espécies presentes em quase todos os continentes, com maior incidência nas Américas e Austrália (JOLY, 1975; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012), a espécie é 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 (SILVA et al., 2011) ou jalão (PIO CORRÊIA, 1984; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012), a espécie é portadora de algumas sinonímias: *Syzygium jambolanum* DC., *S. caryophyllifolium* DC., *Eugenia corticosa* Lour., *E. frondosa* Wall., *E. jambolifera* Roxb., *E. moorei* Muell., *E. obtusifolia* Roxb., *E. glomerata* Sieber., *Calytrantes 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., *Calytranthos 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, estase espalhou com facilidade pela região (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012).

3.1.1 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).

Ademais, 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 peninérvea, 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).

3.1.2 Propriedades farmacológicas

Várias partes de *Syzygium cumini* (raízes, cascas do caule, folhas, flores, frutos e sementes) 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 (SRIVASTANA; CHANDRA, 2013; BALDISSERA, 2016).

Quadro 1 - Uso popular de partes da espécie vegetal *Syzygium cumini*.

Parte da Planta	Uso popular	Referência
<i>Folhas</i>	diabetes, ação hipotensiva, diuréticas, adstringência, obstipação, leucorréia, estômago, cataplasma em doenças de pele, acalmar prurido, antiinflamatória, antimicrobiana.	Morton, 1987; Schapoval et al., 1988; Ross, 1999; Alberton et al., 2001; Zanoello et al., 2002.
<i>Casca do caule</i>	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	Morton, 1987; Ross, 1999; Alberton et al., 2001; Pepato et al., 2001.
<i>Sementes</i>	anticonvulsivante, hipoglicemiante, adstringente e obstipação, atividade eupéptica, anti-hemorragica, para alterações no estômago, antiinflamatória, bactericida, diarréia, diabetes, disenteria e hipertensão.	Morton, 1987; Ross, 1999; Alberton et al., 2001; Pepato et al., 2001; Damasceno, et al., 2002.
<i>Frutos</i>	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.	Bhatia; Bajaj, 1975; Morton, 1987; Ross, 1999; Timbola et al., 2002; Sharma et al., 2003.
<i>Flores</i>	Antibióticas	Morton, 1987.
<i>Raiz</i>	antiemético, aumentar a lactação em lactantes	Ross, 1999.

As pesquisas comprovaram várias ações farmacológicas (Quadro 2) entre elas, atividade anticâncer, antidiabética, anti-hiperlipidêmica, antioxidante, antiulcerosa, hepatoprotetora, antialérgica, antiartrítica, antibacteriana, radioprotetora, sedativa, antidiarreica, nefroprotetora, antiinflamatória, antifertilidade, antiulceroso, antimicrobiana e antiviral. (RAVI; RAJASEKARAN; SUBRAMANIAN, 2005; REKHA; BALAJI; DEECARAMAN, 2008; Yadav et al., 2011; SRIVASTANA; CHANDRA, 2013; Baldissera et al., 2016.).

Quadro 2 -Diferentes atividades farmacológicas de *Syzygium cumini*.

Atividade	<i>Syzygium cumini</i> extrato	Referência
Atividade anticâncer.	Extrato de sementes (fração metanólica do extrato etanólico).	Yadav et al., 2011.
Atividade antidiabética.	Extrato de folhas (etanólico).	Baldissera et al., 2016.
Atividade anti-hiperlipidêmica.	Extrato de sementes (etanólico); extrato da casca do caule (aquoso); extrato de folhas (etanólico).	Ravi; Rajasekaran; Subramanian, 2005; Rekha; Balaji; Deecaraman, 2008; Baldissera et al., 2016.
Atividade anti-hiperglicemiante.	Extrato de sementes (etanólico); extrato de folhas (etanólico); extrato da polpa do fruto (etanólico)	Ayyanar; SubashBabu; Ignacimuthu, 2013; Baldissera et al., 2016.
Atividade antioxidante.	Extrato de sementes (aquoso); extrato de folhas (etanólico, metanólico, cloreto de metileno e óleos essenciais).	Pizzale et al., 2002; Ravi; Ramachandran; Subramanian, 2004; Ruan; Zhang; Lin, 2008; Mohamed; Ali; El-Baz, 2013; Eshwarappa et al., 2014; Baldissera et al., 2016.
Atividade antiulceroso.	Extrato em pó de sementes (etanólico).	Chaturvedi et al., 2007.
Atividade	Extrato de casca (etanólico).	Das & Sarma, 2009.

hepatoprotetora.		
Atividade antiartrítica.	Extrato em pó de sementes (metanólico).	Kumar et al., 2008
Atividade antibacteriana.	Extrato de sementes (fração metanólica do extrato etanólico); Extrato de casca do caule (aquoso e acetona); extrato de folhas (acetato de etila, aquoso, cloreto de metileno, etanólico, éter de petróleo, metanólico, e óleos essenciais).	Djipa; Delmee; Quetin-Leclercq 2000; Gowri; Vasantha, 2010; Yadav et al., 2011; Mohamed; Ali, El-Baz, 2013; Imran et al., 2017).
Atividade radioprotetora.	Extrato de pó de sementes hidroalcoólicas.	Abalea et al., 1999.
Atividade no sistema nervoso central	Extrato de acetato de etila e pó de sementes metanólico.	Kumar; Padmanabhan; Krishana, 2007.
Atividade antidiarreica.	Extrato de casca do caule (etanólico).	Mukherjee et al., 1998.
Atividade nefroprotetora	Isolado a partir de extrato da casca aquosa.	Tanwar et al., 2010.
Atividade anti-inflamatória.	Extrato de acetato de etila e pó de sementes metanólico.	Kumar et al., 2008.
Atividade da antifertilidade.	Ácido oleanólico isolado de flores.	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 (MITRA et al., 1995; JAGETIA; BALIGA, 2002).

Eswarappa et al., (2014) demonstraram o grande potencial antioxidante do extrato metanólico das folhas de *S. cumini*, uma vez que este promoveu a eliminação de radicais DPPH e hidroxilas, utilizando concentrações inferiores ao controle (ácido ascórbico). Já Brito et al., (2007) constataram atividade antialérgica do extrato aquoso das folhas na concentração de 0,1 g kg⁻¹ PC via oral. Poongunran et al., (2017) revelaram 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 (CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004; MICHELIN et al., 2005).

3.1.3 Perfil fitoquímico

O jambolão é rico em compostos contendo antocianinas, ácido elágico, isoquercetina, canferol e mirecetina (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012). Além disso, diversos são os estudos que apresentam comprovação científica dos metabólitos presentes nas variadas partes da planta (raízes, caule, folhas, flores, frutos e sementes).

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; DAYAL; SESHADRI, 1974, BHATIA; BAJAJ, 1975). Já as flores são ricas em campferol, quercetina, miricetina, isoquercetina, dihidromiricetina, ácido oleanólico, acetil ácido oleanólico, eugenoltriterpenoide A e eugenoltriterpenoide (NAIR; SUBRAMANIAN, 1962; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012). As raízes se mostraram ricas em flavonoides e glicosídeos (VAISHNAVA; TRIPATHY; GUPTA, 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-metilelágico, 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 flavonoides e sugeriu-se uma ação sinérgica desses com os taninos para justificar sua potente atividade antimicrobiana (MAHMOUD et al., 2001; TIMBOLA et al., 2002; MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005; KETTELIN et al., 2013)

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

3.1.4 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.

3.2 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 as respostas terapêuticas 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 (FIGUEIRÊDO et al., 2014; MARQUES et al., 2014; FIGUEIRÊDO et al., 2015) 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).

3.3 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 pitíriase 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 gastrointestinal 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 e peste (PFALLER, 2014; BRASIL, 2016).

3.4 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 (FIGUEIREDO, 2008; OLIVEIRA, 2016;).

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 esta (GONÇALVES, 2011; REZENDE et al., 2017).

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 (TAPIA, 2012; PITTOL, 2013).

3.5 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 (VAZ, 2009; BAPTISTA, 2013).

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 (Quadro3).

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 (BRASIL, 2007; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

3.6 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 microbiana 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. Além disso, seis 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).

3.7 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) avaliaram 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) estudaram 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 & 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 pela técnica de 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 eletroscópica 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 consequentemente 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; LOBO; GONZALEZ, 2009).

Routray & 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 polifenóis 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.

4. Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 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 Agrônomo 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 (figura 1).

Figura 1 - *Syzygium cumini* (L.) Skeels utilizada no estudo, localizada no município do Cabo de Santo Agostinho-PE.



Fonte: Autor.

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

As amostras das folhas da planta foram estabilizadas com álcool a 70% (v/v) (Figura 2), 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) (Figura 3), pesado e acondicionado em recipiente de vidro, devidamente vedado e mantido em ausência de luz.

Figura 2 - Folhas de *S. cumini* tratadas com álcool 70% após coleta.



Fonte: Autor.

Figura 3 - Droga vegetal de *S. cumini* após secagem em estufa de ar circulante e pulverização em moinho de facas.



Fonte: Autor.

4.1.2 Caracterização físico-química da droga vegetal

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

4.1.2.1 Determinação de óleos voláteis

O teor de óleos voláteis presentes na droga vegetal oriundo 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 5^a 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).

4.1.2.2 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:

$$D_{ap} = M_{dc} - M_{dv} / V_d \text{ (Eq. 1)}$$

Em que: D_{ap} = densidade aparente; M_{dv} = massa do densímetro vazio; M_{dc} = massa do densímetro cheio; V_d = volume do densímetro.

4.1.2.3 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:

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

Em que: CT = Cinzas Totais; $C1$ = Cadinho cheio antes da incineração; $C2$ = Cadinho cheio após a incineração; Pa = Peso da amostra.

4.1.2.4 Determinação de perda por dessecação

A determinação de perda por dessecação da droga vegetal foi realizada 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 chato previamente

dessecado. Este foi pesado tampado contendo a amostra, posteriormente agitou-se o pesa-filtro levemente a fim de espalhar a amostra para promover uniformidade no recipiente, a uma altura ideal de cerca de 5 mm. Em seguida, este sistema foi conduzido para uma estufa de ar circulante (Ethicktechnology®) a 105°C, onde permaneceu com a tampa do recipiente semiaberta por 2 horas. Logo após o pesa-filtro foi retirado da estufa e transferido para um dessecador para resfriamento, ao chegar à temperatura ambiente este foi pesado e o procedimento de secagem foi repetido até peso constante (BRASIL, 2010). Os resultados foram expressos em percentual de resíduo de massa, pela média de três determinações, segundo a equação 3:

$$Pd = \left(\frac{Pu - Ps}{Pa} \right) \times 100 \text{ (Eq. 3)}$$

Em que: Pd = Perda por dessecação; Pu = Peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação; Ps = Peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação; Pa = Peso da amostra.

4.1.2.5 Determinação de água

A determinação de água da droga vegetal foi realizada pelo método direto de Karl Fischer de acordo com o descrito na Farmacopeia Brasileira, 5ª 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. À titulação foi realizada com o reagente de Karl Fischer (BRASIL, 2010).

4.1.2.6 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, 5ª 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 5h 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).

4.1.2.7 Determinação do índice de espuma

Para determinação do índice de espuma da droga vegetal, foi realizado o método descrito na Farmacopeia Brasileira, 5ª 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 digital (BRASIL, 2010).

4.1.2.8 Determinação granulométrica do pó

A determinação da granulometria do pó da droga vegetal foi feita de acordo com o método descrito na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição. Foram pesados 25g 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, a saber: 850, 600, 425, 250 e 75 µm 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).

4.1.2.9 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.

4.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA DA DROGA VEGETAL

4.2.1 Preparo das amostras

Foi pesado 1 g de amostra e adicionado 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 4). 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 as 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, estas 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
Flavonóides	90:5:5	NEU + PEG	Quercetina e Rutina
Derivados Cinâmicos	90:5:5	NEU + PEG	Ác. Cafeico e Ác. Clorogênico
Terpenos e Esteróides	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
Alcalóides	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.

4.3 AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE

4.3.1 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 μ L. Foram aplicados 10 μ L 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, estas foram secas à temperatura ambiente, foram reveladas com reagentes específicos para cada

metabólito e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm, posteriormente, foram digitalizadas. As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

4.3.2 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 flavonóides e ácido gálico e ácido elágico, para taninos (Quadro 5).

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

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

4.4 ENSAIO FARMACOLÓGICO PARA DEFINIÇÃO DE MELHOR SOLVENTE EXTRATOR

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

4.4.1 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®) onde foram aplicados os seguintes parâmetros: potência de 200W, tempo de extração de 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 resfriamento até chegar em 25°C. Após o término, os extratos foram filtrados em algodão.

4.4.2 Obtenção dos extratos secos

4.4.2.1 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.

4.4.3 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 foram utilizadas 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 mol.L⁻¹;Sigma-Aldrich[®]). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0,22 µm (Millipore[®], Darmstadt, Alemanha). Os extratos secos aquoso e etanol:água (1:1, v/v) foram diluídos em água e as concentrações testadas foram 4092 µg/mL, 2046 µg/mL, 1023 µg/mL, 511,5 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL e 8 µg/mL, porém os extratos etanólico e metanol:água (2:10, v/v) foram testados nas concentrações 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL e 0,125µg/mL.

Foram usados para os testes isolados clínicos de sangue de pacientes internados em Unidade de Terapia intensiva (UTI) do Hospital das Clínicas de Pernambuco resistentes a equinocandinas, 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.

4.4.3.1 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.

4.5 DEFINIÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO VISANDO MAIOR TEOR DE TANINOS TOTAIS

4.5.1 Obtenção das soluções extrativas

As soluções extrativas foram obtidas a partir de duas técnicas, a saber: banho-maria com agitação e micro-ondas. Estas, foram utilizadas a fim de se avaliar qual método extrativo resultaria em maiores teores de taninos totais.

4.5.1.1 Extração por técnica de digestão

Para obtenção da solução extrativa por banho-maria com agitação, foi empregada a metodologia convencional adaptada de Aspé & Fernández (2011) e Dahmoune, (2015) no qual foram utilizados 4 g de droga vegetal para 200 mL de etanol:água (1:1, v/v) a 60° C (banho-maria Novatecnica[®]) com 200 rpm (agitador mecânico Marconi[®]) durante 2h.

4.5.1.2 Extração por técnica de micro-ondas

Para a obtenção da solução extrativa por micro-ondas foi utilizada a metodologia descrita no item 4.4.1, utilizando 4 g de droga vegetal para 200 mL de etanol:água (1:1, v/v).

4.5.2 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.

4.5.2.1 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.

4.5.2.2 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.

4.5.2.3 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 porcentagem sobre o volume.

4.5.2.4 Determinação de taninos totais

Foi realizado o doseamento de acordo com o método descrito por Amorim et al, (2008) para ambas as soluções extrativas e realizado o comparativo do poder de extração de taninos totais em cada metodologia, com resultados expressos em miligrama de Equivalente de Ácido Tânico (EAT) por grama de extrato bruto (mg EAT/g).

4.6 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO SIMULTÂNEO DE POLIFENÓIS E TANINOS TOTAIS DAS FOLHAS DE *S. cumini*

A metodologia analítica para doseamento simultâneo de polifenóis e taninos totais para folhas de *S. cumini* foi desenvolvida a partir de parâmetros apresentados por Amorim (2008). Ademais, os resultados dos doseamentos foram expressos em miligrama de EAT por grama de extrato bruto (mg EAT/g).

4.6.1 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), Caseina P.A Dinâmica® 1g.

4.6.2 Obtenção da solução extrativa

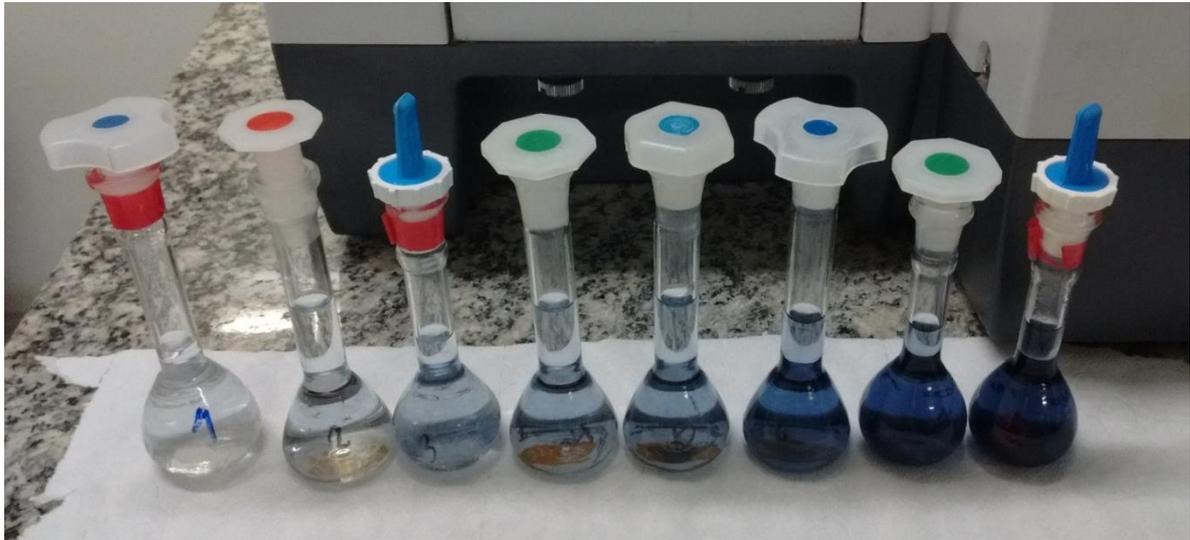
A solução extrativa foi obtida por técnica de micro-ondas, conforme parâmetros definidos no item 4.4.1, porém utilizando como solvente extrator apenas etanol:água (1:1, v/v).

4.6.3 Adaptação para leitura de polifenóis e taninos totais

Para o desenvolvimento da curva padrão, foi realizada uma curva-teste com 8 pontos nas seguintes concentrações, 0,5; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 $\mu\text{g/mL}$ de ácido tânico (AT) (Figura 4). Na curva- teste foram adicionados 1 mL de solução de Na_2CO_3 (7,5%, p/v), as alíquotas da solução de AT para obter as concentrações desejadas, alíquotas de 500, 600 e 700 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) (10%, v/v) e por fim, os volumes foram completados para 10 mL utilizando-se água destilada e colocados ao abrigo da luz para posterior leitura após 30 minutos de reação.

Ademais, as curvas testes foram obtidas utilizando-se alíquotas crescentes do RFC, visando-se avaliar a quantidade de reagente necessária para obter-se uma leitura linear de polifenóis totais.

Figura 4 - Balões volumétricos com concentrações crescentes de ácido tânico utilizados para obtenção da curva de calibração.



Fonte: Autor.

A partir da definição da concentração ideal de Folin-Ciocalteu (FC) para obtenção da curva de calibração, foi ajustada a alíquota do extrato para 0,03 mL, a fim de obter-se uma absorvância entre 500 a 550 nm para polifenóis.

Após ajustada a alíquota do extrato, foi necessário promover a complexação dos taninos totais e para tal, 6 mL da solução extrativa foram adicionadas a um Erlenmeyer contendo 1 g de caseína dissolvida em 12 mL de água destilada. Este, foi submetido a

agitação por 3 h para promover a precipitação dos taninos totais com a caseína, em seguida a solução foi filtrada, obtendo-se então a solução de polifenóis residuais.

Posteriormente, foi efetuada a leitura de polifenóis residuais da solução extrativa utilizando-se a mesma alíquota aplicada para a leitura de polifenóis totais com o objetivo de obter-se a absorvância média em espectrofotômetro (UV/Vis-mini-1240, Shimadzu®) originada do complexo dos taninos totais do extrato com a caseína.

Finalmente, o teor de taninos totais foi calculado pela diferença entre os polifenóis totais e polifenóis residuais.

4.6.4 Definição da quantidade de caseína para complexação dos taninos totais

Foram realizados doseamentos dos taninos totais, utilizando-se quantitativos diferentes de caseína para promover a complexação com os taninos sob agitação, a saber: 100, 250, 500, 750 e 1000 mg de caseína, mantendo-se os outros parâmetros. Os resultados foram comparados com os valores de doseamento obtidos com 1g de caseína e 3h de complexação dos taninos totais sob agitação (Figura 5) (Amorim, 2008), utilizando-se uma alíquota de 0,03 mL e 700 µL de FC para realização da leitura.

Figura 5 – Aspecto da complexação dos taninos totais após adição da caseína.



Fonte: Autor.

A massa da caseína utilizada para complexação dos taninos totais, foi definida pelo doseamento que necessitou de uma menor quantidade de reagente, sem que houvesse diminuição significativamente estatística entre os resultados dos testes.

4.6.5 Avaliação do tempo de complexação da caseína com os taninos totais

Foram realizados 3 doseamentos com 3h, 1:30 h e 30 min de tempo de complexação com os taninos totais sob agitação, utilizando 1g de caseína, em triplicata. Os resultados obtidos para cada tempo de complexação citados, foram comparados com os valores de doseamento obtidos com 1g de caseína e 3h de complexação sob agitação, utilizando-se uma alíquota de 0,03 mL e 700 μ L de FC 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.

4.7 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE

4.7.1 Avaliação da cinética da curva de calibração

Para a avaliação da cinética da curva de calibração foi preparada uma curva com 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, 60, 120, 180 e 240 min. Ademais, todos os balões permaneceram ao abrigo da luz até o momento da leitura no equipamento.

4.7.2 Avaliação da estabilidade das soluções reagentes

Para avaliação de estabilidade das soluções reagentes, foram preparadas 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 1°, 2°, 3°, 14° e 49° dia, a fim de avaliar a estabilidade das mesmas.

4.7.3 Estabilidade da solução extrativa

Para avaliação da estabilidade das soluções extrativas, os resultados dos doseamentos foram expressos em miligrama de EAT por grama de extrato bruto (mg EAT/g).

4.7.3.1 Temperatura ambiente

Para a avaliação da estabilidade da solução extrativa em temperatura ambiente, foram avaliados os teores de polifenóis totais e taninos totais empregando-se a metodologia desenvolvida para *S. cumini* de acordo com o item 4.6 em intervalos de tempo 0, 2 e 4h.

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

4.7.3.2 Sob refrigeração

Para a avaliação da estabilidade da solução extrativa sob refrigeração, foi realizado o doseamento de taninos totais empregando-se a metodologia desenvolvida para *S. cumini*, de acordo com o item 4.6 em intervalos de tempo de 6 h até ser notada desestabilização durante o doseamento.

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

4.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS E TANINOS TOTAIS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DE *S. cumini*

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. Os resultados foram expressos como microgramas de EAT por mililitro de extrato ($\mu\text{g EAT/mL}$). 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 determinado 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%.

