

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS ARARAQUARA

Syzygium cumini (L.) Skeels – JAMBOLÃO: ESTUDO FARMACOGNÓSTICO,
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO, DETERMINAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTI-SÉPTICA DE UM SABONETE LÍQUIDO CONTENDO O
REFERIDO EXTRATO

KETYLIN FERNANDA MIGLIATO

ORIENTADORA: Profa. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORRÊA

ARARAQUARA – SP

2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS ARARAQUARA

Syzygium cumini (L) Skeels – JAMBOLÃO: ESTUDO FARMACOGNÓSTICO,
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO, DETERMINAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTI-SÉPTICA DE UM SABONETE LÍQUIDO CONTENDO O
REFERIDO EXTRATO

KETYLIN FERNANDA MIGLIATO

ORIENTADORA: Profa. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORRÊA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA – SP

2005

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M634s Migliato, Ketylin Fernanda
Syzygium cumini (L) Skeels –jambolão: estudo farmacognóstico, otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade anti-séptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato. / Ketylin Fernanda Migliato . – Araraquara, 2005.
140 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado
Co-orientador: Marcos Antonio Corrêa

1.Jambolão - Controle da qualidade. 2.Sabonete líquido. 3.Atividade antimicrobiana – Extrato de jambolão. 4.Atividade antimicrobiana – Sabonete líquido. I. Salgado, Hérica Regina Nunes , orient.. II. Corrêa, Marcos Antonio. III. Título.

CDD: 658.562

CAPES: 40300005

A Deus:

Obrigada pela saúde, força, amparo e proteção em todos os momentos de minha vida e, principalmente, durante a execução deste trabalho, onde precisei de muito amparo nos momentos de desânimo.

*“Sonhar e perseverar apesar das decepções,
caminhar apesar dos obstáculos,
lutar apesar das barreiras,
acreditar acima de tudo... em Deus.*

*Foi sonhando, caminhando, lutando e acreditando,
que cheguei a este momento”.*

Obrigada, Meu Deus!!!

Aos meus pais:

Obrigada por todo amor dedicado, carinho, compreensão nos momentos de minha ansiedade e por suportarem e não me criticarem nos momentos mais difíceis, e por torcerem pela vitória. Sem os quais eu não conseguiria realizar este trabalho.

Amo vocês!!!

Pai:

Por todo o tempo que eu viver, perpetuarei tua memória e hei de ser fiel aos teus princípios, pois tudo o que me ensinaste é o fruto de todo este meu trabalho.

Mãe:

Jamais me esquecerei que sua compreensão, atenção, apoio e amor são os meus pilares de sustentação.

Aos meus irmãos:

Fernando, Karin e Caio obrigada pelo carinho, respeito, compreensão e incentivo.

Desejo-lhes que busquem seus sonhos. Amo vocês.

Ao meu noivo Ricardo:

Obrigada por todo amor, carinho e companheirismo dedicados a mim em todos estes anos que estamos juntos. Agradeço também pela compreensão, paciência e participação para realização deste trabalho.

Eu te amo!!!

À Profa. Dra. Hérida Regina Nunes Salgado

Obrigada por ser minha orientadora, pela amizade, confiança, dedicação e por me ensinar a caminhar sozinha.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Dizer obrigada seria muito pouco, mas você me ensinou antes de tudo a confiar em mim mesma. Serei eternamente grata não só a você como pela compreensão de sua família.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Obrigada por me acolher em seu laboratório, pelos conhecimentos científicos ensinados e mais que isso pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. João Olímpio Tognolli

Obrigada pela ajuda, paciência e amizade, serei eternamente grata.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto

Obrigada por abrir as portas e ajudar-me nos momentos que achei que tudo seria impossível. Respeito muito sua pessoa.

À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Sem saber quem eu era, você confiou em mim e abriu as portas me acolhendo. Obrigada pela confiança, amizade e respeito.

Ao Prof. Dr. Luis Victor Silva do Sacramento

Obrigada pela sua amizade, dedicação e confiança durante estes anos.

Agradecimentos

À toda minha família, especialmente aos meus avós Donato e Adelaide (*in memoriam*), Nelson e Darcy, que sempre os surpreendi durante minha caminhada.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara Irani, Ana Cristina, Moacir, Ana Lúcia, Maria Rita, Sônia, Natalina, Maximiliano, Elaine, Queila, Alice, Pedro e Lucas pela atenção, dedicação e carinho em nossas dúvidas.

À Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira, obrigada pela amizade, dedicação e o estágio concedido.

À Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, obrigada pela sua amizade, dedicação e respeito.

À Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac Rangel, obrigada pela dedicação, amizade e trabalhos realizados juntas.

Aos professores da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, que durante estes anos foi possível conhecê-los e ter amizade, respeito e admiração por sua dedicação.

Às secretárias Cláudia, Laura e Sônia da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pela atenção e paciência.

Ao Sr. Pedro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, por ajudar na coleta dos frutos, pois sem esta dedicação não seria realizado este trabalho.

Aos técnicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara Eduardo, Angélica, Fátima, Luciene e Osmar, pela colaboração para realização deste trabalho.

À Maria do Carmo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara pela ajuda no momento de maior necessidade de apoio.

À Elaine e Rosângela da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara por me ensinar a caminhar e mais que isso a confiar em mim mesma, serei eternamente grata.

À Ana Marisa obrigada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara por confiar em mim e ajudar-me nos momentos difíceis, sem você, meu trabalho não seria concretizado.

Aos novos amigos do Laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara Marcelo, Liliam, Patrícia, Juliana, Julhiany e Fabiana obrigada pelos momentos que passamos juntos e pelo apoio.

À Tirene e Eliana da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara obrigada pela paciência e amizade.

Aos meus amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara Andréa, Arnóbio, Ângelo, Bruna, Cinara, Cristiane, Cintia, Daniela, Daniele, Fátima, Fernando, Greice, Giselle, Hellen, Kélia, Inaiara, Luana, Luigina, Marlus, Maria Carolina, Maria Cristina, Nelson, Priscila, Rubiana, Talita e Thiago por fazerem parte hoje de minha vida.

À minha amiga Cristina pela nossa sincera amizade que possa ser para sempre.

Às minhas amigas Cristiane e Evelyn nossa amizade será para sempre, mesmo que à distância nos separe.

Às minhas novas amigas de Maringá, Ana Cristina Isler, Fernanda Michely Nicoli, Juliana Cristina Borguezam Rocha dizer obrigada seria muito pouco, sou muito grata.

Aos novos amigos da Faculdade de Maringá Elza, Caetano, Raíssa, Renato, Lúcia e Andrea obrigada pela amizade e apoio.

Às secretárias do Departamento de Farmácia e Farmacologia de Maringá, Helena e Sonia, e aos técnicos Admir e D. Nair que por várias vezes me ajudaram.

À minha professora e amiga Norma, que me ajudou nas horas que mais precisei não só nos ensinamentos, mas também na amizade.

À família Antonio que me acolheram em sua casa em Maringá, não existe palavras para dizer muito obrigada.

À minha ex-professora e hoje amiga Cristina, que me fez acreditar em meus sonhos.

À Sra. Geny e Sr. Benedito, que em todas as minhas angústias, dúvidas e também alegrias deixaram suas portas abertas para me acolher, nossa amizade será eterna.

À minha menina Victória, você é o anjo que apareceu em minha vida.

À Valdete e Vilma pelo carinho e compreensão, muito obrigada.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e também pela amizade.

Por aqueles que em suas orações também puderam me fortalecer.

À CAPES, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	15
Lista de Tabelas.....	19
Lista de Fluxograma.....	21
Lista de Abreviaturas.....	22
Resumo.....	23
Abstract.....	24
1. Introdução.....	25
2. Objetivos.....	29
3. Revisão bibliográfica.....	30
3.1. Sistemática vegetal.....	30
3.1.1. Família Myrtaceae.....	30
3.1.2. Gênero <i>Syzygium</i>	32
3.1.3. A espécie <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	32
3.1.4. Uso popular.....	37
3.1.5. Composição química.....	37
3.1.5.1. Taninos.....	38
3.2. Extratos.....	40
3.2.1. Classificação dos extratos vegetais.....	41
3.2.2. Processos extrativos.....	42
3.2.3. Estabilização e secagem.....	43
3.2.4. Extração.....	44
3.2.4.1. Maceração.....	46
3.2.4.2. Percolação.....	46
3.2.4.3. Turbo-extração (turbólise).....	47
3.3. Planejamento experimental.....	48
3.3.1. Planejamento e análise estatística.....	48
3.3.2. Planejamento fatorial completo.....	50
3.3.3. Metodologia de superfície de resposta.....	53
3.3.4. Análise estatística.....	56
3.4. Atividade antimicrobiana.....	58
3.4.1. Técnicas para determinar a atividade antimicrobiana.....	60
3.4.1.1. Técnica da inoculação em placa.....	60
3.4.1.2. Técnica de microdiluição.....	60
3.5. Microrganismos e a pele.....	61

3.6. Anti-sépticos.....	63
3.6.1. Triclosan.....	65
3.7. Sabonete líquido anti-séptico.....	66
4. Materiais e métodos.....	70
4.1. Materiais.....	70
4.1.1. Material vegetal.....	70
4.1.2. Microrganismo.....	70
4.1.3. Solventes, reagentes e soluções.....	70
4.1.4. Equipamentos.....	73
4.1.5. Softwares.....	74
4.2. Métodos.....	75
4.2.1. Preparo e secagem do material.....	75
4.2.2. Obtenção do pó do fruto seco de <i>S. cumini</i>	75
4.2.2.1. Moagem.....	75
4.2.3. Caracterização física, físico-química e microbiológica do pó do fruto de <i>S. cumini</i>	75
4.2.3.1. Análise granulométrica.....	75
4.2.3.2. Densidade aparente do pó.....	75
4.2.3.3. Controle da qualidade dos frutos frescos e do pó seco do fruto <i>S. cumini</i>	76
4.2.3.3.1. Análises físico-químicas.....	76
4.2.3.3.1.1. Perda por secagem do fruto fresco.....	76
4.2.3.3.1.2. Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho do pó do fruto.....	76
4.2.3.3.1.3. Determinação do pH.....	76
4.2.3.3.1.4. Determinação do teor de cinzas.....	77
4.2.3.3.1.5. Determinação do teor de extrativos.....	77
4.2.4. Análises químicas do pó do fruto.....	78
4.2.4.1. Análise fitoquímica preliminar.....	78
4.2.4.2. Determinação do teor de taninos totais.....	78
4.2.5. Análise microbiológica do pó do fruto de <i>S. cumini</i>	79
4.2.5.1. Contagem total de microrganismos.....	79
4.2.5.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp e <i>Escherichia coli</i>	80
4.2.5.3. Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80
4.2.6. Preparação do extrato.....	81

4.2.6.1. Turbólise (turbo-extração).....	81
4.2.6.2. Maceração.....	81
4.2.6.3. Percolação.....	82
4.2.7. Planejamento fatorial.....	82
4.2.7.1. Controle da qualidade do extrato de <i>Syzygium cumini</i>	83
4.2.7.1.1. Determinação do teor de resíduo seco.....	83
4.2.7.2. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	85
4.2.7.2.1. Método de difusão em ágar.....	85
4.2.7.2.1.1. Preparo do inóculo.....	86
4.2.7.2.1.1.1. Padronização da suspensão bacteriana.....	86
4.2.7.2.1.1.2. Padronização da suspensão fúngica.....	86
4.2.7.2.1.2. Teste de sensibilidade.....	86
4.2.7.2.1.2.1. Padrão de sensibilidade de bactérias - controle.....	86
4.2.7.2.1.2.2. Padrão de sensibilidade de leveduras - controle.....	86
4.2.7.2.1.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais pelo método da difusão com discos.....	87
4.2.7.2.1.4. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica dos extratos vegetais pelo método da difusão com discos.....	87
4.2.7.2.1.5. Leitura.....	88
4.2.8. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	88
4.2.8.1. Preparo do inóculo.....	88
4.2.8.1.1. Padronização da suspensão bacteriana.....	88
4.2.8.1.2. Padronização da suspensão fúngica.....	88
4.2.8.2. Análise de sensibilidade às drogas.....	88
4.2.8.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais pelo método da microdiluição.....	89
4.2.8.4. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica dos extratos vegetais pelo método da microdiluição.....	90
4.2.8.5. Leitura.....	90

4.2.9. Determinação da concentração bactericida (CBM) e fungicida mínima (CFM)..	91
4.2.9.1. Padronização e adaptação dos testes de verificação da concentração bactericida mínima dos extratos vegetais.....	91
4.2.9.2. Padronização e adaptação dos testes de verificação da concentração fungicida mínima dos extratos vegetais.....	91
4.2.10. Sabonete líquido.....	91
4.2.10.1. Formulação.....	91
4.2.10.2. Preparação do sabonete líquido.....	92
4.2.10.3. Obtenção do extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> em propilenoglicol.....	92
4.2.10.4. Incorporação do extrato ao sabonete líquido proposto.....	92
4.2.11. Avaliação da atividade antimicrobiana do sabonete líquido.....	93
4.2.11.1. Método de difusão em ágar.....	93
4.2.11.1.1. Preparo do inóculo.....	93
4.2.11.1.1.1. Padronização da suspensão bacteriana.....	93
4.2.11.1.1.2. Padronização da suspensão fúngica.....	93
4.2.11.1.2. Testes de sensibilidade.....	93
4.2.11.1.2.1. Padrão da sensibilidade de bactérias – controle.....	93
4.2.11.1.2.2. Padrão da sensibilidade de leveduras – controle.....	93
4.2.11.1.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana do sabonete líquido com triclosan pelo método da difusão com discos.....	94
4.2.11.1.4. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana do sabonete líquido com extrato vegetal pelo método da difusão com discos.....	94
4.2.11.1.5. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica do sabonete líquido com triclosan pelo método da difusão com discos.....	94
4.2.11.1.6. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica do sabonete líquido com extrato vegetal pelo método da difusão com discos.....	95
4.2.11.1.7. Leitura.....	95
4.2.12. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do sabonete líquido contendo triclosan e extrato dos frutos de <i>S. cumini</i>	95
4.2.12.1. Preparo do inóculo.....	95

4.2.12.1.1. Padronização da suspensão bacteriana.....	95
4.2.12.1.2. Padronização da suspensão fúngica.....	95
4.2.12.2. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana do sabonete líquido com triclosan pelo método da microdiluição.....	96
4.2.12.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana do sabonete líquido com extrato vegetal pelo método da microdiluição.....	96
4.2.12.4. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica do sabonete líquido com triclosan pelo método da microdiluição.....	96
4.2.12.5. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica do sabonete líquido com extrato vegetal pelo método da microdiluição.....	97
4.2.12.6. Leitura.....	97
4.2.13. Determinação da concentração bactericida (CBM) e fungicida mínima (CFM) sabonete líquido com extrato do fruto de <i>S. Cumini</i> e com triclosan.....	98
4.2.13.1. Padronização e adaptação dos testes de verificação da CBM.....	98
4.2.13.2. Padronização e adaptação dos testes de verificação da CFM.....	98
5. Resultados e Discussão.....	99
5.1. Caracterização física, físico-química, química e microbiológica do pó dos frutos de <i>S. cumini</i>	101
5.2. Preparação do extrato do pó do fruto de <i>S. cumini</i>	108
5.3. Preparação do sabonete líquido e avaliação da atividade antimicrobiana.....	141
6. Conclusões.....	152
7. Referências bibliográficas.....	153
Anexo.....	170

LISTA DE FIGURAS

n.º	Figura	Pg
1	Distribuição geográfica da família Myrtaceae.....	31
2	Árvore <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels (jambolão).....	34
3	Folhas da árvore de jambolão.....	35
4	Flores da árvore de jambolão.....	35
5	(a) Frutos verdes de jambolão; (b) frutos maduros de jambolão.....	36
6	Associação polifenol (tanino)-proteínas.....	39
7	Exemplos de proantocianidinas diméricas.....	40
8	Extração por maceração.....	46
9	Extração por percolação.....	47
10	Extração por turbólise.....	48
11	Superfície de resposta linear.....	54
12	Superfície de resposta quadrático.....	55
13	Estrutura química do triclosan.....	66
14	Tamanho da partícula média do pó dos frutos de <i>S. cumini</i>	102
15	Análise independente de valores médios quantitativos de resíduo seco, em gramas, obtidos pelos diferentes métodos extrativos: 1- turbólise, 2 – maceração 5 dias, 3 – maceração 10 dias, 4 – percolação e empregando-se diferentes solventes: 1 – etanol 50 °GL, 2 – etanol 70 °GL, 3 – etanol 96 °GL.....	112
16	Análise gráfica considerando a inter-relação entre os processos extrativos – solventes – resíduos secos obtidos em grama.....	112
17	Resíduo seco obtido em relação ao processo extrativo e solvente.....	113
18	Resíduo seco obtido em relação ao processo extrativo e solvente.....	114
19	Histograma demonstrando a distribuição dos resultados de resíduo seco em relação à frequência e desvio padrão.....	114
20	Desvio padrão das médias quantitativas dos resíduos secos obtidos pelos diferentes métodos extrativos, e diferentes solventes.....	115
21	Atividade antimicrobiana do extrato de frutos de <i>S. cumini</i> sobre <i>Staphylococcus</i>	

	<i>aureus</i>	122
22	Atividade antimicrobiana do extrato de frutos de <i>S. cumini</i> sobre <i>Staphylococcus epidermidis</i>	122
23	Atividade antimicrobiana do extrato de frutos de <i>S. cumini</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	123
24	Atividade antimicrobiana do extrato de frutos de <i>S. cumini</i> sobre <i>Candida krusei</i>	123
25	Análise independente de valores médios quantitativos da atividade antimicrobiana de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>S. aureus</i> , em milímetros, obtidos pelos diferentes métodos extrativos: 1- turbólise, 2 – maceração 5 dias, 3 – maceração 10 dias, 4 – percolação e empregando-se diferentes solventes: 1 – etanol 50 °GL, 2 – etanol 70 °GL, 3 – etanol 96 °GL.....	124
26	Análise gráfica considerando a inter-relação entre os processos extrativos – solventes – atividade antimicrobiana para <i>S. aureus</i> obtidos em milímetro.....	124
27	Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>S. aureus</i> obtida em relação ao processo extrativo e solvente.....	125
28	Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente à <i>S. aureus</i> obtida em relação ao processo extrativo e solvente.....	126
29	Histograma demonstrando a distribuição dos resultados da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>S. aureus</i> em relação a frequência e desvio padrão.....	126
30	Análise independente de valores médios quantitativos da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>S. epidermidis</i> , em milímetros, obtidos pelos diferentes métodos extrativos: 1- turbólise, 2 – maceração 5 dias, 3 – maceração 10 dias, 4 – percolação e empregando-se diferentes solventes: 1 – etanol 50 °GL, 2 – etanol 70 °GL, 3 – etanol 96 °GL.....	127
31	Análise gráfica considerando a inter-relação entre os processos extrativos – solventes – atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>S. epidermidis</i> obtidos em milímetro.....	127
32	Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>S. epidermidis</i> obtida em relação ao processo extrativo e solvente.....	128
33	Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>S. epidermidis</i> obtida em relação ao processo extrativo e solvente.....	129
34	Histograma demonstrando a distribuição dos resultados da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>S. epidermidis</i> em relação a frequência e desvio padrão.....	129

35	Análise independente de valores médios quantitativos da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>P. aeruginosa</i> , em milímetros, obtidos pelos diferentes métodos extrativos: 1- turbólise, 2 – maceração 5 dias, 3 – maceração 10 dias, 4 – percolação e empregando-se diferentes solventes: 1 – etanol 50 °GL, 2 – etanol 70 °GL, 3 – etanol 96 °GL.....	130
36	Análise gráfica considerando a inter-relação entre os processos extrativos – solventes – atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>P. aeruginosa</i> obtidos em milímetro.....	131
37	Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>P.aeruginosa</i> obtida em relação ao processo extrativo e solvente.....	132
38	Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>P. aeruginosa</i> obtida em relação ao processo extrativo e solvente.....	132
39	Histograma demonstrando a distribuição dos resultados da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>P. aeruginosa</i> , em relação a frequência e desvio padrão.....	133
40	Análise independente de valores médios quantitativos da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>C. krusei</i> , em milímetros, obtidos pelos diferentes métodos extrativos: 1- turbólise, 2 – maceração 5 dias, 3 – maceração 10 dias, 4 – percolação e empregando-se diferentes solventes: 1 – etanol 50 °GL, 2 – etanol 70 °GL, 3 – etanol 96 °GL.....	134
41	Análise gráfica considerando a inter-relação entre os processos extrativos – solventes – atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>C. krusei</i> obtidos em milímetro.....	134
42	Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>C. krusei</i> obtida em relação ao processo extrativo e solvente.....	135
43	Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>C. krusei</i> obtida em relação ao processo extrativo e solvente.....	135
44	Histograma demonstrando a distribuição dos resultados da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de <i>S. cumini</i> frente a <i>C. krusei</i> em relação a frequência e desvio padrão.....	136
45	Concentração inibitória mínima de extrato de frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels para bactérias.....	139
46	Concentração inibitória mínima de extrato de frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels para leveduras.....	139
47	Concentração bactericida mínima do extrato de frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	140

48	Concentração fungicida mínima do extrato de frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	141
49	Atividade antimicrobiana do sabonete líquido com extrato de frutos de <i>S. cumini</i> e com triclosan sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	145
50	Atividade antimicrobiana do sabonete líquido com extrato de frutos de <i>S. cumini</i> e com triclosan sobre <i>Staphylococcus epidermidis</i>	145
51	Atividade antimicrobiana do sabonete líquido com extrato de frutos de <i>S. cumini</i> e com triclosan sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	146
52	Atividade antimicrobiana do sabonete líquido com extrato de frutos de <i>S. cumini</i> e com triclosan sobre <i>Candida albicans</i>	146
53	Atividade antimicrobiana do sabonete líquido com extrato de frutos de <i>S. cumini</i> e com triclosan sobre <i>Candida krusei</i>	147
54	Atividade antimicrobiana do sabonete líquido com extrato de frutos de <i>S. cumini</i> e com triclosan sobre <i>Candida parapsilosis</i>	147
55	Concentração inibitória mínima do sabonete com extrato de frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels e do sabonete com triclosan para bactérias.....	149
56	Concentração inibitória mínima do sabonete com extrato de frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels e sabonete com triclosan para leveduras.....	150
57	Concentração bactericida mínima do sabonete com extrato de frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels e sabonete com triclosan.....	150
58	Concentração fungicida mínima do sabonete com extrato de frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels e sabonete com triclosan.....	151
59	Média dos resultados do resíduo seco obtido em relação ao processo extrativo e solvente realizado em triplicata.....	171
60	Média dos resultados da atividade antimicrobiana frente à <i>S. aureus</i> obtido em relação ao processo extrativo e solvente realizado em triplicata.....	173
61	Média dos resultados da atividade antimicrobiana frente à <i>S. epidermidis</i> obtido em relação ao processo extrativo e solvente realizado em triplicata.....	175
62	Média dos resultados da atividade antimicrobiana frente à <i>P. aeruginosa</i> obtido em relação ao processo extrativo e solvente realizado em triplicata.....	177
63	Média dos resultados da atividade antimicrobiana frente à <i>C. krusei</i> obtido em relação ao processo extrativo e solvente realizado em triplicata.....	179

LISTA DE TABELAS

nº.	Tabela	Pg
1	Evolução de uma investigação experimental.....	49
2	Matriz de planeamento.....	50
3	Matriz de planeamento 2 ² com valores codificados das variáveis.....	51
4	Matriz de planeamento 2 ³ com valores codificados das variáveis.....	52
5	Matriz de planeamento misto com valores codificados das variáveis.....	53
6	Planejamento fatorial completo para os experimentos.....	83
7	Planejamento experimental para determinação do teor de resíduo seco.....	84
8	Planejamento experimental para a atividade antimicrobiana.....	85
9	Distribuição da concentração da amostra e seus respectivos microrganismos.....	90
10	Composição da formulação de sabonete líquido.....	92
11	Distribuição da concentração da amostra e seus respectivos microrganismos.....	97
12	Análise granulométrica do pó dos frutos de <i>S. cumini</i>	101
13	Análise física, físico-química, química e microbiológica.....	103
14	Análise fitoquímica preliminar do pó dos frutos de <i>S. cumini</i>	106
15	Análise microbiológica do pó dos frutos de <i>S. cumini</i>	107
16	Determinação em triplicata do resíduo seco do extrato de frutos de <i>S. cumini</i> utilizando planeamento experimental completo.....	111
17	Representação do melhor método de extração e líquido extrator.....	115
18	Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição produzido pela presença do extrato de fruto de <i>S. cumini</i> sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , utilizando planeamento experimental completo.....	118
19	Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição produzido pela presença do extrato de frutos de <i>S. cumini</i> sobre o crescimento de <i>Staphylococcus epidermidis</i> utilizando planeamento experimental completo.....	119
20	Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição produzido pela presença do extrato de frutos de <i>S. cumini</i> sobre o crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizando planeamento experimental completo.....	120

21	Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição produzido pela presença do extrato de frutos de <i>S. cumini</i> sobre o crescimento de <i>Candida krusei</i> utilizando planejamento experimental completo.....	121
22	Representação do melhor método de extração e líquido extrator.....	136
23	Concentração bactericida e fungicida mínima para o extrato de frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	140
24	Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição produzido pela presença do sabonete com extrato de frutos de <i>S. cumini</i> , sabonete, sabonete com triclosan, solução de triclosan, propilenoglicol e extrato sobre o crescimento dos microrganismos.....	144
25	Concentração bactericida e fungicida mínima para o sabonete com extrato de frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	149
26	Concentração bactericida e fungicida mínima para o sabonete com triclosan.....	149
27	Determinação em triplicata do resíduo seco, média dos resultados e desvio padrão do extrato de frutos de <i>S. cumini</i> utilizando planejamento experimental completo.....	170
28	Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição, média dos resultados e desvio padrão produzido pela presença do extrato de fruto de <i>S. cumini</i> sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , utilizando planejamento experimental completo.....	172
29	Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição, média dos resultados e desvio padrão produzido pela presença do extrato de fruto de <i>S. cumini</i> sobre o crescimento de <i>Staphylococcus epidermidis</i> , utilizando planejamento experimental completo.....	174
30	Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição, média dos resultados e desvio padrão produzido pela presença do extrato de fruto de <i>S. cumini</i> sobre o crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , utilizando planejamento experimental completo.....	176
31	Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição, média dos resultados e desvio padrão produzido pela presença do extrato de fruto de <i>S. cumini</i> sobre o crescimento de <i>Candida krusei</i> , utilizando planejamento experimental completo.....	178

LISTA DE FLUXOGRAMA

nº.	fluxograma	Pg
1	Preparação de extratos a partir dos frutos de <i>S. cumini</i> em vários métodos e várias concentrações de solventes.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
EMB	Eosina-Azul de Metileno
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
Ext.	Extrato
GL	Gay Lussac
Mac.	Maceração
m/V	Massa/volume
MH	Muller Hinton
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
p.a.	Pró – análise
PNA	Polifenóis não adsorventes
PT	Polifenóis totais
SM	Solução mãe
Sol.	Solução
ST	Solução teste
TSI	Tríplice Açúcar-Ferro
UFC	Unidade formadora de colônia
V/V	Volume/volume
WHO	World Health Organization
XLD	Xilose-Lisina-Desoxicolato

RESUMO

Considerando-se a qualidade dos fitoterápicos, é importante salientar que a preocupação com esta questão inclui rigoroso acompanhamento das diferentes etapas do desenvolvimento e produção destes produtos, desde a coleta do vegetal até a disponibilidade do produto final. Neste trabalho foi realizado o estudo farmacognóstico do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, popularmente conhecido como jambolão, no qual foram destacadas a otimização do processo extrativo, a determinação da atividade antimicrobiana do extrato bruto e a avaliação desta atividade após sua incorporação em um sabonete líquido. Análise fitoquímica preliminar dos frutos de *S. cumini* (L.) Skeels evidenciou taninos, flavonóides, antocianidinas, iridóides, alcalóides e heterosídeos fenólicos simples. Tendo como parâmetros o resíduo seco e a atividade antimicrobiana, os extratos foram testados frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Candida krusei*. Por meio da análise fatorial dos resultados do planejamento experimental, onde foi empregada granulometria de 0,302 mm do pó seco do fruto, constatou-se que a percolação constitui o melhor procedimento extrativo, e a mistura etanol: água (50:50) constitui o melhor solvente. Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato foram usados os microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, partindo de uma concentração inicial de 10000 µg/100 µL. A concentração bactericida mínima (CBM) foi de 1250 µg/100 µL para a *S. aureus*, 625 µg/100 µL para a *S. epidermidis* e 2500 µg/100 µL para a *P. aeruginosa* e para a concentração fungicida mínima (CFM) foi de 2500 µg/100 µL. A incorporação do extrato de *S. cumini* (L.) Skeels à uma formulação de sabonete líquido com atividade anti-séptica mostrou-se promissora em função dos resultados positivos obtidos. Apresentou atividade bactericida frente a *S. aureus* na concentração de 625 µg/100 µL, *S. epidermidis* na concentração de 312,5 µg/100 µL e *P. aeruginosa* na concentração de 1250 µg/100 µL. A atividade fungicida frente às leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* necessitou de concentrações de 1250 µg/100 µL.

Palavras-chave: *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Myrtaceae, jambolão, controle de qualidade, atividade antimicrobiana, sabonete líquido.

ABSTRACT

The quality of the phytomedicines must be assured by means of close observation of the different stages of their development and production, which starts at the moment the plant is collected and finishes at the moment the product is put on the market. A pharmacognostic study of *Syzygium cumini* (L.) Skeels fruits (popularly known as “jambolão”) was then performed, pointing out the optimization of the extractive process, the determination of the antimicrobial activity of the crude extract, and the assessment of such activity after its incorporation into the liquid soap. The phytochemical screening from the fruits of *S. cumini* (L.) Skeels demonstrated tannins, flavonoids, anthocyanins, iridoids, alkaloids and simple phenol heterosides. By using dry residue content and antimicrobial activity assessment methodologies, a factorial analysis was accomplished, and considering a dry fruit powder granulometry of 0.302 mm, the results indicated percolation as the best extraction method, and the mixture ethanol: water (50:50) as the best solvent concentration. The microorganisms *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* were used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of the extract, starting from 10000 µg/100 µL. The minimal bactericidal concentration (MBC) to *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* were 1250 µg/100 µL, 625 µg/100 µL and 2500 µg/100 µL respectively. And a minimal fungicidal concentration (MFC) of 2500 µg/100 µL. The liquid soap was then formulated, and had *S. cumini* (L.) Skeels extract added to its formulation leading, therefore, to an antiseptic activity that proved to be favorable considering the good results obtained. In the presence of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* at concentrations of 625 µg/100 µL, 312.5 µg/100 µL, and 1250 µg/100 µL, respectively, the liquid soap presented a bactericidal activity. The fungicidal activity to *C. albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*, was 1250 µg/100 µL.

Keys words: *Syzygium cumini*, Myrtaceae, “jambolão”, black berry, quality control, antimicrobial activity, liquid soap.

1. INTRODUÇÃO

Dados literários sobre a utilização de espécies vegetais para a cura de doenças e outros males são encontrados desde 50.000 anos atrás. Intuitivamente, o homem primitivo buscava descobrir soluções para suas necessidades básicas como nutrição, reprodução e proteção. Pelas suas experiências e observações, evoluiu biologicamente, descobrindo nas plantas e ervas soluções para o tratamento de injúrias ou doenças. Além das plantas benéficas, descobriram as nocivas, capazes de matar e produzir alucinações. Aos primitivos que detinham todos esses conhecimentos, foram atribuídos poderes sobrenaturais e passaram a ser considerados mágicos, curandeiros ou feiticeiros (DEVIENNE, 2000).

No processo histórico das plantas medicinais, muitas civilizações descreveram a utilização de ervas e outros vegetais como forma de medicamento, em seus registros e manuscritos. Os babilônios e sumerianos (2.600 a.C.) usavam em seus remédios, frutos, folhas, flores, cascas e raízes como a oliveira e o alho. A “Tabuinha sumeriana”, uma coleção de textos médicos em tabletes de argila, contém registros dos primeiros sintomas de doenças e a prescrição para cada enfermidade, sendo considerada o mais antigo tratado de medicina (TEIXEIRA, 1994; MIGUEL & MIGUEL, 1999). A cultura chinesa (2.000~2.500 a.C.) descreve no 1º Pen T', 635 drogas citando plantas como ginseng, ruibarbo, podofilum e *Ephedra* (DEVIENNE, 2000).

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

Na primeira metade do século XX, os produtos de origem vegetal foram esquecidos temporariamente em decorrência do grande sucesso dos compostos químicos obtidos a partir

de microrganismos, os quais eram capazes de curar infecções graves (VILEGAS, 1998). As pesquisas concentraram-se no descobrimento de vários antimicrobianos produzidos por inúmeras variedades de microrganismos, a grande maioria sem utilidade prática devido à sua toxicidade. Houve uma revolução na terapêutica induzida pelas pesquisas realizadas pela indústria químico-farmacêutica cujo objetivo maior era e ainda é o de sintetizar novas substâncias ativas com o mínimo de toxicidade (DEVIENNE, 2000).

Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e aproximadamente 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizados na terapêutica moderna. De fato, os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todas as novas drogas (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

Os produtos sintéticos têm se tornado, em algumas situações, ineficientes ou inseguros. O excesso de efeitos colaterais, o uso abusivo, a prescrição indiscriminada e o emprego incorreto destes produtos resultam em uma razão não ideal de risco / benefício. Isto promove graves riscos ao paciente e muitas vezes acarreta dependências ou resistências piorando o quadro clínico. Outro motivo que levou ao crescimento da fitoterapia é que parte da população mundial não tem acesso à medicina convencional, devido à situação econômica ou ao descaso com a população por parte do sistema político econômico mundial ou mesmo pela política adotada pelas grandes indústrias farmacêuticas (TOLEDO, 2002).

Muitas empresas estão conscientes das tendências de consumo, e buscam novos ingredientes para incorporar aos produtos já existentes e aos que poderão ser desenvolvidos no futuro. Uma tendência que está se destacando é o aumento na procura por parte da população, de produtos funcionais baseados em ativos ou fitoterápicos (ROCHA FILHO, 1995; OLIVEIRA & BLOISE, 1995).

A necessidade da introdução de novos ativos no arsenal farmacêutico é absoluta. Em se tratando de antimicrobiano, tal necessidade torna-se mais evidente ao considerar-se o aparecimento de formas bacterianas resistentes, decorrentes, principalmente, do uso indiscriminado e mal orientado deste tipo de produto. Dentro desse contexto, o interesse em plantas com propriedades antimicrobianas tem evoluído com amplas perspectivas.

Em vista disso, aumentaram também as preocupações com a qualidade de tais produtos, pois são bastante conhecidas as características desse segmento no sentido de apresentarem adulterações e falsificações frequentes (ZAUPA *et al.*, 2000). Portanto, através do controle da qualidade da droga vegetal é possível garantir também a eficácia e segurança dos produtos farmacêuticos, cosméticos e correlatos preparados a partir de drogas vegetais. Análises físico-químicas farmacopéicas são importantes para o controle da qualidade da droga vegetal. Entretanto, nem todas as drogas vegetais possuem parâmetros estabelecidos que possam contribuir ao controle de qualidade.

São inúmeras as formas farmacêuticas e fitocosméticas que vêm sendo desenvolvidas utilizando matérias-primas vegetais, e muitas delas empregadas no desenvolvimento de preparações para higiene. A utilização de agentes anti-sépticos em formulações deve ser distinguido do uso de agentes conservantes. No caso de anti-sépticos, espera-se um produto ativo contra microrganismos presentes na pele, couro cabeludo ou boca, enquanto que os conservantes têm por principal função a manutenção do produto em condições microbiológicas satisfatórias durante seu prazo de validade. Baseado no exposto e considerando o fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, popularmente conhecido como jambolão, material abundante e já referenciado por suas diversas propriedades, inclusive antimicrobiana, demonstrou ser bastante interessante a possibilidade da elaboração de um estudo farmacognóstico do fruto, preparo do extrato seco, avaliação do possível efeito antimicrobiano e sua incorporação em uma preparação para higiene. Tais procedimentos

visam colaborar de modo a ampliar os conhecimentos sobre composição química – atividade dos extratos vegetais, o que permitirá melhorar a qualidade e eficácia para as preparações que os contenha e conseqüentemente atingir-se maior segurança em relação ao usuário.

2. OBJETIVOS

Devido à imensa procura popular de plantas medicinais, entre elas a espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels, os objetivos do trabalho foram:

- Caracterizar física, físico-química, química e microbiológica o pó do fruto de *S. cumini*.
- Otimizar das condições de extração de substâncias antimicrobianas dos frutos de *S. cumini* por diferentes técnicas de extração e solventes.
- Avaliar da atividade antimicrobiana pelos métodos de difusão em ágar e determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição do extrato dos frutos de *S. cumini*.
- Desenvolver a formulação de sabonete líquido, e incorporar o extrato de frutos de jambolão ao sabonete líquido.
- Avaliar da atividade antimicrobiana pelos métodos de difusão em ágar e determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição do sabonete líquido contendo extrato dos frutos de *S. cumini*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Sistemática vegetal

Syzygium cumini (L) Skeels é uma árvore pertencente da família Myrtaceae, nativa dos trópicos, sendo popularmente conhecida no Brasil como jambolão, jamelão ou azeitona-roxa.

3.1.1. Família Myrtaceae

É caracteristicamente marcante nesta família a formação de bolsas secretoras de essências, tanto no córtice do caule como no parênquima das folhas, inferindo daí a denominação Myrtaceae, relativa a “myron” (do grego = perfume). As flores são regulares, andróginas, pentâmeras ou tetrâmeras. Apresentam o cálice aderente ao ovário, com quatro ou cinco divisões, raras vezes mais, geralmente inteiro e persistente. O androceu compõe-se de estames em número indefinido, em dois verticilos. Em regra são simples, mas às vezes se ramificam, formando estames compostos. O pistilo é ínfero ou meio ínfero, de carpelos fechados, concrecentes em ovários multiloculares e contém cada loja, grande número de óvulos anátropos. O fruto pode ser baga, como nos gêneros *Myrtus* e *Eugenia*; drupa como no gênero *Aulacocarpo*; pixídio no gênero *Bertholletia*; cápsulas loculicidas no gênero *Malaleuca*; ou aquênio no gênero *Chamelaucium*. Encerra a semente um embrião ora reto, ora curvo, ora espiralado (PINTO, [1956?]; DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

As mirtáceas, em grande número intertropicais, compreendem mais de 4.620 espécies, agrupadas em 129 gêneros e em 5 tribos, que se dividem em duas seções: a primeira contém as Myrteas, as Lepiospermeas e as Chamelauceas, e à segunda pertence as Lecythideas e as Puniceas. As pertencentes à primeira seção possuem as espécimes contendo bolsas secretoras, ao contrário das pertencentes à segunda seção (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

Nessas tribos há vegetais importantes sob diversos aspectos, aqueles que dão frutos comestíveis como a jaboticabeira (*Eugenia cauliflora* O. Berg), a goiabeira (*Psidium guajava* L.), a romeira (*Punica granatum* L.), a uvaia (*Eugenia uvalha* (Cambess.) D. Legrand), o jambo (*Eugenia jambosa* L.) e o castanheiro do Pará (*Bertholletia excelsa* Bonpl.). Aquelas ditas aromáticas, como o craveiro da Índia (*Caryophyllus aromáticas*), a murfa (*Myrthus communis*) e o cajepute (*Melaleuca cajeput*), e aquelas que oferecem madeira de qualidade empregada em construção, como o jequitibá-rosa (*Couratari legalis* Mart.), o jequitibá-vermelho (*C. estrellensis* Ames) e a sapucaia (*Lecythis pisonis* ou *Lecythis ollaria* Loefl.) entre outros (PINTO, [1956?]; DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).



Figura 1. Distribuição geográfica da família Myrtaceae
Vermelho: Países onde é encontrada a família Myrtaceae
GÊNERO *Syzygium*, 17/02/05

3.1.2. Gênero *Syzygium*

O gênero *Syzygium* (sinônimo: *Eugenia*) possui 14 espécies, incluindo *Eugenia uniflora* L., *Eugenia punissifolia*, *Syzygium jambos* (L.) Alst e *Syzygium jambolanum* DC., todas possuindo comprovado efeito fisiológico em várias espécies, incluindo o homem (ALBERTON *et al.*, 2001). A literatura relata que as folhas de *E. uniflora* L. apresentam efeitos diurético, antiinflamatório, anti-hipertensivos, antigotosos, hipoglicemiantes e hipotriglicéridicos. Além disto, existem relatos de que seu fruto apresente efeito hipoglicêmico. As raízes de *E. punissifolia* Specimens. possuem efeitos hipoglicêmicos em cães normais e pancreaticomizados. No Brasil, tanto o *S. jambos* (L.) Alston., como *S. jambolanum* DC. são conhecidos como jabolão. As folhas de *S. jambos* possuem ação hipotensiva, enquanto as folhas e brotos de flores da *S. jambolanum* são considerados diuréticos. As cascas de *S. jambolanum* têm mostrado efeito antidiarréico bem como uma ação inibitória contra a atividade da protease HIV-1, enquanto as sementes desta planta têm mostrado efeito anticonvulsivante (PEPATO *et al.*, 2001; MAHMOUD *et al.*, 2001).

3.1.3. A espécie *Syzygium cumini* (L) Skeels

Syzygium cumini (L.) Skeels (Fig. 2) é uma árvore nativa dos trópicos, particularmente da Índia, bem como da Tailândia, Filipinas e Madagascar. A planta foi introduzida em muitos países tropicais pertencentes à África e à América Latina. No Brasil é encontrada em diversos estados das regiões Sudeste, Nordeste e Norte. Pode também ser encontrada em algumas regiões subtropicais como a Flórida, a Califórnia nos Estados Unidos, a Argélia e Israel (MORTON, 1987; ROSS, 1999; ALBERTON *et al.*, 2001; MAHMOUD *et al.*, 2001; GROVER *et al.*, 2001; jabolão, 07/12/2003).

Apresenta as seguintes sinónímias: *Eugenia jabolana* Lam., *Syzygium jambolanum* DC., *S. caryophyllifolium* DC., *Eugenia cortisona* Lour., *E. frondosa* Wall., *E. caryophyllifolia*

Lam., *E. jabolifera* Roxb., *E. moorei* Muell., *E. obtusifolia* Roxb., *E. cumini* Druce., *Jabolifera pedunculata* Gaertn, *E. glomerata* Sieber, *Calyptrantes caryophyllifolia* Willd., *C. jabolana* Willd., *C. cumini* Pers., *Myrtus cumini* L. (MORTON, 1987; SLOWING *et al.*, 1994; ALBERTON *et al.*, 2001, MAHMOUD *et al.*, 2001; TIMBOLA *et al.*, 2002; DAMASCENO *et al.*, 2002; ZANOELLO *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, 2003; jambolão 07/12/2003).

É uma árvore que mede cerca de 10 m de altura e 3 a 4,5 m de diâmetro de projeção da copa, com folhagem abundante, ramos de coloração acinzentada-claro, com fissuras escuras e cicatrizes foliares bastante aparentes. O caule é aéreo, ereto, tipo tronco, lenhoso, cilíndrico, apresentando ramificação caulinar do tipo simpodial.



Figura 2. Árvore *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolão)

Os ramos são retorcidos com folhas dispostas em filotaxia oposta. As folhas (Fig. 3) são simples, pecioladas, lanceoladas, com margem ondulada, ápice cuspidado e base cuneada. A nervação é peninérvea, apresentando nervura marginal (nervuras soldadas em bordo).



Figura 3. Folhas da árvore de jambolão

As flores (Fig. 4), de coloração branca a creme, estão dispostas em inflorescências axilares, racemosas, plurifloras compostas, sendo semelhantes quanto à forma às panículas mirceóides, que caracterizam outros gêneros pertencentes à família Myrtaceae. Tanto o pedúnculo principal quanto os pedicelos se apresentam pouco retorcidos como ocorre nos ramos. As flores são hermafroditas, com cálice gamossépalo e corola dialipétala. Androceu dialistêmone e polistêmone, apresenta anteras globosas que, por sua vez, estão inseridas no filete dorsiventralmente e apresentam deiscência longitudinal. O gineceu apresenta ovários ínferos, gamocarpelares, bicarpelares, biloculares com placentação axial (MORTON, 1987; ROSS, 1999; OLIVEIRA & AKISUE, 2000; ALBERTON *et al.* 2001).



Figura 4. Flores da árvore de jambolão

Os frutos são carnosos do tipo baga, elípticos, apresentando cerca de 3 a 4 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, com pericarpo de coloração roxa escura intensa, apresentando

apenas uma semente (Fig. 5). O mesocarpo é carnoso e sucoso com sabor ácido adocicado, oferecendo forte sensação de adstringência (MORTON, 1987; ROSS, 1999; OLIVEIRA & AKISUE, 2000; ALBERTON *et al.*, 2001). No Brasil floresce nos meses de setembro a novembro e o fruto é encontrado abundantemente nos meses de dezembro a fevereiro (DANADIO *et al.*, 1998; ROSS, 1999; OLIVEIRA & AKISUE, 2000; ALBERTON *et al.*, 2001; jambolão, 07/12/2003).



Figura 5. (a) Frutos verdes de jambolão

b) frutos maduros de jambolão

Esta planta é popularmente conhecida nos diversos países de sua ocorrência com as seguintes denominações: jambolão, jamun, jamblon, jambolan, jambolana, jambol, jamdian, jamoon, jambul, black plum, blackberry, jamelão, jalão, neredu, jam, azeitona, azeitona-roxa, murta, jambuí, oliva, alla, naeredu, oliveira, java plum, portuguese plum, malabar plum, purple plum, damson plum, jaman, jambu, jambool, jambhool, jamelong, jamblang, jiwat, salam, koriang, luk-wa, madan, malak rose-apple, naval, negresse, rotra, tete, wa, waa, ma-há, pring bai, pring das krebey, voi rung, duhat, lomboy, lunaboy, djoowet, doowet, pésjua extranjera, guayabo pésjua, koeli, jamoen, druif, jambeiro (PENNA, 1930; MORTON, 1987; ROSS, 1999; SHARMA *et al.*, 2002; TIMBOLA, *et al.*, 2002; GROVER *et al.*, 2002; GARCIA, *et al.*, 2003; jambolão, 07/12/2003).

3.1.4. Uso popular

Syzygium cumini, popular jambolão, se destaca por ser rico em vários constituintes. A literatura relata suas ações hipoglicemiante, antimicrobiana, hipotensiva, diurética, cardiotônica, adstringente, antiinflamatória, antiemética, estimulante do sistema nervoso central, antipirética, anticonvulsivante, anti-hemorrágica, carminativa e antiescorbútica.

Tal situação tem popularizado seu emprego no tratamento de constipação, leucorréia, úlcera venérea, purificação de sangue, interrupção de hemorragia nas fezes, disenteria, dispepsia, asma, bronquite, gengivite, estomatite, queimaduras, retenção urinária e descamações do couro cabeludo (MORTON, 1987, BHATIA & BAJA, 1975; SCHAPOVAL *et al.*, 1988; SANTOS *et al.*, 1995; ROSS, 1999; MOHMOUD *et al.*, 2001; ALBERTON *et al.*, 2001; PEPATO *et al.*, 2001; ZANOELLO *et al.*, 2002; DAMASCENO *et al.*, 2002; TIMBOLA *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, 2003; jambolão, 07/12/2003).

3.1.5. Composição química

A composição química das sementes, cascas, folhas, frutos e flores do jambolão tem sido referenciada por diversos autores (BHATIA & BAJAJ, 1975; LIU, 1995; SCHAPOVAL *et al.*, 1988; ROSS, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2000; AHMAD & BEG, 2001; ALBERTON *et al.*, 2001; MAHMOUD *et al.*, 2001; DAMASCENO *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, 2003; TIMBOLA *et al.*, 2002; ZANOELLO *et al.*, 2002).

Sementes: foram encontrados taninos hidrolisáveis (ácido gálico, elágico, corilágico), quercetina, antimelina, óleo essencial (á- e â-pineno, canfeno, mirceno, limoneno, *cis*-ocineno, *trans*-ocineno, ã-terpineno, acetato de bornila, á-copaeno, á-humuleno e candineno), materiais resinosos e glicose.

Cascas: foram encontrados ácido acetil oleanólico, triterpenóides, ácido elágico, isoquercetina, quercetina, canferol e miricetina.

Folhas: foram encontrados ácido gálico, metilgalato, canferol, miricetina, ácido elágico, ácido clorogênico, quercetina e nilocitina.

Frutos: foram encontradas antocianidinas.

Flores: foi encontrado ácido oleanólico.

3.1.5.1 Taninos

Taninos e compostos fenólicos vêm sendo amplamente reconhecidos por possuírem alto potencial antibiótico. Tal afirmação encontra respaldo ao confirmar-se o uso de plantas medicinais ricas em polifenóis para obtenção de efeito anti-séptico (KOLODZIEJ *et al.*, 2003).