4.8.1 Preparo da solução extrativa mãe

A Solução Extrativa Mãe (SEM) foi preparada diluindo-se 10 mL da solução extrativa (item 4.4.1) em água destilada utilizando-se um balão volumétrico de 100 mL.

4.8.2 Especificidade

A especificidade do método foi verificada através da sobreposição dos espectros das amostras nos comprimentos de onda de 500 a 900 nm, onde: solução padrão (6 µg AT/ mL) com 700 µL RFC, solução teste (0,06 mL de SEM em 10 mL de água destilada) com 700 µL de RFC e solução teste (0,06 mL de SEM em 10 mL de água destilada) sem RFC.

4.8.3 Linearidade, limites de detecção e quantificação para polifenóis 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 µg/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).

4.8.4 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 AT para polifenóis totais e seu comportamento comparado com uma curva feita exatamente com as mesmas concentrações de AT. 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).

4.8.5 Robustez

O ensaio para determinação da robustez do método espectrofotométrico para polifenóis 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%.

4.8.6 Precisão

A precisão para polifenóis totais e taninos totais foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária (BRASIL, 2017). Para calcular a repetibilidade, em um único dia, um único analista determinou a concentração de seis amostras a 100% da concentração teste (6,0 µg EAT/mL para polifenóis totais e 5,1 µg EAT/mL para taninos totais) obtidas das seis soluções extrativas distintas. Posteriormente, para análise da precisão intermediária, dois analistas em dias separados avaliaram a concentração de três amostras a 100% obtidas a partir das três soluções extrativas distintas.

4.8.7 Exatidão

A exatidão para polifenóis totais e taninos totais foi avaliada por ensaios de recuperação, através da adição de 1 µg/mL de AT às amostras contendo 4,8; 6,0 e 7,2 µg EAT/mL de polifenóis totais e 4,2; 5,1 e 6 µg EAT/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

Após o desenvolvimento da metodologia analítica para doseamento de taninos totais para as folhas de *S. cumini*, realizou-se um estudo de otimização do método de extração de polifenóis e taninos totais, o qual segue descrito a seguir.

4.9.1 Planejamento experimental

Um desenho experimental foi planejado para otimizar a extração de polifenóis 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 concentração etanólica (X_4) foram selecionados 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 foram analisados os impactos dos fatores independentes sobre as concentrações de polifenóis (Y_1) e taninos (Y_2) totais, mensurados em mg/g de extrato bruto. Os níveis experimentais foram selecionados baseados em trabalhos prévios envolvendo extrações similares a do presente estudo (DAHMOUNE et al., 2015; NAIMA et al., 2015; MEDOUNI-ADRAR et al., 2015; RHAZI et al., 2015).

Os efeitos foram estimados por regressão dos 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 na solução extrativa a partir das condições testadas.

Tabela 1 - Fatores e níveis independentes empregados no planejamento experimental de Box-Behnken para otimização da Concentração de Polifenóis Totais (CPFT) e Concentração de Taninos Totais (CTT) da solução extrativa das folhas de *S. cumini* por Extração Assistida por Micro-ondas (EAM).

		Códigos	Fatores	Níveis		
				Menor (-1)	Médio (0)	Maior (1)
Fatores independentes	X ₁		Tempo de extração (min)	1	5	10
	X ₂		Potência do micro-ondas (w)	50	150	300
	X ₃		Proporção droga/solvente (g/mL)	1/10	1/25	1/40
	X ₄		Concentração etanólica (%)	20	50	80
Respostas	Y ₁		CPFT (mg EAT/g)			
	Y ₂		CTT (mg EAT/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).

4.10 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO OTIMIZADO 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:

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

O extrato seco de *S. cumini* foi obtido por liofilização a partir da solução extrativa otimizada, nas seguintes condições: proporção droga/solvente (1/34 g/mL); concentração etanólica (38%); tempo de 10 min; potência 300W. 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.

4.10.2 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.

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

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).

4.10.4 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 degaseificada 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.

4.10.5 Caracterização térmica

As curvas de termogravimetria (TG) foram obtidas por meio de termobalança Shimadzu[®], modelo DTG 60H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa do extrato seco de *S. cumini*, em torno de 5 mg ($\pm 0,2$), acondicionadas em cadinho de alumina, nas razões de aquecimento 10 °C.min⁻¹, na faixa de temperatura 25 - 600°C. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS[®] (*Thermal Analysis*) versão 2.20 da Shimadzu[®].

4.10.6 Determinação de polifenóis e taninos totais

Os teores de polifenóis totais e taninos totais do extrato seco foram determinados dissolvendo-se 142 mg do extrato seco em 100 mL de etanol 38% e posteriormente, aplicando-se o método desenvolvido no trabalho descrito no item 4.6.

4.10.7 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).

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

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

Quadro 6. Relação 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

Legenda: IC = Índice de Carr.

Fonte: WELLS, apud ANDRADE, 2009.

4.10.8 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).

4.11 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 utilizada levedura, padrão American Type Culture Collection (ATCC): *Candida parapsilosis* ATCC 22019 com perfilsensível. 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 diluídos em água e as concentrações

testadas foram 640µg/mL, 320 µg/mL, 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5µg/mL, 2,5µg/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. haemulonii*, *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 clinico de escamas epidérmicas da região inguinal e vulva) e *Trichophyton rubrum* 5413 (isolado clinico 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.

4.12 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 *Staphylococcus 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 10 mL 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 2560 µg/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 dispensado 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 concentrações 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.

4.13 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 *Tenebrio 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 µcg/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 (168h) após a inoculação do extrato (LIMA, 2011).

4.14 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE DO EXTRATO SECO DE *S. cumini*:EXCIPIENTES

Para avaliação da compatibilidade do extrato seco de *S. cumini* com os excipientes avaliados, foram obtidas misturas binárias na proporção de 1:1 (p/p), das quais foram avaliados os perfis térmicos destas com os respectivos perfis do extrato seco de *S. cumini* e excipientes. Ademais, os perfis térmicos foram obtidos através das técnicas de TG/DTG, empregando-se os mesmos parâmetros utilizados no estudo de caracterização térmica do extrato seco de *S. cumini* (3.10.4).

Na tabela 2 estão relacionados os excipientes farmacêuticos avaliados no estudo de compatibilidade.

Tabela 2 - Relação dos excipientes avaliados no estudo de compatibilidade com o extrato seco de *S. cumini*.

Excipiente	Classificação	Marca/Lote
Aerosil®	Adsorvente	Degussa® / 156050514
Croscarmelose Sódica	Desintegrante	Blanver® / 83452
Crospovidona	Desintegrante	Jiaozue Zhongwei® / 2014PP1023
Talco	Lubrificante	Magnesita® / N-80062-3
Estearato de Magnésio	Lubrificante	Peter Greven® / 83307
Celulose Microcristalina 200	Diluyente	Blanver® / 155012092
Starch 1500®	Diluyente	Colorcon® / IN530936
Tabletose® 100	Diluyente	Meggle® / 0735
Compremix®	Diluyente	Chemunion® / CN102-1209
Polivinilpirrolidona K30 (PVP K30)	Aglutinante	Viafarma® / 20111218

Legenda: Aerosil® - Dióxido de silício coloidal; Starch 1500® - Amido pré-gelatinizado; Tabletose®100 - Lactose Monoidratada; Compremix® - Fosfato de cálcio, celulose microcristalina, derivado de açúcar, derivado de amido, dióxido de silício coloidal e estearato de magnésio.

4.15 OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS À BASE DE *S. cumini* POR TÉCNICA DE COMPRESSÃO DIRETA

Para a obtenção dos comprimidos à base de *S. cumini* por compressão direta foi utilizada a seguinte formulação para o lote de bancada – LB:

Tabela 3 – Composição do LB para obtenção de comprimidos de 150 mg à base de *S. cumini* por técnica de compressão direta.

Componentes	Fução	LB (%)
Extato seco de <i>S. cumini</i>	Insumo Farmacêutico Ativo (IFA)	16,7
Croscarmelose	Desintegrante	10
Celulose Microcristalina 200	Diluyente	68,3
Polivinilpirrolidona K30 (PVP K30)	Aglutinante	5
Total	-	100

Legenda: IFA – Insumo Farmacêutico Ativo.

Após a seleção dos excipientes para formulação, estes foram misturados ao IFA de forma manual em recipiente adequado por 05 (cinco) minutos e posteriormente, o granel foi submetido aos testes de avaliação das propriedades de compactação e ângulo de repouso/tempo de escoamento, utilizando os mesmos parâmetros utilizados na caracterização do extrato seco conforme descrito nos itens 3.10.6 e 3.10.7, respectivamente.

Em seguida, o granel foi comprimido em compressora rotativa com 16 punções Neuberger[®] utilizando punções e matrizes de 07 (sete) mm para obtenção de comprimidos com 150 mg de peso médio. Ademais, o controle de qualidade do produto em processo foi realizado aplicando as técnicas de peso médio, friabilidade, dureza e desintegração, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira, 5^a edição, utilizando os seguintes equipamentos: friabilômetro (Varian/Wankel[®], modelo 42093), balança semi-analítica (Gehaka[®], modelo 200AC), durômetro (Wankel[®], modelo VK 200) e desintegrador (Nova Ética[®], modelo 301AC).

5. Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

5.1.1 Caracterização físico-química da droga vegetal

5.1.1.1 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 das 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.

5.1.1.2 Densidade aparente

A determinação da densidade aparente é importante para estabelecer sua melhor utilização e está relacionada com o volume ocupado por uma determinada massa. A densidade aparente do material vegetal foi de 0,3073 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.

5.1.1.3 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 *S. cumini* abordadas na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (até 11%), tem-se um resultado dentro do intervalo aceitável.

5.1.1.4 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 das folhas de *S. cumini*, 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, observou-se que *Eugenia uniflora* L. e *Eugenia dysenterica* DC. devem apresentar, respectivamente, o teor máximo de 10% e 8% de umidade. Levando-se 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.

5.1.1.5 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 das folhas de *S. cumini*. Tomando por base os dados da Farmacopeia Brasileira (5 ed.) observou-se que *Eugenia uniflora* L. e *Eugenia dysenterica* DC. devem apresentar, respectivamente, os teores máximos de 10% e 8% de umidade. A semelhança do que se verificou no ensaio de perda por dessecação, em função das semelhanças taxonômicas das espécies, podemos sugerir que o resultado obtido neste estudo é aceitável, revelando que o baixo conteúdo de umidade representa a eficiência do processo de secagem.

5.1.1.6 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, onde o teor obtido foi de 13,07% ($\pm 1,51$) aproximadamente.

5.1.1.7 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).

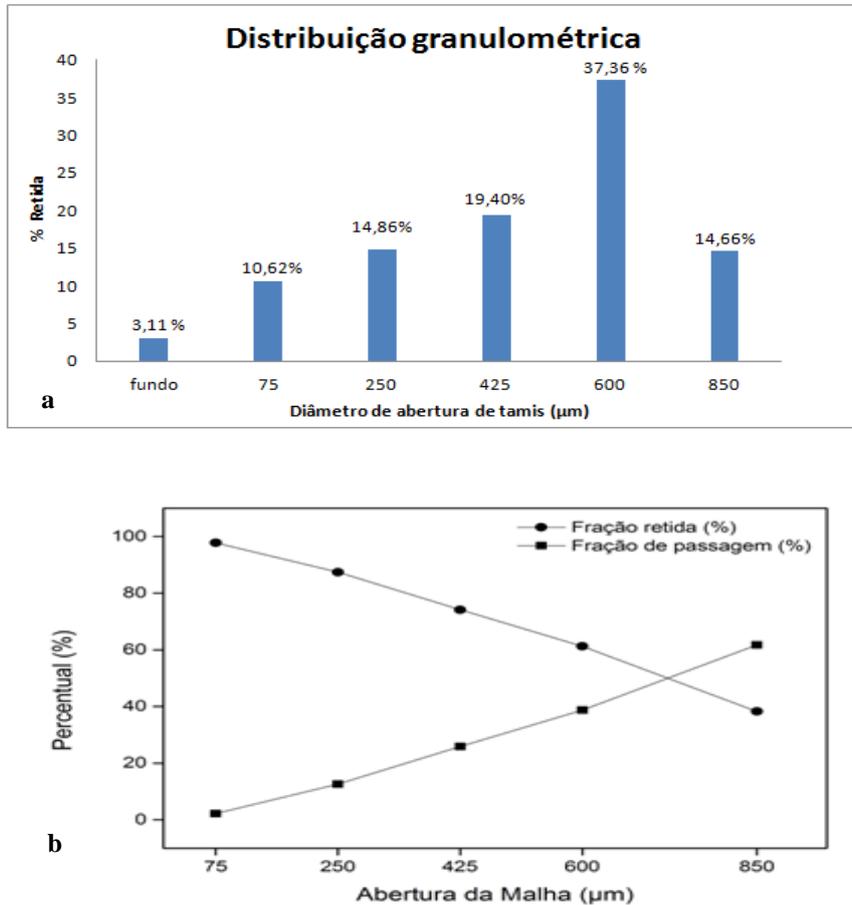
Os ensaios realizados com *S. cumini* demonstraram que os índices de espuma referentes à droga vegetal não ultrapassaram 1cm em nenhum dos tubos, sendo 8,72 mm o valor máximo atingido nas aferições (tubo 10, contendo o decocto não diluído). Desse modo, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (5ª ed),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

5.1.1.8 Determinação granulométrica do pó

Através do histograma obtido (Figura 6a), relacionando-se 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 6b), 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 6 -Histograma de distribuição granulométrica e curvas de retenção e passagem.



Fonte: Dados da pesquisa.

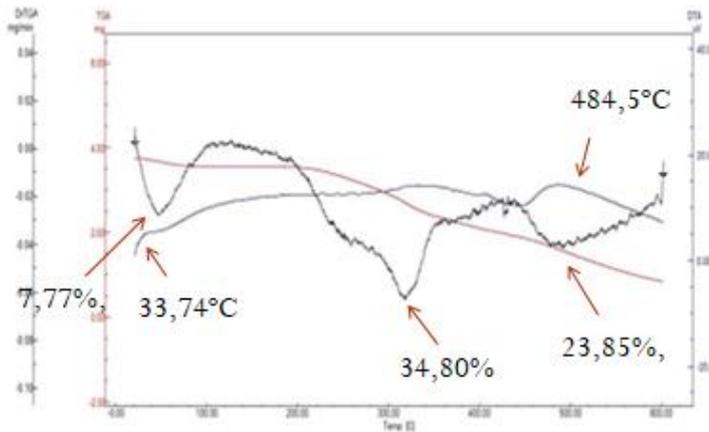
5.1.1.9 Análise térmica

Na Figura 7, 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 7 -Curvas TG/DTG e DTA do pó das folhas de *S. cumini*.



Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA DA DROGA VEGETAL

Taninos hidrolisáveis, taninos condensados, flavonóides, terpenos, esteróides, saponinas e açúcares redutores foram observados nos ensaios realizados. Os demais metabólitos, como derivados cinâmicos, cumarinas, alcalóides 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; SHARMA; BAJAJ, 1974; GUPTA; SHARMA, 1974; MAHMOUD et al., 2001; VANOLLI et al., 2009).

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	+
Flavonóides	Quercetina e Rutina	+
Derivados Cinâmicos	Ác. Cafeico e Ác. Clorogênico	-
Terpenos e Esteróides	β -Sitosterol	+
Cumarinas	Cumarina	-
Saponinas	Escina	+
Açúcares redutores	D-frutose	+
Alcalóides	Nitrato de Pilocarpina	-
Antraquinonas	Senosídeo A	-

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

Fonte: Autor.

5.3 AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE

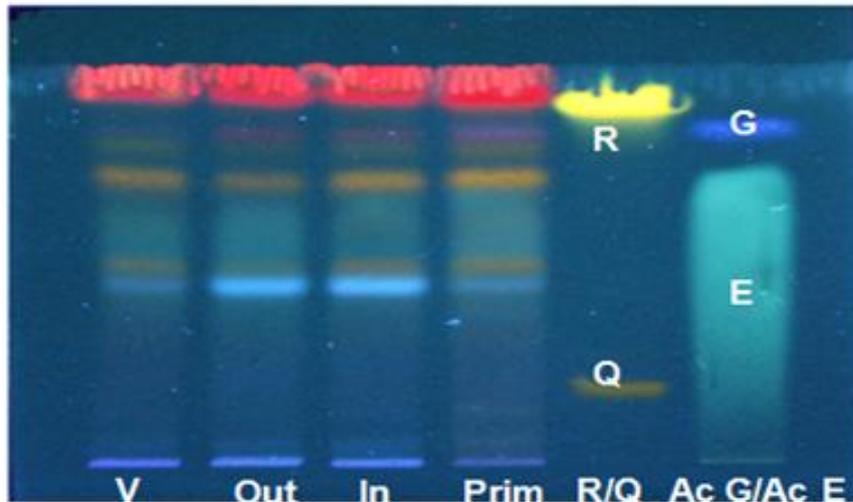
Uma vez que a influência da sazonalidade pode interferir na resposta biológica devido à diferença de concentrações dos metabólitos secundários necessários para atividade, neste estudo foi analisada a variação sazonal dos flavonoides e taninos os quais são os responsáveis pela atividade antimicrobiana.

Na primavera foi observada uma maior quantidade de bandas coradas evidenciando uma maior variedade de polifenóis quando comparado com as outras estações do ano (Figura 8). Resultado 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 de *Thuja occidentalis* Linn. (cupressaceae) e verificou-se que o índice pluviométrico foi um fator crucial para ocorrência de variação fitoquímica durante o ano.

Estudos, conduzidos por outros autores, afirmam que condições ambientais descritas como favoráveis para produção de flavonoides estão presentes na estação seca, conforme descrito por Alves et al., (2011), em um trabalho realizado com 20 plantas medicinais da Savana no qual estas apresentaram maior rendimento de flavonóides durante a estação seca.

Tais evidências, foram reafirmadas no presente estudo (Figura 8), uma vez que a primavera (Novembro/2015) e o verão (Dezembro/2016) foram os períodos com menor índice pluviométrico na região (Tabela 4).

Figura 8 - Resultados obtidos no estudo de sazonalidade de flavonóides e polifenóis.



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.
Fonte: Autor.

Tabela 4 - Índice pluviométrico anual em mm da região do Cabo de Santo Agostinho - PE.

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

5.4 ENSAIO FARMACOLÓGICO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR SOLVENTE EXTRATOR

5.4.1 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 5).

Tabela 5 -Atividade antifúngica dos extratos secos obtidos de *S. cumini*.

Isolado fúngico	EA (µg/mL)	EEt (µg/mL)	EHet (µg/mL)	EHMEt (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

Legenda: R (resistente, não houve inibição do crescimento); EA – Extrato Aquoso; EEt – Extrato Etanólico; EHet – Extrato Hidroetanólico; EHMEt – Extrato Hidrometanólico.

Fonte: Dados da pesquisa.

Entre os extratos secos 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 comparados 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 ocorreu 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; RAGAZZINI; ANDRADE, 2012).

A anfotericina B é considerada o padrão ouro para o tratamento de infecções sistêmicas causadas por espécies de *Candida* (BOUZA; MUÑOZ, 2008). Todavia, o aumento de espécies de *Candida* resistentes a este fármaco é um fato preocupante (ESPINEL-INGROFF; ARTHINGTON-SKAGGS; IQBAL, 2007), uma vez que alguns autores relataram a ocorrência de resistência em isolados de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (PFALLER; DIEKEMA, 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; PATEL; MANN, 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 *S. cumini* 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.

5.5 DEFINIÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO VISANDO MAIOR TEOR DE TANINOS TOTAIS

5.5.1 Caracterização da solução extrativa

As soluções extrativas obtidas pelas técnicas de banho-maria com agitação e micro-ondas apresentaram rendimento de 33,5 % e 70 %, respectivamente. Ademais, estas foram caracterizadas e seus resultados foram comparados como descritos a seguir.

5.5.1.1 Determinação de pH

Na Tabela 6, estão apresentados os valores de pH para cada uma das soluções.

Tabela 6 - 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.

5.5.1.2 Determinação de densidade relativa

Os valores de densidade relativa das soluções extrativas estão apresentados abaixo na Tabela 7, mostrando-se menos densa que a água e com resultados parecidos com a densidade das tinturas e extratos descritos na Farmacopéia 5^a ed.

Tabela 7 - 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.

5.5.1.3 Determinação de resíduo seco

Os teores de resíduo seco para cada uma das técnicas utilizadas estão apresentados a seguir na Tabela 8, evidenciando também valores bem próximos aos especificados para outras plantas descritas na Farmacopéia 5^a ed.

Tabela 8 - 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.

5.5.1.4 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 polifenóis totais na extração por microondas foram significativamente superiores aos obtidos pela técnica de digestão (Tabela 9), observa-se a eficiência na extração por microondas pelo fato desta resultar em um teor 16,62% e 6,89% superior de polifenóis totais e taninos totais, respectivamente, ao obtido pela técnica de digestão. Tais dados corroboram com os estudos realizados por Aspé & Fernández (2011), pois realizaram ensaios comparativos entre diversas técnicas de extração e observaram que o método mais efetivo, quando relacionado a teores de extração de polifenóis totais e taninos, foi a técnica por micro-ondas.

Tabela 9 - Teor de polifenóis e taninos totais das folhas de *S. cumini* extraídos pelas técnicas de micro-ondas e digestão.

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

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

Fonte: Dados da pesquisa.

5.6 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO SIMULTÂNEO DE POLIFENÓIS E TANINOS TOTAIS DAS FOLHAS DE *S. cumini*

5.6.1 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 polifenóis totais quanto de taninos totais e para tal, sabendo-se que o teor de taninos totais é obtido pela diferença entre polifenóis totais e polifenóis residuais após a complexação dos taninos totais 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 crescentes de padrão, além do aumento da concentração do RFC de 500 para 600 µL, como observados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Valores da triplicata das absorvâncias do padrão de AT aplicando-se 500 µL do RFC.

AT (µg/mL)	Absorvâncias ± dp		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,5	0,048 ± 0,001	0,048 ± 0,001	0,049 ± 0,001
2,0	0,132 ± 0,069	0,132 ± 0,001	0,133 ± 0,002
4,0	0,245 ± 0,001	0,245 ± 0,001	0,246 ± 0,001
6,0	0,333 ± 0,001	0,333 ± 0,002	0,333 ± 0,001
8,0	0,411 ± 0,001	0,412 ± 0,002	0,412 ± 0,001
10,0	0,473 ± 0,001	0,573 ± 0,002	0,474 ± 0,001
12,0	0,480 ± 0,001	0,481 ± 0,002	0,482 ± 0,002
14,0	0,510 ± 0,001	0,511 ± 0,002	0,511 ± 0,001

Legenda: dp – desvio padrão; AT – Ácido Tânico.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 11 - Valores da triplicata das absorvâncias do padrão AT aplicando 600 µL do RFC.

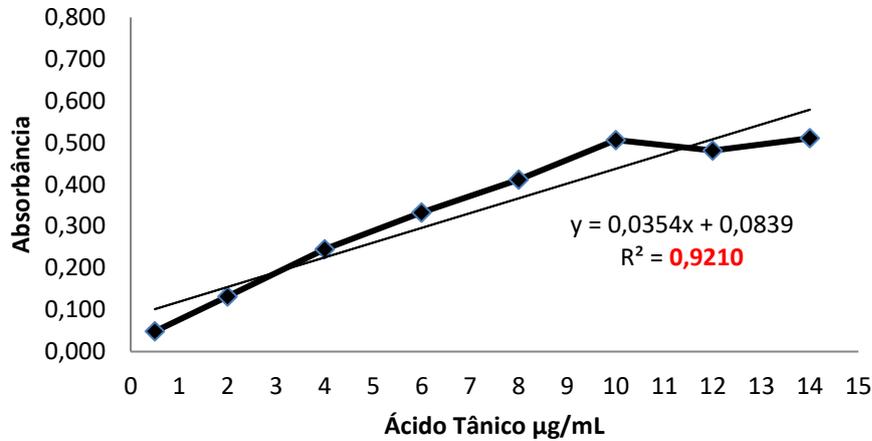
AT (µg/mL)	Absorvâncias ± dp		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,5	0,040 ± 0,001	0,038 ± 0,001	0,039 ± 0,001
2,0	0,093 ± 0,069	0,124 ± 0,001	0,120 ± 0,002
4,0	0,255 ± 0,001	0,255 ± 0,001	0,254 ± 0,001
6,0	0,380 ± 0,001	0,377 ± 0,002	0,378 ± 0,001
8,0	0,487 ± 0,001	0,480 ± 0,002	0,478 ± 0,001
10,0	0,561 ± 0,001	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

Legenda: dp – desvio padrão; AT – Ácido Tânico.

Fonte: Dados da pesquisa.

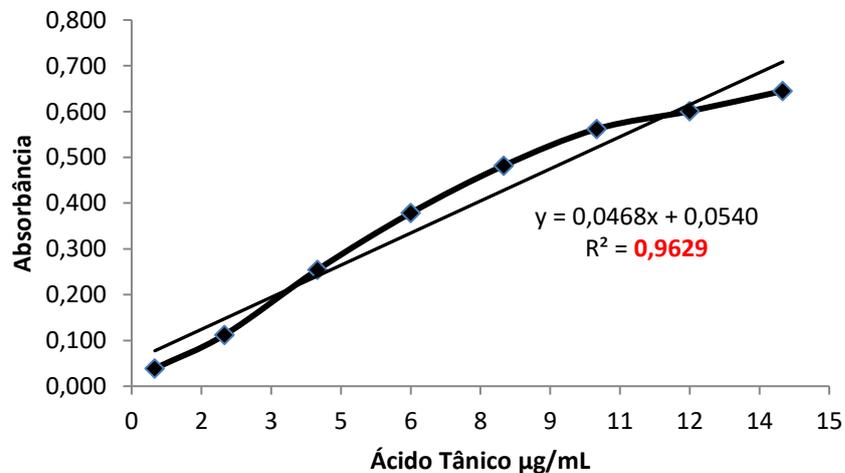
Os valores de absorvância obtidos nas três curvas para as concentrações de 500 µL e 600 µL de Folin-Ciocalteu não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, conforme demonstrado pelo teste ANOVA com $F_{\text{calculado}} (0,00826) < F_{\text{tabelado}} (3,098391)$ e $F_{\text{calculado}} (0,0001) < F_{\text{tabelado}} (3,4668)$, respectivamente. Contudo, as concentrações utilizadas não foram satisfatórias, uma vez que as curvas de calibração não apresentaram linearidade por possuírem valores de R^2 inferiores a 0,99 como evidenciados nas figuras 9 e 10 que representam a média das três curvas de calibração obtidas.

Figura 9 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando-se 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 10 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando-se 600 µL de reagente de Folin-Ciocalteu.



Fonte: Dados da pesquisa.

Diante dos resultados obtidos com as curvas de calibração aplicando-se 500 e 600 µL de Folin-Ciocalteu, decidiu-se elevar a concentração para 700 µL em virtude de possivelmente haver ocorrido uma saturação dos reagentes e por isso, as curvas não terem apresentado-se lineares. As novas absorbâncias obtidas estão demonstradas na Tabela 12.

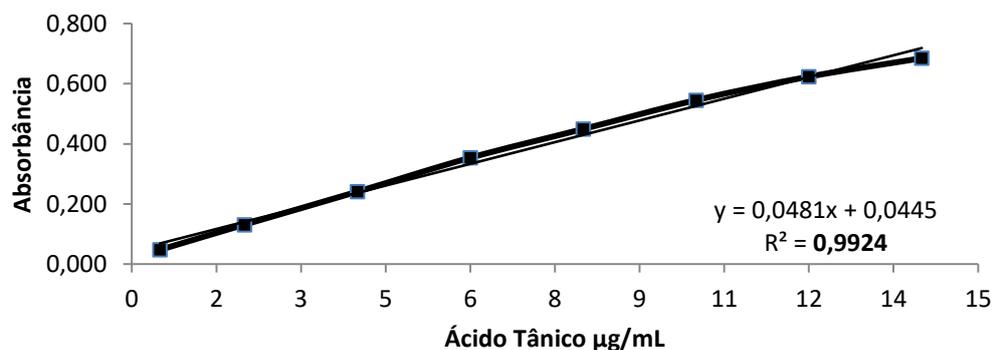
Tabela 12 - Valores da triplicata das absorvâncias do padrão de AT aplicando-se 700 µL do RFC

AT (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

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

Os resultados das três curvas de calibração não apresentaram valores de absorvância com diferenças estatisticamente significativas entre si, de acordo com o teste ANOVA, com $F_{\text{calculado}} (0,005) < F_{\text{tabelado}} (3,467)$. Além disso, as curvas de calibração demonstraram-se lineares resultando no gráfico apresentado na Figura 11 que compreende a média das três curvas, sendo definida pela equação da reta $y = 0,0481x + 0,0445$, com $R^2 = 0,9924$.

Figura 11 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando-se 700 µL de reagente de Folin-Ciocalteu.

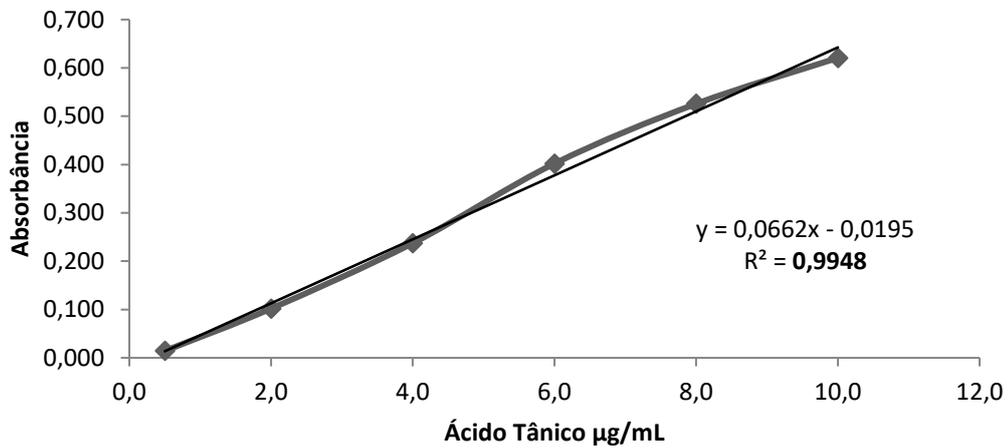


Fonte: Dados da pesquisa.

5.6.2 Definição da quantidade de caseína para complexação dos taninos totais

Após definida a alíquota ideal do RFC, o passo seguinte foi verificar a menor quantidade possível de caseína para executar a complexação dos taninos totais para posterior leitura do sobrenadante do extrato. Para tanto, foi obtida uma curva de calibração utilizando 700 μL do RFC, conforme a Figura 12 que resultou na equação da reta $y = 0,0662x + 0,0195$, com $R^2 = 0,9948$.

Figura 12 - Curva de calibração do ácido tânico utilizando-se 700 μL de reagente de Folin-Ciocalteu, aplicada no estudo de definição da massa de caseína para complexação dos taninos.



Fonte: Dados da pesquisa.

Tendo obtida a curva de calibração para avaliação do comparativo entre os quantitativos de caseína 100, 250, 500, 750 e 1000 mg, foi realizado o experimento com as massas citadas e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 13 apresentada abaixo:

Tabela 13 - Avaliação da influência do quantitativo de caseína sobre o doseamento de taninos totais de *S. cumini*.

Parâmetros	Taninos Totais (mg EAT/g) ± dp	CV (%)
Caseína 100 mg	2,3783 ± 0,013	0,55
Caseína 250 mg	2,4029 ± 0,009	0,37
Caseína 500 mg	2,6215 ± 0,063	2,29
Caseína 750 mg	2,7013 ± 0,008	0,31
Caseína 1000 mg	2,9124± 0,006	0,19

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

Os dados da Tabela 13 demonstraram 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 significativamente maior que o F_{tabelado} , evidenciando o decaimento da concentração de taninos totais ao diminuir a massa de caseína, indicando a saturação desta. Devido a isso, elegeu-se a porção de 1000 mg de caseína na condução dos experimentos, resultando assim em respostas seguras.

5.6.3 Avaliação do tempo de complexação da caseína com os taninos totais

Com a definição da menor porção de caseína capaz de complexar os taninos 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 30 min. Estes resultados estão descritos na Tabela 14, abaixo:

Tabela 14 - Avaliação dos tempos de complexação da caseína com taninos totais sobre o doseamento de taninos totais de *S. cumini*.

Parâmetros	Taninos Totais (mg EAT/g) ± dp	CV (%)
30 min	2,9717 ± 0,009	0,29
1:30 h	3,0431 ± 0,009	0,29
3 h	2,9894 ± 0,012	0,39

Legenda: dp – desvio padrão; CV – Coeficiente de variação; EAT – Equivalente de Ácido Tânico; CV – Coeficiente de Variação.

Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com a Tabela 14, os resultados obtidos foram semelhantes quando comparados os tempos de 1:30 h e 30 min, com 3 h para o doseamento de taninos totais. Sendo confirmado pelo teste ANOVA onde para taninos totais os tempos de 30 min e 1:30h apresentaram $F_{\text{calculado}} (0,262445) < F_{\text{tabelado}} (4,493998)$ e $F_{\text{calculado}} (2,414927) < F_{\text{tabelado}} (4,493998)$, respectivamente, quando comparados com 3 h de complexação provando não haver diferença estatisticamente significativa entre os tempos avaliados.

Ademais, quando os tempos de 30 min, 1:30 h e 3 h foram comparados simultaneamente, estes também não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, uma que no teste ANOVA foi verificado que o $F_{\text{calculado}} (2,411821) < F_{\text{tabelado}} (3,402826)$ confirmando não haver diferença entre os tempos de complexação. Portanto, o tempo de 30 min de complexação de caseína com os taninos totais foi o escolhido para dar prosseguimento aos experimentos, resultando em ganho de tempo significativo para resposta analítica.

5.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

5.7.1 Avaliação da cinética da curva de calibração

Devido à necessidade de haver uma reação entre o RFC com o AT para quantificação dos polifenóis totais no espectrofotômetro, analisamos a cinética de reação ao longo do tempo de 30 a 240 minutos resultando em valores de absorvância obtidos para cada curva que estão representados na tabela 15.

Tabela 15 - Valores de absorvância da curva de calibração lida após 30, 60, 120, 180 e 240 minutos.

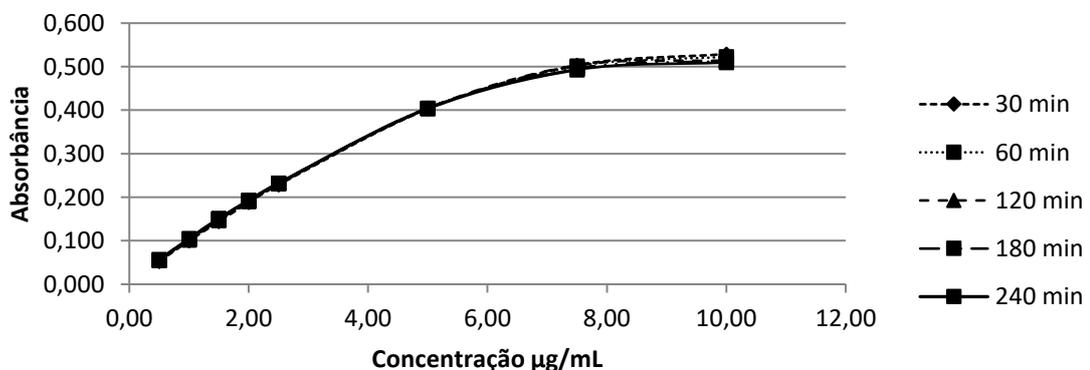
AT ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias				
	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min
0,5	0,052	0,055	0,055	0,057	0,056
1,0	0,100	0,102	0,102	0,105	0,105
1,5	0,144	0,147	0,148	0,151	0,151
2,0	0,188	0,190	0,191	0,193	0,193
2,5	0,229	0,231	0,231	0,233	0,232
5,0	0,403	0,404	0,404	0,405	0,404
7,5	0,503	0,501	0,503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

Legenda AT – Ácido Tânico.

Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com a tabela 15 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 13 o comportamento semelhante das curvas avaliadas.

Figura 13 - Curva de calibração lida após 30, 60, 120, 180 e 240 minutos.



Fonte: Dados da pesquisa.

Portanto, os resultados obtidos demonstraram que as curvas de calibração avaliadas permaneceram estáveis por até 4 horas, sendo tempo suficiente para a realização da avaliação de taninos totais, sem que esta tivesse proporcionado resultados duvidosos em função de uma possível desestabilização.

5.7.2 Avaliação da estabilidade das soluções reagentes

Foi efetuada a avaliação das estabilidades das soluções reagentes, utilizadas para o preparo das curvas de calibração aplicadas no estudo, resultando nos dados que estão sumarizados na Tabela 16 a seguir.

Tabela 16 - Valores de absorvância obtidas na avaliação da estabilidade das soluções reagentes após 1°, 2° 3° 14° e 49° dia.

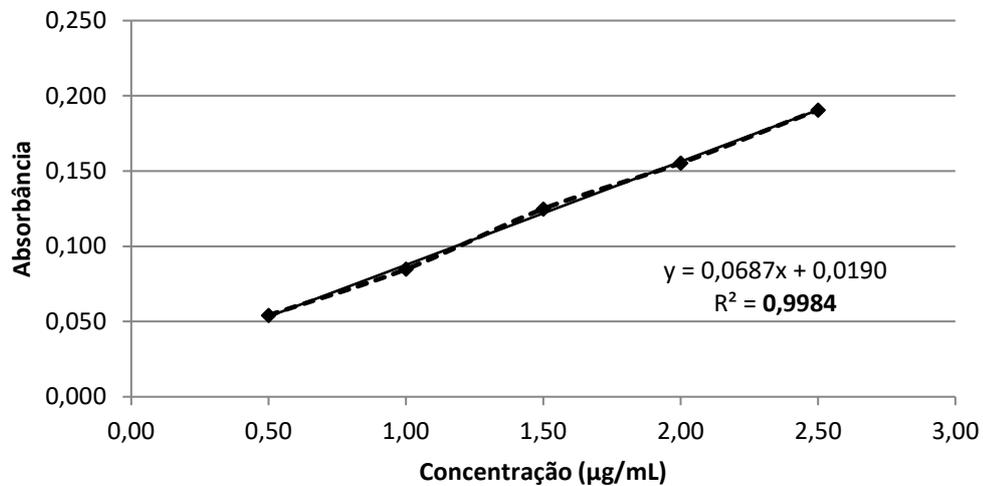
AT (µg/mL)	Absorbâncias				
	1° dia	2° dia	3° dia	14° dia	49° dia
0,5	0,047	0,074	0,053	0,048	0,049
1,0	0,081	0,085	0,088	0,077	0,093
1,5	0,121	0,126	0,125	0,117	0,135
2,0	0,156	0,157	0,157	0,141	0,165
2,5	0,195	0,193	0,193	0,168	0,205

Legenda: AT – Ácido Tânico.
Fonte: Dados da pesquisa.

A partir dos dados observados na Tabela 16 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, a Figura 14 representa a curva de calibração obtida pelas médias das curvas avaliadas, sendo definida pela equação da reta $y = 0,0687x + 0,0190$, com $R^2 = 0,9984$.

Figura 14 - 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 polifenóis 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.

5.7.3 Estabilidade da solução extrativa

Após o desenvolvimento do método para doseamento de taninos e polifenóis totais (curva de calibração com 700 µL RFC; 1 g de caseína; 30 min. de complexação), foi avaliada a estabilidade dos extratos em temperatura ambiente e sob refrigeração. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

5.7.3.1 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 17 estão relatados os resultados obtidos na avaliação da estabilidade do extrato etanol:água (1:1, v/v) de *S. cumini*.

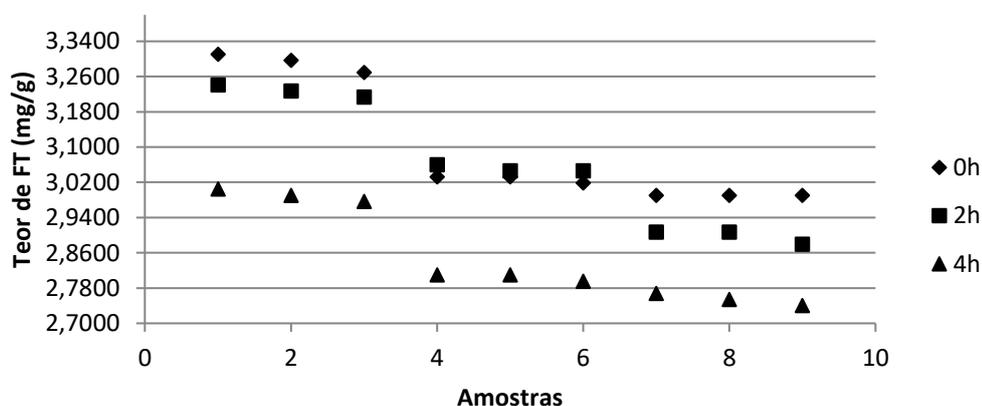
Tabela 17 - Resultados da avaliação dos teores de taninos totais e polifenóis totais de *S. cumini* no estudo de estabilidade do extrato sem refrigeração.

Parâmetros	Taninos Totais (mg EAT/g) ± dp	CV (%)	Polifenóis 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

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

De acordo com o demonstrado na Tabela 17 o tempo de 4h apresentou menores valores de teor tanto para taninos quanto para polifenóis 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 polifenóis 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 polifenóis totais apresentaram decaimento gradativo de seus teores, em especial quando comparados os tempos 0 h com 4 h principalmente para polifenóis totais, conforme apresentado na Figura 15 abaixo.

Figura 15 - Valores de polifenóis totais doseados do extrato de *S. cumini* após 0, 2 e 4 h de extração.



Fonte: Dados da pesquisa.

5.7.3.2 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 18 a seguir.

Tabela 18 - Avaliação dos teores de taninos totais e polifenóis totais de *S. cumini* no estudo de estabilidade do extrato sob refrigeração.

Parâmetros	Taninos Totais (mg EAT/g) ± dp	CV (%)	Polifenóis 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

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

De acordo com a Tabela 18 houve bastante variação entre as respostas obtidas na avaliação da estabilidade do extrato de *S. cumini*, uma vez que apenas os teores de polifenóis 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 se conhecer melhor o extrato de *S. cumini* no que se refere a estabilidade.

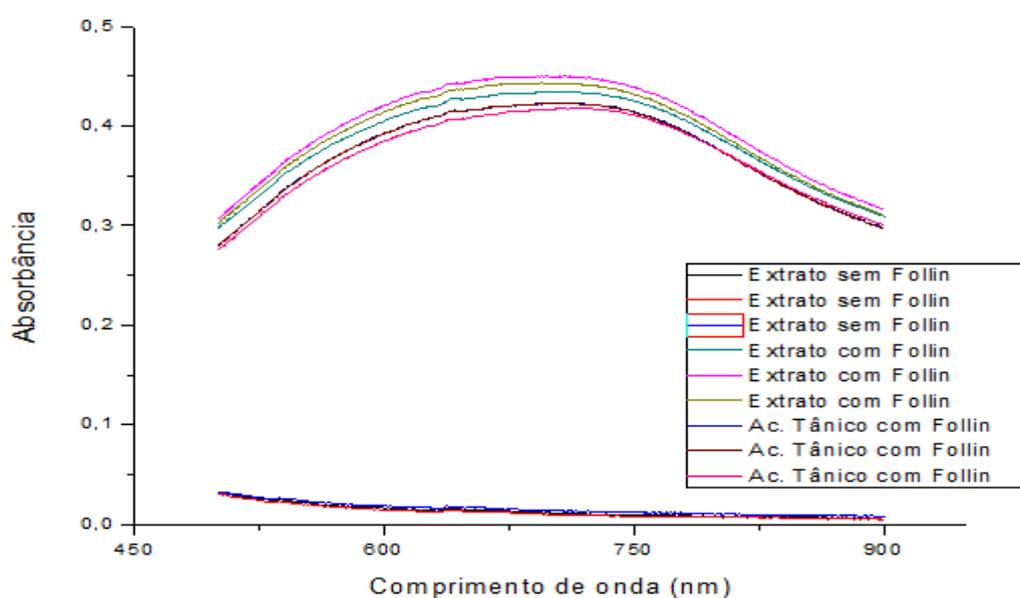
5.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS E TANINOS TOTAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS DE *S. cumini*

5.8.1 Especificidade

Considerar um método específico significa que ele possui a capacidade de medir exatamente complexos específicos, independente da matriz da amostra e de suas impurezas. Na Figura 16 estão apresentados os espectros de varredura obtidos para as amostras do extrato

de *S. cumini* com e sem adição do RFC, em comparação com os espectros dos padrões de AT, após adição do RFC. Observa-se que não há absorvância 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 absorvância em 706 nm.

Figura 16 - Espectros de varredura obtidos na análise de especificidade com e sem adição de Folin-Ciocalteu para determinação de polifenóis para *S. cumini*.