Tanino é um termo utilizado para designar substâncias de origem vegetal capazes de transformar “pele fresca em couro”. Estas substâncias encontram-se difundidas em plantas e alimentos de origem vegetal, como por exemplo: frutas, legumes, sementes, grãos cereais, bebidas (vinho, chá, cidra, cacau) (BUELGA & SCALBERT, 2000).

São metabólitos secundários de plantas superiores. Possuem peso molecular entre 500 e 3000 Daltons (MELLO & SANTOS, 2004), são solúveis em água, possuem propriedades especiais como precipitar proteínas e alcalóides (Fig. 6). A capacidade de precipitar proteínas, particularmente salivares da cavidade oral, caracteriza o sabor adstringente dos taninos, possibilitando seu fácil reconhecimento em frutos verdes. Tal propriedade é relevante para a proteção do vegetal frente ao ataque de alguns patógenos e herbívoros.

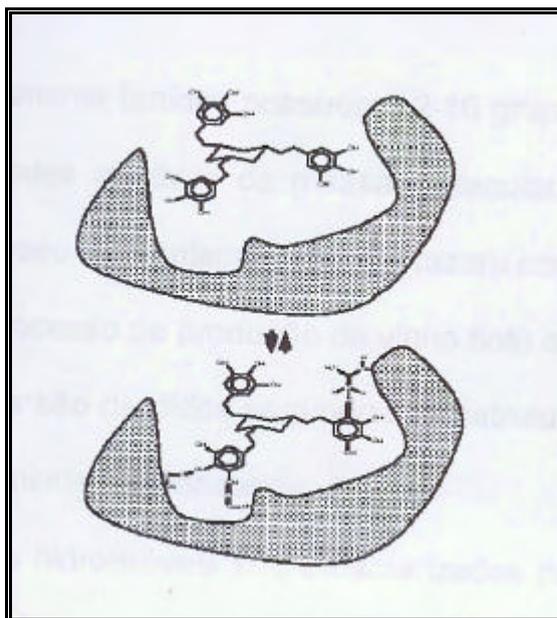


Figura 6. Associação polifenol (tanino)-proteínas
HASLAM, 1989

Estruturalmente, os taninos possuem 12 – 16 grupos fenólicos e 5 – 7 anéis aromáticos com 1000 unidades relativas de massa molecular. São divididos segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados.

Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente α -D-glucose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com ácido gálico (MELLO & SANTOS, 2004).

Os taninos condensados são ligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas unidades ou mais de flavan-3-ol e flavan-3-4-diol. Esta classe também é denominada de proantocianidina ou leucocianidinas (MELLO & SANTOS, 2004). Pelo fato de cederem antocianidinas (cianidina, delphinidinas) após a degradação com ácido mineral diluído à quente (BUELGA & SCALBERT, 2000; MELLO & SANTOS, 2004).

Os taninos condensados são formados por unidades elementares de flavan-3-ol com ligações C-C e ocasionalmente ligações C-O-C. Os flavan-3-óis possuem um esqueleto típico flavonóidico com ligações $C_6-C_3-C_6$ (BUELGA & SCALBERT, 2000).

As proantocianidinas são formadas comumente por unidades de catequina e/ou epicatequina com ligações $4 \rightarrow 6$ ou $4 \rightarrow 8$, entre as unidades superior e inferior, respectivamente, como pode ser visto na figura 7. Além dos monômeros catequina e epicatequina, outros são bastante comuns, como galocatequina, epigalocatequina, robinetinidol e fisetinidol (TOLEDO, 2002).

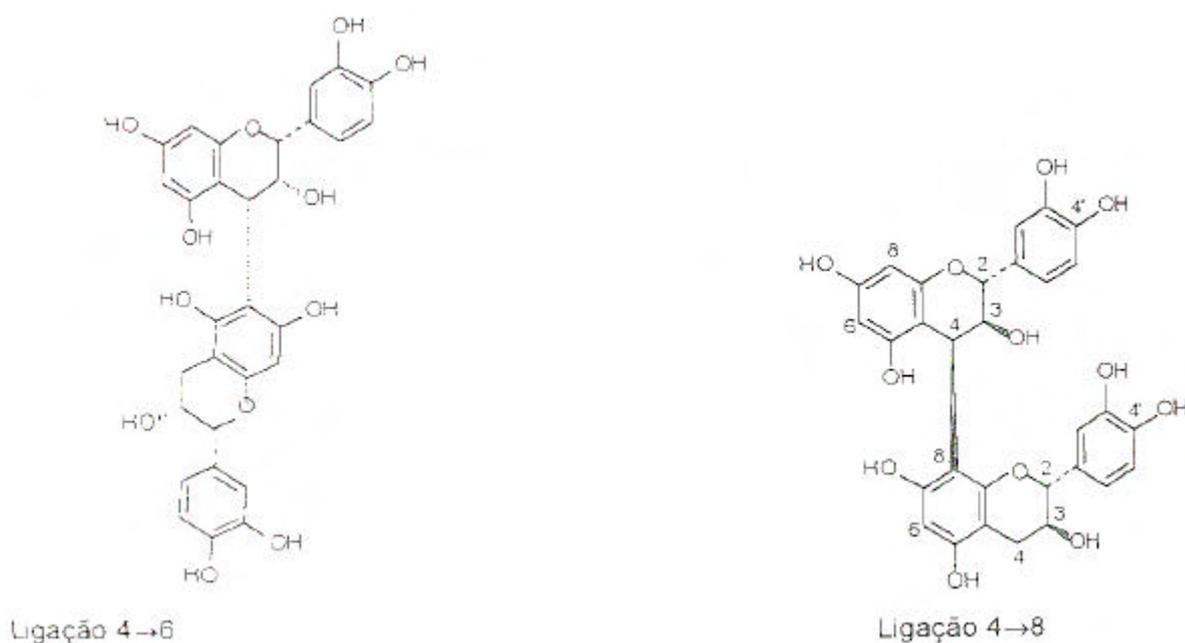


Figura 7. Exemplos de proantocianidinas diméricas

HASLAM, 1975

3.2- Extratos

As farmacopéias brasileira e a americana, entre outras, definem os extratos como preparações farmacêuticas obtidas pela concentração, até determinado grau, das soluções resultantes do esgotamento das substâncias medicamentosas por um dissolvente, como a água, álcool, éter, acetona (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000).

Os egípcios sabiam usar numerosas medicações extraídas de vegetais e anestesiá-los pelo uso de macerações de plantas em vinho. Faziam mumificações usando-se de uma minuciosa técnica, com plantas, essências aromáticas, resinas e salmouras para as quais já tinham observado suas propriedades anti-sépticas (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; OS EXTRATOS, 2002).

Hipócrates (460–377 a.C.) menciona mais de duzentas plantas usadas em sua terapêutica. No ano de 65 da era cristã uma obra notável de medicina e botânica, chamada de “De matéria médica” escrita por Dioscóride cita os sucos concentrados de cicuta e um extrato aquoso de gengiana, obtido por evaporação das soluções aquosas desta droga depois de filtrada (PRISTA *et al.*, 1996; OS EXTRATOS, 2002).

3.2.1 Classificação dos extratos vegetais

Apesar das definições farmacopéicas definirem extratos como sendo preparações sólidas, na realidade tais preparações compreendem, um conceito vasto de fitoterápicos que podem ser líquidos, moles, espessos e secos.

Extratos líquidos são os produtos obtidos a partir de matérias-primas vegetais, através de várias metodologias de extração ou dissolução. Tais metodologias envolvem o emprego de misturas solventes adequadas, em qualquer relação de concentração entre a matéria-prima vegetal e o meio líquido. São preparadas soluções extrativas em meio aquoso, hidro-etanólico, hidro-poliglicólico ou oleosos (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

Extratos moles são descritos, segundo a Farmacopéia Brasileira, como preparações semi-sólidas obtidas por evaporação parcial de extratos de drogas vegetais, adicionadas ou não de adjuvantes (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; COSTA, 1994; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

Extratos espessos são preparações viscosas à temperatura ambiente, obtidas pela concentração de soluções extrativas até o ponto de formar uma massa maleável contendo quantidades variáveis de umidade residual (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; COSTA, 1994; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

Extratos secos são preparações obtidas pela eliminação total da fase líquida por operação de secagem sob pressão reduzida ou atmosférica, por liofilização ou pela incorporação da solução extrativa em matriz sólida, com posterior secagem (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; COSTA, 1994; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

3.2.2. Processos extrativos

Os extratos vegetais são obtidos fundamentalmente pelo emprego de vegetais secos. Como o principal objetivo é retirar do vegetal diversas possibilidades dentre um universo químico extraordinariamente complexo, a seletividade exigida fundamenta-se em dois principais fatores, as características do solvente e o processo extrativo aplicado (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000).

Apesar de inúmeros outros fatores, tais como, temperatura, agitação, granulometria do vegetal e pH, influenciarem no processo extrativo, o sucesso da extração é estreitamente dependente do sistema solvente escolhido. Neste aspecto, pode-se dizer que a seletividade da extração pode atingir um elevado grau, trabalhando-se com a polaridade relativa dos solventes e dos constituintes que se pretende extrair (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

A literatura classifica os processos extrativos em dois grandes procedimentos, a maceração e a percolação ou lixiviação, que em seus fundamentos são capazes de correlacionar outras técnicas, como a digestão, a infusão, a decocção, a turbólise (turbo-extração) (DÄR, 1981;

VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

3.2.3. Estabilização e secagem

Independente do processo extrativo, a secagem do material é um procedimento de extrema importância.

A utilização de material vegetal fresco pode ser indispensável para a detecção de alguns componentes específicos. Seu emprego tem a vantagem de evitar a presença de substâncias oriundas do metabolismo de fornecimento vegetal, e a desvantagem de necessitar de imediato processamento. Caso isto não seja possível, a análise do material só deve ser processada com segurança quando este tiver sido armazenado a baixas temperaturas (COSTA, 1994; SCHULZ *et al.*, 2002).

O material vegetal seco apresenta maior estabilidade química, e o processo de secagem exige alguns cuidados que objetivem interromper os processos metabólicos que ocorrem após a coleta da planta (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

A secagem tem por finalidade a retirada de água evitando reações de hidrólise e de crescimento microbiano. Pode ser realizada ao ar livre, em estufas empregando ar quente, ou com o emprego de liofilizadores. A secagem ao ar livre é mais econômica, embora exija maior vigilância para garantir a uniformidade das condições durante a operação. Preferencialmente, deve ser realizada à sombra, já que a irradiação solar pode alterar a constituição química do material. O local deve ser convenientemente seco e protegido contra o ataque de insetos ou contaminantes ambientais e é comum dispor o material sobre papel para absorção da umidade. Na secagem por ar quente empregam-se estufas equipadas com um termostato, o que garante a manutenção de temperatura constante durante o tempo desejado. É conveniente deixar escapar o

ar da estufa, a fim de evitar a sua saturação com o vapor d'água que vai sendo desprendido do material a secar. A secagem a frio, com liofilizadores, freqüentemente é usada para preservar a integridade da amostra sensível ao aquecimento. A operação de secagem, independente de como é realizada, propicia a redução de volume e de peso e facilita a moagem dos materiais (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

3.2.4. Extração

A preparação de amostras vegetais é muito complexa apresentando várias etapas. A primeira etapa, e certamente a mais importante é a extração que tem a finalidade de separar substâncias de interesse de uma matriz complexa (COSTA, 1994; BANDEIRA, 2004).

Antes de executar uma extração, deve-se levar em consideração uma série de fatores que interferem nesta operação tais como granulometria do material, polaridade do solvente, acidez do meio, agitação, temperatura e tempo de extração (SOARES *et al.*, 1998).

A granulometria do material influencia diretamente na eficiência da extração. A estrutura histológica das diversas partes componentes de uma planta é bastante heterogênea; existem órgãos como as raízes e os caules, cujos tecidos estão fortemente compactados, ao passo que em folhas e flores os tecidos se apresentam com textura mais delicada. Como o poder de penetração dos solventes depende, entre outros fatores, da consistência dos tecidos que formam o material a extrair, quanto mais rígido for o material menor deve ser sua granulometria (COSTA, 1994; SIMÕES *et al.*, 2003).

A polaridade do solvente também influencia na eficiência da extração. O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível. É devido à seletividade que se podem extrair as substâncias desejadas. Como a seletividade depende da polaridade, o grau de polaridade do

grupo que se deseja extrair determina o solvente ou a mistura de solventes que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração (PRISTA *et al.*, 1996; SIMÕES *et al.*, 2003).

A extração de determinadas substâncias ainda pode ser influenciada pela acidez do meio extrator. Considerando que os processos de extração dependem, em grande parte, de fenômenos de difusão e que a renovação do solvente em contato com as substâncias a dissolver desempenha um papel de grande influência na velocidade da dissolução, pode-se concluir que a agitação pode diminuir a duração de um processo extrativo (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

O aumento da temperatura provoca um aumento da solubilidade de qualquer substância, motivo pelo qual os métodos de extração a quente são sempre mais rápidos do que aqueles realizados à temperatura ambiente. Entretanto, o calor nem sempre pode ser empregado, já que muitas substâncias são instáveis em altas temperaturas (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

O tempo de extração varia em função da rigidez dos tecidos do material vegetal, do seu estado de divisão, da natureza das substâncias a extrair, do solvente empregado e do emprego – ou não – de temperatura e/ou agitação (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a seletividade, a estabilidade das substâncias extraídas e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar (COSTA, 1994; SIMÕES *et al.*, 2003).

As técnicas de maceração, percolação e turbólise (turbo-extração) foram utilizadas nesse trabalho e estão descritas abaixo.

3.2.4.1. Maceração

Maceração designa a operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em diversas temperaturas, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator (DÄR, 1981; SIMÕES *et al.*, 2003) (Fig. 8).

O princípio do processo consiste em manter o vegetal em contato com o solvente. Como em tal processo a capacidade extrativa é dependente de um gradiente de concentração, torna-se evidente que o rendimento extrativo apresenta sensível tendência a diminuir com o tempo (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

Os principais fatores que influenciam a eficiência da maceração estão vinculados ao material vegetal, ao líquido ou misturas de líquidos extratores e às condições do sistema, em conjunto (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

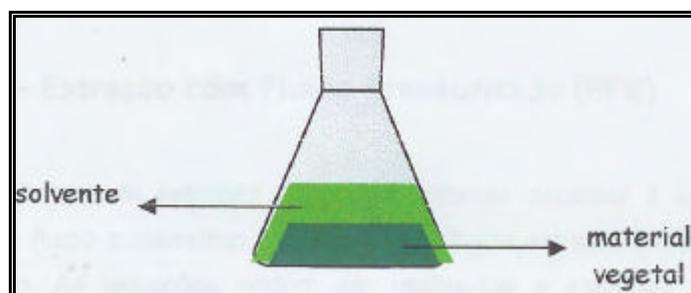


Figura 8. Extração por maceração
BANDEIRA, 2004

3.2.4.2. Percolação

Este grupo de operações tem como característica comum a extração exaustiva das substâncias ativas (Fig. 9). Na percolação, a droga vegetal moída é colocada em um recipiente cônico ou cilíndrico (percolador), de vidro ou de metal, através do qual é feito passar o líquido extrator (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996).

Diferentemente da maceração, a percolação é uma operação dinâmica, indicada na extração de substâncias, farmacologicamente ativas e presentes em pequenas quantidades ou pouco solúveis (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

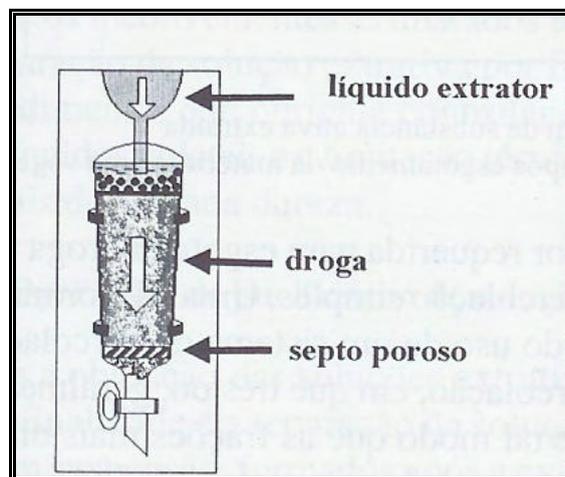


Figura 9. Extração por percolação
SIMÕES *et al.*, 2003

3.2.4.3. Turbo-extração (turbólise)

Esta técnica baseia-se na extração com simultânea redução do tamanho de partícula, resultado da aplicação de elevadas forças de cisalhamento, geradas no pequeno espaço compreendido entre o extrator e um rotor de alta velocidade (5000 a 20000 rpm). A redução drástica do tamanho de partícula e o conseqüente rompimento das células favorece a rápida dissolução das substâncias ativas (Fig. 10). Nestas circunstâncias, a difusão das substâncias dissolvidas pela membrana celular fica relegada a um plano secundário, resultando em tempos de extração da ordem de minutos e o quase esgotamento da droga. A esse incremento da eficiência somam-se a simplicidade, rapidez e versatilidade da técnica, que permitem a fácil utilização dessa técnica em processamentos em pequena e média escala (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; SIMÕES *et al.*, 2003).

Entre os inconvenientes assinalados à turbo-extração cabe mencionar: a difícil separação da solução extrativa por filtração; a geração de calor durante o procedimento, que obriga a

controlar a temperatura, restringindo o emprego de líquidos voláteis e a limitação técnica, quando se trata de caules, raízes ou materiais de elevada dureza (DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; SIMÕES *et al.*, 2003).

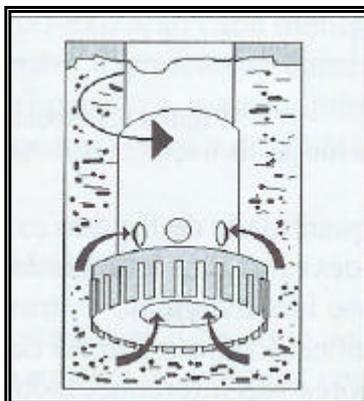


Figura 10. Extração por turbólise
SIMÕES *et al.*, 2003

3.3. Planejamento experimental

O planejamento experimental é a forma de realizar de modo sistemático os experimentos para selecionar os processos e as variáveis que possam influenciar uma pesquisa científica. Através da realização de experimentos em ordem aleatória, busca-se avaliar os fatores mais significativos, a sua correlação e a otimização das condições experimentais, alterando-as quando necessário.

3.3.1. Planejamento e análise estatística

Técnicas de planejamento e análise estatística de experimentos são utilizadas para a otimização de diversos sistemas (CLARKE & KEMPSON, 1997).

A seguir apresentam-se alguns conceitos de termos fundamentais para a aplicação dessas técnicas de planejamento.

- Fatores: são as variáveis que influenciam a resposta de um sistema.
- Níveis: são as diferentes condições experimentais de um fator.
- Resposta: é a propriedade de interesse de um sistema.

- Superfície de resposta: é a função que descreve a influência dos fatores sobre a resposta de um sistema.

A evolução de uma investigação experimental é apresentada na Tabela 1 (NETO *et al.*, 2001).

Tabela 1. Evolução de uma investigação experimental

Objetivo	Técnica
Triagem de variáveis	Planejamento fatorial fracionário
Avaliação da influência individual das variáveis	Planejamento fatorial completo
Otimização	Metodologia de superfície de resposta
Avaliação do modelo	Análise estatística

Planejamentos fatoriais fracionários são utilizados quando não se sabe quais são as variáveis mais importantes para o sistema estudado. Com esse planejamento realiza-se uma triagem de variáveis e descartam-se as não significativas (HASWELL, 1992).

Selecionados os fatores importantes, pode-se avaliar a influência dos fatores sobre a resposta de interesse, bem como as possíveis interações entre os fatores empregando-se planejamentos fatoriais completos.

Ultrapassando esta etapa e desejando otimizar o sistema, isto é, maximizar ou minimizar algum tipo de resposta é conveniente utilizar metodologia de superfície de resposta, um método baseado na modelagem por mínimos quadrados.

Por fim, é preciso avaliar se o modelo construído é realmente adequado ao sistema que se quer descrever, só então é possível extrair conclusões desse modelo.

Nesse trabalho foi realizada a otimização das condições de extração utilizando planejamentos fatoriais completos, metodologia de superfície de resposta e análise estatística dos resultados.

3.3.2. Planejamento fatorial completo

Para executar um planejamento fatorial é necessário especificar os níveis em que cada fator deve ser estudado, isto é, os valores dos fatores que devem ser usados para fazer os experimentos. É necessário apoiar-se no conhecimento disponível sobre o sistema para determinar quais serão os níveis escolhidos. Para fazer um planejamento fatorial completo, deve-se realizar experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Cada um desses experimentos, em que o sistema é submetido a um conjunto de níveis definido, é um ensaio experimental. A lista dessas combinações é chamada de matriz de planejamento. Em geral, se houver n_1 níveis do fator x_1 , n_2 do fator x_2 , ..., e n_k do fator x_k , o planejamento será um fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ (NETO *et al.*, 2001).

Uma ilustração de uma matriz de planejamento de um fatorial $n_1 \times n_2$ é apresentado na Tabela 2 sendo que:

x_1 e x_2 são os fatores

A_{n_1} e B_{n_1} são os níveis do fator x_1

A_{n_2} e B_{n_2} são os níveis do fator x_2

Tabela 2. Matriz de planejamento

Ensaio	Fatores	
	x_1	x_2
1	A_{n_1}	A_{n_2}
2	A_{n_1}	A_{n_2}
3	B_{n_1}	B_{n_2}
4	B_{n_1}	B_{n_2}

É conveniente que os valores originais das variáveis sejam codificados para facilitar a construção dos planejamentos experimentais, remover as unidades de medida dos fatores, colocar a origem do eixo das variáveis no valor intermediário e definir uma nova escala. Existem

ainda vantagens adicionais quando se trabalha com variáveis codificadas. Elas proporcionam facilidade computacional, com aumento da exatidão na estimativa dos coeficientes do modelo e facilidade de interpretação desses coeficientes, pois todas as variáveis estão sendo estudadas dentro de um mesmo intervalo. No planejamento fatorial pode-se trabalhar com variáveis qualitativas ou quantitativas. No caso de se trabalhar com variáveis quantitativas, para fazer a transformação dos valores originais em valores codificados basta aplicar a Equação 1 (BANDEIRA, 2004).

$$x = (T - \bar{T}) / (\Delta T / 2) \tag{1}$$

sendo que:

x é o valor codificação da variável;

T é o valor original da variável a ser codificado;

\bar{T} é a média entre os valores do nível alto e do nível baixo da variável original;

ΔT é a variação entre os valores do nível alto e do nível baixo da variável original.

Uma ilustração de uma matriz de planejamento de um fatorial $n_1 \times n_2$ com valores codificados das variáveis é apresentada na Tabela 3 sendo que:

x_1 e x_2 são os fatores;

(+1) é o nível codificado de A_{n_1} e A_{n_2} dos fatores x_1 e x_2

(-1) é o nível codificado de B_{n_1} e B_{n_2} dos fatores x_1 e x_2

Tabela 3. Matriz de planejamento 2^2 com valores codificados das variáveis

Ensaio	Fatores	
	x_1	x_2
1	+1	+1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	-1	-1

Uma ilustração de uma matriz de planejamento de um fatorial $n_1 \times n_2$ com valores codificados das variáveis é apresentada na Tabela 4 sendo que:

x_1 , x_2 e x_3 são os fatores;

(+1) é o nível codificado de A_{n_1} , A_{n_2} e A_{n_3} dos fatores x_1 , x_2 e x_3

(-1) é o nível codificado de B_{n_1} , B_{n_2} e B_{n_3} dos fatores x_1 , x_2 e x_3

Tabela 4. Matriz de planejamento 2^3 com valores codificados das variáveis

Ensaio	Fatores		
	x_1	x_2	x_3
1	+1	+1	+1
2	-1	+1	+1
3	+1	-1	+1
4	-1	-1	+1
5	+1	+1	-1
6	-1	+1	-1
7	+1	-1	-1
8	-1	-1	-1

São denominados fatoriais mistos quando os fatores envolvidos estão cada um em diferentes níveis. Esta é a situação do presente trabalho em que o fator processo se apresenta em quatro níveis: turbólise, maceração 5 dias, maceração 10 dias e percolação. O outro fator a ser estudado é o solvente que será apresentado em três níveis etanol 50 °GL, 70 °GL e 96 °GL (Tabela 5).