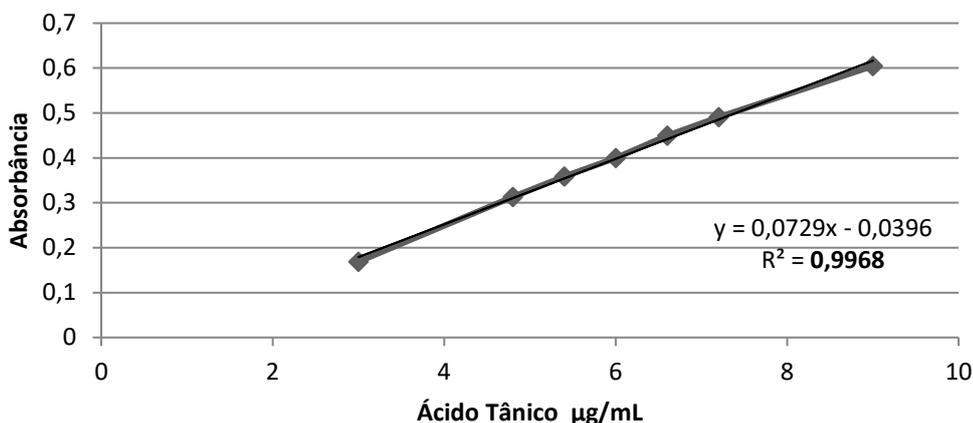
Fonte: Dados da pesquisa

5.8.2 Linearidade, limites de detecção e quantificação de polifenóis totais e taninos totais

A linearidade de um método demonstra que o valor de absorvância obtido, correlaciona a 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 μg EAT/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 ($y = 0,0729x - 0,0396$, 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 (Figuras 17 e 18).

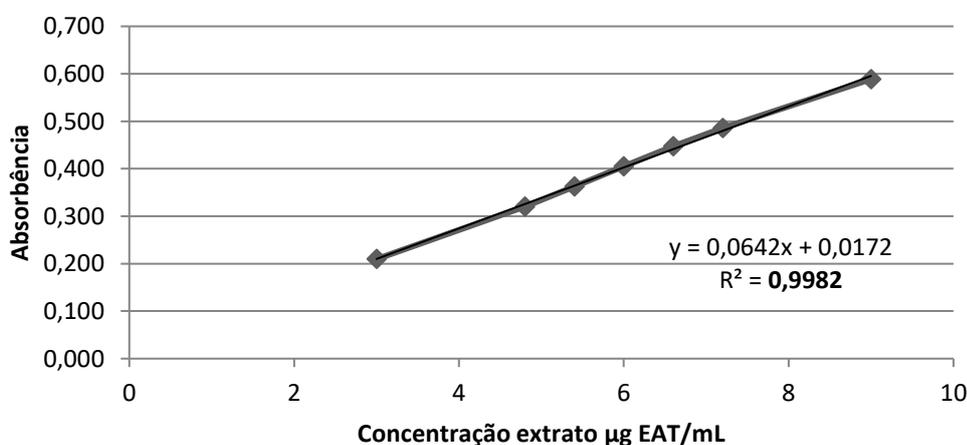
Figura 17- Linearidade da curva padrão para polifenóis totais.



Fonte: Dados da pesquisa

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 0,314 µg AT/mL para solução padrão e 0,275 e 1,046 µg EAT/mL para solução extrativa, respectivamente. Com esses resultados, verificou-se que os procedimentos proporcionaram uma resposta espectrofotométrica com sensibilidade para detecção e quantificação dos polifenóis totais de *S. cumini* com a confiabilidade desejada.

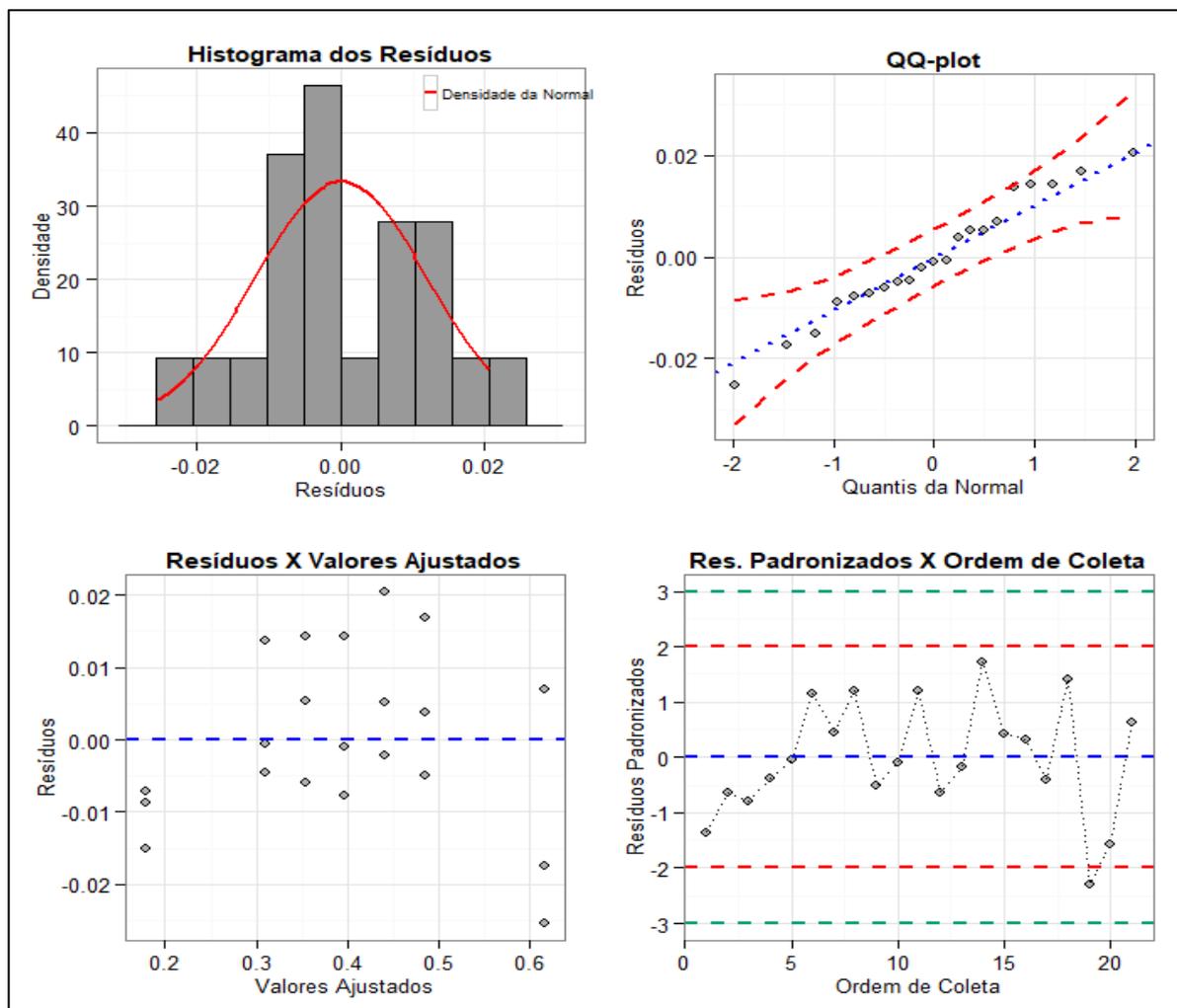
Figura 18 - Linearidade da solução extrativa para polifenóis totais



Fonte: Dados da pesquisa.

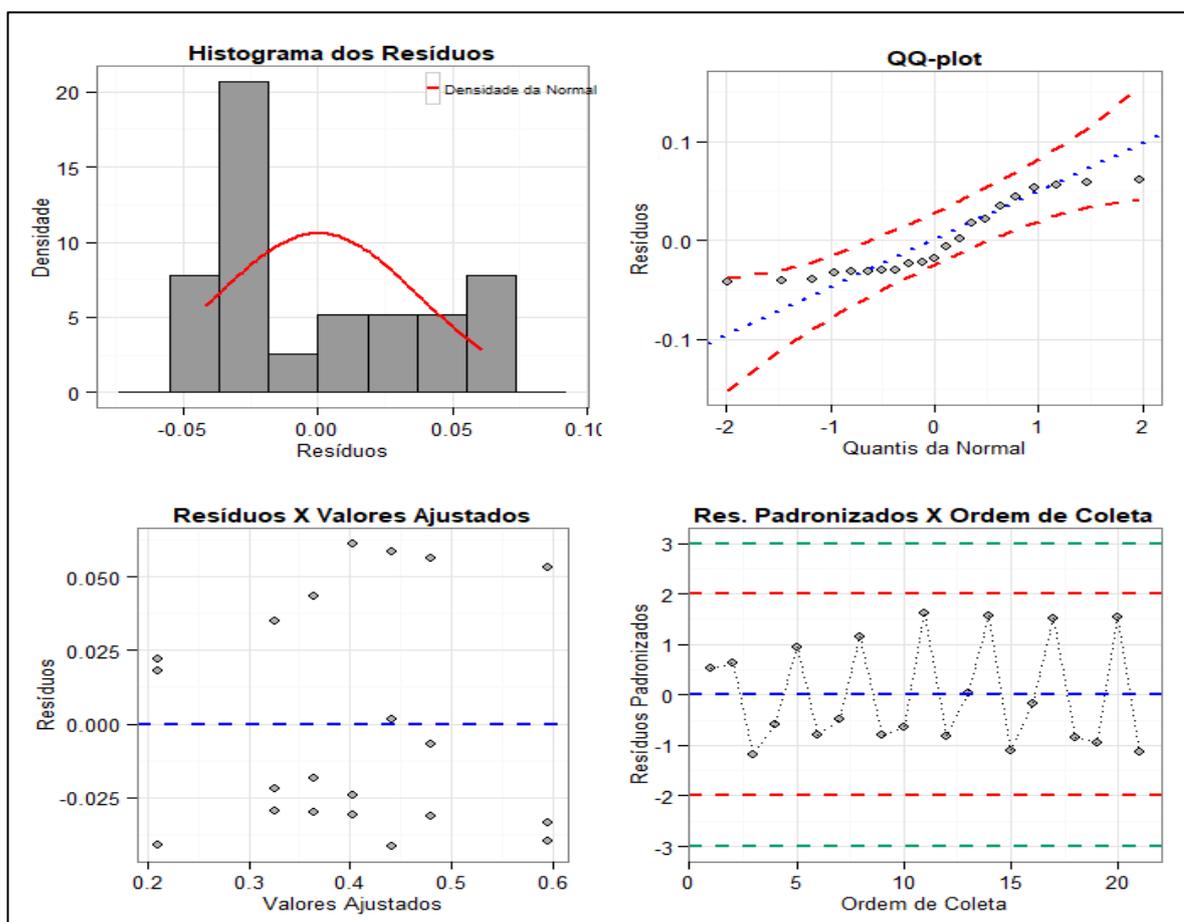
O método se mostrou homocedástico ao nível de significância de 5% para polifenóis totais de acordo com o teste de Cochran que resultou em p-valor (0,6742) para a curva realizada com o padrão e p-valor (1) para a curva realizada com a solução extrativa (Figuras 19 e 20).

Figura 19- Plotagem de resíduo para polifenóis totais da curva padrão.



Fonte: Dados da pesquisa.

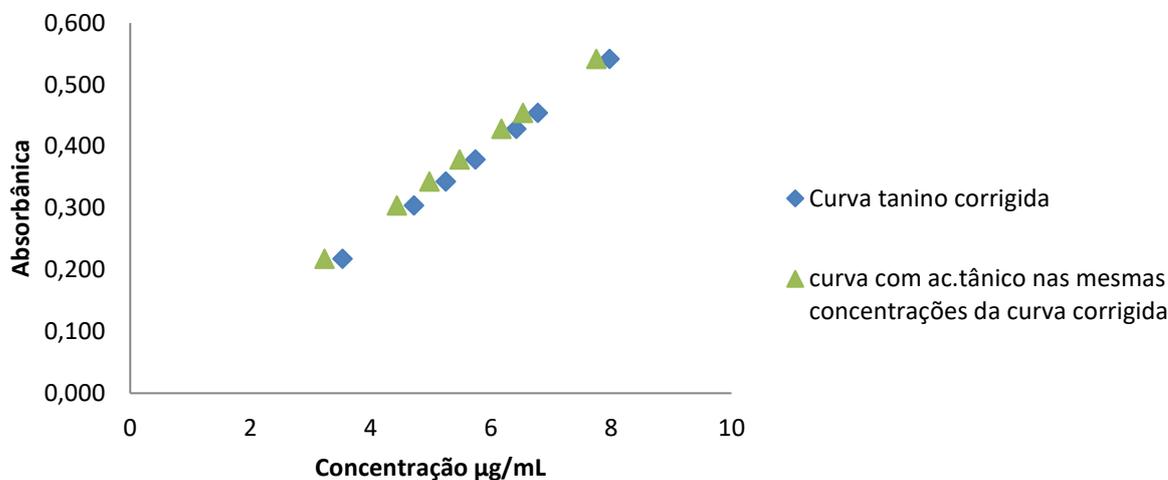
Figura 20 - Plotagem de resíduo da curva padrão da solução extrativa para polifenóis totais.



Fonte: Dados da pesquisa

Para o desenvolvimento da solução padrão para taninos totais foi realizada uma curva de concentrações conhecidas de tanino total do extrato corrigida pela curva de AT para polifenóis totais dando as seguintes concentrações: 3,54; 4,72; 5,25; 5,74; 6,42; 6,78 e 7,98 μg EAT/mL, depois de verificar as concentrações de cada alíquota, seu comportamento de absorbância foi comparado com uma curva de AT feita com as mesmas concentrações. A figura 21 mostra a correlação das concentrações entre as amostras quando comparado com as absorbâncias, identificando que não há diferença significativa entre elas de acordo com o 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.

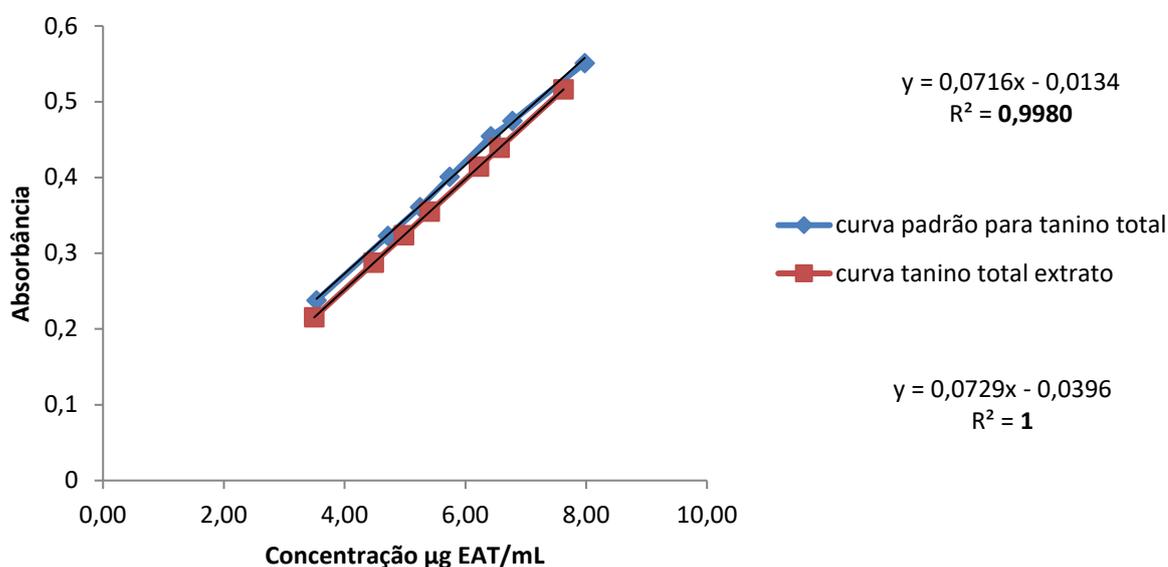
Figura 21 - Comparativo entre os resultados das concentrações de taninos totais feito com a solução extrativa de *S. cumini* e com ácido tânico.



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 µg/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 22. 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 22 -Linearidade realizada para solução padrão e para solução extrativa.

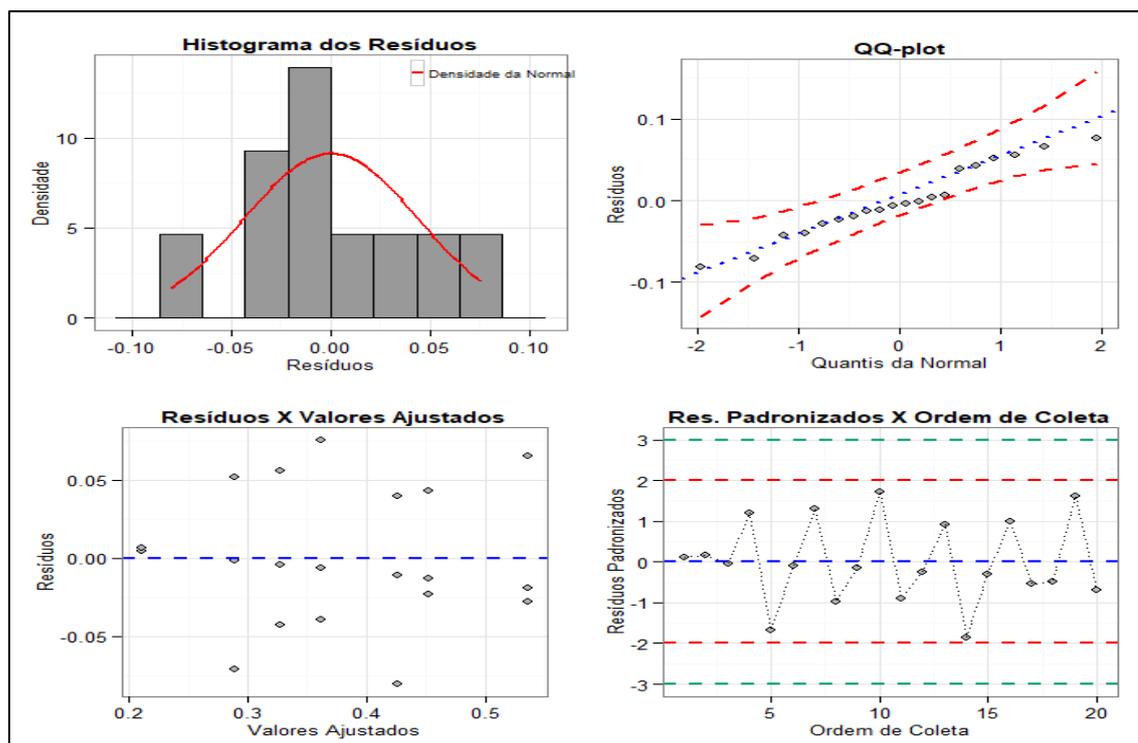


Fonte: Dados da pesquisa

Os valores dos limites de detecção e de quantificação foram 0,100 e 0,894 µg AT/mL para solução padrão e 0,102 e 0,912 µg EAT/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.

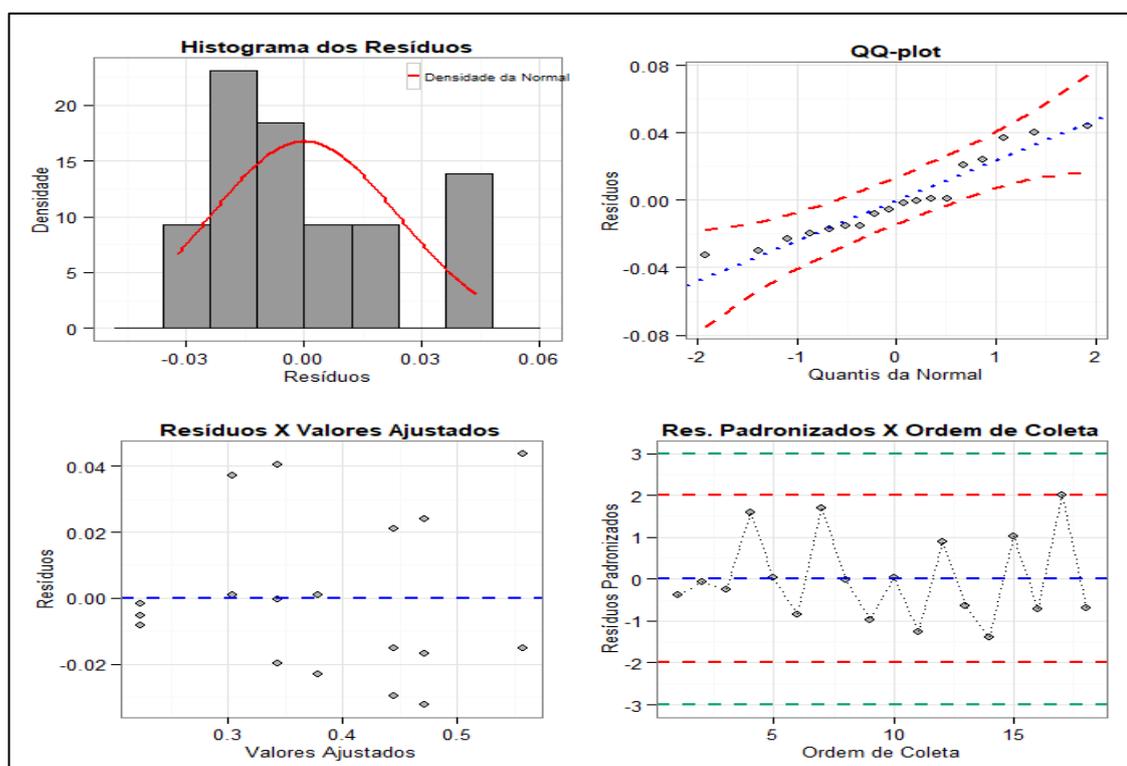
O método se mostrou homocedástico ao nível de significância de 5% para taninos totais de acordo com o teste de Cochran que resultou no p-valor (1) para a curva realizada com o padrão e p-valor (0,7096) para a curva realizada com a solução extrativa (figuras 23 e 24).

Figura 23 - Plotagem de resíduo da curva padrão para taninos totais.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 24 - Plotagem de resíduo da curva padrão da solução extrativa para taninos totais.



Fonte: Dados da pesquisa.

5.8.3 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 19, 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 do teste ANOVA *One-Way* para quantificação de polifenóis totais e taninos totais. Além disso, para variação da marca do equipamento o método também se mostrou robusto para polifenóis totais e taninos totais, pois o $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ através do teste ANOVA *One-Way*.

Tabela 19 - Análise de robustez.

Parâmetros	Teor PFT (μg EAT/mL) \pm DP	Teor TT (μg EAT/mL) \pm DP	F. calculado PFT/TT	F. tabelado PFT/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®	6,192 \pm 0,093	5,776 \pm 0,118	1,508/5,467	7,709/ 7,709
Equipamento Micronal®	6,259 \pm 0,062	5,858 \pm 0,802		

Legenda: PFT= Polifenóis totais; TT = Taninos totais; DP = Desvio padrão; EAT – Equivalente de Ácido Tânico.
Fonte: Dados da pesquisa.