Tabela 5. Matriz de planejamento misto com valores codificados das variáveis

Ordem Padrão	Processo	Solvente
1	1	1
2	1	2
3	1	3
4	2	1
5	2	2
6	2	3
7	3	1
8	3	2
9	3	3
10	4	1
11	4	2
12	4	3

3.3.3. Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica estatística de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais e na modelagem por mínimos quadrados. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) às respostas obtidas com planejamentos fatoriais (MASSART *et al.*, 1988; NETO *et al.*, 2001).

No procedimento de otimização, o primeiro passo é identificar uma função matemática que modele a variação da resposta em função da variação dos fatores avaliados.

Geralmente, a primeira função que é utilizada para se aproximar ao conjunto de resultados são os polinômios de primeira ordem, ou seja, funções lineares, cujas respostas são estimadas pela Equação 2. Nesse caso, procura-se verificar se a variação da resposta em função dos fatores é bem modelada por uma superfície linear, conforme a Figura 11.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 \quad (2)$$

sendo que:

y é a resposta;

x_1 e x_2 são os fatores experimentais;

b_0 , b_1 , b_2 são os coeficientes do polinômio.

A superfície de resposta é uma forma gráfica para definir as melhores condições experimentais conforme a visualização proposta pela escala de cores apresentadas de verde (sendo piores condições) a marrom (sendo melhores condições).

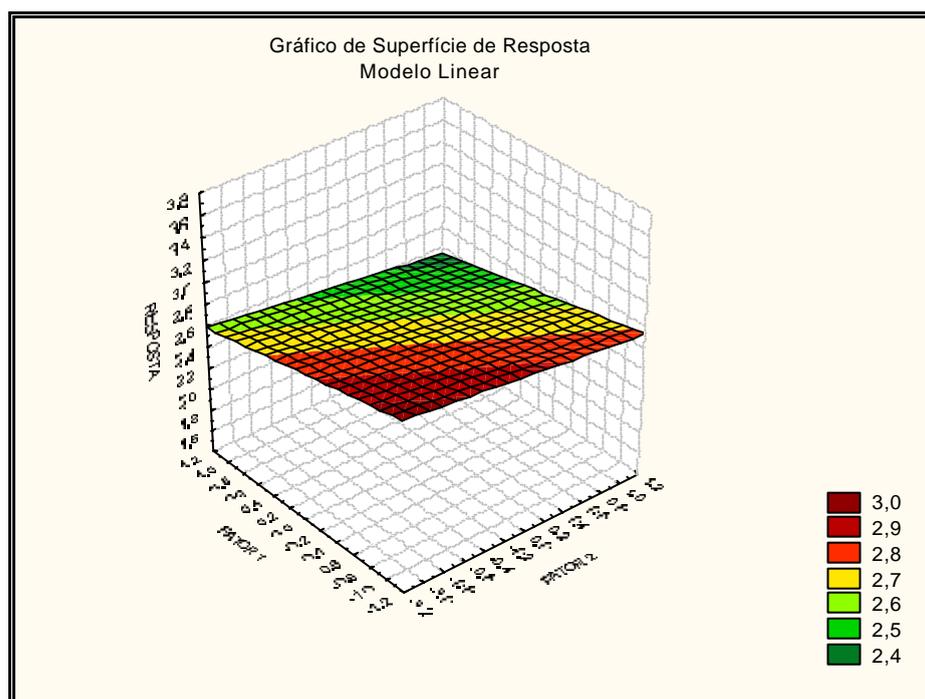


Figura 11. Superfície de resposta linear

No entanto, a função que melhor descreve modelos que maximizam ou minimizam uma resposta são os polinômios de segunda ordem, ou seja, funções quadráticas, cujas respostas são estimadas pela Equação 3. Nesse caso, procura-se verificar se a variação da resposta em função dos fatores é bem modelada por uma superfície quadrática, conforme a Figura 12.

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1^2 + b_{22} x_2^2 \quad (3)$$

sendo que:

y é a resposta;

x_1 e x_2 são os fatores experimentais;

$b_0, b_1, b_2, b_{12}, b_{11}$ e b_{22} são os coeficientes do polinômio.

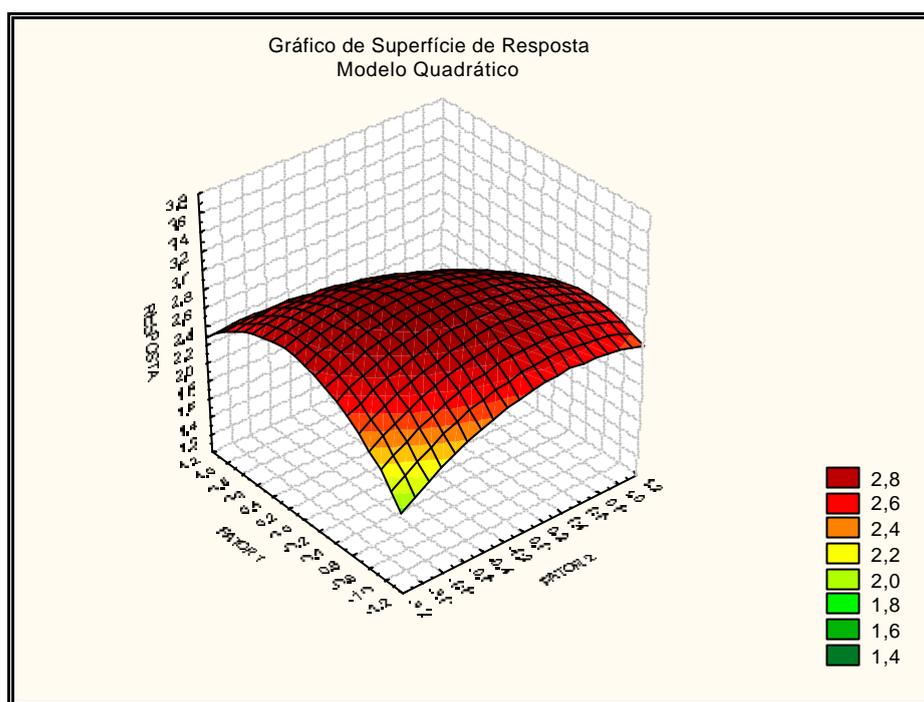


Figura 12. Superfície de resposta quadrático

Os valores de b dos polinômios de primeira e segunda ordem podem ser obtidos pelo método dos mínimos quadrados, conforme a Equação 4 ou com o auxílio de programas estatísticos.

$$b = (X^t X)^{-1} X^t y \quad (4)$$

sendo que:

b é uma matriz com os coeficientes;

X é uma matriz com os parâmetros experimentais codificados;

y é uma matriz com a resposta experimental.

Finalmente, a última etapa é estudar a superfície de resposta na região de interesse. Essa etapa tem como objetivo determinar os níveis ótimos do sistema investigado através da localização do ponto estacionário.

O ponto estacionário será definido pelo conjunto de pontos (x_1, x_2) para o quais as derivadas parciais se igualam a zero, conforme a Equação 5.

$$y / x_1 = y / x_2 = 0 \quad (5)$$

sendo que:

y / x_1 é a derivada parcial de y em relação a x_1 ;

y / x_2 é a derivada parcial de y em relação a x_2 .

O ponto estacionário pode representar um ponto de máximo, um ponto de mínimo ou um ponto de sela.

3.3.4. Análise estatística

O método mais utilizado para avaliar se o modelo construído é realmente adequado ao sistema que se quer descrever é a análise de variância (ANOVA) (NETO *et al.*, 2001).

Para fazer a análise de variância de um modelo é feita a decomposição algébrica dos desvios das respostas observadas em relação à resposta média global, conforme a Equação 6 (ZAR, 1984).

$$(y - \bar{y}) = (\hat{y} - \bar{y}) + (y - \hat{y}) \quad (6)$$

sendo que:

y é a resposta observada;

\bar{y} é a resposta média global;

\hat{y} é a resposta estimada pelo modelo.

Elevando a Equação 6 ao quadrado e fazendo o somatório sobre todos os pontos, teremos do lado esquerdo a soma quadrática em torno da média e do lado direito as somas quadráticas das duas parcelas, conforme a Equação 7.

$$\sum (y - \bar{y})^2 = \sum (\hat{y} - \bar{y})^2 + \sum (y - \hat{y})^2 \quad (7)$$

sendo que:

$\sum (y - \bar{y})^2$ é a soma quadrática em torno da média (SQ_T);

$\sum (\hat{y} - \bar{y})^2$ é a soma quadrática devida à regressão (SQ_R);

$\sum (y - \hat{y})^2$ é a soma quadrática residual (SQ_r).

Uma parte da variação total das observações y em torno da média \bar{y} é descrita pela equação de regressão, e o restante fica por conta dos resíduos. Quanto maior for a fração descrita pela regressão, melhor será o ajuste do modelo, o que pode-se quantificar por meio da razão, conforme a Equação 8.

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{\sum (\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum (y - \bar{y})^2} \quad (8)$$

R^2 é chamado de coeficiente de determinação do modelo. O valor máximo de R^2 é 1, e só ocorrerá se não houver resíduo nenhum e, portanto, toda variação em torno da média for explicada pela regressão. Quanto mais perto de 1 estiver o valor de R^2 , melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas.

A cada soma quadrática está associado um certo número de graus de liberdade, (v), que satisfazem a Equação 9.

$$V_T = V_R + V_r \quad (9)$$

sendo que:

V_T é o número de graus de liberdade da SQ_T ;

V_R é o número de graus de liberdade da SQ_R ;

V_r é o número de graus de liberdade da SQ_r .

Para a soma quadrática dos n desvios em relação à média, SQ_T , o número de graus de liberdade é $(n - 1)$. Em um modelo com \tilde{n} parâmetros, o número de graus de liberdade da soma quadrática devida à regressão, SQ_R , tem de ser igual ao número de parâmetros menos um $(\tilde{n} - 1)$ e o número de graus de liberdade da soma quadrática residual, SQ_r , é dado pela diferença entre o número de observações e o número de parâmetros estimados $(n - \tilde{n})$.

Pode-se usar um teste F da razão $\frac{MQ_R}{MQ_r}$, para avaliar se a regressão é estatisticamente significativa:

$$\text{se } \frac{MQ_R}{MQ_r} > F_{v_R, v_r}$$

Então há uma regressão estatisticamente significativa.

sendo que:

MQ_R é a média quadrática em relação a média total;

MQ_r é a média quadrática residual;

v_R é o número de graus de liberdade da SQ_R ;

v_r é o número de graus de liberdade da SQ_r ;

F_{v_R, v_r} é o valor tabelado da distribuição F no nível de confiança desejado.

O valor de F_{v_R, v_r} pode ser encontrado com o auxílio de tabelas estatísticas, com intervalo de 95% de confiança.

Se os experimentos forem realizados em replicatas, pode-se usá-las para obter uma estimativa do erro, podendo julgar se o modelo escolhido é uma boa representação das observações (NETO *et al.*, 2001).

3.4. Atividade antimicrobiana

A história do desenvolvimento e uso de substâncias antimicrobianas na prática médica antecedeu a descoberta de espécies microbianas uma vez que Hipócrates (460–337 a.C.) recomendava a lavagem de ferimentos com vinho para impedir o processo infeccioso. Documentos datados de 2500 a 3000 anos atrás, mostram que alguns povos como chineses e indianos, ainda primitivos, utilizavam mofo, papa de soja e outros produtos correlatos para o tratamento de lesões infectadas e processos inflamatórios (LIMA *et al.*, 2000).

As substâncias antibióticas ou antimicrobianas representam um imenso avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas ou mais. Os antimicrobianos atuam sobre microrganismos patogênicos e oportunistas que podem levar a uma incapacitação prolongada ou mesmo levar ao óbito (SANCHES, 2004).

Entre as várias atividades biológicas referentes às substâncias fenólicas, a atividade antimicrobiana é uma das mais estudadas.

A toxicidade dos taninos para com os microrganismos tem sido bem documentada. Tais estudos envolvem vários campos de pesquisas, entre eles: alimentos, plantas, solos, patologia de plantas, farmacologia e nutrição humana e animal (SCALBERT, 1991).

Segundo Shafi *et al.* (2002), os extratos de plantas do gênero *Syzygium* apresentam atividade antibacteriana. Estudos da atividade antimicrobiana das sementes de *S. jambolanum* foram realizados por Chandrasekaran & Venkatesalu (2004), mostrando que o extrato aquoso e metanólico apresentaram atividade inibitória sobre alguns microrganismos envolvidos em doenças de pele como *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum gypseum*.

O extrato acetônico das cascas de *Syzygium jambos* (L.) Alston mostrou ter atividade frente a *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Staphylococcus warneri* devido à presença dos taninos. Um mesmo ensaio realizado com o extrato acetônico, porém com outra espécie vegetal a *Guazuma ulmifolia* Lam., onde houve prévia extração dos taninos, indicou a perda da atividade antimicrobiana do extrato (GALINA, 2003).

Uma investigação da atividade antimicrobiana de diversos taninos frente à *Staphylococcus aureus* demonstrou que o ácido tânico é um ótimo adjuvante no tratamento de infecções da pele (AKIYAMA *et al.*, 2001).

Vários métodos podem ser utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo aplicados em estudos de triagem de novas substâncias ativas. A técnica de difusão

em ágar e métodos de diluição em caldo e/ou placas podem ser utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana de compostos químicos. Tais técnicas permitem a análise de vários compostos e diferentes espécies bacterianas concomitantemente (ELOFF *et al.*, 1998).

3.4.1. Técnicas para determinar a atividade antimicrobiana

Os procedimentos mais utilizados para determinar a atividade antimicrobiana são: técnica da inoculação em placa e técnica de microdiluição.

3.4.1.1. Técnica da inoculação em placa

A técnica da inoculação em placa utiliza ágar nutriente e é inoculada com o organismo-teste. Se a amostra for líquida, deve ser dispensada em reservatórios. Estes podem ser cilindros de vidro ou aço inoxidável, *templates* de aço, discos de papel de filtro e os reservatórios podem ainda se constituir em uma cavidade perfurada no próprio ágar nutriente. Após a incubação de 24-48 h, a placa é observada buscando-se uma zona de inibição ao redor do agente testado (PELCZAR *et al.*, 1997; VILA *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2003; CHANDRASEKARAN & VENKATESALU, 2004).

3.4.1.2. Técnica de microdiluição

A microdiluição constitui-se, na atualidade, numa importante técnica para a avaliação da atividade antimicrobiana, pois além de ser um método de fácil realização, permite a análise de grande número de amostras, com economia razoável de material. O método foi validado em 1992 quando um grupo de pesquisadores publicaram os resultados de um estudo multicêntrico, comparando o micrométodo com o macrométodo de diluição em caldo segundo o documento do NCCLS. Nesta técnica uma placa contém 96 poços com transferência seriada de 100 μ L entre extrato e caldo, totalizando 200 μ L de volume em cada poço entre o microrganismo e o a

concentração do extrato. A microplaca incubada por 24-48 h à 37 °C, é examinada visualmente ou espectrofotometricamente, quanto ao crescimento microbiano, determinada pela turvação do meio (KOLODZIEJ *et al.*, 1999; ALMEIDA, 2000).

3.5. Microrganismos e a pele

A pele constitui uma barreira mecânica de proteção ao corpo, além de participar da termorregulação, da excreção de água e eletrólitos e das percepções táteis de pressão, dor e temperatura. É constituída por três camadas: epiderme, derme e tecido conjuntivo subcutâneo (WILKINSON & MOORE, 1982; VIGLIOGLIA & RUBIN, 1989; PRUNIERAS, 1994; KEDE & SABATOVICH, 2003). É na epiderme que encontramos o estrato córneo, referido como a camada mais externa da pele, composto fundamentalmente pela proteína fibrosa e queratina. O estrato córneo desempenha importantes funções de barreira, elétrica, térmica, química, microbiológica e frente à radiação solar. Apesar da renovação incessante, a camada córnea é colonizada por microrganismos.

Qualquer interrupção na continuidade da pele representa uma ferida. As feridas podem variar em espessura, pois algumas lesam a pele apenas superficialmente e outras podem até atingir tecidos profundos. A cicatrização da ferida consiste na restauração da continuidade e, enquanto tal processo não ocorre, os processos infecciosos poderão facilmente ocorrer (KEDE & SABATOVICH, 2003).

O tratamento de uma ferida e a assepsia cuidadosa têm como objetivo evitar ou diminuir os riscos de complicações decorrentes, bem como facilitar o processo de cicatrização.

Segundo Orth (1990), a microbiota residente da pele foi descrita como consistindo de um pequeno número de espécies de bactérias aeróbias e anaeróbias: cocos aeróbios da família micrococcaceae (como *Staphylococcus epidermidis* e o *Staphylococcus hominis*), difteróides

aeróbios (*Corynebacterium* e *Brevibacterium*), difteróides anaeróbios (*Propionibacterium acnes*, *P. granulosum* e *P. avidum*) e fungos (*Malassezia*).

Existe também, sobretudo sobre as partes descobertas expostas ao ambiente, uma microbiota dita “transitória”, constituída por germes que não se multiplicam na superfície da pele, resultantes, portanto, de uma contaminação. A bactéria mais freqüente neste processo é o *Staphylococcus aureus*. A hospitalização é um fator habitual no aumento do número destas bactérias, bem como a antibiose geral ou local e os tratamentos por cortisona (PRUNIERAS, 1994).

As bactérias são os principais agentes das infecções emergentes de pacientes hospitalares, principalmente naqueles que recebem administração de injetáveis, solução parenteral, alimentação enteral e procedente de lactário hospitalar. Tais infecções têm sido caracterizadas por casos isolados ou surtos em estabelecimentos de saúde. Em hospitais e postos de saúde as infecções estão associadas a uma inadequada desinfecção de ambientes e de artigos médicos. As severidades destes casos têm variado desde uma colonização assintomática à morte, com um grande número de agentes causadores distintos.

As infecções hospitalares são as mais freqüentes e importantes complicações ocorridas em pacientes hospitalizados. No Brasil, estima-se que entre 5% e 15% dos pacientes internados contraem alguma infecção hospitalar. Uma infecção hospitalar acresce, em média, 5 a 10 dias ao período de internação. Além disso, os gastos relacionados a procedimentos diagnósticos e terapêuticos da infecção hospitalar fazem com que o custo seja elevado. A epidemiologia e a prática do controle das infecções hospitalares são disciplinas dinâmicas que estão sofrendo evolução constante. O conhecimento dos mecanismos de transmissão, aliados a ampliação dos recursos diagnósticos laboratoriais, delinearam medidas objetivas para o controle. Entre os principais meios de prevenção incluem-se a lavagem de mãos, isolamento de pacientes com doenças transmissíveis e medidas específicas para cada sítio de infecção. A prevenção das

infecções hospitalares deve constituir o objetivo de todos os profissionais de saúde (MACHADO *et al.*, 2001).

As mãos devem ser lavadas imediatamente antes de cada contato direto com o paciente e após qualquer atividade ou contato que potencialmente resulte em nova contaminação. Preconiza-se, inclusive, que para uma higienização adequada deve-se aplicar água antes do sabão. O sabão líquido deve ser aplicado com as mãos úmidas e ocupar toda a superfície das mãos. Estas devem ser friccionadas vigorosamente, no mínimo por 10 a 15 segundos, com particular atenção para a região entre os dedos e as unhas (MACHADO *et al.*, 2001).

A utilização de sabão com antimicrobianos para lavagem rotineira das mãos reduz transitoriamente a microbiota da pele e é recomendada em unidades de terapia intensiva e em unidades de imunodeprimidos.

Diversos agentes antimicrobianos podem ser empregados na assepsia da pele e envolve diferentes famílias de compostos. Podemos citar o emprego dos álcoois, tendo como principal referência o etanol 70%; aldeídos, como o glutaraldeído; agentes catiônicos, como a clorexidina; o iodo e os fenóis. Considerando, porém, o emprego de sabonetes contendo tais anti-sépticos, a grande maioria destes agentes apresenta comprometida aplicação. Indiscutivelmente, são os fenóis, mais precisamente, os bifenóis halogenados os rotineiramente indicados para este tipo de preparação. Em algumas situações, o uso do álcool-gel está indicado, fundamentalmente para os locais em que ocorra dificuldade para a lavagem das mãos (MACHADO *et al.*, 2001).

Os extratos vegetais são pouco explorados neste sentido, porém representam uma tendência que merece toda atenção.

3.6. Anti-sépticos

A palavra *sepsis* refere-se ao efeito tóxico da presença do microrganismo no corpo durante a infecção, enquanto a *anti-sepsia* refere-se à medida que eliminam aqueles efeitos por

prevenir a infecção. A anti-sepsia foi praticada mesmo antes da teoria microbiana da doença ser comprovada (PELCZAR *et al.*, 1996).

A primeira referência de desinfetante que se tem notícia foi feita por Homero em A Odisseia, onde citava o uso do enxofre, na forma de dióxido de enxofre (aproximadamente 800 a.C.). Substância ainda hoje empregada na preservação de frutas secas, sucos de frutas e vinho (TRABULSI *et al.*, 1999).

A cidade de Veneza foi uma das pioneiras em controle sanitário. O holandês Anton Van Leeuwenhoek (1876), inventor do microscópio, representou um marco na história da microbiologia e desinfecção. Louis Pasteur (1822-1895), com seu trabalho criterioso, demonstrou serem os microrganismos responsáveis por doenças infecciosas. Pasteur desenvolveu o método físico, denominado *pasteurização*, ainda hoje utilizado na higienização de produtos alimentícios e médico-odontológicos (WILKINSON & MOORE, 1982; PELCZAR *et al.*, 1996; TRABULSI *et al.*, 1999).

Oliver Wendell Holmes (1809-1894), um bem sucedido médico americano, assim como um homem de letras, em 1843 insistiu que a febre de parturiente era contagiosa e, portanto, era transmitida de uma mulher para outra pelas mãos dos médicos e parteiras. Agora conhecida como febre puerperal, naquela época era uma infecção séria, freqüentemente fatal à mãe após o nascimento do bebê (PELCZAR *et al.*, 1996; TRABULSI *et al.*, 1999).

Relatos históricos indicam que desinfetantes e anti-sépticos foram utilizados durante o início do século XIX. Ignaz Semmelweis, um médico húngaro, utilizou compostos clorados, em 1846, na enfermaria do hospital obstétrico para reduzir a incidência da febre puerperal. Estudantes de medicina do hospital foram instruídos a lavar as mãos com água e sabão e em seguida imergi-las em uma solução de hipoclorito de sódio antes de examinar as pacientes (TRABULSI *et al.*, 1999).

Por volta de 1860, Joseph Lister (1827-1912), cirurgião inglês, pesquisava uma maneira de manter as incisões cirúrgicas livres de contaminação pelos microrganismos. Naquele período, mortes por infecção pós-cirúrgica eram frequentes. Em 1864, os relatos de Lister demonstraram que 45% de seus próprios pacientes morreram desta maneira.

As soluções anti-sépticas têm sido empiricamente utilizadas durante séculos, mesmo antes de Pasteur e Koch demonstrarem a existência de microrganismos. O interesse de avaliações da eficácia terapêutica das soluções anti-sépticas tópicas diminuiu com o uso indiscriminado de antibióticos (PELCZAR *et al.*, 1996).

Estas observações levaram ao desenvolvimento de muitos compostos químicos antimicrobianos atualmente disponíveis. Substâncias químicas utilizadas para desinfecção ou anti-sepsia são divididas em vários grupos principais: fenol e compostos fenólicos, álcoois, halogênios (iodo e cloro), metais pesados e seus compostos e detergentes (WILKINSON & MOORE, 1982; PELCZAR *et al.*, 1996; TRABULSI *et al.*, 1999).

3.6.1. Triclosan

O triclosan (2, 4, 4'-triclora-2'-hidroxidifenol éter) é um bi-fenol halogenado (fig. 13), comercializado desde 1967 e considerado o principal agente antimicrobiano da atualidade. Apresenta atividade antimicrobiana frente a bactérias de importância higiênica e clínica, sendo rotineiramente utilizado em sabonetes antimicrobianos, cremes dentais, desodorantes, entre outros produtos (KABARA, 1984; McMARRY *et al.*, 1998; KOKOSKA *et al.*, 2002).

O triclosan apresenta-se como pó cristalino esbranquiçado, com fraco odor aromático, praticamente insolúvel em água e solúvel em álcool (KABARA, 1984; SWEETMAN, 2002; USP 26, 2003).

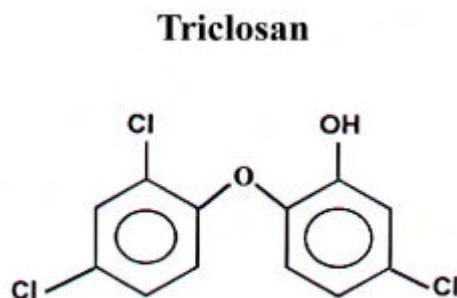


Figura 13. Estrutura química do triclosan
USP 26, 2003

ZHOU *et al.* (1993) estudaram a eficácia “in vivo” do triclosan em preparações cosméticas. Os autores discutem o mecanismo de ação do triclosan, sugerindo que o sítio de ação é a membrana celular.