5.8.4 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 repetibilidade e da precisão intermediária. No ensaio de repetibilidade a solução extrativa apresentou um teor médio de polifenóis totais de 6,642 μg EAT/mL \pm 0,858 (12,91%) e taninos totais de 5,621 μg EAT/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 polifenóis totais (Tabela 20) e taninos totais (Tabela 21).

Tabela 20 - Análise da precisão intermediária para polifenóis totais.

Parâmetros	PFT µg EAT/mL ± DP (CV%) (1)	PFT µg EAT/mL ± DP (CV%) (2)	F tabelado	F calculado
Dias 1 e 2	7,169 ± 0,708 (9,87%)	7,211 ± 0,119 (1,65%)	5,317	1,222
Analistas 1 e 2	6,233 ± 0,072 (1,16%)	6,151 ± 0,103 (1,68%)	3,466	0,020

Legenda: PFT= Polifenóis totais; TT = Taninos totais; DP = Desvio padrão; EAT – Equivalente de Ácido Tânico; CV – Coeficiente de Variação.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 21 - Análise da precisão intermediária para taninos totais.

Parâmetros	TT µg EAT/mL ± DP (CV%) (1)	TT µg EAT/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

Legenda: PFT= Polifenóis totais; TT = Taninos totais; DP = Desvio padrão; EAT – Equivalente de Ácido Tânico; CV – Coeficiente de Variação.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.8.5 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 polifenóis totais e de 100% para taninos totais, com confiança de 95% (Tabela 22 e 23). 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 22 - Teste de recuperação para polifenóis totais.

Solução extrativa (μg EAT/mL) + Ác. Tânico ($\mu\text{g/mL}$)	Valor teórico PFT (μg EAT/mL)	Valor real PFT (μg EAT/mL) \pm DP	Recuperação %
4,8 + 1	5,80	5,771 \pm 0,002	99,498
6,0 + 1	7,00	6,967 \pm 0,005	99,534
7,2 + 1	8,20	8,051 \pm 0,002	98,192

Legenda: PFT= Polifenóis totais; TT = Taninos totais; DP = Desvio padrão; EAT – Equivalente de Ácido Tânico; CV – Coeficiente de Variação.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 23 - Teste de recuperação para taninos totais.

Solução extrativa (μg EAT/mL) + Ác. Tânico ($\mu\text{g/mL}$)	Valor teórico TT (μg EAT/mL)	Valor real TT (μg EAT/mL) \pm DP	Recuperação %
4,20 + 1	5,20	5,200 \pm 0,017	99,995
5,14 + 1	6,14	6,150 \pm 0,019	100,16
6,05 + 1	7,05	7,0510,019	100,01

Legenda: PFT= Polifenóis totais; TT = Taninos totais; DP = Desvio padrão; EAT – Equivalente de Ácido Tânico; CV – Coeficiente de Variação.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.9 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO EXTRATIVO

5.9.1 Planejamento experimental

A Tabela 24 traz os valores de reposta obtidos no planejamento Box Behnken para otimização da extração de polifenóis totais e taninos totais das folhas de *S. cumini*.

Tabela 24 -Respostas obtidas do planejamento experimental de Box-Behnken para otimização da EAM de polifenóis totais e taninos totais das folhas de *S. cumini*.

Amostra	Fatores codificados ^a				Respostas	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	CPFT (mg/g)	CTT (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

Legenda: CTPF – Concentração de Polifenóis Totais; CTT – Concentração de Taninos Totais.

^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 polifenóis 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), enquanto para proporção droga/solvente (1/25 g/mL) e concentração etanólica (50%) foram os valores médios. 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 polifenóis 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 25). 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 polifenóis totais e 0,85 para taninos totais, indicando uma forte correlação entre os fatores independentes e as respostas. Retirando os efeitos não significativos no intervalo de confiança, a equação estimada pelo modelo para a quantificação de CPFT (Eq. 1) e CTT (Eq. 2) segue:

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

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

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; KULLU et al., 2014; CAMEL, 2000).

Tabela 25 - Efeitos estimados por regressão de mínimos quadrados e ANOVA do delineamento experimental de Box-Behnken para otimização de CPFT e CTT presentes na solução extrativa obtida por EAM. Valores significativos ($p < 0,05$) estão marcados em **negrito**.

Fatores	Coeficientes	
	(Y ₁) CPFT (mg EAT/g)	(Y ₂) CTT (mg EAT/g)
Intercepto	35,39154	29,89255
(X₁) Tempo de extração (min) (L)	11,33061	9,37228
(X₁) Tempo de extração (min) (Q)	4,94169	5,30938
(X₂) Potência do microondas (w) (L)	7,06006	4,84714
(X₂) Potência do microondas (w) (Q)	-0,19753	0,45735
(X₃) Proporção Droga vegetal/Solvente (g/mL) (L)	5,00912	8,33603
(X₃) Proporção Droga vegetal/Solvente (g/mL) (Q)	7,01044	9,02052
(X₄) Concentração etanólica (%) (L)	-9,32137	-8,80187
(X₄) Concentração etanólica (%) (Q)	5,89353	5,31803
X₁ (L)×X₂ (L)	-1,10572	-2,06654
X₁ (L)×X₃ (L)	8,07468	11,83094
X₁ (L)×X₄ (L)	4,14548	4,15190
X₂ (L)×X₃ (L)	3,27400	8,77698
X₂ (L)×X₄ (L)	1,25650	1,22392
X₃ (L)×X₄ (L)	-6,68935	-6,73917
ANOVA		
Erro puro	34,454	12,707
Falta de ajuste	892,253	1127,539
R²	0,86327	0,85082

Legenda: EAT – Equivalente de Ácido Tânico; CTPF – Concentração de Polifenóis Totais; CTT – Concentração de Taninos Totais.

Fonte: Dados da pesquisa.

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 (Y₂). 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 concentração etanólica 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 X₃ e X₄, 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 concentração etanólica 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.

5.9.1.1 Superfície de resposta e função desejabilidade

Após ajustar um modelo adequado para explicar as variações do CPFT e CTT através de um modelo quadrático, a escolha pelas melhores condições extrativas ocorreu através da aplicação de uma desejabilidade global (D) proposta por Derringer & Suich (1980) que varia entre 0 e 1, e pode ser expressa por (Eq. 3):

$$D = (d_1(Y_1) \times d_2(Y_2))^n \quad (3)$$

Onde d_i é a desejabilidade individual de cada resposta Y_i e n é o número de respostas (neste caso, 2). Se uma resposta é considerada completamente indesejável, então o valor d seria 0, sendo 1 a situação mais desejável. Para estimar valores de d , deve-se decidir se cada resposta Y_i deve ser maximizada ou minimizada. No nosso caso, tanto o CPFT quanto o CTT devem ser maximizados, portanto, os valores d podem ser calculados por (Eq. 4):

$$d_i(Y_i) = \left(\frac{Y_i - L_i}{H_i - L_i} \right)^s \quad (4)$$

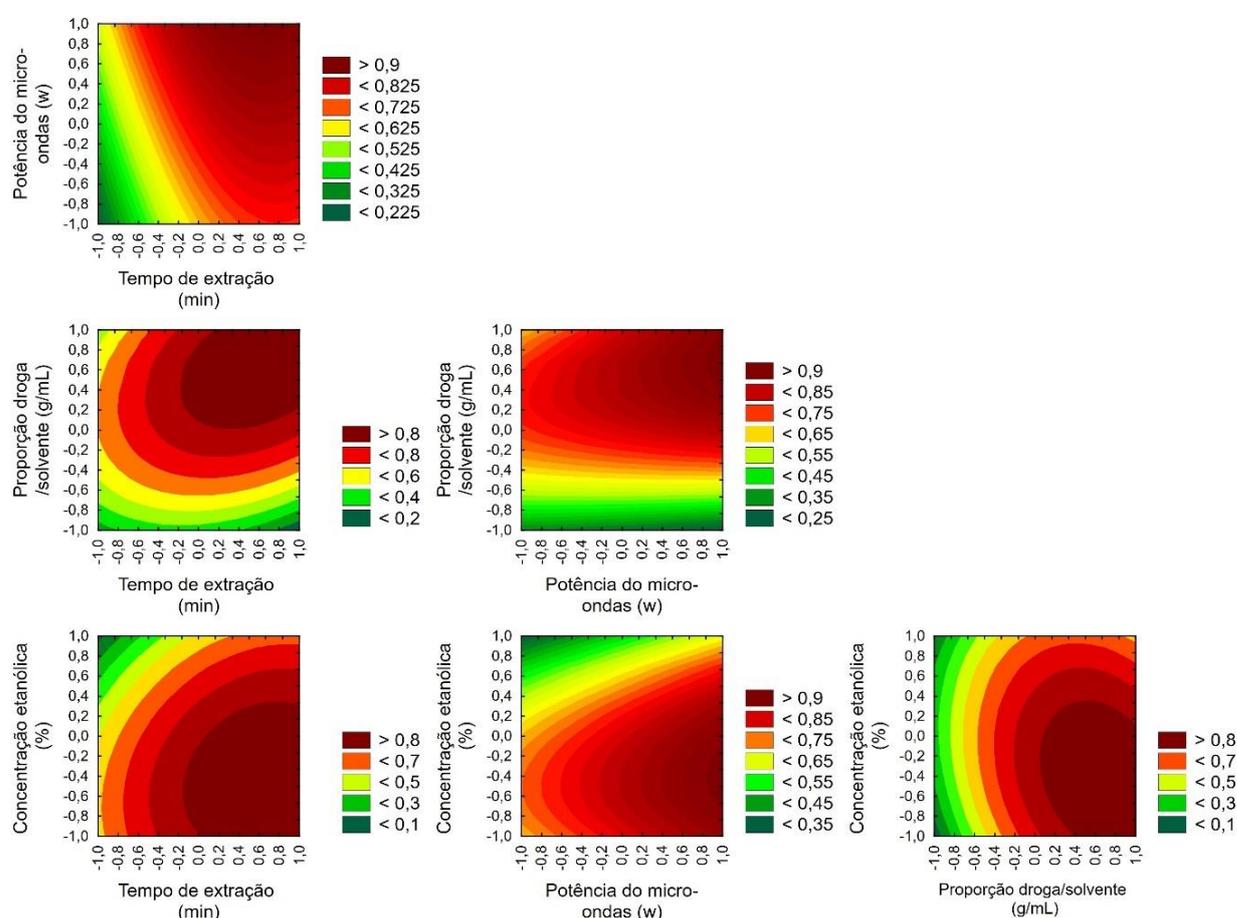
Onde L_i é a resposta mais baixa, H_i é a resposta mais alta e s a curvatura na qual o alvo d_i é construído (isto é, quão importante é considerada a resposta mais alta).

No delineamento experimental as Eq. 1 e 2 foram utilizadas para estimar as respostas entre os níveis inferior e superior (-1 a +1) dos fatores independentes em uma escala de 0,2, então para cada resposta Y , um valor de desejabilidade foi atribuído e os contornos para superfície de resposta foram analisados (figura 25).

Particularmente, a concentração etanólica 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 0,2 níveis para as variáveis independentes, fixando a concentração etanólica em função dos outros fatores independentes (figura 25).

Figura 25 -Contornos das superfícies de respostas obtidas para otimização de extração de polifenóis e taninos totais de folhas de *S. cumini* por EAM. As cores de contorno estão associadas a desejabilidade global entre 0 e 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.

Ademais, a desejabilidade ótima mostrou-se com $X_1 = 0,6$ (8 min), $X_2 = 1$ (300 w), $X_3 = 0,6$ (1/34 g / mL) e $X_4 = -0,4$ (38%) em que D foi igual a 0,98. Esses valores codificados foram então transformados em condições reais de extração e foram testados para obter melhores resultados, o que de fato levou a um maior rendimento de extração quando comparado às condições de extração testadas anteriormente (Tabela 26). Esta foi a condição experimental final adotada para o método de extração.

Tabela 26 -Valores estimados pela função desejabilidade comparados aos resultados experimentais (n = 3) na condição otimizada onde $X_1 = 0.6$ (8 min), $X_2 = 1$ (300 w), $X_3 = 0.6$ (1/34 g/mL) e $X_4 = -0.4$ (38%). O nível de confiança foi estabelecido em 95%.

Função desejabilidade	Estimado	CPFT (mg EAT/g)	CTT (mg EAT/g)
		73.73	71.18
	-95% CI	60.78	63.31
	+95% CI	86.69	79.04
Observado (n=3)	1	85.28	77.84
	2	87.99	80.21
	3	88.83	81.00
Média		87.37	79.68
DP		1.85	1.64
D.P.R. (%)		2.12	2.06

Legenda: CTPF – Concentração de Polifenóis Totais; CTT – Concentração de Taninos Totais; EAT – Equivalente de Ácido Tânico; DP – Desvio Padrão.
Fonte: Dados da pesquisa.

5.10 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO OTIMIZADO DE *S. cumini*

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

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

5.10.2 Descrição macroscópica

O extrato seco de *S. cumini* apresentou-se visualmente como pó marrom claro, com aspecto opaco e odor característico (Figura 26). Além disso, apesar de ser leve, não possui fácil aglomeração evidenciando pouca higroscopicidade.

Figura 26 - Imagem macroscópica do extrato seco de *S. cumini*.



Fonte: Autor.

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

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

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

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 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).

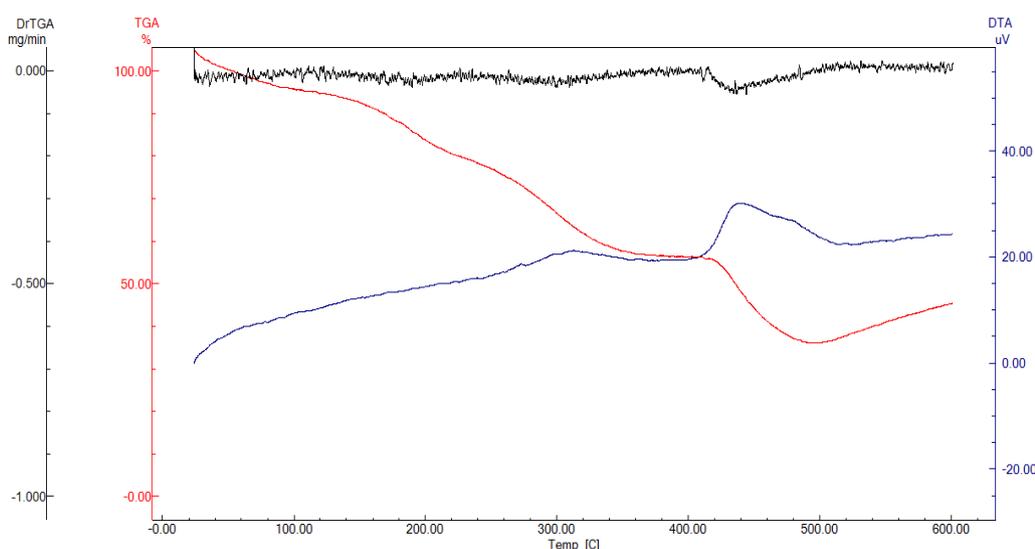
Levando-se em consideração a classificação dos poros da IUPAC [microporos (< 20 Å), mesoporos (entre 20 Å e 500 Å) e macroporos (> 500 Å)] (SANTANA et al., 2012), os resultados obtidos neste estudo para o extrato seco de *S. cumini* demonstram que o produto analisado possui mesoporos, com área superficial definida de 4,1808 m²/g; volume e tamanho de poro de 0,01228 cm³/g e 270,076 Å, 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.

5.10.5 Caracterização térmica

Na Figura 27, 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 metabolitos secundários no processamento do extrato seco vegetal.

Figura 27 - Curva TG/DTG e DTA do extrato seco de *S. cumini*.



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

Fonte: Autor.

5.10.6 Determinação de polifenóis totais e taninos totais

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

5.10.7 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 27) 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 27 - 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).

5.11 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 28). Também foi verificado que os resultados para CIM e CFM foram iguais, pois a mesma dosagem que inibiu o crescimento dos fungos também os matou. Além disso, no estudo foi possível obter respostas exatas para CIM e CFM, com exceção de *Candida tropicalis* que o resultado foi $\leq 10 \mu\text{g/mL}$.

Candida albicans é uma das principais espécies de fungos citadas na literatura para avaliação de atividade antifúngica de plantas medicinais, 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.

Aliannis 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 de *S. cumini* apresentou-se como um forte inibidor de crescimento frente todas às espécies testadas, inclusive para a *Candida haemulonii*, pois os valores das CIM oscilaram 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 µg/mL.

Diante disso, devido a ausência de trabalhos na literatura que evidenciem o potencial antifúngico de extratos secos obtidos de espécies vegetais combinado a eficácia do extrato seco padronizado a base de *S. cumini* avaliado nesse estudo, é possível considerar a possibilidade de obtenção futura de um fitoterápico adjuvante ao tratamento de infecções causadas por fungos dos gêneros *Candida* e *Trichophyton*.

Adicionalmente, na Tabela 29, 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 µg/mL e 1,25 µg/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 28 - Atividade antifúngica do extrato padronizado de *S. cumini*.

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

Legenda: Concentração inibitória mínima CIM; concentração fungicida mínima CFM; American Type Culture Collection ATCC; Extrato *Syzygium cumini*; I: intermediário; S: sensível; R: resistente; Critério de interpretação CIM: CLSI, 2012. Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 29 - 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

Legenda: EHE – Extrato Hidroetanólico; EHEO – Extrato Hidroetanólico Otimizado.
Fonte: Dados da pesquisa.

5.12 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 30 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.

Tabela 30 - Atividade antibacteriana do extrato padronizado de *S. cumini*.

MICRO-ORGANISMOS	CIM/CBM (µg/mL)		
	EXTRATO	OXACILINA*	VANCOMICINA*
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	640/≥1280	ND	1024/≥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/≥256	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 16	160/640	256/≥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

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

- Valores previamente determinados.

Aualmente a literatura carece de pesquisas realizadas com extrato seco de *S. cumini* para avaliação de sensibilidade bacteriana. Por outro lado, alguns trabalhos realizados com essa espécie corroboram com os resultados deste estudo. Loguercio et al. (2005) mostraram 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.

Os resultados da atividade antimicrobiana do extrato seco de *S. cumini* obtidos frente a espécie *S. aureus* apresentados neste trabalho, estão de acordo com os dados publicados por Albuquerque, Soares e Oliveira (2017) que verificaram a mesma atividade no extrato aquoso de *S. cumini* contra isolados de *S. aureus* na concentração de 100 mg/mL, utilizando o método de difusão em Ágar Mueller-Hinton que apresentou halos de inibição de 10 mm para *S. aureus*, porém para *E. faecalis* foi verificado halos com 0 mm evidenciando ausência de inibição.

A atividade antimicrobiana do extrato seco das folhas de *S. cumini* presente neste estudo deve-se, provavelmente, a forte presença de flavonoides e taninos contidos no extrato. Além disso, os flavonoides possuem a capacidade de complexar-se com proteínas e células bacterianas formando complexos irreversíveis, principalmente com aminoácidos nucleofílicos. Tal complexo geralmente leva à inativação de proteínas e perda de função (Cowan, 1999). Semelhantemente, os taninos apresentam função antimicrobiana devido à sua ligação com proteínas adesinas, inibindo várias enzimas, sua complexação com a parede celular e íons metálicos, desestabilizando-a, como também lisando a membrana plasmática (Natalli, et al., 2011).

Os resultados deste trabalho mostram o potencial do extrato seco 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.

5.13 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).

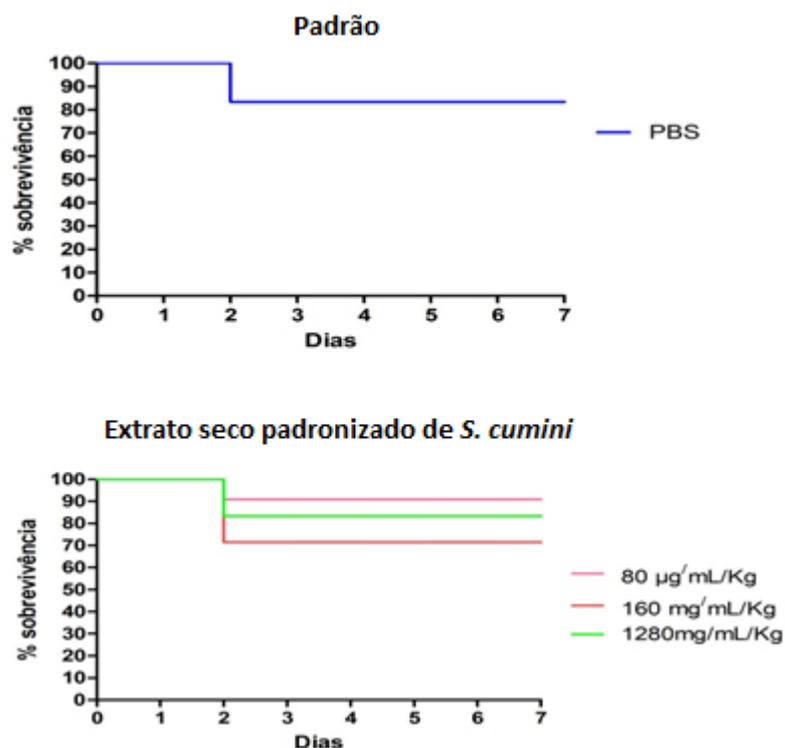
Nas primeiras 24h após a administração do extrato houve sobrevivência de 100% dos indivíduos testados. As mortes ocorreram após 48h da administração, ocasionando letalidade em 6%, 3,33%, 13,33% e 6% nos grupos, controle, 80 µg/mL/kg, 160 mg/mL/kg e 1280 mg/mL/kg, respectivamente. A partir de 72h não houveram mais mortes em nenhum dos grupos, totalizando sobrevivência de 94%, 96,67%, 86,67, 94% dos indivíduos do grupos, controle, 80 µg/mL/Kg ,160 mg/mL/Kg e 1280 mg/mL/Kg, respectivamente (Figura 28).

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 28 - Avaliação da toxicidade do extrato seco padronizado de *S. cumini* em larvas *Tenebrio molitor*.

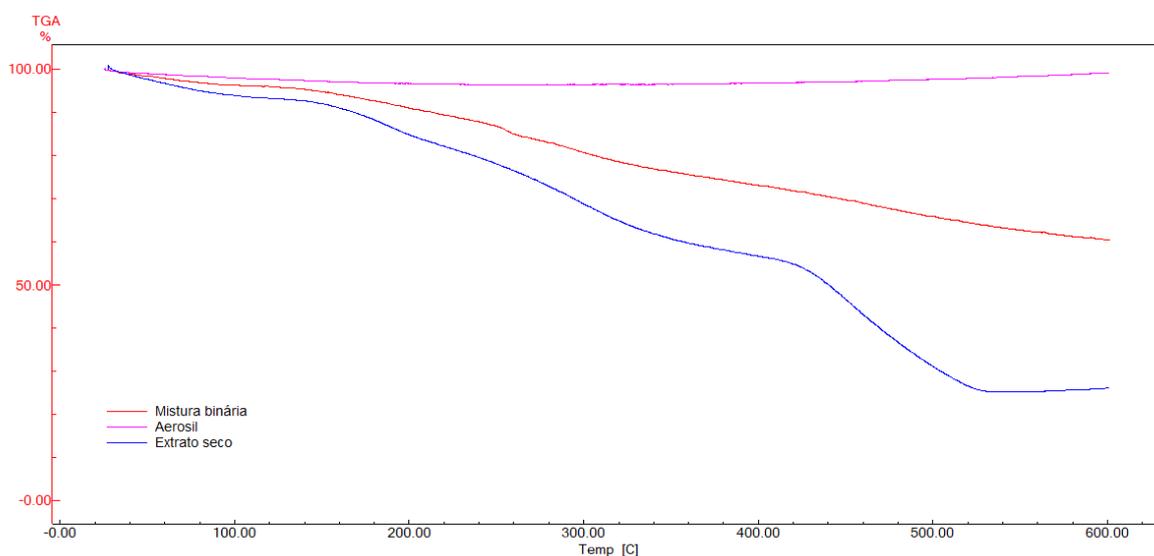


Fonte: Autor

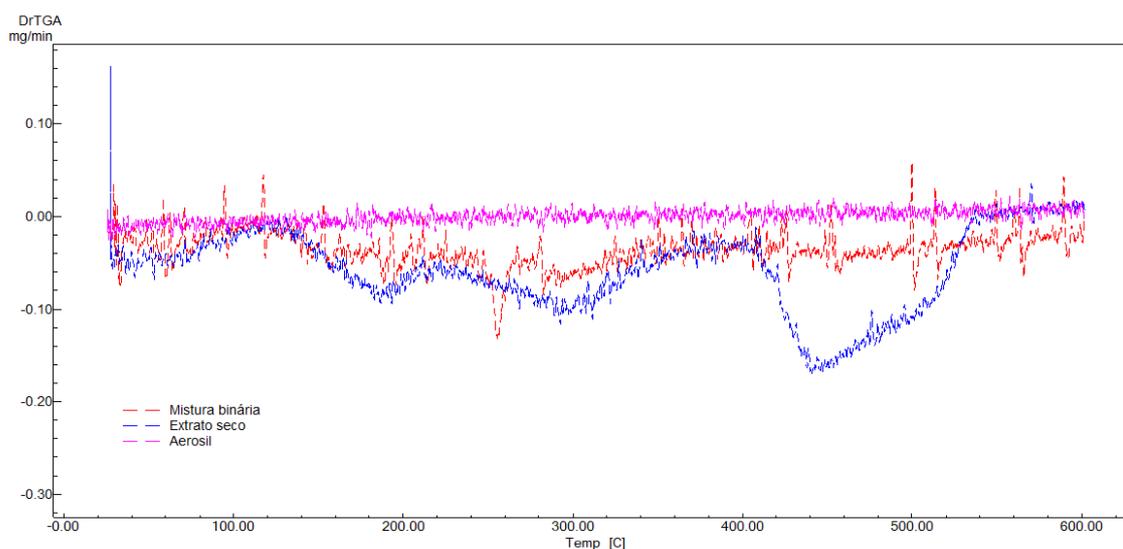
5.14 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE DO EXTRATO SECO DE *S. cumini*:EXCIPIENTES

O estudo de compatibilidade foi realizado por meio da obtenção e comparação das curvas TG/DTG do extrato seco de *S. cumini* e das misturas binárias com os excipientes, na proporção 1:1.

Dito isto, pode-se perceber nas curvas TG (figura 29) e DTG (figura 30) do Aerosil[®], do extrato seco de *S. cumini* e da mistura binária do extrato seco com aerosil, que não há alterações significativas nos eventos térmicos da mistura binária 1:1, uma vez que nesta é possível observar um somatório das amostras isoladas. Ademais, devido a ausência de eventos térmicos no Aerosil[®] pode-se verificar que a linha de base da mistura binária sofreu uma elevação na faixa da temperatura analisada. Portanto, tais resultados corroboram para a inexistência de incompatibilidade entre o extrato sedo de *S. cumini* e o Aerosil[®].

Figura 29-Curvas TG do extrato seco, do Aerosil® e da mistura binária (1:1)

Fonte: Dados da pesquisa.

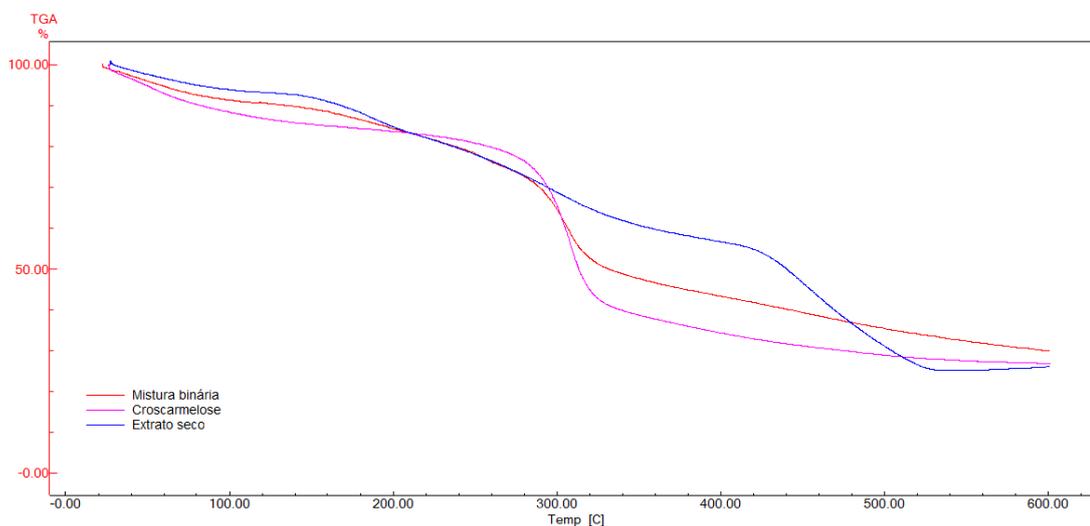
Figura 30 – Curvas DTG do extrato seco, do Aerosil® e da mistura binária (1:1)

Fonte: Dados da pesquisa.

As curvas TG (figura 31) e DTG (figura 32) da Croscarmelose, do extrato seco de *S. cumini* e da mistura binária do extrato seco com a Croscarmelose demonstraram que não houve incompatibilidade entre o extrato e excipiente, uma vez que o início do terceiro evento de degradação do extrato foi deslocado de 263,73°C para 293°C, resultando em um incremento de estabilidade térmica. Vale salientar, que o principal evento térmico de degradação da croscarmelose também foi reproduzido na mistura binária, uma vez que no

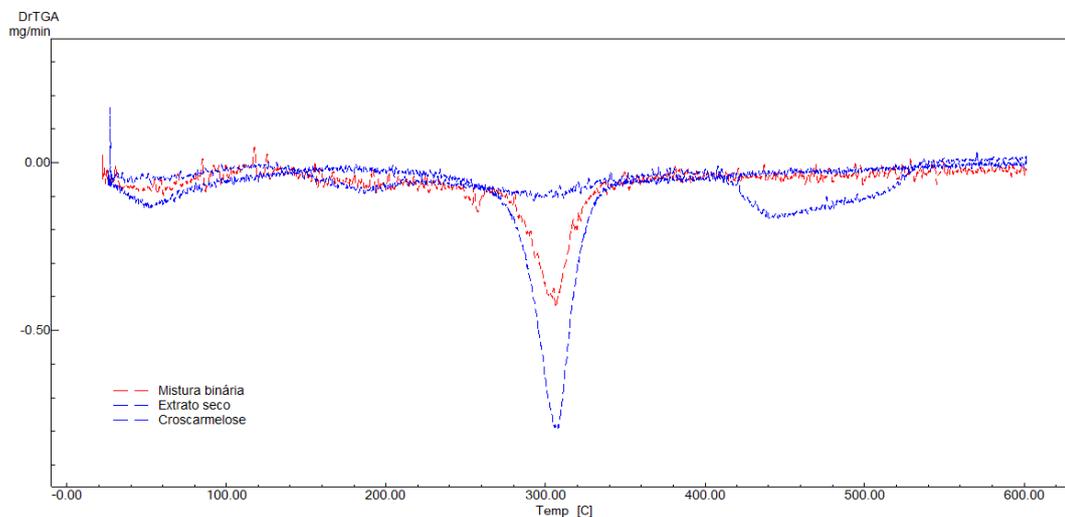
excipiente isolado o início da degradação ocorre em 290°C e na mistura binária tal evento foi evidenciado a partir de 293°C.

Figura 31 - Curvas TG do extrato seco, da Croscarmelose e da mistura binária (1:1)



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 32 - Curvas DTG do extrato seco, da Croscarmelose e da mistura binária (1:1)

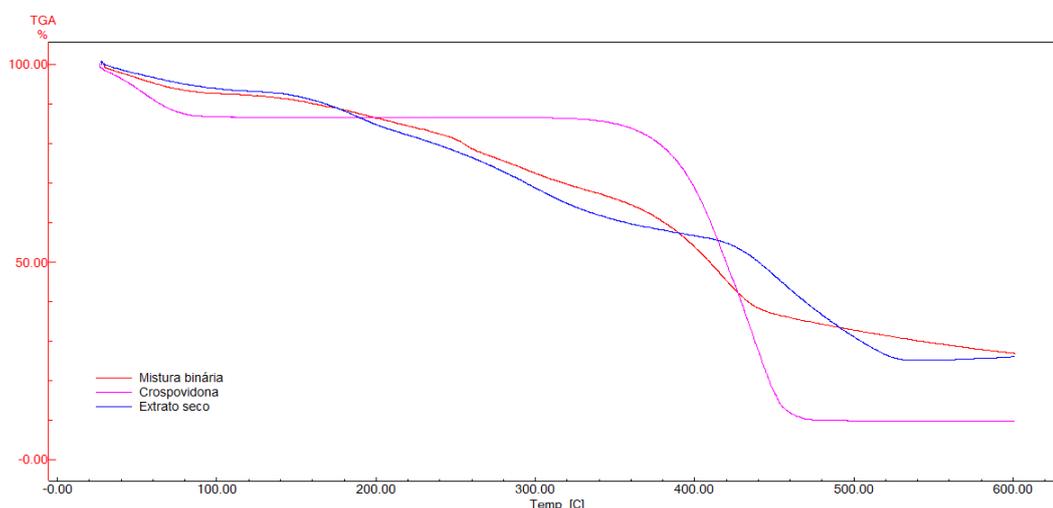


Fonte: Dados da pesquisa.

De modo oposto ao que foi observado para croscarmelose, as curvas TG (figura 33) e DTG (Figura 34) da mistura binária extrato seco:crospovidona, mostraram que houve uma possível incompatibilidade entre esta e o extra seco, em virtude do principal evento de degradação térmica da crospovidona ter sido antecipado de 394 °C no excipiente isolado para 381°C na mistura binária. Ademais, não foi possível observar os eventos térmicos

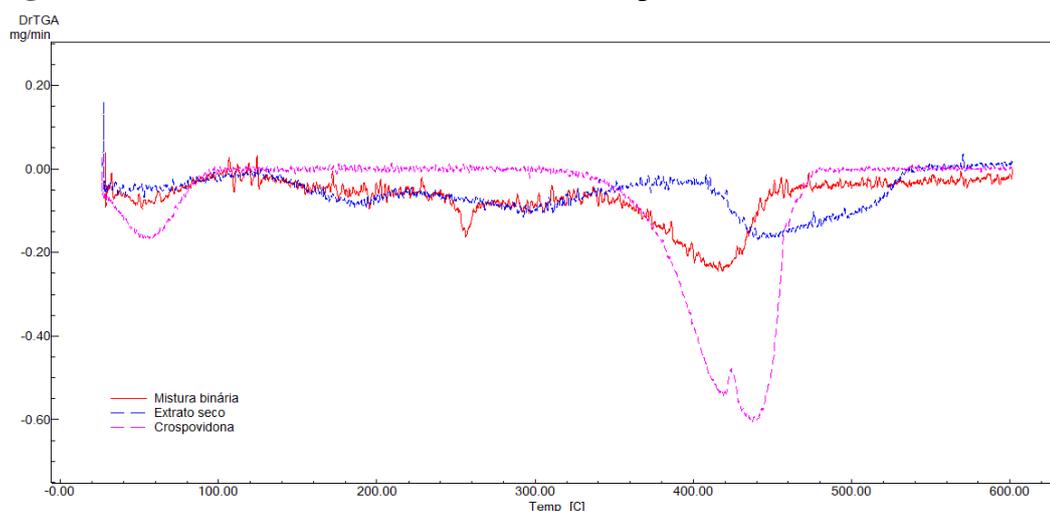
característicos do extrato seco na mistura binária e tal condição, sugere uma interação extrato seco:excipiente.

Figura 33 - Curvas TG do extrato seco, da Crospovidona e da mistura binária (1:1)



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 34 - Curvas DTG do extrato seco, da Crospovidona e da mistura binária (1:1)

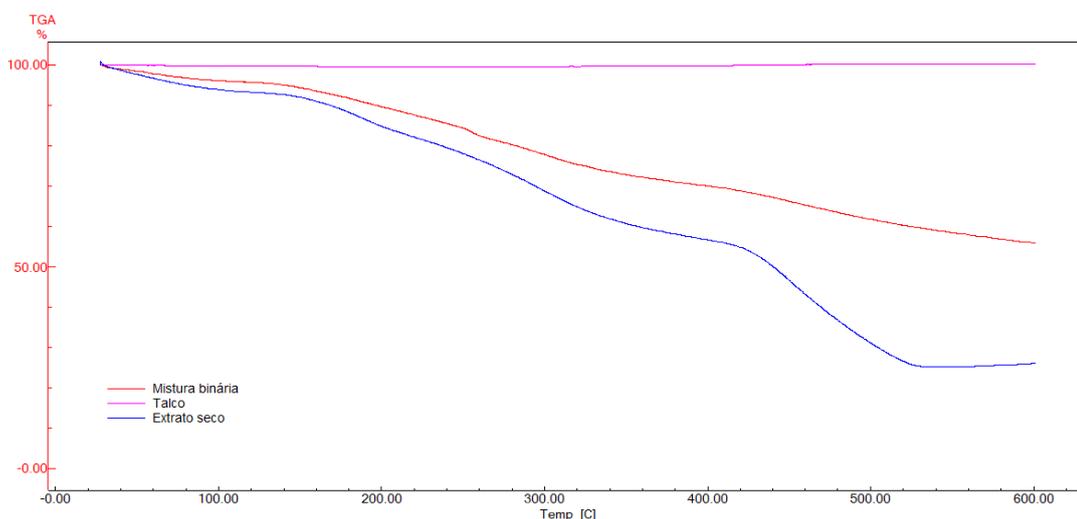


Fonte: Dados da pesquisa.

As análises térmicas realizadas para avaliação da compatibilidade do extrato seco com o talco sugerem que não houve incompatibilidade entre eles uma vez que, nas curvas TG (figura 35) e DTG (figura 36) da mistura binária extrato seco:talco é possível observar todos os principais eventos de degradação térmica apontados na análise do extrato seco isolado nos quais pode-se sugerir a ocorrência de um incremento de estabilidade térmica no extrato seco promovida pelo talco, em virtude do segundo e quarto eventos de perda de massa do extrato seco terem sido deslocados de 156°C e 424°C para 160°C e 442°C, respectivamente. Contudo,

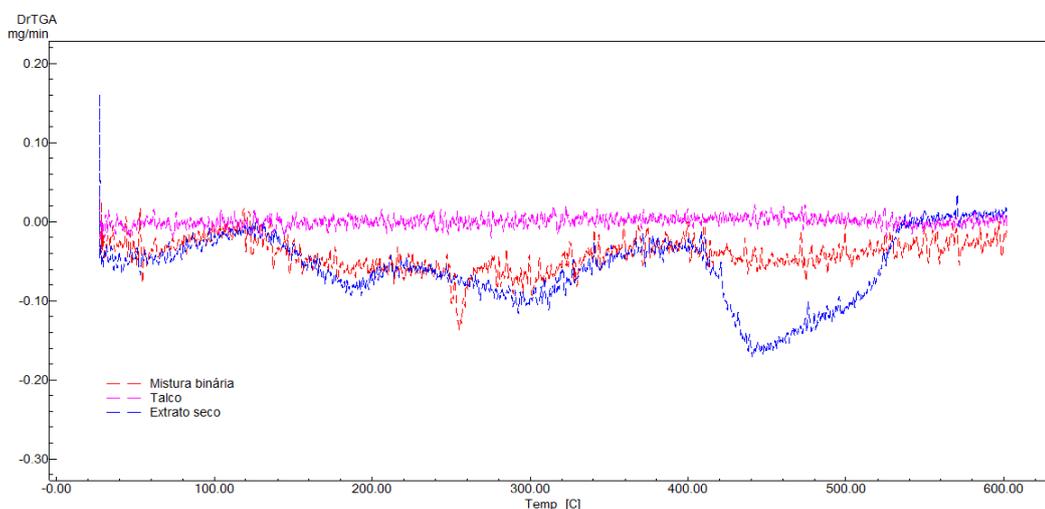
ocorreu uma antecipação do terceiro evento de perda de massa do extrato seco de 263°C para 251°C e devido a isso, se faz necessário o uso de técnicas complementares para avaliar com mais segurança se este evento pode ser significativo ou não.

Figura 35 - Curvas TG do extrato seco, do talco e da mistura binária (1:1)



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 36 - Curvas DTG do extrato seco, do talco e da mistura binária (1:1)

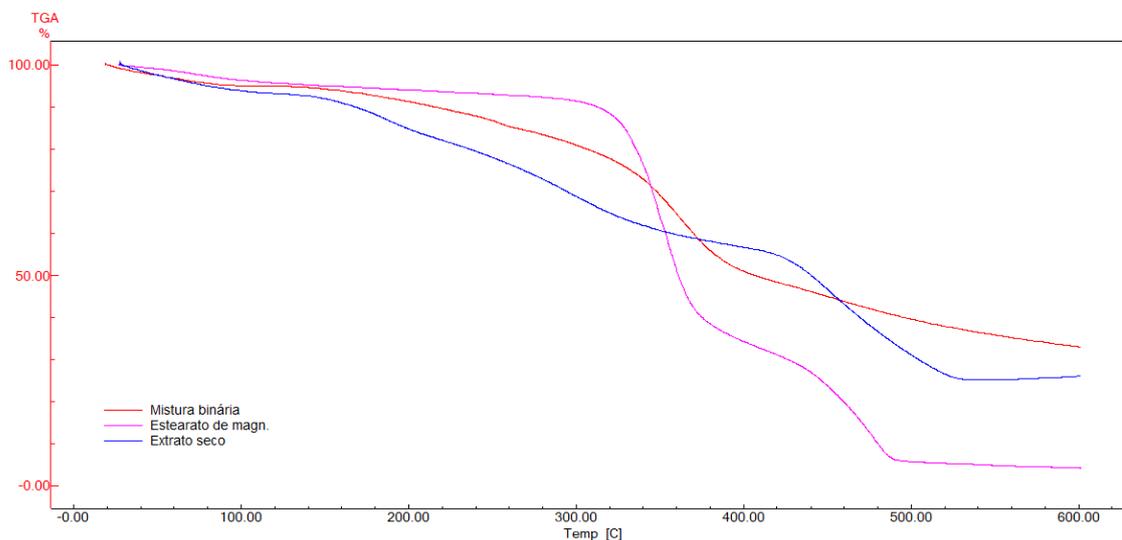


Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com as curvas TG (figura 37) e DTG (figura 38) obtidas na avaliação da mistura binária extrato seco:estearato de magnésio, possivelmente não houve incompatibilidade entre o estearato de magnésio e o extrato seco, em virtude de não se observar nenhuma antecipação das etapas de perda de massa do extrato seco, pois estas foram deslocadas para temperaturas mais elevadas, tais como: primeiro, segundo, terceiro e quarto eventos de perda de massa passaram de 60°C, 156°C, 263°C e 424°C para 76°C, 188°C, 328°C

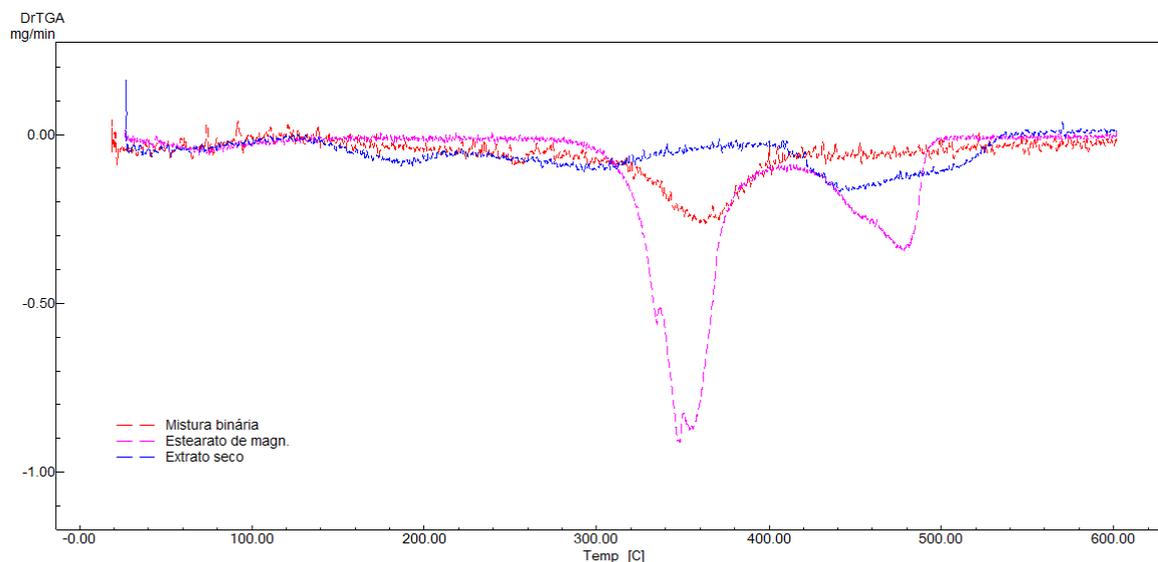
e 433°C, respectivamente. Tais dados corroboram com uma possível interação positiva com o extrato seco promovendo maior estabilidade térmica.