O benefício preliminar do triclosan é a atividade antimicrobiana tendo efeito contra bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, mas com pouca atividade sobre *Pseudomonas sp* (NISSEN & OCHS, 1998) e apresenta também atividade contra fungos. Utiliza-se uma concentração acima de 1% para assepsias das mãos e feridas como também na assepsia da pele nos procedimentos pré-operatórios (FAOAGALI *et al.*, 1995; NISSEN & OCHS, 1998).

A lista positiva de conservantes autorizada pela ANVISA refere-se ao emprego do triclosan e estabelece limites máximos para a aplicação do mesmo. É indicado em concentrações de até 0,5% em preparações destinadas ao contato permanente com a pele, e estabelece um limite máximo de 2% para preparações que sofrem enxágüe, como é o caso dos sabonetes líquidos. (ANVISA, 2003).

3.7. Sabonete líquido anti-séptico

Os agentes antibacterianos são incluídos em preparações de limpeza principalmente para aliviar condições comuns como halitose, odor corporal e infecções de pele mais simples,

incluindo infecções secundárias associadas à acne. Entretanto, tais produtos devem ser diferenciados de produtos farmacêuticos utilizados para o tratamento de condições patológicas, os quais podem conter antibióticos e outros agentes não comumente considerados susceptíveis para os objetivos mais gerais de higiene (WILKINSON & MOORE, 1982).

A microbiota normal da superfície corporal compreende dois distintos grupos de microrganismos, a microbiota residente e a transitória. A microbiota normal, de baixa patogenicidade, é composta por microrganismos Gram-positivos, e, em menor proporção, Gram-negativos (MIMS, 1999). Deve ser mencionado que a população de bactérias varia consideravelmente nas diferentes partes do corpo, sendo encontrada em maiores proporções na face, cabelos e axilas, particularmente nos folículos pilosos e glândulas sebáceas (McDENNELL *et al.*, 1999).

A anti-sepsia é feita com substâncias que removem, destroem ou impedem o crescimento de microrganismos da microbiota transitória e alguns residentes da pele e mucosas, chamados anti-sépticos (JAWETZ, 2000).

Em procedimentos de risco que não precisem de efeito residual dos anti-sépticos pode-se optar pela lavagem das mãos com água e sabão, seguida do uso de anti-séptico. Proceda-se deste modo, por exemplo, no preparo da dieta para o berçário, no preparo de solução parenteral e enteral, na instalação de diálise, na instrumentação e sondagem de orifícios naturais, em punções, após tarefa em laboratório, antes e após curativos.

A escolha entre lavagem simples das mãos, uso de anti-sépticos ou a lavagem seguida pelo emprego de um anti-séptico deve basear-se no grau de contaminação, no procedimento a ser realizado e na importância de reduzir-se a microbiota transitória e/ou residente.

Geralmente, uma simples limpeza da pele não é suficiente para remover a microbiota natural, o que pode ser conseguido com a aplicação de agentes antibacterianos. Normalmente, a microbiota normal apresenta baixa virulência, e infecções mais sérias só ocorrem se tais

microrganismos forem introduzidos no corpo através de injúrias ou procedimentos cirúrgicos (WILKINSON & MOORE, 1982; ANVISA, 2003).

O uso de anti-sépticos em preparações de higiene tem por objetivo obter um produto ativo contra microrganismos presentes na pele, no couro cabeludo ou na boca, como também reduzir a incidência de infecções de pequenos ferimentos dermatológicos (ORTH & KABARA, 1998; WOLF *et al.*, 2001).

Várias áreas do corpo, principalmente as mãos, também contêm, em adição à microbiota normal, as microbiotas transientes, provenientes do meio ambiente e de outras áreas como mucosa nasal e trato gastrointestinal. Esta microbiota pode conter diferentes microrganismos patogênicos como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli* (JAWETZ, 2000).

Em geral, esses contaminantes transientes sobrevivem por curtos períodos de tempo, devido à umidade insuficiente e à presença de substâncias bactericidas, como ácidos graxos, na superfície da pele. Estes microrganismos podem ser removidos de maneira substancial através de banhos e lavagens da pele (WILKINSON & MOORE, 1982).

Nos últimos 30 anos muitas mudanças ocorreram no mercado de preparações para higiene. O desenvolvimento dos detergentes sintéticos a partir de 1940, a evolução dos materiais para embalagens, bem como o surgimento de “design” mais arrojados a partir dos anos 70, somados ao desenvolvimento das válvulas tipo “pump”, que revolucionou os sistemas de doseamento e spray de preparações líquidas, e o grande avanço da química fina, que proporcionou e continua proporcionando uma enorme oferta de novas matérias-primas, permitiram a introdução de outros produtos destinados à limpeza que não apenas o sabão tradicional (LUNDMARK, 1992; MORGANTI, 1995).

Os sabonetes líquidos lançados no mercado a partir de 1970 fizeram grande sucesso, pois permitiam a elaboração de preparações com pH próximo ao da pele, o que é impossível de se

verificar com os sabonetes ou sabões tradicionais que são alcalinos por natureza. Além desta vantagem, estas preparações, normalmente líquidas, envasadas em embalagens com sistema adequado de propulsão, permitiram a utilização da preparação de limpeza com o mínimo contato do mesmo com o meio ambiente. Tal proposta vem ao encontro com as necessidades de higienização e anti-sepsia rotineira e fundamentalmente naquelas referentes ao uso hospitalar e clínico laboratorial (LUNDMARK, 1992; MORGANTI, 1995).

Outro aspecto bastante positivo é o fato de tais preparações permitirem a incorporação de anti-sépticos sem comprometerem a estrutura da preparação, além de maior facilidade para fazê-lo.

A estrutura formal para estas preparações refere-se à estrutura de um xampu adequadamente sobreengordurado. Emprega-se rotineiramente o lauril éter sulfato de sódio como detergente, sobreengordura-se com a dietanolamida de ácido graxo de coco e óleos vegetais etoxilados e confere-se viscosidade adequada com eletrólito ou materiais específicos para este tipo de função. Tais preparações aceitam perfeitamente a inclusão de extratos vegetais e este fator torna bastante positiva a proposta aqui assumida (LUNDMARK, 1992; MORGANTI, 1995).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Material vegetal

Os frutos de *Syzygium cumini* (L) Skeels (jambolão) foram coletados nos meses de dezembro de 2003 a janeiro de 2004, no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da FCF/UNESP, em Araraquara – SP. Na mesma ocasião, foram amostrados ramos da mesma árvore para o processo de conferência de exsicata que está depositada sob o número SJRP 19586 no herbário do Departamento de Botânica do IBILCE-UNESP, Campus de São José do Rio Preto.

4.1.2. Microrganismos

Foram utilizados isolados de bactérias e leveduras de coleções padrões da American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 10541), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 64548), *Candida krusei* (ATCC 63-00) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), para todos os ensaios de verificação da atividade antimicrobiana.

4.1.3. Solventes, reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes, exceto quando especificado, possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.), sendo Sigma[®], Merck[®] ou SynthLab[®].

- Acetato de chumbo
- Acetato de etila
- Acetona
- Ácido acético

- Ácido bórico
- Ácido cítrico
- Ácido clorídrico concentrado
- Ácido clorídrico diluído
- Ácido fosfotúngstico
- Ácido oxálico
- Ágar bismuto sulfito
- Ágar brain heart infusion (BHI)
- Ágar eosina-azul de metileno (EMB) - DIFCO®
- Ágar MacConkey
- Ágar Mueller Hinton
- Ágar RPMI - AMERICAN BIORGANICS®
- Ágar sabouraud- ACUMEDIA®
- Ágar tioglicolato -DIFCO®
- Ágar tríplice açúcar - ferro (TSI) -DIFCO®
- Ágar verde brilhante - DIFCO
- Ágar Vogel Johnson -OXOID®
- Ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD)- DIFCO®
- Água oxigenada
- Anfotericina B
- Caldo brain heart infusion (BHI)
- Caldo caseína-soja - DIFCO®
- Caldo lactosado- DIFCO®
- Caldo Mueller Hinton
- Caldo RPMI – AMERICAN BIORGANICS®

- Caldo selenito cistina
- Caldo tetracionato - DIFCO®
- Caldo tioglicolato
- Carbonato de sódio
- Ciprofloxacino
- Cloranfenicol
- Cloreto de alumínio
- Cloreto férrico
- Clorofórmio
- Cocoamido propilbetaína- Clariant
- Cocoato de glicerila PEG 7- Cognis
- Dietanolamida de ácido graxo de coco- Biosíntese
- Dimetilsulfóxido (DMSO-d₆) ALDRICH®
- Discos de papel de anfotericina B CECON®
- Discos de papel de ciprofloxacino CECON®
- Discos de papel de eritromicina CECON®
- Etanol
- Éter de petróleo
- Éter etílico
- Gelatina
- Glicose
- Hidróxido de amônio
- Hidróxido de potássio
- Hidróxido de sódio
- Lauril éter sulfato de sódio- Clariant

- Magnésio
- Metanol
- Pó-de-pele
- Reativo de Bertrand
- Reativo de Bouchardat
- Reativo de Dragendorff
- Reativo de Mayer
- Reativo Liebermann-Burchard
- Reativo Salkowski
- Solução de urotropina
- Solução tampão
- Tampão MOPS - AMERICAN BIORGANICS®
- Tolueno
- Triclosan - Ciba
- Zinco metálico

4.1.4. Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento – FISATOM 752A®
- Agitador -MARCONI®
- Autoclave vertical - PHOENIX®
- Balança analítica – BEL MARK®
- Balança com infravermelho -METTLER® LP 11
- Contador de colônias -PHOENIX®
- Espectrofotômetro - UV/VIS Cary 1E Varian
- Estufa de ar circulante - FABBE®

- Estufa agitadora para cultura - MARCONI[®]
- Evaporador rotatório – MARCONI[®]
- Fluxo laminar - VECO[®]
- Liofilizador – CHRISTH ALPHA[®]
- Liquidificador de aço inoxidável - WALITA[®]
- Moinho de bolas -FABBE[®]
- Moinho de facas -TECNAL[®]
- Mufla -FORLABO[®]
- Potenciômetro -MICRONAL[®]
- Sistema de filtração - MILLIPORE[®]
- Tamisador vibratório -PRODUTEST[®]

4.1.5. Softwares

- Excel - MICROSOFT[®]
- Statistica - STAT SOFT[®]
- Minitab - MINITAB INC[®]

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo e secagem do material

Os frutos frescos colhidos foram submetidos à secagem em estufa com ar circulante, à temperatura de 45 °C, até a estabilização do peso.

4.2.2. Obtenção do pó do fruto seco de *S. cumini*

4.2.2.1. Moagem

A metodologia utilizada para moagem foi o seccionamento através de moinho de facas seguidas pelo emprego de moinho de bolas. Este processo duplo objetivou reduzir o tamanho das partículas de modo a aumentar, posteriormente, seu contato com o líquido extrator.

4.2.3. Caracterização física, físico-química e microbiológica do pó do fruto de *S. cumini*

4.2.3.1. Análise granulométrica

Com o objetivo de padronizar a granulometria do pó do fruto moído foi submetido à passagem forçada por vibração, através de tamises com abertura de malhas correspondentes e o coletor, 0,125; 0,177; 0,420; 0,840; 2,00 mm, utilizando tamisador vibratório, na escala dez do aparelho, durante trinta minutos. Após este processo, as frações foram retiradas dos tamises e do coletor e quantificadas quanto às suas proporções.

4.2.3.2. Densidade aparente do pó

Para determinar a densidade aparente do pó, foram amostrados 50 g do pó, os quais foram distribuídos em encapsulador contendo 25 cápsulas de tamanho 00. Em seguida, o peso foi determinado e a densidade calculada pela relação massa/volume do pó. Este procedimento foi repetido três vezes com três amostras distintas.

4.2.3.3. Controle da qualidade dos frutos frescos e do pó seco do fruto *S. cumini*

Os métodos de avaliação da droga vegetal foram desenvolvidos segundo normas farmacopéicas: Farmacopéia Brasileira, 1988; Farmacopéia Brasileira, 1996; Farmacopéia Brasileira, 2000; USP 26, 2003; e outras técnicas não farmacopéicas: GLASL, 1983; HARBORNE, 1998; CARTURAN, 1999; MELLO & PETROVICK, 2000; PINTO *et al.*, 2003.

4.2.3.3.1. Análises físico-químicas

4.2.3.3.1.1. Perda por secagem do fruto fresco

Cerca de 10,0 g, exatamente pesados, da droga vegetal fresca foram colocados a secar a temperatura ambiente, com ausência de luminosidade. Foram pesados diariamente até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de substâncias voláteis e/ou água percentual, pela média de cinco determinações.

4.2.3.3.1.2. Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho do pó do fruto

Amostras de 4,0 g de droga vegetal moída, exatamente pesada, foram submetidas ao aquecimento (110 °C) por raios infravermelhos pelo período de aproximadamente 1 h. Após este período foi feita a leitura do peso. Este procedimento foi realizado de hora em hora até que o peso não variasse mais do que 0,25%. Os valores foram expressos em porcentagem (p/p), pela média de três determinações.

4.2.3.3.1.3. Determinação do pH

Uma solução a 1% (p/v) do pó do fruto em água destilada foi aquecida até ebulição em chapa-elétrica por 5 min.

Pelo processo extrativo de infusão, foi vertida imediatamente a água fervida sobre a droga, foi tampado o recipiente e foi deixado em infusão por 15 min. Após este tempo foi realizada a filtração utilizando algodão.

Após o resfriamento, foi medido o pH da solução obtida em potenciômetro previamente calibrado. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

4.2.3.3.1.4. Determinação do teor de cinzas

Foi calcinado previamente o cadinho de porcelana em mufla à 450 °C por 30 min. O mesmo foi resfriado em dessecador (15 min) e seu peso foi determinado em balança analítica. Foram pesados exatamente 3,0 g do material vegetal triturado, os quais foram incinerados e, posteriormente, submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 450 °C por duas horas. Foi deixado em dessecador para arrefecimento durante 15 min e pesagem posterior. Foi repetida a técnica até peso constante. O resultado foi expresso em porcentagem em peso de cinza na droga (% , p/p) e representando a média de três determinações.

4.2.3.3.1.5. Determinação do teor de extrativos

Cerca de 1,0 g da droga vegetal moída, exatamente pesado, foi submetido à decocção com 100,0 mL de água, durante 10 min. Após resfriamento, o volume foi completado a 100,0 mL. A solução restante foi filtrada em papel de filtro e os primeiros 20,0 mL foram desprezados. Do restante do filtrado, pesou-se uma alíquota equivalente a 20,0 g, em pesa-filtro previamente tarado e evaporou-se até secura em banho de água, sob agitação constante. O resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105 °C por 3 h. Em seguida, resfriado em dessecador e pesado. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de três determinações segundo a equação:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m}$$

Onde:

TE = teor de extrativos (%; m/m)

g = massa de resíduo seco (g)

m = massa da amostra (g)

FD = fator de diluição (5)

4.2.4. Análises químicas do pó do fruto

4.2.4.1. Análise fitoquímica preliminar

Essas análises objetivaram estabelecer o conhecimento de grupos químicos por reações químicas segundo Harbone (1998): 1) cumarinas; 2) heterosídeos fenólicos simples; 3) saponinas; 4) antracênicos; 5) taninos; 6) alcalóides; 7) iridóides; 8) goma resina; 9) flavonóides; 10) anel esteroidal/ triterpênicos; 11) metil-xantinas; 12) antocianidinas.

4.2.4.2. Determinação do teor de taninos totais

Uma amostra de 0,750 g de droga pulverizada, exatamente pesada, foi transferida para erlenmeyer com 150,0 mL de água, foi deixado durante 30 min em banho-maria à temperatura de 80-90 °C. Após, o erlenmeyer foi resfriado em água corrente sendo transferido, seu conteúdo, para balão volumétrico de 250,0 mL, sendo lavado e completando-se o volume com água. Sendo 80,0 mL do extrato filtrado, desprezado os primeiros 50,0 mL. O filtrado foi denominado solução-mãe (SM).

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5,0 mL da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25,0 mL. Dois mililitros dessa solução foram transferidos e adicionados de 1,0 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2/N) e 10,0 mL de água para balão volumétrico de 25,0 mL, sendo completado o volume com solução de

carbonato de sódio a 14,06%. Após a adição da última solução foram esperados 15 min e foi medida a absorvância a 691 nm, sendo empregada a água como branco. Para determinação de polifenóis não adsorventes (PNA), 10,0 mL de SM foram transferidos e adicionados de 0,100 g de pó-de-pele R para béquer e agitados durante 60 min. Após, a solução foi filtrada. Cinco mililitros do filtrado foram diluídos com água para 25,0 mL em balão volumétrico. Dois mililitros do filtrado desta solução foram transferidos e adicionados de 1,0 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2/N) e 10,0 mL de água para balão volumétrico de 25,0 mL sendo completado o volume com solução de carbonato de sódio a 14,06%. Após a adição da última solução foi esperado 15 min e foi medida a absorvância a 691 nm, sendo empregada a água como branco. O conjunto de operações (extrações e diluições) foi realizado sob proteção da ação da luz direta.

A porcentagem de taninos totais foi calculada segundo as fórmulas:

$$PT = \frac{15625 \times \text{Abs.}}{1000 \times m} \qquad \qquad \qquad PNA = \frac{15625 \times \text{Abs.}}{1000 \times m}$$
$$TT = PT - PNA$$

Onde:

PT = Polifenóis totais (%)

PNA = Polifenóis não adsorventes (%)

Abs. = Absorvância medida

m = massa da droga em g

TT = teor de taninos totais (%)

4.2.5. Análise microbiológica do pó do fruto de *S. cumini*

4.2.5.1. Contagem total de microrganismos

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g da droga vegetal para 90,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, para a contagem dos microrganismos totais. A amostra 1:10 foi submetida à agitação durante 10 min. Após a homogeneização, foi pipetado 1,0 mL da amostra

1:10 e adicionados 20,0 mL ágar tioglicolato para bactérias e ágar Sabouraud para leveduras, a 47 °C em placa de Petri, que foram colocadas em estufa a 35 °C por 24 h e 25 °C por 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias com o auxílio de contador de colônias, calculando o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

4.2.5.2. Pesquisa de *Salmonella* sp e *Escherichia coli*

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g da droga vegetal para 90,0 mL de caldo lactosado, para pesquisa de *Salmonella* e *E. coli*, incubados a 35 °C durante 24 a 48 h. Após este período, 1 mL do caldo lactosado foi transferido para 2 tubos contendo caldo tetrionato e caldo selenito cistina, que foram incubados a 35 °C por 24 h. Após este período, a amostra foi semeada do caldo tetrionato para 1 tubo contendo ágar verde brilhante e duas placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e ágar bismuto sulfito. Foi realizado da mesma forma com a amostra inoculada no caldo selenito cistina, transferindo para os três meios, os quais foram incubados a 35 °C por 24 h. O crescimento e as características das colônias foram observados. As colônias suspeitas foram semeadas com alça reta em tubo contendo ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) e incubado a 35°C por 24 h. A confirmação da *Salmonella* foi feita pelo método de Gram.

Na pesquisa de *E. coli*, 1,0 mL do caldo lactosado foi transferido para placa contendo ágar Mac Conkey e incubado a 35 °C por 24 h. As colônias suspeitas foram semeadas em ágar eosina-azul de metileno (EMB) e incubadas a 35 °C por 24 h. A confirmação da *E. coli* foi realizada através de método de Gram.

4.2.5.3. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g da droga vegetal para 90,0 mL de caldo soja-caseína, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e incubados a 35 °C por 24 a 48 h. Após

este período, foi semeado em ágar Vogel Johnson, para a pesquisa de *S. aureus* e ágar cetrímida, para a pesquisa de *P. aeruginosa* a 35 °C por 24 h. As características das colônias foram observadas e a confirmação foi realizada através de método de coloração de Gram.

4.2.6. Preparação do extrato

A preparação de 100,0 mL do extrato, em triplicata, executada por três métodos, turbólise (turbo-extração), maceração e percolação. Utilizou-se 10% (p/V) do fruto em relação ao líquido extrator que foi, etanol:água 50 °GL, 70 °GL e 96 °GL, de acordo com o fluxograma 1.

4.2.6.1. Turbólise (turbo-extração)

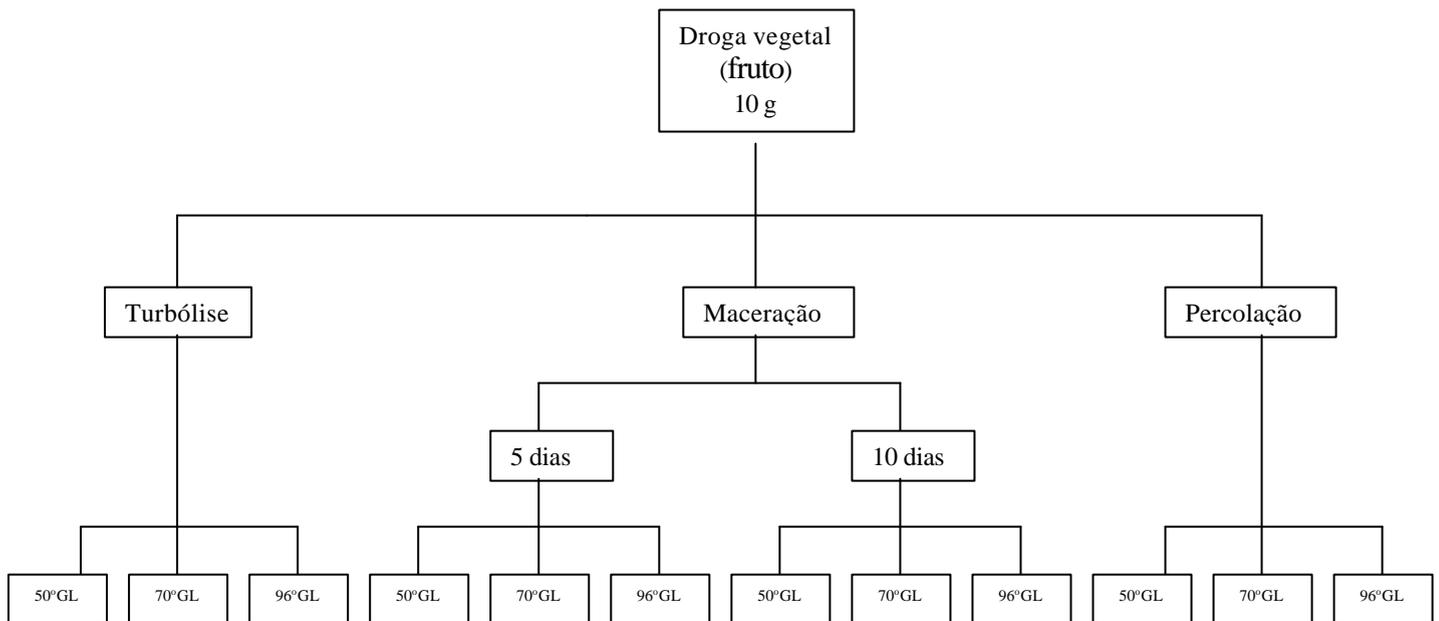
Para o método de turbólise o aparelho realizou a extração através da agitação em alta velocidade por 15 min, tomando o cuidado para que a temperatura do líquido extrator não excedesse à 40 °C. Após a filtração, o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura máxima de 40 °C até completa eliminação do solvente orgânico (TOLEDO, 2002) e depois foi liofilizado até eliminação da água.

4.2.6.2. Maceração

Para o processo de maceração o material vegetal ficou em repouso junto com o líquido extrator foi mantido em contato por um período de tempo de 5 dias e a outra amostra por um período de tempo de 10 dias, sob agitações constantes. Após este período foi feita a filtração e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura máxima de 40 °C até completa eliminação do solvente orgânico e depois foi liofilizado até eliminação da água.

4.2.6.3. Percolação

A percolação foi realizada por arraste os constituintes químicos foram esgotados da droga vegetal. Após este período foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura máxima de 40 °C até completa eliminação do solvente orgânico e depois foi liofilizado até eliminação da água.



Fluxograma 1- Preparação de extratos a partir dos frutos de *S. cumini* em vários métodos e várias concentrações de solventes.

4.2.7. Planejamento fatorial

Um planejamento fatorial completo com 2 fatores (processo de extração e solventes) foi executado a otimização pelos 4 níveis sendo os processos de extração (turbólise, maceração 5 dias, maceração 10 dias e percolação) e 3 níveis sendo os solventes (50 °GL, 70 °GL e 96 °GL em etanol:água), conforme indica a Tabela 6.

Tabela 6. Planejamento fatorial completo para os experimentos

Fator 2	Fator 1		
	SOLVENTE		
TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO	50 °GL	70 °GL	96 °GL
Turbólise	X	X	X
Maceração 5 dias	X	X	X
Maceração 10 dias	X	X	X
Percolação	X	X	X

X= 3 repetições

4.2.7.1. Controle da qualidade do extrato de *Syzygium cumini*

4.2.7.1.1. Determinação do teor de resíduo seco

Uma amostra de 20,0 g da solução extrativa (extratos preparados pelos 4 processos de extração e pelos 3 solventes) foi exatamente pesada em pesa-filtro previamente tarado e evaporada até secagem em banho de água, sob agitação constante. O pesa-filtro foi colocado em estufa por 3 h à temperatura de aproximadamente 105 °C, resfriado em dessecador e pesado. O resultado foi expresso em relação a 100,0 g do extrato, pela média de três determinações. Estes experimentos foram realizados, observando o planejamento experimental conforme Tabela 7.

Tabela 7. Planejamento experimental para determinação do teor de resíduo seco

ORDEM PADRÃO	ORDEM EXECUÇÃO	PROCESSO	SOLVENTE
1	19	1	1
2	1	1	2
3	12	1	3
4	32	2	1
5	4	2	2
6	22	2	3
7	35	3	1
8	18	3	2
9	20	3	3
10	25	4	1
11	8	4	2
12	14	4	3
13	13	1	1
14	34	1	2
15	36	1	3
16	24	2	1
17	17	2	2
18	5	2	3
19	23	3	1
20	10	3	2
21	6	3	3
22	7	4	1
23	3	4	2
24	31	4	3
25	33	1	1
26	11	1	2
27	26	1	3
28	2	2	1
29	29	2	2
30	28	2	3
31	15	3	1
32	9	3	2
33	27	3	3
34	30	4	1
35	16	4	2
36	21	4	3

Ordem padrão: número de extratos preparados

Ordem execução: distribuição aleatória para o preparo dos extratos

Processo: 1: Turbólise; 2: Maceração 5 dias; 3: Maceração 10 dias; 4: Percolação

Solvente: 1. etanol 50 °GL; 2. etanol 70 °GL; 3. etanol 96 °GL

4.2.7.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

4.2.7.2.1. Método de difusão em ágar

A atividade antimicrobiana do extrato de *S. cumini* foi avaliada pelo método de difusão em ágar, observando o planejamento experimental conforme a Tabela 8.

Tabela 8. Planejamento experimental para a atividade antimicrobiana

ORDEM PADRÃO	ORDEM EXECUÇÃO	PROCESSO	SOLVENTE
1	19	1	1
2	1	1	2
3	12	1	3
4	32	2	1
5	4	2	2
6	22	2	3
7	35	3	1
8	18	3	2
9	20	3	3
10	25	4	1
11	8	4	2
12	14	4	3
13	13	1	1
14	34	1	2
15	36	1	3
16	24	2	1
17	17	2	2
18	5	2	3
19	23	3	1
20	10	3	2
21	6	3	3
22	7	4	1
23	3	4	2
24	31	4	3
25	33	1	1
26	11	1	2
27	26	1	3
28	2	2	1
29	29	2	2
30	28	2	3
31	15	3	1
32	9	3	2
33	27	3	3
34	30	4	1
35	16	4	2
36	21	4	3

Ordem padrão: número de extratos preparados

Ordem execução: distribuição aleatória para o preparo dos extratos

Processo: 1: Turbólise; 2: Maceração 5 dias; 3: Maceração 10 dias; 4: Percolação

Solvente: 1. etanol 50°GL; 2. etanol 70°GL; 3. etanol 96°GL

4.2.7.2.1.1. Preparo do inóculo

4.2.7.2.1.1.1. Padronização da suspensão bacteriana

O inóculo de bactérias foi adaptado e padronizado segundo Murray *et al.* (2003) e segundo documento do NCCLS (2000). Cultura de colônias isoladas foram obtidas em caldo Mueller Hinton (MH) por 24 h, até a obtenção de turvação igual à escala 0,5 de Mc Farland que equivale a aproximadamente $1,5 \times 10^6$ UFC/mL.

4.2.7.2.1.1.2. Padronização da suspensão fúngica

O inóculo de leveduras foi adaptado e padronizado segundo NCCLS (1997-M27A), pelo cultivo durante 24 h em placas de ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (250 mg/L) a 30 °C, onde uma alçada das leveduras, de colônias isoladas, foi suspensa em solução salina, sendo ajustada a contagem de leveduras em $1 \times 10^6 - 5 \times 10^5$ UFC/mL em câmara de Neubauer.

4.2.7.2.1.2. Teste de sensibilidade

4.2.7.2.1.2.1. Padrão de sensibilidade de bactérias - controle

Para os ensaios de verificação da sensibilidade bacteriana, foi utilizado o método da difusão em ágar por discos contendo 5 µg/mL de ciprofloxacino para todas as bactérias com exceção do *E. faecalis* que foi utilizado discos contendo 15 µg/mL de eritromicina. Os inóculos preparados na escala 0,5 de Mc Farland foram semeados através de “swabs” em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton e após secagem foram colocados os discos de antibióticos sobre a superfície. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa durante 24 h.

4.2.7.2.1.2.2. Padrão de sensibilidade de leveduras - controle

Para os ensaios de verificação da sensibilidade das leveduras foi utilizado o método da difusão em ágar por discos contendo 16 µg/mL de anfotericina B. Inóculos contendo 10^5

UFC/mL leveduras, foram preparados como anteriormente descrito e foram semeados através de “swabs” em placas de Petri contendo ágar RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio acrescido de 2% de glicose tamponado em MOPS 0,165 M. Após secagem, foram colocados os discos contendo antifúngico sobre a superfície e as placas incubadas a 37 °C em estufa durante 24 a 48 h.

4.2.7.2.1.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais pelo método da difusão com discos

Para os ensaios de verificação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais (turbólise, maceração 5 dias, maceração 10 dias e percolação) foi utilizado o método da difusão em ágar Mueller Hinton com discos que foram padronizados quanto aos seus tamanhos (15 mm de diâmetro) e concentração dos extratos vegetais (1000 µg extrato seco/ 50 µL de dimetilsulfóxido 5%) impregnado individualmente, ou seja, concentração final nos discos. O preparo do inóculo foi realizado pelo ajuste da suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland, semeada por “swab” estéril. Os discos impregnados com os extratos foram colocados sobre as placas e estas foram incubadas a 37 °C durante 24 h.

Para esta metodologia foram utilizadas as seguintes bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *E. coli*.

4.2.7.2.1.4. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica dos extratos vegetais pelo método da difusão com discos

Para os ensaios de verificação da atividade antifúngica dos extratos vegetais (turbólise, maceração 5 dias, maceração 10 dias e percolação) foi utilizado o método da difusão em ágar RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio acrescido de 2% de glicose tamponado em MOPS 0,165M com discos que foram padronizados quanto aos seus tamanhos (15 mm de

diâmetro) e concentração dos extratos vegetais (2500 µg extrato seco/ 50 µL de dimetilsulfóxido 5%) impregnado individualmente, ou seja, concentração final nos discos. O preparo do inóculo foi realizado pelo ajuste da suspensão ($1 \times 10^6 - 5 \times 10^5$ UFC/mL) por contagem em câmara de Neubauer, que foi semeado através de “swab” estéril. Os discos impregnados com os extratos foram colocados sobre as placas e estas foram incubadas a 37 °C durante 24 h.

Para esta metodologia foram utilizadas as seguintes leveduras *C. albicans* e *C. krusei*.

4.2.7.2.1.5. Leitura

A leitura foi realizada depois de 24 h através da medida do halo de inibição com auxílio de régua (mm).

4.2.8. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

4.2.8.1. Preparo do inóculo

4.2.8.1.1. Padronização da suspensão bacteriana

O procedimento foi realizado conforme o item 4.2.7.2.1.1.1.

4.2.8.1.2. Padronização da suspensão fúngica

O procedimento foi realizado conforme o item 4.2.7.2.1.1.2., posteriormente foi realizada, uma diluição 1/10 em tubo, de modo que foi obtida uma suspensão de 10^4 UFC/mL, cujo inóculo foi empregado no ensaio.

4.2.8.2. Análise de sensibilidade às drogas

Para esta metodologia foram utilizadas drogas antibacterianas e antifúngicas (ciprofloxacino para bactérias e anfotericina-B para leveduras), utilizadas sob a forma de pó, e calculadas quanto a suas potências seguindo recomendações de Murray *et al.* (2003) e segundo

documentos do NCCLS (2000) para bactérias e NCCLS (1997- M27A) para leveduras. Ciprofloxacino e anfotericina-B foram dissolvidos individualmente em 1 mL de dimetilsulfóxido para obtenção de solução estoque a 3200 µg/mL (dobro da concentração de uso). A partir desta solução foram preparadas 10 concentrações, para emprego nos testes realizados em microplacas de 96 poços com fundos chatos.

Para o teste de microdiluição, ciprofloxacino e anfotericina-B foram diluídos para se obter um gradiente de 16 a 0,031 µg/mL a ser adicionado à placa de microdiluição.

4.2.8.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais pelo método da microdiluição

Foram preparadas solução estoque a 100 mg/mL em DMSO a 5% e solução estoque a 100 mg/mL em propilenoglicol a 80% do extrato, que foi a solução teste (ST).

Em placa de 96 poços com fundos chatos, pipetou-se 100 µL de caldo Mueller Hinton em cada poço utilizado, de acordo com o número de diluições realizadas. No experimento foram realizadas 8 diluições do extrato.

Na primeira coluna foi pipetado meio de cultura como controle negativo (controle de esterilidade). Na segunda coluna foram pipetados 100 µL de meio e 100 µL de extrato. A partir da ST, foram pipetados 200 µL para a terceira coluna do primeiro poço, foi obtido uma concentração inicial de 10000 µg/100 µL. Foi realizada diluição seriada 1:2, homogeneizando e transferindo 100 µL do primeiro poço para os poços subsequentes, obtendo-se concentrações de 5000; 2500; 1250; 625; 312,5; 156,25; 78,12; 39,06 µg/100 µL (Tabela 9). A última coluna foi utilizada como controle das bactérias, sem a ST. A última coluna constituiu-se de meio de cultura e inóculo 10^6 UFC/mL, correspondente ao controle de 100% de crescimento. Foram pipetados 100 µL da suspensão 10^6 UFC/mL de bactéria em cada poço com exceção da primeira e segunda coluna. A microplaca foi incubada em estufa a 37 °C, sob agitação por 24 h.

Para esta metodologia foram utilizadas as seguintes bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.

4.2.8.4. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica dos extratos vegetais pelo método da microdiluição

O mesmo procedimento foi realizado conforme o item 4.2.8.3., porém o caldo utilizado para leveduras foi RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio acrescido de 2% de glicose tamponado em MOPS 0,165 M. A concentração de inóculo utilizado foi 10⁴ UFC/mL, correspondente ao controle de 100% de crescimento.

Para esta metodologia foram utilizadas as seguintes leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

Tabela 9. Distribuição da concentração da amostra e seus respectivos microrganismos

Amostra	ORDEM DECRESCENTE DE CONCENTRAÇÃO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1** #	C-	Meio + Extrato	10000 ìg/ 100iL	5000 ìg/ 100iL	2500 ìg/ 100iL	1250 ìg/ 100iL	625 ìg/ 100iL	312,5 ìg/ 100iL	156,25 ìg/ 100iL	78,12 ìg/ 100iL	39,06 ìg/ 100iL	C+
2** #												
3** #												
5** #												
6** #												
7** #												

* 1, 2 e 3 Extrato de frutos de jambolão solubilizado com propilenoglicol 80%; 5,6 e 7 Extrato de frutos de jambolão solubilizado com DMSO 5%.

** 1 e 5: *Staphylococcus aureus*; 2 e 6: *Pseudomonas aeruginosa*; 3 e 7: *Staphylococcus epidermidis*.

1 e 5: *Candida albicans*; 2 e 6: *Candida krusei*; 3 e 7: *Candida parapsilosis*.

C- meio de cultura

C+ meio de cultura e inóculo

4.2.8.5. Leitura

Foram realizadas leituras visual e espectrofotométrica em 655 nm depois de 24 h.

4.2.9. Determinação da concentração bactericida (CBM) e fungicida mínima (CFM)

4.2.9.1. Padronização e adaptação dos testes de verificação da concentração bactericida mínima dos extratos vegetais

A CBM foi realizada em todos os poços da microplaca. Para cada poço foi realizada uma subcultura, foi transferido de cada poço da microplaca em placa com ágar Mueller Hinton. A semeadura foi realizada por meio de hastes estéreis para cada poço. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. A CBM foi definida como a menor concentração da droga que apresentou inibição do crescimento.

4.2.9.2. Padronização e adaptação dos testes de verificação da concentração fungicida mínima dos extratos vegetais

A CFM foi realizada em todos os poços. Para cada poço foi realizada uma subcultura, foi transferido por meio de hastes estéreis de cada poço da microplaca, em placa com ágar Sabouraud. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. A CFM foi definida como a menor concentração da droga que apresentou inibição do crescimento.

4.2.10. Sabonete líquido

4.2.10.1. Formulação

Para a incorporação do extrato foi preparada uma formulação de sabonete líquido (Tabela 10).

Tabela 10. Composição da formulação de sabonete líquido

COMPONENTES	nome INCI	PORCENTAGEM	AÇÃO
Lauril éter sulfato de sódio	Sodium laureth sulfate	35,0%	Detergente
Cocoamido propilbetaína	Cocamidopropyl betaine	6,0%	Detergente
Dietanolamida de ácido graxo de coco	Cocamide dea	4,0%	Espessante, estabilizador de espuma, solubilizante e sobreengordurante
Cocoato de glicerila PEG 7	PEG 7 glyceryl cocoate	1,0%	Sobreengordurante
Ácido cítrico	Citric acid	qs pH= 6,0	Corretor do pH
Água destilada		qsp 100 mL	Veículo

4.2.10.2. Preparação do sabonete líquido

Em um béquer com capacidade adequada foram pesados o lauril éter sulfato de sódio, cocoamido propilbetaína, dietanolamida de ácido graxo de coco, cocoato de glicerila PEG 7.

Sob os materiais previamente pesados e homogeneizados, verteu-se a água e a mistura foi submetida à adequada agitação (manual).

O pH da preparação foi corrigido com adequada quantidade de solução de ácido cítrico a 10%.

4.2.10.3. Obtenção do extrato dos frutos de *Syzygium cumini* em propilenoglicol

Com o objetivo de facilitar a solubilização do extrato seco de *Syzygium cumini* foi preparada uma mistura de propilenoglicol:água na proporção de 4:1.

4.2.10.4. Incorporação do extrato ao sabonete líquido proposto

O extrato glicólico de *S. cumini* foi incorporado ao sabonete em concentração elevada para que fosse possível encontrar a CIM, portanto foi trabalhado a 5000 ìg/ 100 ìL do extrato seco.

4.2.11. Avaliação da atividade antimicrobiana do sabonete líquido

4.2.11.1. Método de difusão em ágar

A atividade antimicrobiana do sabonete com extrato de *S. cumini* foi avaliada pelo método de difusão em ágar.

4.2.11.1.1. Preparo do inóculo

4.2.11.1.1.1. Padronização da suspensão bacteriana

O mesmo procedimento foi realizado conforme o item 4.2.7.2.1.1.1.

4.2.11.1.1.2. Padronização da suspensão fúngica

O mesmo procedimento foi realizado conforme o item 4.2.7.2.1.1.2.

4.2.11.1.2. Testes de sensibilidade

4.2.11.1.2.1. Padrão da sensibilidade de bactérias - controle

Para os ensaios de verificação da sensibilidade bacteriana, foi utilizado o método da difusão em ágar por discos contendo 1000 µg/100 µL de solução de triclosan. Inóculos preparados na escala 0,5 de Mc Farland foram semeados através de “swabs” em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton. Após secagem do meio, foram colocados os discos de triclosan sobre a superfície e as placas incubadas a 37 °C em estufa durante 24 h.

4.2.11.1.2.2. Padrão da sensibilidade de leveduras - controle

O mesmo procedimento foi realizado conforme o item 4.2.11.1.2.1., porém o ágar utilizado para leveduras foi RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio acrescido de 2% de glicose tamponado em MOPS 0,165M.

4.2.11.1.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana do sabonete líquido com triclosan pelo método da difusão com discos

Para os ensaios de verificação da atividade antibacteriana do sabonete líquido com triclosan foi utilizado o método da difusão em ágar Mueller Hinton com discos que foram padronizados quanto aos seus tamanhos (15 mm de diâmetro) e concentração do sabonete com triclosan (500 µg/50 µL de sabonete) impregnada individualmente, ou seja, concentração final nos discos. O preparo do inóculo foi realizado através do ajuste da suspensão bacteriana na escala 0,5 de Mc Farland, semeada através de “swab” estéril. O disco impregnado com o sabonete foi colocado sobre as placas, que foram incubadas a 37 °C durante 24 h.

Para esta metodologia foram utilizadas as seguintes bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.

4.2.11.1.4. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana do sabonete líquido com extrato vegetal pelo método da difusão com discos

O procedimento foi realizado conforme o item 4.2.11.1.3., porém a concentração do sabonete com extrato vegetal utilizado foi de 2500 µg de extrato seco/50 µL de sabonete.

4.2.11.1.5. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica do sabonete líquido com triclosan pelo método da difusão com discos

O procedimento foi realizado conforme o item 4.2.11.1.3., utilizando o método da difusão em ágar RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio acrescido de 2% de glicose tamponado em MOPS 0,165 M.

Para esta metodologia foram utilizadas as seguintes leveduras *C. albicans* e *C. krusei*.

4.2.11.1.6. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica do sabonete líquido com extrato vegetal pelo método da difusão com discos

O procedimento foi realizado conforme o item 4.2.11.1.4., utilizando o método da difusão em ágar RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio acrescido de 2% de glicose tamponado em MOPS 0,165 M.

Para esta metodologia foram utilizadas as seguintes leveduras *C. albicans* e *C. krusei*.

4.2.11.1.7. Leitura

A leitura foi realizada depois de 24 h através da medida do halo de inibição com auxílio de régua (mm).

4.2.12. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do sabonete líquido contendo triclosan e extrato dos frutos de *S. cumini*

4.2.12.1. Preparo do inóculo

4.2.12.1.1. Padronização da suspensão bacteriana

O procedimento foi realizado conforme o item 4.2.7.2.1.1.1.

4.2.12.1.2. Padronização da suspensão fúngica

O procedimento foi realizado conforme o item 4.2.7.2.1.1.2.. Posteriormente foi realizada, uma diluição 1/10 em tubo, de modo que foi obtida uma suspensão de 10^4 UFC/mL, cujo inóculo foi empregado no ensaio.

4.2.12.2. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana do sabonete líquido com triclosan pelo método da microdiluição

Foi preparado o sabonete com 10000 µg/mL de extrato bruto, que foi a solução teste (ST). O procedimento foi realizado conforme o item 4.2.8.3., porém a concentração inicial utilizada foi de 1000 µg/100 µL de triclosan. Foi realizada uma diluição seriada 1:2 e transferidos, de maneira homogênea 100 µL do primeiro poço para os poços subsequentes, obtendo concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 µg/100 µL (Tabela 11).

4.2.12.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana do sabonete líquido com extrato vegetal pelo método da microdiluição

Foi preparado o sabonete com 25000 µg/mL de extrato bruto, que foi a solução teste (ST). O procedimento foi realizado conforme o item 4.2.8.3., porém a concentração inicial utilizada foi de 2500 µg/ 100 µL. Foi realizada uma diluição seriada 1:2 e transferidos, de maneira homogênea 100 µL do primeiro poço para os poços subsequentes, obtendo concentrações de 1250; 625; 312,5; 156,25; 78,12; 39,06 µg/100 µL (Tabela 11).

4.2.12.4. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica do sabonete líquido com triclosan pelo método da microdiluição

O procedimento foi realizado conforme o item 4.2.12.2., utilizando para leveduras o caldo RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio acrescido de 2% de glicose tamponado em MOPS 0,165 M.

Para esta metodologia foram utilizadas as seguintes leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

4.2.12.5. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica do sabonete líquido com extrato vegetal pelo método da microdiluição

O procedimento foi realizado conforme o item 4.2.12.3., utilizando para leveduras o caldo RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio acrescido de 2% de glicose tamponado em MOPS 0,165 M.

Para esta metodologia foram utilizadas as seguintes leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

Tabela 11. Distribuição da concentração da amostra e seus respectivos microrganismos

Amostra	ORDEM DECRESCENTE DE CONCENTRAÇÃO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1**#	C-	Meio Sabonete	Meio Sabonete Extrato	2500 ìg/100iL	1250 ìg/100iL	625 ìg/100iL	312,5 ìg/100iL	156,25 ìg/100iL	78,12 ìg/100iL	39,06 ìg/100iL	Meio Sabonete Mcg	C+
2**#												
3**#												
4												
5**#	C-	Meio Sabonete	Meio Sabonete Triclosan	1000 ìg/100iL	500 ìg/100iL	250 ìg/100iL	125 ìg/100iL	62,5 ìg/100iL	31,25 ìg/100iL	15,625 ìg/100iL	Meio Sabonete Mcg	C+
6**#												
7**#												
8												

* 1,2 e 3: Sabonete líquido com extrato vegetal dos frutos de jambolão; 5,6 e 7: Sabonete líquido com Triclosan.

** 1 e 5: *Staphylococcus aureus*; 2 e 6: *Pseudomonas aeruginosa*; 3 e 7: *Staphylococcus epidermidis*.

1 e 5: *Candida albicans*; 2 e 6: *Candida krusei*; 3 e 7: *Candida parapsilosis*.

C- meio de cultura

C+ meio de cultura e inóculo

4.2.12.6. Leitura

Foram realizadas leituras visual e espectrofotométrica em 655 nm depois de 24 h.

4.2.13. Determinação da concentração bactericida (CBM) e fungicida mínima (CFM) sabonete líquido com extrato do fruto de *S. cumini* e com triclosan

4.2.13.1. Padronização e adaptação dos testes de verificação da CBM

A CBM foi realizada em todos os poços. Para cada poço foi realizada uma subcultura, foi transferido de cada poço da microplaca em placa com ágar Mueller Hinton. A semeadura foi realizada por meio de hastes estéreis para cada poço. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. A CBM foi definida como a menor concentração da droga que apresentou inibição do crescimento.

4.2.13.2. Padronização e adaptação dos testes de verificação da CFM

A CFM foi realizada em todos os poços. Para cada poço foi realizada uma subcultura, foi transferido por meio de hastes estéreis de cada poço da microplaca, em placa com ágar Sabouraud. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. A CFM foi definida como a menor concentração da droga que apresentou inibição do crescimento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos de extratos vegetais em busca de novas opções terapêuticas, ou mesmo os estudos que objetivem apenas a melhoria e garantia da qualidade dos extratos vegetais já caracterizados farmacologicamente, representam uma área em expansão tanto no setor acadêmico como no industrial. O imenso uso popular e a eficácia terapêutica, muitas vezes baseadas apenas em evidências, sem a conotação científica necessária, tem colaborado e estimulado novas pesquisas neste campo.

Ainda, prevalece em nível popular a idéia de que: “planta, se não fizer bem, mal também não faz”, porém tal conceito não somente é errôneo como também perigoso. É fato bastante conhecido nos meios científicos que dependendo da dose, pode-se ter plantas com atividade terapêutica ou tóxica. Como exemplo podemos citar: *Digitalis purpurea* L. (dedaleira), espécie vegetal que contém glicosídeos cardiotônicos, utilizada em casos de insuficiência cardíaca, com dose terapêutica muito próxima à dose tóxica. Uma dose um pouco mais elevada pode causar intoxicação, provocando a morte por parada cardíaca.

A forma e a organização são os aspectos fundamentais para identificação de uma espécie vegetal ou parte dessa, e podem ser reconhecidas através de várias características específicas a cada uma delas.

Na realidade existe uma necessidade bastante evidente de estudos cada vez mais detalhados destes vegetais, para que se possam garantir os três aspectos básicos e fundamentais para um medicamento: eficácia, segurança e qualidade. Preceitos importantes para que se possa oferecer garantia e credibilidade necessária ao seu uso (SANCHES, 2004).