Figura 37 - Curvas TG do extrato seco, da Estearato de Magnésio e da mistura binária (1:1)



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 38 - Curvas DTG do extrato seco, da Estearato de Magnésio e da mistura binária (1:1)

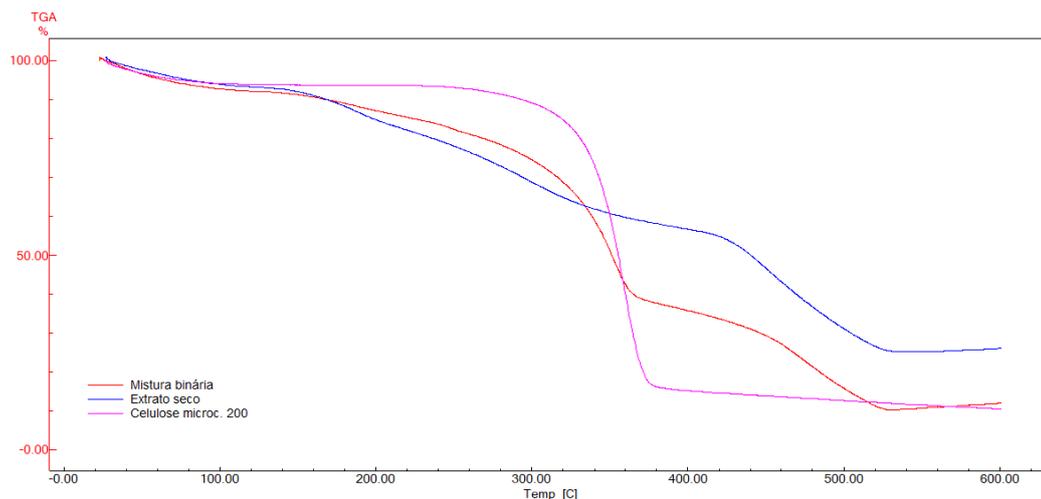


Fonte: Dados da pesquisa.

Semelhantemente ao comportamento observado na mistura binária com estearato de magnésio, a celulose microcristalina 200 promoveu uma maior estabilidade térmica do extrato seco, uma vez que as curvas TG (Figura 39) e DTG (Figura 40) da mistura binária apresentaram deslocamento para temperaturas mais elevadas do segundo, terceiro e quarto

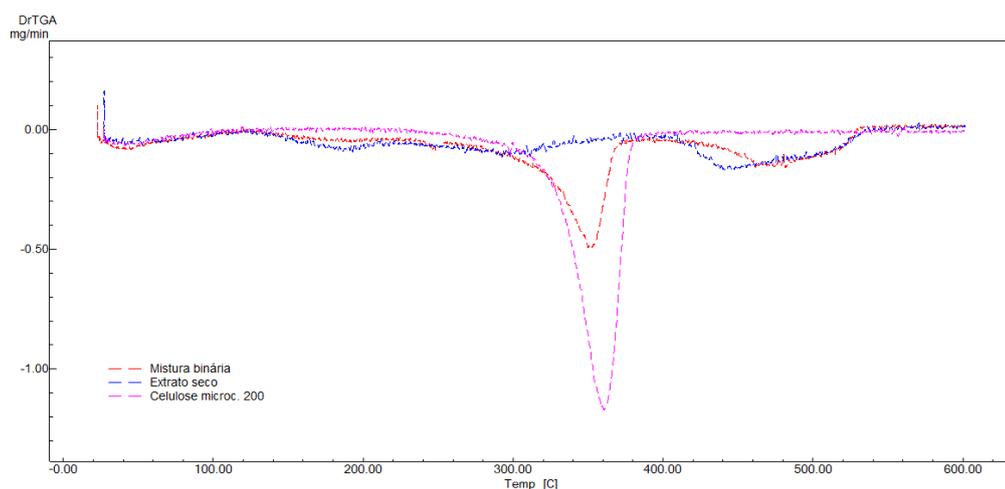
eventos de perda de massa do extrato seco que passaram de 156°C, 263°C e 424°C para 194°C, 327°C e 447°C, respectivamente. Sendo assim, os resultados obtidos sugerem de que não houve incompatibilidade extrato seco:celulose microcristalina 200.

Figura 39 - Curvas TG do extrato seco, da Celulose Microcristalina 200 e da mistura binária (1:1)



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 40 - Curvas DTG do extrato seco, da Celulose Microcristalina 200 e da mistura binária (1:1)

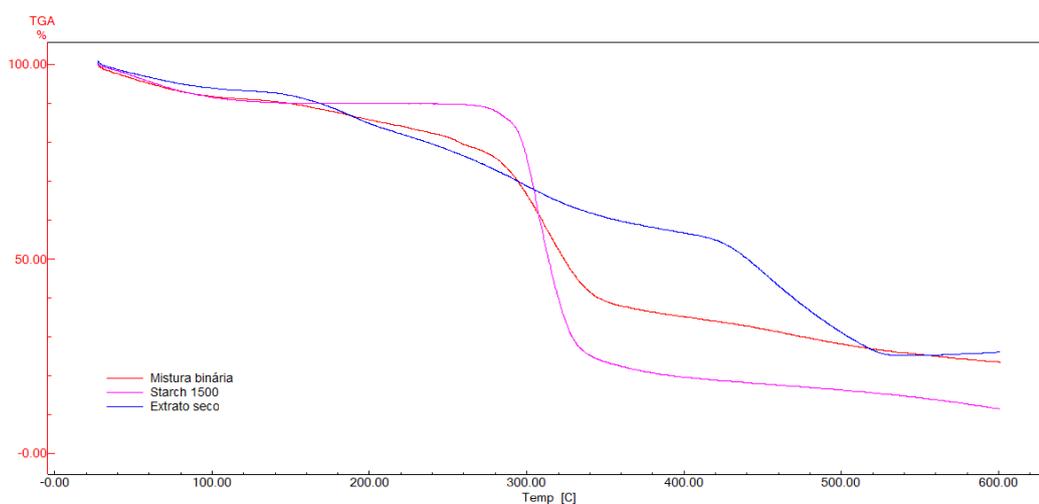


Fonte: Dados da pesquisa.

As curvas TG (figura 41) e DTG (figura 42) da mistura binária extrato seco:starch 1500[®] demonstraram ausência de incompatibilidade entre o extrato seco e excipiente, tendo em vista que os principais eventos térmicos de perda de massa de ambos foram verificados na

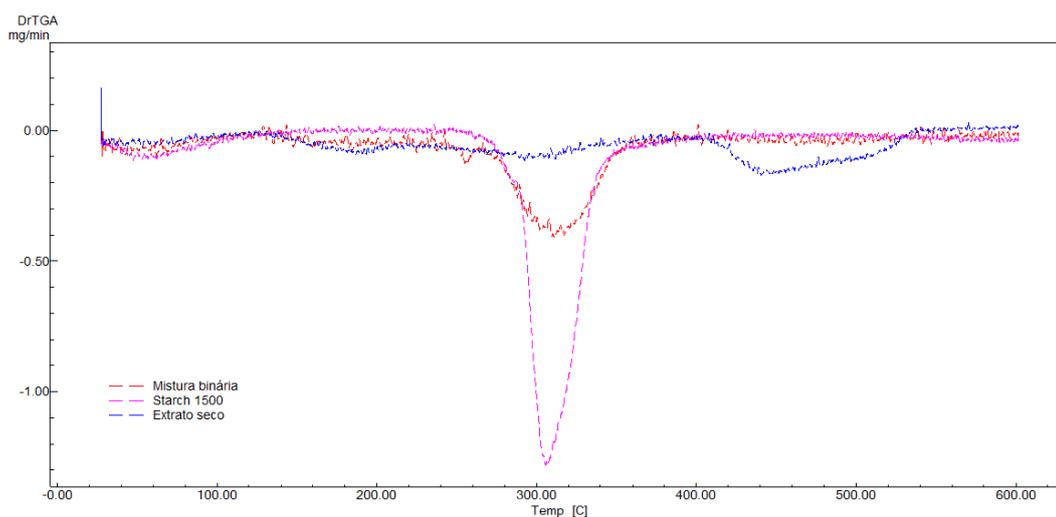
mistura binária. Contudo, apesar do terceiro e quarto eventos do extrato seco terem sido elevados de 263°C e 424°C para 283°C e 441°C, respectivamente, houveram também antecipações do primeiro e segundo eventos térmicos de perda de massa do extrato e portanto, se faz necessário o uso de técnicas complementares para elucidar melhor o comportamento da mistura binária em questão.

Figura 41 - Curvas TG do extrato seco, da Starch 1500® e da mistura binária (1:1)



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 42 - Curvas DTG do extrato seco, da Starch 1500® e da mistura binária (1:1)

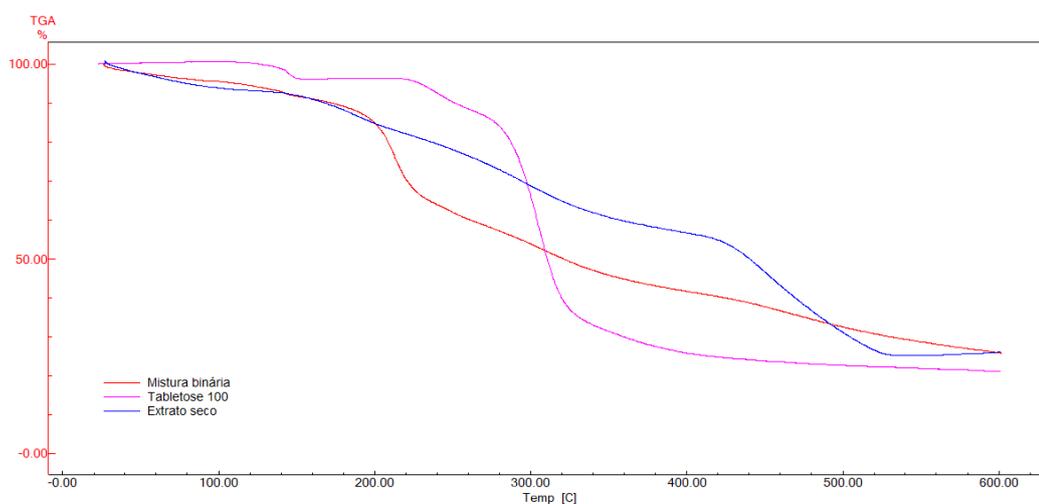


Fonte: Dados da pesquisa.

A avaliação do comportamento térmico da mistura binária extrato seco:tabletose 100 apontou que houve compatibilidade entre o extrato seco:tabletose 100, uma vez que nas

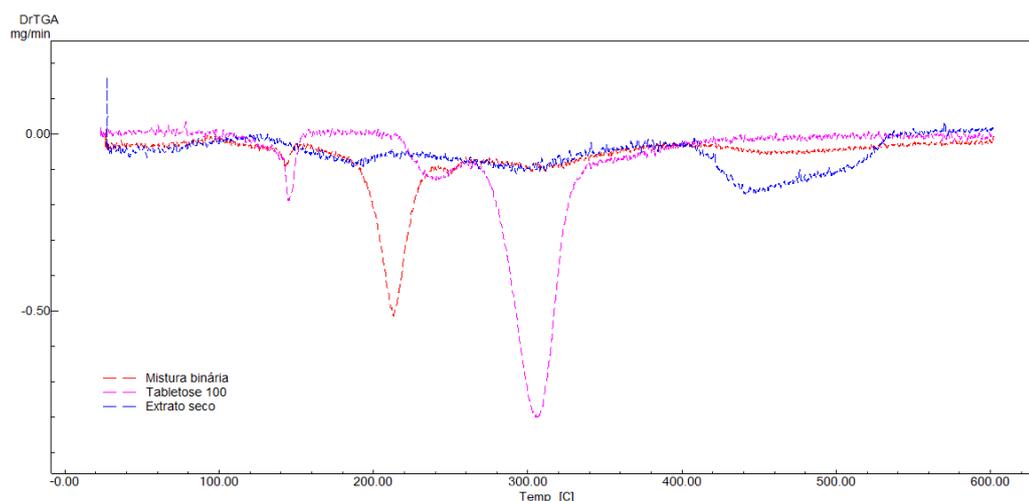
curvas TG (figura 43) e DTG (figura 44) da mistura binária é possível observar os principais eventos térmicos de perda de massa do extrato seco e também da tabletose 100. Ademais, é importante ressaltar que houve uma interação positiva na mistura binária, uma vez que o segundo, terceiro e quarto eventos de perda de massa do extrato seco foram deslocados de 156°C, 263°C e 424°C para 203°C, 293°C e 434°C, respectivamente.

Figura 43 - Curvas TG do extrato seco, da Tabletose 100[®] e da mistura binária (1:1)



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 44 - Curvas DTG do extrato seco, da Tabletose 100[®] e da mistura binária (1:1).

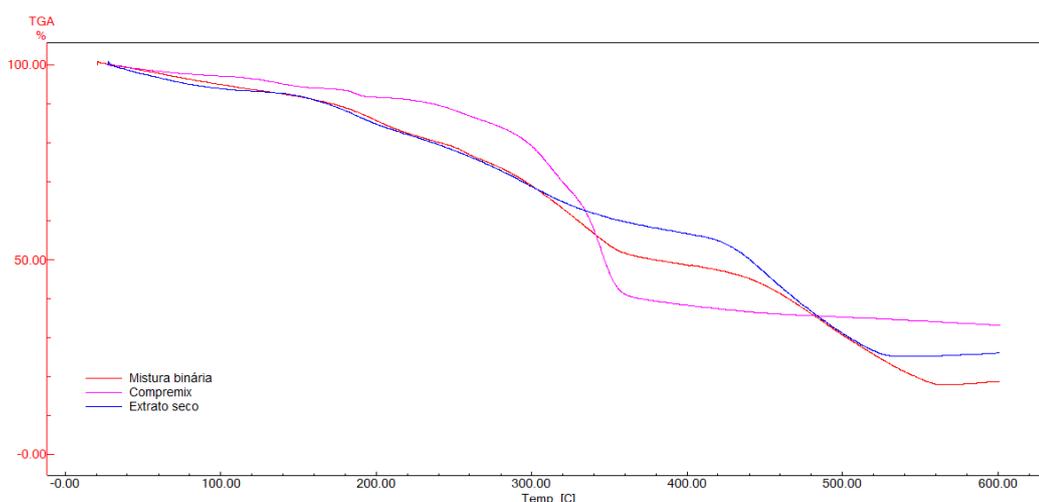


Fonte: Dados da pesquisa.

De modo semelhante aos dados obtidos para tabletose 100[®], o compremix[®] também não apresentou incompatibilidade com o extrato seco, porquanto as curvas TG (figura 45) e DTG (figura 46) da mistura binária extrato seco:compremix[®] revelaram que foi possível

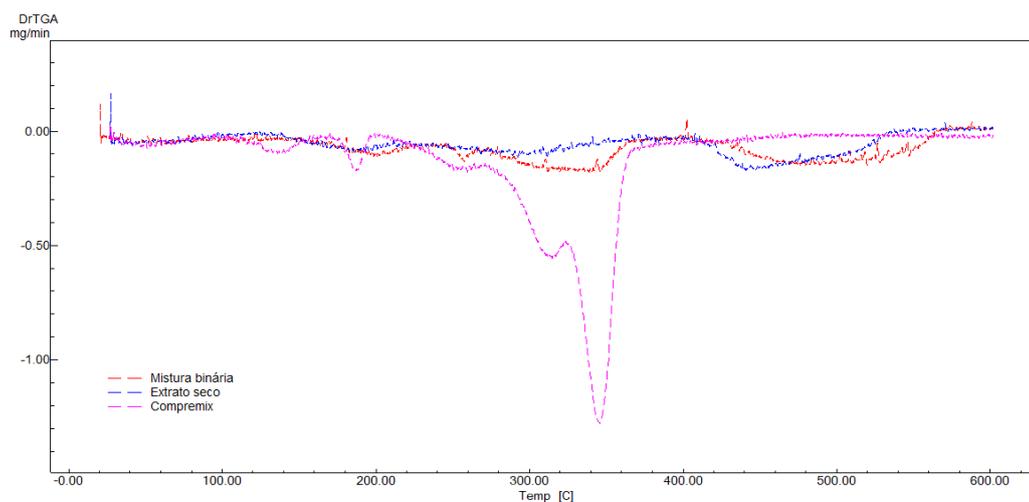
verificar os principais eventos de perda de massa do extrato seco, além de expressar uma interação positiva com este promovendo uma maior estabilidade térmica, visto que as temperaturas iniciais dos três eventos de perda de massa do extrato seco foram deslocados para temperaturas superiores. De maneira que, o segundo, terceiro e quarto eventos térmicos de perda de massa do extrato seco passaram de 156°C, 263°C e 424°C para 176°C, 281°C e 439°C, respectivamente.

Figura 45 – Curvas TG do extrato seco, da Compremix® e da mistura binária (1:1).



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 46 – Curvas DTG do extrato seco, da Compremix® e da mistura binária (1:1).



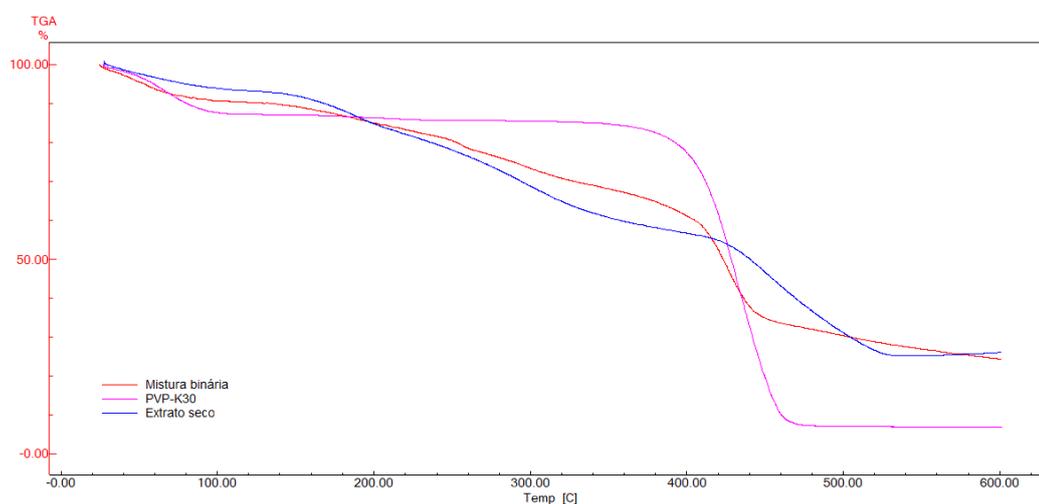
Fonte: Dados da pesquisa.

A partir das curvas TG (figura 47) e DTG (figura 48) da mistura binária extrato seco:PVP-k30, foi possível observar todos os principais eventos térmicos de perda de massa

tanto do extrato seco, quanto do PVP-K30 e, portanto, não houve incompatibilidade entre eles. No entanto, verificou-se também que no terceiro e quarto eventos térmicos de perda de massa do extrato seco ocorreu antecipação destes para temperaturas mais baixas, as quais passaram de 263°C e 424°C para 249°C e 409°C, respectivamente.

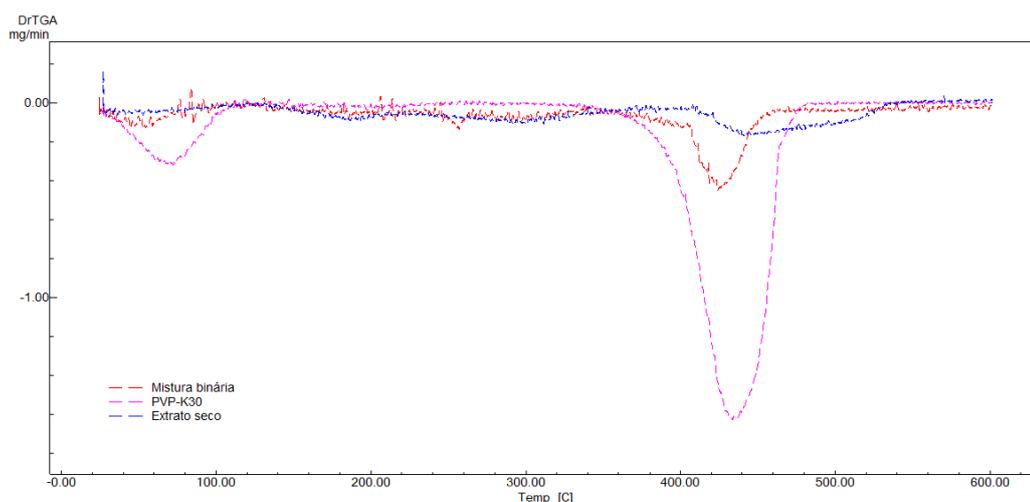
Dito isto, é necessário o uso de técnicas complementares para avaliar se tais antecipações refletem uma possível incompatibilidade entre eles, porém como estas ocorreram em temperaturas bem superiores as que são aplicadas nos processos industriais farmacêuticos para obtenção de comprimidos, tal condição não deve ser definitiva para a inutilização do PVP-K30 em uma formulação junto ao extrato seco de *S. cumini*.

Figura 47 – Curvas TG do extrato seco, da PVP-K30 e da mistura binária (1:1).



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 48 - Curvas DTG do extrato seco, da PVP-K30 e da mistura binária (1:1)



Fonte: Dados da pesquisa.

5.15 OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS À BASE DE *S. cumini* POR TÉCNICA DE COMPRESSÃO DIRETA

Após a avaliação da compatibilidade extrato seco:excipientes, estes foram selecionados para compor a formulação (LB) e após misturados, foram realizados ensaios de avaliação da propriedade de compactação, ângulo de repouso e tempo de escoamento que revelaram uma boa capacidade de compactação da mistura, uma vez que esta foi de 3 mL indicando ser compatível para obtenção de formas farmacêuticas sólidas.

Ademais, os índices FH e IC (tabela 31) revelaram que o granel apresentou propriedades reológicas satisfatórias, haja visto que as características de compatibilidade e compressibilidade representadas pelo Índice de Carr foram confirmadas como positivas, pois o valor obtido para este índice foi de 15,09% e tal condição, representa uma excelente fluidez do pó (WELLS, apud ANDRADE, 2009). De igual modo, o bom fluxo do pó foi confirmado pelo FH que apresentou valor de 1,18 sendo este inferior ao limite preconizado pela literatura para que não seja necessário o uso de lubrificantes para melhoramento de escoamento, a saber, 1,25 (PRISTA, et al., 1995; ALVES et al., 2008).