No Brasil, embora existam normas para garantir a qualidade dos fitoterápicos (WHO, 1998; ANVISA - RDC n. 48/2004; 88/2004), essas nem sempre são cumpridas, podendo gerar produtos sem qualidade, sem eficácia e sem segurança.

Uma das dificuldades encontradas no estudo dos vegetais diz respeito aos diversos nomes populares que um mesmo vegetal pode apresentar. Colabora, ainda, para dificultar, o fato de um mesmo vegetal com diversos nomes populares, apresentar também, mais de uma denominação científica. *Syzygium cumini* (L.) Skeels é conhecido no norte e nordeste do Brasil por azeitona roxa, e por jambolão em outras regiões do país. Por outro lado, este mesmo vegetal, apresenta outras sinonímias científicas, como *Syzygium jambolanum* (L.), *Syzygium caryophyllifolium* L. entre outros.

Foram amostrados ramos da árvore de jambolão para o processo e preparação de exsicata que está deposita sob o número SJRP 19586 no herbário do Departamento de Botânica do IBILCE-UNESP, Campus de São José do Rio Preto.

Todos os frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skells (jambolão) foram coletados nos meses de dezembro de 2003 a janeiro de 2004, no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da FCF/UNESP, em Araraquara – SP. Este processo de coleta envolveu alguns cuidados necessários: o emprego de lonas para coleta evitando-se, desta forma, que os frutos caíssem no solo, e tendo-se, também, o cuidado de que todo o material fosse recolhido logo pela manhã, eliminando-se assim, a possibilidade de que a irradiação solar viesse a alterar a sua constituição química.

Seguindo as exigências da resolução ANVISA - RDC n. 48/2004, e a ausência de estudos de controle da qualidade, foi traçado o perfil da droga vegetal *Syzygium cumini* (L.) Skeels, em consonância com as exigências legislativas, e de tal forma, que pudesse colaborar com preceitos da qualidade para a droga vegetal proposta.

Após a identificação, etapa importante no controle da qualidade do fitoterápico, o material botânico foi submetido à secagem. Os frutos e sementes foram secos em estufa com ar circulante à temperatura de 45 °C, até estabilização do processo de secagem que ocorreu após sete dias. Esta secagem tem por finalidade a conservação da droga vegetal, uma vez que a

retirada de água impede possíveis reações de hidrólise e o crescimento microbiano (SIMÕES *et al.*, 2003).

5.1. Caracterização física, físico-química, química e microbiológica do pó dos frutos de *S. cumini*

A moagem possibilitou reduzir mecanicamente o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o, assim, para a próxima etapa, a extração. Partículas com pequenas dimensões aumentam a área de contato entre o material sólido e o líquido extrator, tornando, desta forma, mais eficiente a operação de extração (DÄR, 1981; SIMÕES *et al.*, 2003). Para os frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels foi utilizada moagem em moinho de facas e moinho de bolas. Deve-se salientar que apesar deste procedimento duplo, certa dificuldade foi encontrada para a redução do material em partículas diminutas. A presença das sementes nos frutos dificultaram a redução das partículas.

A avaliação granulométrica do material moído é um parâmetro imprescindível a ser estabelecido, pois representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo. Os resultados da avaliação da granulometria estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Análise granulométrica do pó dos frutos de *S. cumini*

TAMANHO DA MALHA (mm)	AMOSTRA		
	1 (g)	2 (g)	3 (g)
2	0	0	0
0,840	7,06	5,33	5,93
0,420	13,33	12,47	11,79
0,177	3,38	4,49	4,50
0,125	0,72	0,80	1,23
Coletor	0,48	1,59	1,15

A aplicação de análise estatística dos resultados expressos na Tabela 10 e demonstrada na figura 14 permitiu detectar um diâmetro médio de partículas de 0,302 mm.

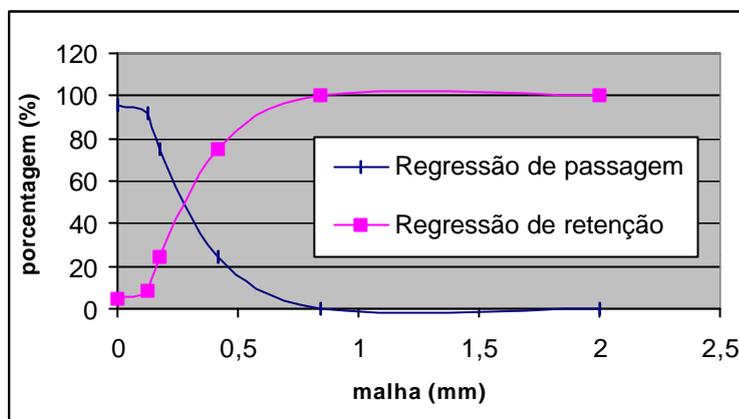


Figura 14. Tamanho da partícula média do pó dos frutos de *S. cumini*

A densidade aparente para as partículas obtidas foi de 0,86 g/mL. Vale ressaltar que tal ensaio constitui-se numa exigência estabelecida pela RDC n. 48/2004-ANVISA.

Vários ensaios foram realizados com o objetivo de controlar a qualidade do material botânico. As análises físico-químicas envolveram a perda por secagem (utilizando-se do material fresco), a determinação da perda por dessecação, determinação do pH, determinação do teor de cinzas e determinação do teor de extrativos. Com relação à análise química, realizou-se análise fitoquímica preliminar e posteriormente análise química quantitativa para a determinação do teor de taninos totais (Tabela 13).

Tabela 13. Análise física, físico-química, química e microbiológica

PARÂMETROS	VALORES OBTIDOS
Diâmetro médio das partículas	0,302 mm
Densidade aparente	0,86 g/mL
Perda por secagem	86,5%
Perda por dessecação	6,01%
pH	4,09
Teor de cinzas	9,56%
Teor de extrativos	2,37%
Fitoquímica preliminar	Heterosídeos fenólicos simples, taninos, alcalóides, iridóides, flavonóides, antocianidinas
Teor de taninos	4,2%
Análise microbiológica	Ausência de microrganismos patogênicos e presença inferior ao aceito para fungos

A determinação da perda por secagem constituiu-se num ensaio difícil de ser realizado. Os frutos de jambolão apresentam polpa carnosa e, quando maduros, contêm açúcar ligado às substâncias presentes, sendo os responsáveis pelas dificuldades que surgem durante a secagem do material à temperatura ambiente (ALBERTON *et al.*, 2001). No presente trabalho ocorreu a perda de 86,5% de água, porém ocorreu o desenvolvimento de fungos. Em função das dificuldades encontradas, entende-se não ser recomendável a realização deste tipo de análise como metodologia para secagem do fruto em grande quantidade, por isso foi utilizada a secagem em estufa de ar circulante, que impede o desenvolvimento de microrganismos e também diminui o tempo de secagem, pois ao realizar a perda por secagem houve demora de trinta dias para que ocorresse a estabilização enquanto a secagem em estufa ocorreu por sete dias.

A determinação da perda por dessecação do pó do fruto de *S. cumini* foi realizada em balança de infravermelho à temperatura de 110 °C por um período de oito horas apresentado uma perda de 6,01%, quando ocorreu estabilização do processo.

Este tipo de análise é importante uma vez que pode oferecer informações importantes com referência ao armazenamento da droga vegetal. A água residual encontrada na droga vegetal

seca está diretamente relacionada com o seu correto armazenamento, que pode acarretar na perda do material por contaminação microbiana ou degradação dos constituintes químicos. Pode-se afirmar que os valores característicos da perda por dessecação, além de informação importante do ponto de vista tecnológico, servem também como parâmetro de controle da qualidade do pó do fruto de *S. cumini*.

O valor de pH do extrato da droga vegetal foi 4,09 utilizando água com pH de 6,25, o que sugere a presença de substâncias ácidas no farmacógeno estudado .

Quanto à determinação do teor de cinzas, utilizou-se o hamamelis (*Hamamelis virginiana* L.) (cascas), como um parâmetro comparativo, e os teores encontrados foram: 9,56% para o jambolão e 9,14% para a hamamelis. Em se tratando de drogas vegetais, o principal objetivo deste tipo de ensaio é a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes (Farmacopéia Brasileira, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

Com o objetivo de avaliar-se a quantidade de substâncias extraíveis, denominado de teor de extrativos, e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998), empregou-se a decocção em água. O rendimento encontrado foi de 2,37%. No entanto, é importante levar em consideração a substância que se deseja extrair. Por exemplo, para taninos, Santos & Mello (2003), demonstram ser necessário o emprego de misturas de solventes como o metanol: água ou acetona: água. Refere-se, inclusive, que a extração com o sistema acetona:água, apesar de significativamente maior, representa um sistema com menor estabilidade para os taninos presentes. Quando se considera a extração cujo solvente é somente a água, a estabilidade do extrato torna-se ainda mais comprometida, uma vez que o risco de contaminação microbológica aumenta significativamente.

Plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas (alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas, entre outros) e o fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, do regime de chuvas, da insolação, do solo, enfim, das características climáticas-edáficas.

Entretanto, algumas substâncias químicas são bastantes características para um determinado vegetal, e desta forma podem servir como parâmetro para sua caracterização e identificação.

Os dados das análises fitoquímicas preliminares, realizadas com os frutos de jambolão, referidos na Tabela 14, mostram grupos de substâncias químicas que podem ser empregadas para a caracterização da matéria-prima. É o caso dos taninos, flavonóides, alcalóides, heterosídeos fenólicos simples, iridóides e antocianidinas.

A presença de taninos, por exemplo, no barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, é uma característica de identificação do vegetal, visto ser esse grupamento químico o responsável pela atividade farmacológica (TOLEDO, 2002). O maracujá, *Passiflora alata* Dryander, é caracterizado, dentre outras análises, pela presença de flavonóides e alcalóides (SOULIMANI *et al.*, 1997).

Considerando que o presente trabalho propôs-se a buscar e comprovar o efeito anti-séptico do extrato de frutos do jambolão e considerando ainda, a já bem documentada atividade antimicrobiana apresentada pelos taninos, justifica-se a realização do doseamento deste grupo de substâncias presentes no pó do fruto de *S. cumini* (Tabela 14).

Tabela 14. Análise fitoquímica preliminar do pó dos frutos de *S. cumini*

SUBSTÂNCIA ATIVA	RESULTADO
Cumarinas	-
Heterosídeos fenólicos simples	+
Saponinas	-
Antracênicos	-
Taninos	+
Alcalóides	+
Iridóides	+
Goma resina	-
Flavonóides	+
Anel esteroidal/ triterpênicos	-
Metil-xantinas	-
Antocianidinas	+

+ presença do grupo químico; - ausência do grupo químico

O doseamento realizado para a avaliação do teor de taninos presentes nos frutos de jambolão, detectou a presença de 4,2% desta substância. Tal valor pode ser considerado baixo quando comparado com o teor de taninos encontrado no *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, conhecido popularmente como barbatimão, cujo teor mínimo é de 20%, porém, o valor encontrado pode ser considerado razoável, quando comparado, por exemplo, com a *Krameria triandra* Ruiz e Pavon., conhecida como ratânia, cujo teor é de aproximadamente 10%. Apesar de apresentar valores não muito elevados em taninos, a possibilidade de se encontrar efeito antimicrobiano não pode ser descartada, pois este efeito pode ser resultado da contribuição de outros grupos químicos presentes.

Considerando os diversos aspectos impostos para a garantia da qualidade do material botânico, que englobam não somente os aspectos físico-químicos, mas também o microbiológico, e considerando-se ainda, o fato dos materiais vegetais conterem um grande número de fungos e bactérias, pertencentes à sua microflora natural ou mesmo introduzidas durante a manipulação, contaminação esta que pode ser intensificada com o tempo e não

somente comprometer o material em si, mas também o usuário, procurou-se realizar um controle microbiológico do pó do fruto de *S. cumini* (SIMÕES *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos através do controle microbiológico do pó do fruto de jambolão (Tabela 15) permitiram observar que não houve crescimento microbiano de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, considerados microrganismos patogênicos nas amostras analisadas, porém ocorreu crescimento de fungos. Na contagem do número total de bactérias do pó do fruto, houve crescimento inferior a 10 UFC/g e para fungos ocorreu o crescimento de 40 UFC/g.

O controle microbiológico tem como função determinar o número total de microrganismos presentes em preparações não estéreis, cosméticos e drogas vegetais, além de visar a identificação dos patogênicos, tais como *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que não devem estar presentes (Tabela 15). Como visto, este tipo de análise visa assegurar o consumo de produtos de boa qualidade; ou seja, isentos de microrganismos patogênicos ou potencialmente prejudiciais, permitindo um número limite de microrganismos aceitáveis, assegurando qualidade microbiológica do pó do fruto.

Tabela 15. Análise microbiológica do pó dos frutos de *S. cumini*

Microrganismos	Recomendação *	Resultado
Microrganismos aeróbios viáveis	$\leq 10^5$ UFC/g	Inferior 10 UFC/g
Fungos	$\leq 10^4$ UFC/g	40 UFC/g
Enterobactérias/ Bactérias Gram-negativas	$\leq 10^3$ UFC/g	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausente
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausente

* Fonte: CARTURAN, 1999; PINTO *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2003; USP 26, 2003.

Ao realizar o controle microbiológico o resultado encontrado torna-se interessante, uma vez que não foi encontrado nenhum tipo de microrganismo patogênico, o que pode ser resultado cuidado na coleta, manipulação seguida de boas práticas, bem como pode ser devido à presença de taninos condensados, os quais vem sendo pesquisados por suas propriedades farmacológicas e fisiológicas. Devido à propriedade de se combinarem com as proteínas das plantas, protegem-nas contra o ataque de herbívoros, microrganismos, além de apresentarem inibição enzimática em humanos (GALLOWAY, 1989).

5.2. Preparação do extrato do pó do fruto de *S. cumini*

Após a realização do controle de qualidade da droga vegetal, a etapa seguinte do trabalho foi realizar a preparação dos extratos. Pelo fato de não existir padronização do melhor método de extração e o melhor solvente, a otimização das condições de extração foram realizadas empregando-se planejamentos fatoriais completos, metodologia de superfície de resposta e análise estatística dos resultados, utilizando a análise da variância (ANOVA), para o resíduo seco (Anexo 1), e atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* (Anexo 2), *Staphylococcus epidermidis* (Anexo 3), *Pseudomonas aeruginosa* (Anexo 4) e *Candida krusei* (Anexo 5).

Planejamento fatorial é uma classe de desenhos experimentais que permitem uma grande quantidade de informação a partir de um pequeno número de experimentos. O planejamento fatorial completo envolve um certo número de níveis de cada um dos fatores de interesse (MASSART, 1988). Desta forma, o planejamento fatorial utilizado foi do tipo misto com valores codificados das variáveis.

Segundo Massart (1988) os fatores podem ser divididos em duas categorias, quantitativa e qualitativa. Portanto nosso estudo a concentração do etanol é um fator quantitativo, uma vez que é o valor numérico e expressa a quantidade deste fator. Já o tipo de processo utilizado para a extração (turbólise, maceração e percolação) consiste em fatores qualitativos.

Os planejamentos experimentais podem ser usados de modo a explorar a superfície de resposta.

Foram preparados, em triplicata, extratos a 10% de droga vegetal, por meio de quatro procedimentos diferentes: (1) turbólise; (2) maceração 5 dias; (3) maceração 10 dias; e (4) percolação. Para cada procedimento foram testados os seguintes solventes: (1) etanol a 50 °GL; (2) etanol a 70 °GL; e (3) etanol a 96 °GL. Como parâmetros de avaliação foram utilizados o método de determinação do teor de resíduo seco (Tabela 16) e determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar (Tabelas 18, 19, 20 e 21).

Para todos os métodos de extração, o solvente escolhido foi baseado na polaridade do grupo de substâncias que se procurou extrair, portanto para os taninos foram utilizadas misturas etanol:água de modo a obter-se etanol 50 °GL, 70 °GL e 96 °GL.

O método de extração por turbólise foi um dos métodos escolhidos, devido à eficiência da técnica, simplicidade, rapidez e versatilidade, permitindo sua fácil utilização em processamento de pequena e média escala (GALINA, 2003).

Este método de extração apresenta alguns inconvenientes. A redução drástica nos tamanhos das partículas da droga vegetal normalmente dificulta a posterior filtração pela compactação do material. Além disto, a possível elevação da temperatura durante o processo de agitação cria a necessidade de controle adequado. Em função dos pequenos tamanhos de partículas, na ordem de 0,302 mm, obtidas para os frutos de jambolão durante o processo de moagem, foram bastante evidentes as dificuldades encontradas durante o processo de filtração. A escolha de papel de filtro, com objetivo de impedir a passagem das partículas, tornou a filtração bastante lenta. Com relação aos problemas relativos ao aumento de temperatura do solvente junto com a droga vegetal, o inconveniente foi contornado, estabelecendo-se um procedimento onde alternou-se agitação e repouso. Agitou-se o material durante 5 minutos seguida por repouso de 10 minutos. Repetiu-se este procedimento por três vezes.

O método de extração por maceração é um processo no qual a droga vegetal, adequadamente reduzida a partículas diminutas, é embebida no solvente até que a estrutura celular amoleça e seja penetrada pelo solvente de tal forma que os componentes solúveis sejam dissolvidos (ANSEL *et al.*, 2000).

Para este processo foram utilizados recipientes de vidro âmbar, hermeticamente fechados, sendo o conteúdo agitado várias vezes ao dia, durante um período de 5 e 10 dias.

Esta técnica apresenta o inconveniente de não conduzir ao esgotamento da matéria-prima vegetal, devido à possível saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento do equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. A agitação objetiva contornar estes inconvenientes (SIMÕES *et al.*, 2003).

O método de extração por percolação, diferentemente do processo de maceração, trata-se de uma operação dinâmica, capaz de esgotar a droga vegetal em função da constante renovação do solvente. Para esta metodologia os inconvenientes referem-se ao empacotamento da droga vegetal no percolador e ao diâmetro das partículas da droga vegetal. O empacotamento deve ser realizado de forma homogênea e não compacta. Com relação ao tamanho das partículas do vegetal, propõe-se que não seja inferior a 1 mm, uma vez que partículas menores que este tamanho podem produzir uma compactação excessiva, reduzindo a velocidade de fluxo.

Para este trabalho foi utilizada a percolação simples, que se iniciou com o intumescimento prévio da droga com o líquido extrator, durante 2 h. Apesar do empacotamento homogêneo, a grande dificuldade encontrada dizia respeito ao tamanho das partículas obtidas com a moagem dos frutos. Como já referido, as partículas com valores médios de 0,302 mm, dificultaram o processo de lixiviação do solvente, tornando o processo extrativo bastante moroso. Vale ressaltar que esse comportamento não se repetiu para os diferentes solventes. Os procedimentos de percolação que envolveu a utilização de álcool 96 °GL e 70 °GL como líquido

extrator, foram menos morosos, quando comparados aos solventes com maiores quantidades de água.

A Tabela 16 apresenta a ordem de execução para a realização do preparo do processo com as respectivas concentrações e os resultados obtidos para resíduo seco.

Tabela 16. Determinação em triplicata do resíduo seco do extrato de frutos de *S. cumini* utilizando planejamento experimental completo

ORDEM PADRÃO	ORDEM EXECUÇÃO	PROCESSO	SOLVENTE	RESULTADO (g)		
				1	2	3
1	19	1	1	0,7561	0,7415	0,7412
2	1	1	2	0,6893	0,6652	0,6626
3	12	1	3	0,4950	0,4916	0,5020
4	32	2	1	0,8165	0,8098	0,8021
5	4	2	2	0,7289	0,7662	0,7196
6	22	2	3	0,5399	0,5528	0,5474
7	35	3	1	0,7666	0,7502	0,7571
8	18	3	2	0,7493	0,6759	0,6760
9	20	3	3	0,4990	0,5140	0,5060
10	25	4	1	0,9560	0,9771	0,9760
11	8	4	2	0,8496	0,8511	0,8437
12	14	4	3	0,6063	0,6059	0,6212
13	13	1	1	0,7556	0,7555	0,7574
14	34	1	2	0,7054	0,6970	0,7150
15	36	1	3	0,5374	0,5343	0,5461
16	24	2	1	0,8369	0,8214	0,8175
17	17	2	2	0,7507	0,7390	0,7425
18	5	2	3	0,5420	0,5452	0,5477
19	23	3	1	0,7398	0,7339	0,7632
20	10	3	2	0,6502	0,6703	0,6756
21	6	3	3	0,4876	0,5164	0,4967
22	7	4	1	0,7985	0,7924	0,7962
23	3	4	2	0,8251	0,8519	0,8129
24	31	4	3	0,6008	0,6225	0,6448
25	33	1	1	0,7579	0,7626	0,7663
26	11	1	2	0,6301	0,6127	0,6460
27	26	1	3	0,4814	0,4859	0,4841
28	2	2	1	0,8276	0,8203	0,8072
29	29	2	2	0,7296	0,7297	0,7486
30	28	2	3	0,5302	0,5352	0,5339
31	15	3	1	0,8060	0,7338	0,7435
32	9	3	2	0,7326	0,6836	0,7181
33	27	3	3	0,5508	0,5160	0,5647
34	30	4	1	0,7631	0,7621	0,7645
35	16	4	2	0,8980	0,9171	0,9050
36	21	4	3	0,6013	0,6075	0,6083

Ao considerar-se os resultados obtidos de forma independente (Tabela 16 e figura 15) conclui-se que o melhor procedimento para a determinação do resíduo seco, a partir da solução extrativa 10%, foi a percolação, e o melhor solvente o etanol 50 °GL. Isto pode ocorrer devido ao

maior tempo de contato e à diminuição do fluxo, que podem influenciar na obtenção de um maior rendimento. Porém, considerando-se a interação processo extrativo-solvente, percebe-se claramente pela figura 16, que o etanol 50 °GL constitui-se no melhor solvente ou líquido extrativo para os processos realizados por turbólise, maceração 5 dias e maceração 10 dias, o mesmo não ocorrendo porém, em relação à percolação. Para este procedimento o melhor solvente foi o etanol 70 °GL.

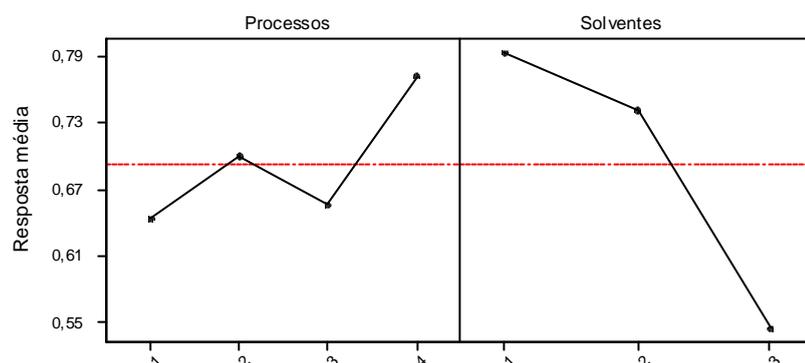


Figura 15. Análise independente de valores médios quantitativos de resíduo seco, em gramas, obtidos pelos diferentes métodos extrativos: 1- turbólise, 2 – maceração 5 dias, 3 – maceração 10 dias, 4 – percolação e empregando-se diferentes solventes: 1 – etanol 50 °GL, 2 – etanol 70 °GL, 3 – etanol 96 °GL

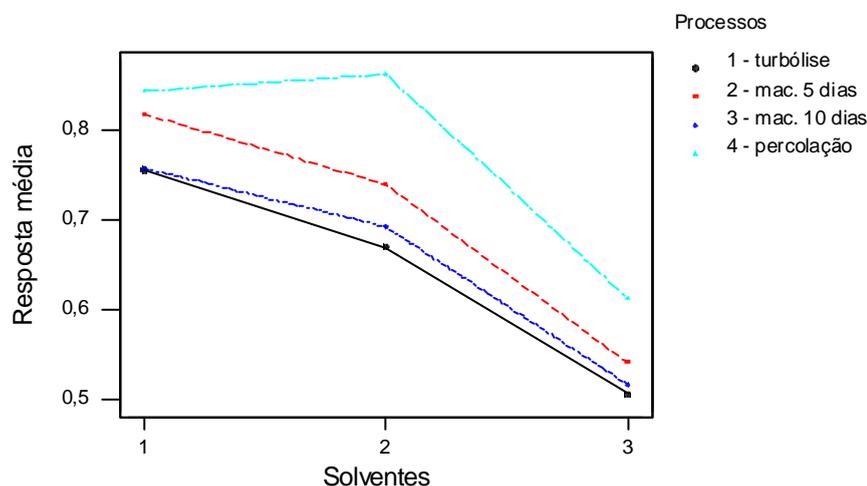


Figura 16. Análise gráfica considerando a interação entre os processos extrativos – solventes – resíduos secos obtidos em grama

O melhor rendimento é apresentado pela coloração intensa observada nas representações gráficas nas figuras 17 e 18. Desta forma, observa-se que o melhor rendimento ocorre utilizando-se a percolação como processo extrativo.