Tabela 31 - Propriedade de compactação do LB.

Propriedade	Média
<i>Densidade aparente</i>	0,45 g/ mL
<i>Densidade compactada</i>	0,53 g/mL
<i>Fator de Hausner (FH)</i>	1,18
<i>Índice de Carr (IC)</i>	15,09 %

Fonte: Dados do autor.

Em relação ao tempo de escoamento do pó verificou-se que este foi de 1 segundo, confirmando a facilidade de fluxo já verificada no FH e IC. Além disso, após o escoamento do pó, este resultou em ângulo de repouso de $0,2^{\circ} \pm 0,04$ evidenciando assim, as boas características do LB para obtenção de formas farmacêuticas sólidas, em virtude de valores iguais ou inferiores a 30° serem condizentes com boa capacidade de escoamento para pós (ALVES et al., 2008).

Tendo em vista as características reológicas do pó, optou-se pela obtenção de comprimidos à base de *S. cumini* por técnica de compressão direta, em virtude desta ser bastante viável para produção de medicamentos em escala industrial (Wanczinski, et al., 2002), aplicada em situações em que o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) e os excipientes que compõem a formulação apresentam fluxo livre, boas propriedades de coesão e se permitem compactar diretamente, sem que necessite de aplicação de técnica de granulação por via úmida ou seca (PRISTA et al., 1995).

Logo após, os comprimidos do LB foram obtidos em compressora rotativa (figura 49) e estes, apresentaram-se satisfatórios, pois foram aprovados nos ensaios de controle de qualidade realizados durante o processo de compressão, conforme apresentado na tabela 32. Além disso, em relação as características macroscópicas dos comprimidos de *S. cumini*, estes apresentaram coloração amarronzada, conformação circular, convexos e isentos de material estranho.

Figura 49 - Comprimidos de *S. cumini* obtidos por compressão direta.

Fonte: Dados do autor.

Tabela 32–Resultados obtidos no controle de qualidade físico-químico do LB.

Parâmetros	Especificação	Média (LB)
<i>Peso Médio</i>	150 mg \pm 7,5 %	145 mg
<i>Friabilidade</i>	< 1,5 %	0,07 %
<i>Desintegração</i>	< 30'	1'34''
<i>Dureza</i>	> 30 N	74,5 N

Legenda: LB – Lote de Bancada.

Fonte: Dados da pesquisa.

Durante o processo de compressão para obtenção dos comprimidos de *S. cumini*, verificou-se que estes foram de fácil obtenção tendo um bom fluxo de escoamento dos pós e necessitando de aplicação de baixas forças de compressão. Tal condição se mostra interessante, pois quanto menos força aplicar-se para obtenção de comprimidos maior será o ganho referente a vida útil dos punções, uma vez que estes sofrerão menos desgaste durante a rotina de produção de lotes industriais.

Paralelamente, durante o ensaio para avaliação da dureza (figura 50) dos comprimidos de *S. cumini* observou-se que os resultados obtidos estavam dentro dos valores que foram estabelecidos para o projeto e além disso, foi possível notar que a quebra dos comprimidos se

deu perfeitamente ao meio destes, resultando em bandas que permaneceram íntegras com ausência de pós frouxos ou formação de “capping” (figura 51).

Figura 50 - Comprimido de *S. cumini* sendo submetido a ensaio de dureza em durômetro.



Fonte: Dados do autor.

Figura 51 - Comprimidos de *S. cumini* quebrados após serem submetidos o ensaio de dureza.



Fonte: Dados do autor.

É importante salientar que a ausência da formação de *capping* corrobora com as previsões obtidas nos índices de FH e IC, tendo em vista que entre os fatores responsáveis pelo surgimento desse fenômeno encontra-se o excesso de ar retido no pó oriundo de um fluxo irregular durante o processo de compressão (Staniford, 2005).

No ensaio de friabilidade (Tabela 32) a perda de massa dos comprimidos foi inferior a 1,5% demonstrando que estes foram obtidos com força de compressão adequada para suportar aos impactos oriundos da manipulação e transporte.

6. Considerações finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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.

Foi escolhido como solvente extrator etanol:água (1:1, v/v), pois foi o que apresentou a melhor resposta 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 RDC166/2017 e permitiu que no mesmo método fosse possível o doseamento de polifenóis e taninos totais, bem como a 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 polifenóis 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.

A otimização do método de extração, aplicando o planejamento experimental mostrou que o efeito positivo mais relevante foi o tempo de extração, seguido pela potência e proporção droga:solvente, resultando em maiores recuperações dos metabólitos, além de fornecer um aumento em 73,63% e 87,13% na extração de polifenóis totais e taninos totais, respectivamente. 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 temperaturas para causar degradação no mesmo.

Sobre a reologia, o liofilo não possui boa capacidade de compactação, entretanto dispõe de boa propriedade de escoamento. Na atividade biológica, o extrato seco foi sensível para todas as sete cepas testadas 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.

Do mesmo modo, os ensaios de avaliação de toxicidade *in vivo* realizado em larvas de *Tenébrio molitor* demonstraram que o extrato seco de *S. cumini* se mostrou atóxico em todas as concentrações testadas.

Em relação ao estudo de compatibilidade com os excipientes foi possível verificar que o extrato seco de *S. cumini* mostrou-se compatível com quase todos os excipientes avaliados o que foi importante para a escolha dos excipientes que compuseram a forma farmacêutica obtida, a qual foi aprovada frente os ensaios físico-químicos de controle de qualidade avaliados.

A partir dos resultados obtidos, é possível sugerir que o extrato seco padronizado e otimizado de *S. cumini* desenvolvido nesse trabalho pode ser de grande valia para o tratamento de infecções causadas por fungos do gênero *Candida* e bactérias das espécies *Enterococcus aureus* e *Staphylococcus faecalis*, podendo servir de matéria-prima para obtenção de formas farmacêuticas sólidas, como por exemplo comprimidos, os quais foram obtidos neste trabalho.

Perspectivas

7 PERSPECTIVAS

- Realizar teste de sensibilidade antibacteriana *in vitro* do extrato seco de *S. cumini* antes da otimização, a fim de comparar a resposta farmacológica deste, com a verificada neste trabalho utilizando o extrato seco padronizado e otimizado;
- Avaliar a estabilidade da solução extrativa sob refrigeração, utilizando intervalos de tempo menores para o doseamento, a fim de verificar o tempo máximo em que a solução extrativa se mantém estável;
- Realizar doseamento dos comprimidos obtidos aplicando a metodologia analítica desenvolvida e validada neste trabalho;
- Realizar determinação do perfil de dissolução *in vitro* dos comprimidos obtidos;
- Promover estudos de estabilidade acelerada, longa duração e de acompanhamento das formas farmacêuticas produzidas, segundo a RE nº1/2005 (ANVISA).

Referências

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.
- AHMAD, I.; AQIL, F. In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESβL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. **Microbiol Res.** v. 162, p. 264–275, 2007.
- AKINS, R. A. An update on antifungal agents and mechanism of resistance in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v.42, p. 285-318, 2005.
- ALBERTON, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L. V. S.; FRANCO, S. L.; LIMA, M. A. P. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*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.
- ALIGIANNIS, 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.
- ANGOY, A.; VALAT, M.; GINISTY, P.; SOMMIER, A.; GOUPY, P.; CARIS-VEYRAT, C.; CHEMAT, F. Development of microwave-assisted dynamic extraction by combination with centrifugal force for polyphenols extraction from lettuce. **LWT**, v. 98, p. 283–290, 2018.
- 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.
- SILVA, C. C. A. R. Obtenção de forma farmacêutica sólida (comprimido) à base de *Syzygium cumini* (L.) SKEELS como alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por microrganismos.

ANVISA. **Uso Racional de Antimicrobianos e Resistência Microbiana**. [online]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/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; IGNACIMUTHU, S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: Folk medicinal and pharmacological evidences. **Complementary Therapies in Medicine**. v. 21, p. 232—243, 2013.

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.

BAG, A.; BHATTACHARYYA, S. K.; PAL, N. K.; CHATTOPADHYAY, R. R. In vitro antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. **Microbiol Res**.v. 167, p. 352–357, 2012.

BALDISSERA, G.; SPEROTTO, N. D. M.; ROSA, H. T.; HENN, J. G.; PERES, V. F.; MOURA, D. J.; ROEHRS, R.; DENARDIN, E. L. G.; DAL LAGO, P.; NUNES, R. B.; SAFFI, J. Effects of crude hydroalcoholic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves and continuous aerobic training in rats with diabetes induced by a high-fat diet and low doses of streptozotocin. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 194, p. 1012 – 1021, 2016.

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.

BEN-AMI, R.; BERMAN, J.; NOVIKOV, A.; BASH, E.; SHACHOR-MEYOUHAS, Y.; ZAKIN, S.; MAOR, Y.; TARABIA, J.; SCHECHNER, V.; ADLER, A.; FINN, T. Multidrug-Resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel. **Emerg Infect Dis**, v. 23, p. 195,

2017.

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

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. 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.

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.

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.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção de forma farmacêutica sólida (comprimido) à base de *Syzygium cumini* (L.) SKEELS como alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por microrganismos.

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 amonialiase e dos teores de polifenóis 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.

COWAN, M.M.. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev**. v. 12, n. 4, p. 564 – 582, 1999.

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 sapogenina extraída de sementes de *Eugenia jambolana* Lam. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, p. 46-54, 2002.

DAS, A.K.; MANDAL, V.; MANDAL, S.C. A Brief Understanding of Process Optimisation in Microwave-assisted Extraction of Botanical Materials: Options and Opportunities with Chemometric Tools. **Phytochem Anal**,v. 25, p. 1–12, 2014.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção de forma farmacêutica sólida (comprimido) à base de *Syzygium cumini* (L.) SKEELS como alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por microrganismos.

DE HOYOS-MARTÍNEZ, P. L.; MERLE, J.; LABIDI, J.; CHARRIER – EL BOUHTOURY, F. Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production. **J Clean Prod**, v. 206, p. 1138-55, 2019.

DE SOUZA, A.; DE OLIVEIRA, C.; DE OLIVEIRA, V.; BETIM, F.; MIGUEL, O.; MIGUEL, M. Traditional Uses, Phytochemistry, and Antimicrobial Activities of Eugenia Species – A Review. **Planta Med**, v. 84, p. 1232–48, 2018.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **J Qual Technol**, v. 12, p. 214–19, 1980.

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.

ESHWARAPPA, R. S. B.; IYER, R. S.; SUBBARAMAIAH, S. R.; RICHARD, S. A.; DHANANJAYA, B. L. Antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaf gall extracts. **BioImpacts**, v. 4, n. 2, p. 101-107, 2014.

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 Medicinais Nativas com Potencial de Conservação/Recuperação de Florestas Tropicais. Tese de doutorado (biociências). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro Estado de São Paulo, 2007.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção de forma farmacêutica sólida (comprimido) à base de *Syzygium cumini* (L.) SKEELS como alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por microrganismos.

GOWRI, S. S.; VASANTHA, K. Phytochemical screening and antibacterial activity os *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. **International Journal of Pharmtech Research**, v. 2, n. 2, p. 1569-1573, 2010.

GUIMARÃES, D. O., MOMESSO, L. S., PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas Para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Quimica 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.

IMRAN, M., IMRAN, M., KHAN, SHAISTA. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* leaf extracts against multidrug resistant pathogenic bacteria. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 3, p. 168-174, 2017.

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.

KHAN, S.; IMRAN, M.; IMRAN, M.; PINDARI, N. Antimicrobial activity of various ethanolic plant extracts against pathogenic multi drug resistant *Candida* spp. **Bioinformation**,v. 13, p. 67-72, 2017.

KULLU, J., DUTTA, A., CONSTALES, D., CHAUDHURI, S., DUTTA, D., 2014. Experimental and modeling studies on microwave-assisted extraction of mangiferin from *Curcuma amada*. **3 Biotech**,v. 4, p. 107-120, 2014.

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.

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.

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.

MIGLIATO, K.F.; MELLO, J.C.P.; HIGA, O.Z.; RODAS, A.C.D.; CORRÊA, M.A.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; PIZZOLITTO, A.C.; SALGADO, H.R.N. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Fruit Extract from *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Am J Pharm**, v. 29, p. 725–55, 2010.

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.

MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* Leaves. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. 1-7, 2013.

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.

NAIMA, R.; OUMAM, M.; HANNACHE, H.; SESBOU, A.; CHARRIER, B.; PIZZI, A.; CHARRIER - EL BOUHTOURY, F. Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. **Ind Crops Prod**, v. 70, p. 245-52, 2015.

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.

NATALI, V. D.; BARCELOS, R. M.; PINTO, A. P. A.; RESENDE, K. M.; BELINELO, V. J. Investigação fitoquímica e atividade antimicrobiana de *Amaranthus viridis* L. (Amaranthaceae). **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-8, 2011.

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

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, 2007.

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 clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. v.18, n.1, p.230-239, 2016.

PADIYARA, P.; INOUE, H.; SPRENGER, M. Global Governance Mechanisms to Address Antimicrobial Resistance. **Infect Dis Res Treat**,v. 11, p. 1-4, 2018.

PANJA, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. **Curr Opin Food Sci**, v. 23, p. 173–82, 2018.

PALMEIRA, S. J. G. Micoses Sistêmicas. Dissertação de mestrado (Cienências 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 electrocinética 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.

PRISTA, L. N. et al. Tecnologia Farmacêutica. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

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 of 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 methicillin-resistant *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.

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.

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

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.

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.

SHAFI, P.; ROSAMMA, M.; JAMIL, K.; REDDY, P. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v. 73, p. 414-416, 2002.

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.

SILVA, S. N.; ABREU, I. C.; SILVA, G. F.; RIBEIRO, R. M.; LOPES, A. S.; CARTÁGENES, M. S.S.; FREIRE, S. M. F.; BORGES, A. C. R.; BORGES, M. O. R. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. **Braz. J. Pharmacogn.** v. 22, n. 1, p. 102 – 108, 2012.

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

SINGH, J.P.; KAUR, A.; SINGH, N.; NIM, L.; SHEVKANI, K.; KAUR, H.; ARORA, D.S. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. **LWT - Food Sci Technol**, v. 65, p. 1025-30, 2016.

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

STANIFORD, J. **Fluxo de pós**. In: AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 14, p. 208-21.

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.

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 skills: 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.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção de forma farmacêutica sólida (comprimido) à base de *Syzygium cumini* (L.) SKEELS como alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por microrganismos.

Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de ciências farmacêuticas, Araraquara, SP, 2008.

UGBABA, G.; EZEUNALA, M.; EDMOND, I.; APEV, J.; SALAWU, O. Preliminary Phytochemical, Antimicrobial and Acute Toxicity Studies of the Stem, bark and the Leaves of a cultivated *Syzygium cumini* Linn. (Family: Myrtaceae) in Nigeria. **African J Biotechnol**, v. 9, p. 6943–47, 2010.

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.

VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.; ESPADA-BELLIDO, E.; V. GONZÁLEZ DE PEREDO, A.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; CARRERA, C.; PALMA, M.; G. BARROSO, C.; F. BARBERO, G.; VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.; ESPADA-BELLIDO, E.; V. GONZÁLEZ DE PEREDO, A.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; CARRERA, C.; PALMA, M.; G. BARROSO, C.; F. BARBERO, G. Optimization of Microwave-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from the Chilean Superfruit (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). **Agronomy**, v. 8, p. 240, 2018.

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.

YADAV, S. S.; MESHARAM, G. A.; SHINDE, D.; PATIL, R. C.; MANOHAR, S. M.; UPADHYE, M. V. Antibacterial and Anticancer Activity of Bioactive Fraction of *Syzygium cumini* L. Seeds. **HAYATI Journal of Biosciences**. v. 18, n. 3, p. 118-122, 2011.

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.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção de forma farmacêutica sólida (comprimido) à base de *Syzygium cumini* (L.) SKEELS como alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por microrganismos.

Anexos

ANEXO A – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS

Anais da Academia Brasileira de Ciências

Decision Letter (AABC-2019-0373.R2)

From: editor-in-chief@abc.org.br
To: rolim.pedro@gmail.com
CC:
Subject: Annals of the Brazilian Academy of Sciences - Decision on Manuscript ID AABC-2019-0373.R2
Body: 17-Jul-2019

Dear Prof. Rolim Neto:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Development of an analytical method for determination of polyphenols and total tannins from leaves of *Syzygium cumini* L. Skeels" in its current form for publication in the Annals of the Brazilian Academy of Sciences. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Annals of the Brazilian Academy of Sciences, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Alexander Kellner
Editor-in-Chief, Annals of the Brazilian Academy of Sciences
editor-in-chief@abc.org.br

Associate Editor
Comments to the Author:
(There are no comments.)

Entire Scoresheet:

Date Sent: 17-Jul-2019

 Close Window

ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS

Decision Letter (AABC-2019-0632.R2)

From: kaefer@ufam.edu.br

To: rolim.pedro@gmail.com

CC:

Subject: Annals of the Brazilian Academy of Sciences - Decision on Manuscript ID AABC-2019-0632.R2

Body: 07-Oct-2019

Dear Prof. Rolim Neto:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Optimized microwave-assisted extraction of polyphenols and tannins from *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves through an experimental design coupled to a desirability approach" in its current form for publication in the Annals of the Brazilian Academy of Sciences. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Annals of the Brazilian Academy of Sciences, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Igor Luis Kaefer
Editor-in-Chief, Annals of the Brazilian Academy of Sciences
kaefer@ufam.edu.br, igorkaefer@hotmail.com

Associate Editor
Comments to the Author:
Dear Dr. Rolim-Neto,

You have modified your manuscript ABC-2019-0632.R2 (Optimized microwave-assisted extraction of polyphenols and tannins from *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves through an experimental design coupled to a desirability approach) according to the reviewer's comments and it can be accepted for publication in the Annals of the Brazilian Academy of Sciences.

Sincerely,
Associate Editor

Entire Scoresheet:

Date Sent: 07-Oct-2019

ANEXO C – TRABALHO APRESENTADO NO 1º SIMPÓSIO BRASIL – FRANÇA DE QUÍMICA MEDICINAL



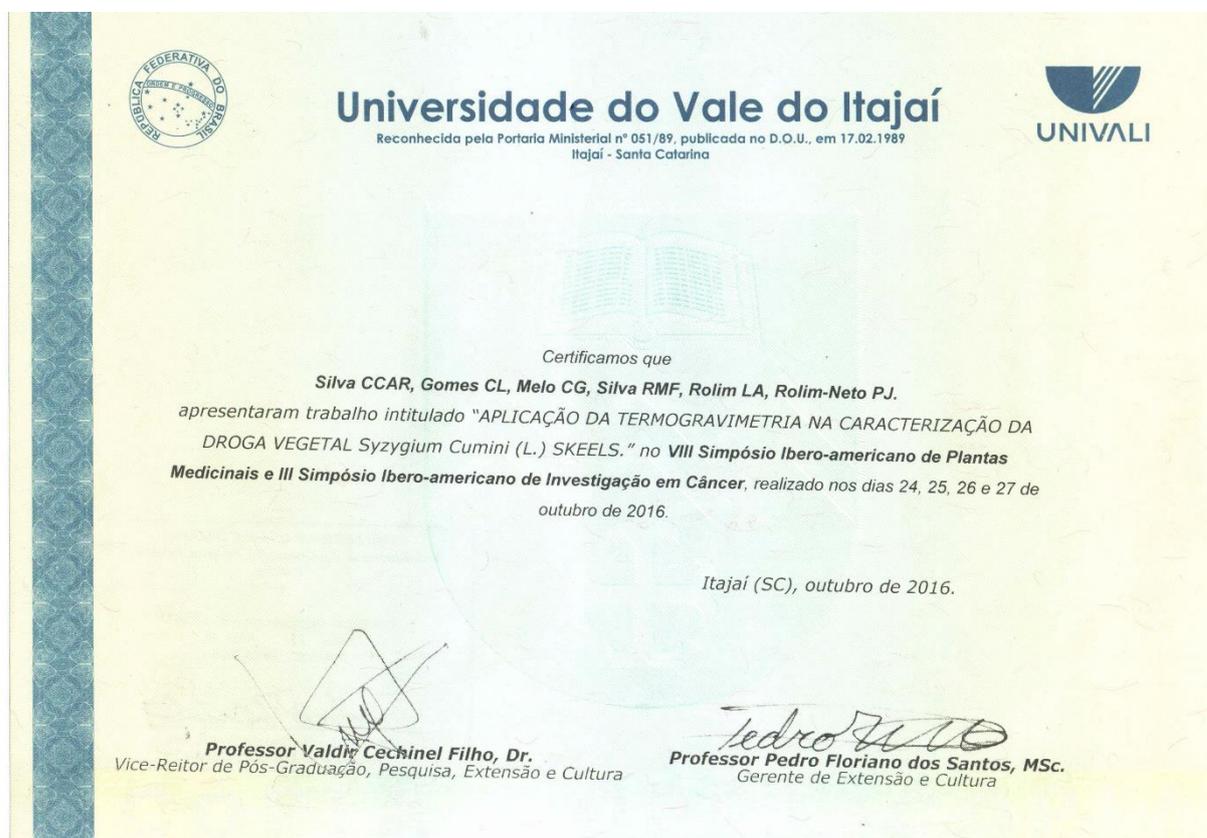
ANEXO D – TRABALHO APRESENTADO NO VIII SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS E III SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE INVESTIGAÇÃO EM CÂNCER



ANEXO E – TRABALHO APRESENTADO NO VIII SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS E III SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE INVESTIGAÇÃO EM CÂNCER



ANEXO F – TRABALHO APRESENTADO NO VIII SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS E III SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE INVESTIGAÇÃO EM CÂNCER



ANEXO G – TRABALHO APRESENTADO NO VIII SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS E III SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE INVESTIGAÇÃO EM CÂNCER

Certificado de Apresentação

XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil – 2016



Certificamos que o trabalho 'Caracterização físico-química da droga vegetal de *Syzygium cumini* (L.) Skeels' (CQ-07), de autoria de CAIO CÉSAR ANDRADE RODRIGUES SILVA, CAMILA GOMES DE MELO, CAMILA LUIZ GOMES, LARISSA ARAÚJO ROLIM, PEDRO JOSÉ ROLIM NETO., foi apresentado na forma de pôster durante o XXIVSPMB - 2016, realizado no Minascentro, em Belo Horizonte-MG, no período de 21 a 24 de setembro de 2016.

Profª Drª Maria das Graças Lins Brandão
FAFAR & MHNJB - UF **MG**

Presidente do XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil

Prof Dr João Paulo Viana Leite
DBB - UFV

Presidente da Comissão Científica do XXIVSPMB