Desta mesma maneira, as figuras 17 e 18 o etanol 50 °GL apresentou-se como o melhor solvente extrator.

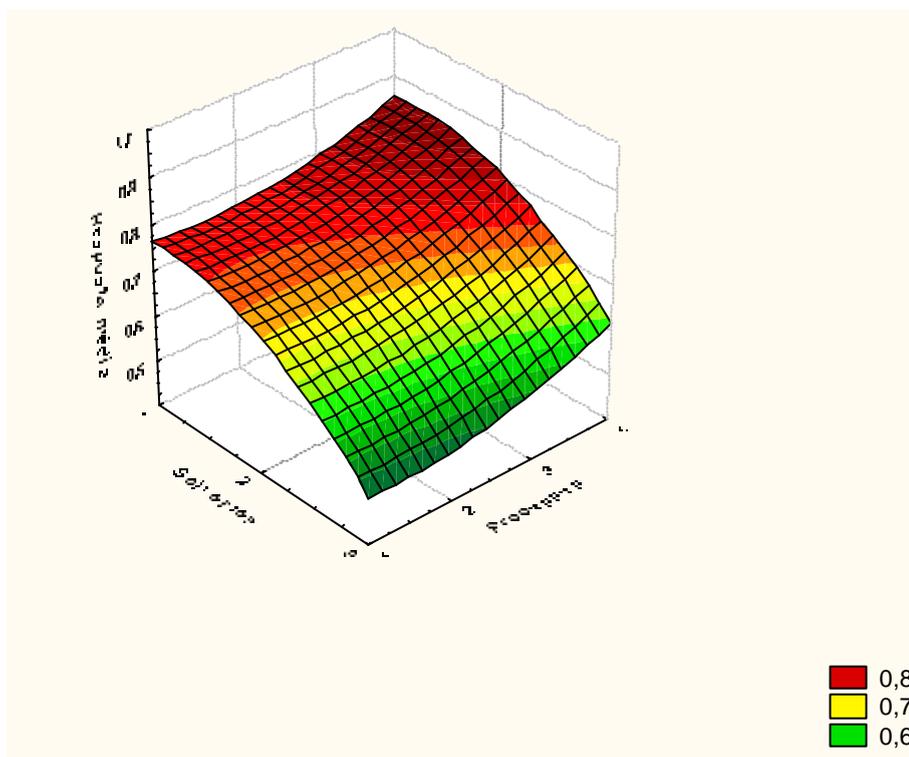


Figura 17. Resíduo seco obtido em relação ao processo extrativo e solvente

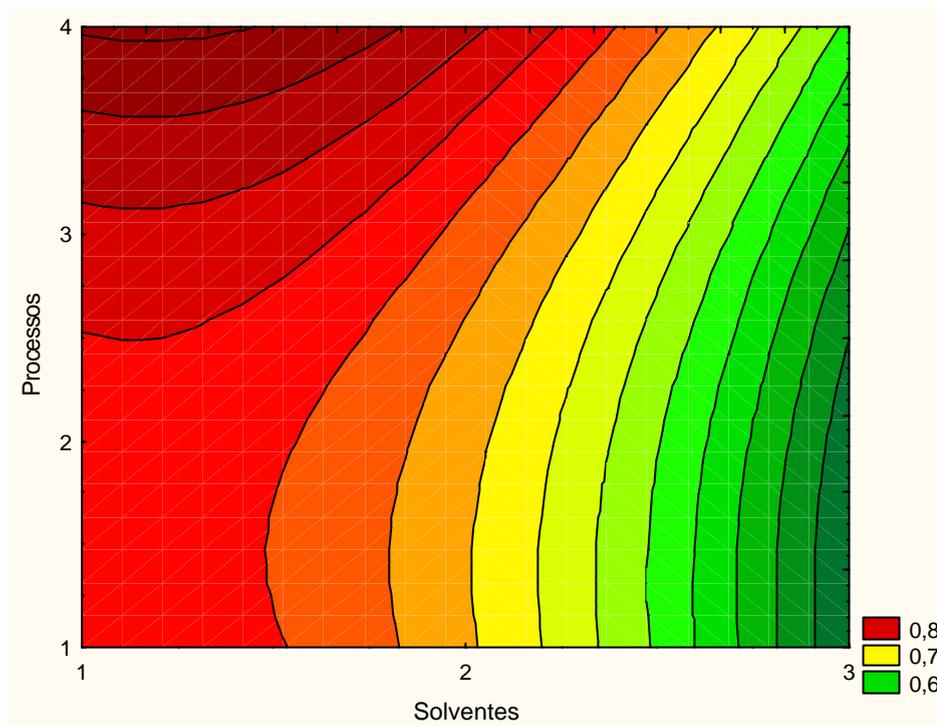


Figura 18. Resíduo seco obtido em relação ao processo extrativo e solvente

A análise dos resultados de resíduo seco mostrou, ainda, a existência de uma distribuição normal como bem demonstra as figuras 19 e 20, onde a maior frequência ocorre entre mais ou menos duas vezes o desvio padrão.

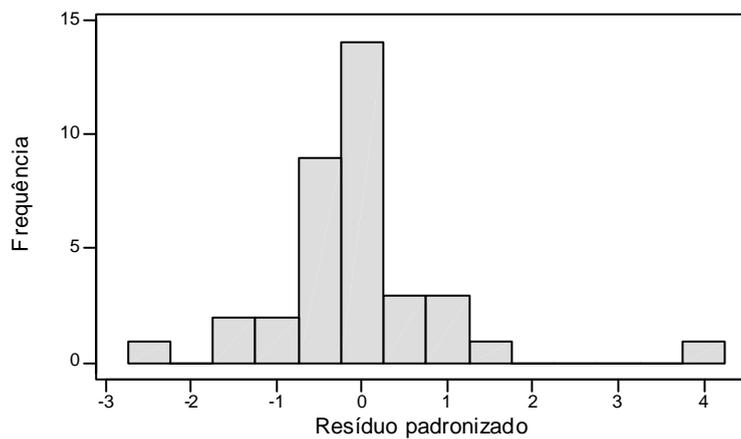


Figura 19. Histograma demonstrando a distribuição dos resultados de resíduo seco em relação à frequência e desvio padrão

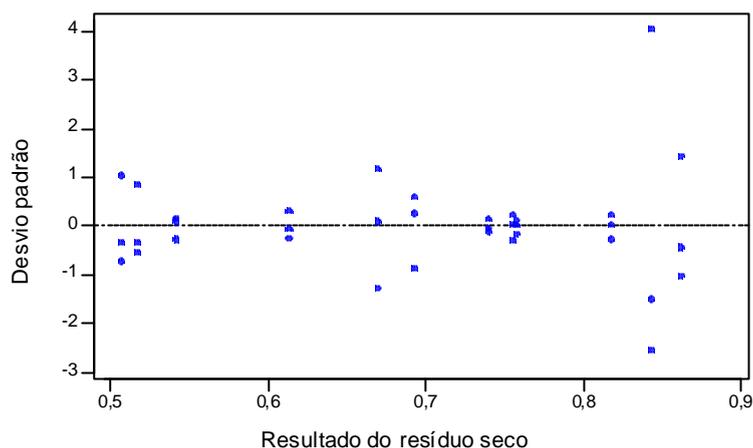


Figura 20. Desvio padrão das médias quantitativas dos resíduos secos obtidos pelos diferentes métodos extrativos e diferentes solventes

De acordo com determinação do teor de resíduo seco, foi possível identificar o melhor processo extrativo e o melhor solvente ou líquido extrator, conforme demonstra a Tabela 17.

Tabela 17. Representação do melhor método de extração e líquido extrator

ANÁLISE	PROCESSO	SOLVENTE
Resíduo seco	4	1

Processo 4 - percolação
Solvente 1- etanol 50 GL

Como evidencia a Tabela 17 e, baseados na determinação do teor de resíduo seco, o processo de percolação empregando-se como solvente o etanol 50 GL constituiu-se no melhor procedimento. Uma análise mais profunda deste comportamento se torna bastante complexa ao considerar-se a complexidade química existente nos extratos vegetais de forma geral e o resultado obtido.

A análise da atividade antimicrobiana do jambolão foi realizada utilizando-se o extrato seco solubilizado em dimetilsulfóxido 5% (DMSO). O ensaio ocorreu frente às bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*), Gram-

negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) e leveduras (*Candida albicans*, *Candida krusei*).

Com o objetivo de se determinar o melhor processo extrativo e o melhor solvente na obtenção do extrato seco com maior atividade antimicrobiana, utilizou-se da análise fatorial. Para esta análise, realizou-se ensaio antimicrobiano pelo método de difusão em ágar. Os extratos e os testes para a avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados em triplicata.

Para a avaliação da atividade pelo método de difusão em ágar foi utilizada concentração de 1000 µg/50 µL de extrato para bactérias e 2500 µg/50 µL para leveduras.

Conjuntamente com as análises referentes aos extratos secos a serem avaliados, e com o objetivo de se ter um controle positivo, inseriu-se nas placas referentes a cada microrganismo um padrão de sensibilidade. Para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, o padrão de sensibilidade foi o ciprofloxacino e para o microrganismo *Enterococcus faecalis* empregou-se a eritromicina. Para as leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei* foi utilizada a anfotericina B.

Outra consideração importante, diz respeito à utilização de DMSO como material para a solubilização do extrato seco. Tal material apresenta atividade antibacteriana e desta forma, foi necessário utilização de uma concentração que não interferisse no crescimento dos diferentes microrganismos. Para tanto, diluiu-se o DMSO em água de modo a obter-se solução a 5% do referido material, que foi utilizado nas placas como controle com o objetivo de certificar-se de que esta solução não apresentasse qualquer atividade (CHANDRASEKARAN & VENKATESALU, 2004).

Não foi encontradas atividade antimicrobiana frente à concentração utilizada de extrato para os microrganismos *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Para cada microrganismo estudado foi gerando uma tabela com auxílio de programa de computador, que mostrava a ordem padrão que seria a quantidade de extratos que seria

preparado, a ordem de execução, pois os extratos não poderiam ser preparados numa seqüência, portanto gerou-se uma numeração aleatória, que por sua vez seria distribuída nas placas e não tendo uma seqüência, assim evitando forçar resultados e trabalhou-se com dois fatores sendo o primeiro processo que apresentava quatro níveis: turbólise, maceração 5 dias, maceração 10 dias e percolação e o segundo fator sendo os solventes utilizados etanol 50 °GL, 70 °GL e 96 °GL.

A seguir (Tabelas 18, 19, 20 e 21) estão representadas as ordens de execução e os resultados obtidos na realização da atividade antimicrobiana do extrato de *S. cumini* frente aos microrganismos já citados.

Tabela 18. Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição produzido pela presença do extrato de fruto de *S. cumini* sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*, utilizando planejamento experimental completo

ORDEM PADRÃO	ORDEM EXECUÇÃO	PROCESSO	SOLVENTE	RESULTADO (mm)		
				1	2	3
1	19	1	1	4,9	4,4	4,3
2	1	1	2	3,9	3,8	3,8
3	12	1	3	0,0	0,0	0,0
4	32	2	1	3,6	3,6	3,8
5	4	2	2	3,7	3,8	3,4
6	22	2	3	0,0	0,0	0,0
7	35	3	1	4,7	4,4	4,6
8	18	3	2	3,2	3,0	3,3
9	20	3	3	0,0	0,0	0,0
10	25	4	1	4,2	4,8	4,4
11	8	4	2	3,3	3,2	3,5
12	14	4	3	0,0	0,0	0,0
13	13	1	1	2,8	2,9	3,0
14	34	1	2	3,3	3,9	3,5
15	36	1	3	0,0	0,0	0,0
16	24	2	1	3,4	3,2	3,3
17	17	2	2	3,6	3,8	2,8
18	5	2	3	0,0	0,0	0,0
19	23	3	1	2,9	2,1	2,3
20	10	3	2	3,4	3,1	3,0
21	6	3	3	0,0	0,0	0,0
22	7	4	1	3,6	3,7	3,6
23	3	4	2	3,2	3,6	3,2
24	31	4	3	0,0	0,0	0,0
25	33	1	1	3,6	3,9	4,1
26	11	1	2	3,7	3,5	3,8
27	26	1	3	0,0	0,0	0,0
28	2	2	1	4,1	4,4	4,8
29	29	2	2	3,2	2,9	2,5
30	28	2	3	0,0	0,0	0,0
31	15	3	1	3,6	4,0	3,7
32	9	3	2	3,7	4,0	3,6
33	27	3	3	0,0	0,0	0,0
34	30	4	1	4,2	5,2	5,2
35	16	4	2	3,5	3,7	3,6
36	21	4	3	0,0	0,0	0,0

Tabela 19. Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição produzido pela presença do extrato de frutos de *S. cumini* sobre o crescimento de *Staphylococcus epidermidis* utilizando planejamento experimental completo

ORDEM PADRÃO	ORDEM EXECUÇÃO	PROCESSO	SOLVENTE	RESULTADO (mm)		
				1	2	3
1	19	1	1	4,8	4,8	4,1
2	1	1	2	4,6	4,5	4,6
3	12	1	3	0,0	0,0	0,0
4	32	2	1	3,7	3,6	3,9
5	4	2	2	3,3	3,1	3,5
6	22	2	3	0,0	0,0	0,0
7	35	3	1	5,7	5,9	5,8
8	18	3	2	4,9	4,7	4,6
9	20	3	3	0,0	0,0	0,0
10	25	4	1	6,2	4,8	4,9
11	8	4	2	5,7	5,4	6,0
12	14	4	3	0,0	0,0	0,0
13	13	1	1	6,0	5,7	5,3
14	34	1	2	4,4	3,2	4,3
15	36	1	3	0,0	0,0	0,0
16	24	2	1	6,5	5,8	6,7
17	17	2	2	3,6	3,1	3,6
18	5	2	3	0,0	0,0	0,0
19	23	3	1	6,2	5,2	6,5
20	10	3	2	3,2	4,2	3,3
21	6	3	3	0,0	0,0	0,0
22	7	4	1	5,0	5,1	5,7
23	3	4	2	4,4	4,0	4,1
24	31	4	3	0,0	0,0	0,0
25	33	1	1	5,5	6,0	5,5
26	11	1	2	4,3	4,9	4,6
27	26	1	3	0,0	0,0	0,0
28	2	2	1	6,4	5,2	5,8
29	29	2	2	3,5	3,4	3,2
30	28	2	3	0,0	0,0	0,0
31	15	3	1	5,0	4,6	4,8
32	9	3	2	5,4	5,4	6,1
33	27	3	3	0,0	0,0	0,0
34	30	4	1	6,4	6,1	6,3
35	16	4	2	4,4	4,2	4,6
36	21	4	3	0,0	0,0	0,0

Tabela 20. Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição produzido pela presença do extrato de frutos de *S. cumini* sobre o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando planejamento experimental completo

ORDEM PADRÃO	ORDEM EXECUÇÃO	PROCESSO	SOLVENTE	RESULTADO (mm)		
				1	2	3
1	19	1	1	3,9	3,7	3,5
2	1	1	2	3,7	3,6	3,6
3	12	1	3	0,0	0,0	0,0
4	32	2	1	3,1	3,2	3,2
5	4	2	2	3,4	3,2	3,4
6	22	2	3	0,0	0,0	0,0
7	35	3	1	4,2	0,0	3,9
8	18	3	2	2,8	2,7	3,0
9	20	3	3	0,0	0,0	0,0
10	25	4	1	2,3	3,0	2,9
11	8	4	2	3,8	3,8	3,0
12	14	4	3	0,0	0,0	0,0
13	13	1	1	3,6	3,4	3,6
14	34	1	2	3,0	3,1	3,3
15	36	1	3	0,0	0,0	0,0
16	24	2	1	3,6	3,2	3,4
17	17	2	2	0,0	0,0	0,0
18	5	2	3	0,0	0,0	0,0
19	23	3	1	3,3	2,9	3,0
20	10	3	2	3,5	3,1	3,1
21	6	3	3	0,0	0,0	0,0
22	7	4	1	3,4	2,1	3,1
23	3	4	2	0,0	0,0	0,0
24	31	4	3	0,0	0,0	0,0
25	33	1	1	2,9	0,0	0,0
26	11	1	2	3,0	3,4	3,4
27	26	1	3	0,0	0,0	0,0
28	2	2	1	3,7	3,5	3,3
29	29	2	2	3,5	0,0	0,0
30	28	2	3	0,0	0,0	0,0
31	15	3	1	3,6	3,7	3,7
32	9	3	2	3,8	3,4	3,3
33	27	3	3	0,0	0,0	0,0
34	30	4	1	3,6	3,6	3,2
35	16	4	2	3,4	3,0	3,2
36	21	4	3	0,0	0,0	0,0

Tabela 21. Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição produzido pela presença do extrato de frutos de *S. cumini* sobre o crescimento de *Candida krusei* utilizando planejamento experimental completo

ORDEM PADRÃO	ORDEM EXECUÇÃO	PROCESSO	SOLVENTE	RESULTADO (mm)		
				1	2	3
1	19	1	1	2,0	4,0	4,0
2	1	1	2	4,0	5,0	5,0
3	12	1	3	0,0	0,0	0,0
4	32	2	1	4,0	3,0	5,0
5	4	2	2	4,0	5,0	3,0
6	22	2	3	0,0	0,0	0,0
7	35	3	1	5,0	5,0	3,0
8	18	3	2	3,0	4,0	4,0
9	20	3	3	0,0	0,0	0,0
10	25	4	1	2,0	3,0	4,0
11	8	4	2	5,0	4,0	3,0
12	14	4	3	0,0	0,0	0,0
13	13	1	1	3,0	3,0	3,0
14	34	1	2	3,0	5,0	4,0
15	36	1	3	0,0	0,0	0,0
16	24	2	1	0,0	0,0	0,0
17	17	2	2	4,0	5,0	4,0
18	5	2	3	0,0	0,0	0,0
19	23	3	1	5,0	3,0	5,0
20	10	3	2	0,0	0,0	0,0
21	6	3	3	0,0	0,0	0,0
22	7	4	1	5,0	4,0	4,0
23	3	4	2	2,0	3,0	3,0
24	31	4	3	1,0	3,0	3,0
25	33	1	1	4,0	3,0	4,0
26	11	1	2	5,0	5,0	5,0
27	26	1	3	0,0	0,0	0,0
28	2	2	1	4,0	4,0	4,0
29	29	2	2	5,0	4,0	4,0
30	28	2	3	0,0	0,0	0,0
31	15	3	1	3,0	4,0	3,0
32	9	3	2	5,0	4,0	4,0
33	27	3	3	0,0	0,0	0,0
34	30	4	1	5,0	4,0	3,0
35	16	4	2	3,0	4,0	4,0
36	21	4	3	0,0	0,0	0,0

As figuras 21, 22, 23 e 24 ilustram uma placa teste e sua distribuição, tanto dos extratos, como do controle positivo e da solução de DMSO à 5%, para cada microrganismo.

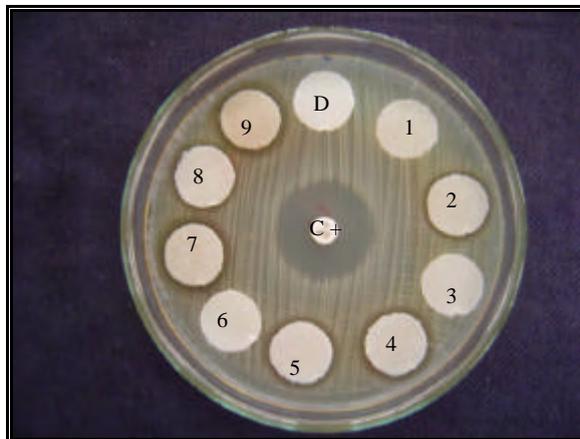


Figura 21. Atividade antimicrobiana do extrato de frutos de *S. cumini* sobre *Staphylococcus aureus*
C + (ciprofloxacino); D (DMSO 5%);
1 (Ext. 27); 2 (Ext. 8); 3 (Ext.26); 4 (Ext. 2); 5 (Ext. 4); 6 (Ext. 6); 7 (Ext. 30); 8 (Ext. 34); 9 (Ext. 25).

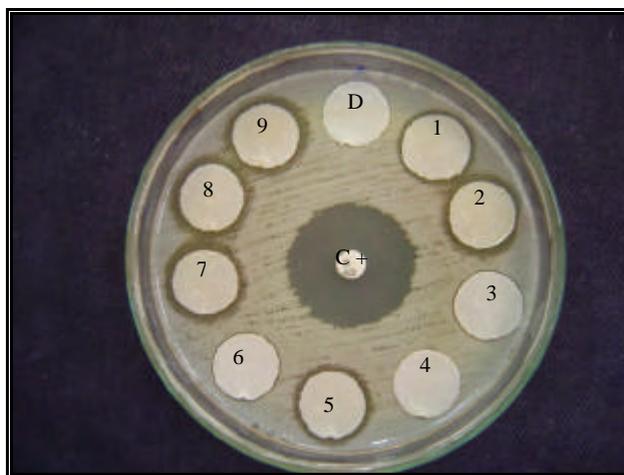


Figura 22. Atividade antimicrobiana do extrato de frutos de *S. cumini* sobre *Staphylococcus epidermidis*
C + (ciprofloxacino); D (DMSO 5%);
1 (Ext. 3); 2 (Ext. 7); 3 (Ext.20); 4 (Ext. 31); 5 (Ext. 16); 6 (Ext. 21); 7 (Ext. 30); 8 (Ext. 35); 9 (Ext. 24).

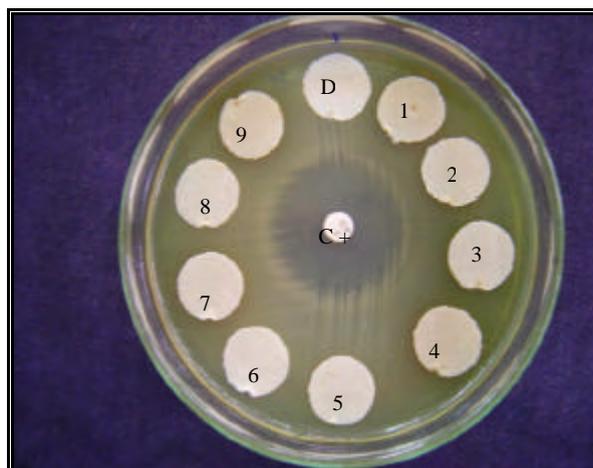


Figura 23. Atividade antimicrobiana do extrato de frutos de *S. cumini* sobre *Pseudomonas aeruginosa*

C + (ciprofloxacino); D (DMSO 5%);

1 (Ext. 7); 2 (Ext. 23); 3 (Ext.17); 4 (Ext. 13); 5 (Ext. 27); 6 (Ext. 22); 7 (Ext. 34); 8 (Ext. 20); 9 (Ext. 33).

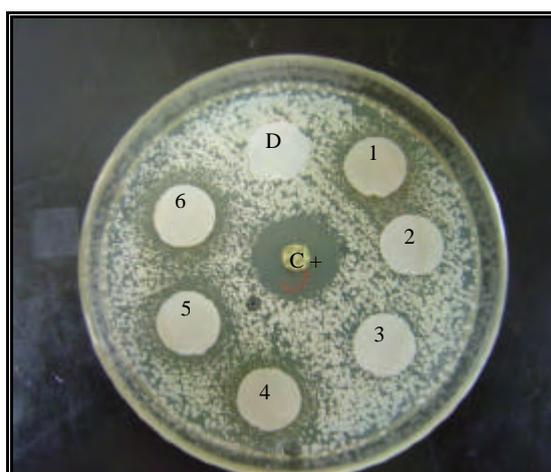


Figura 24. Atividade antimicrobiana do extrato de frutos de *S. cumini* sobre *Candida krusei*

C + (Anfotericina B); D (DMSO 5%);

1 (Ext. 30); 2 (Ext. 16); 3 (Ext.20); 4 (Ext. 11);5 (Ext. 7); 6 (Ext. 4).

Os valores médios de inibição referentes à Tabela 21, relativas à avaliação frente a *Staphylococcus aureus*, encontram-se distribuídos e expressos pela figura 25. A análise gráfica permite uma avaliação da inibição bacteriana considerando os processos extrativos de forma independente da variação dos solventes. Em tal situação, observa-se mínima variação na inibição

em relação aos processos, porém ao considerar-se a variação nos solventes propostos, pode-se visualizar significativa diferença entre eles. O melhor solvente constituiu-se o etanol 50 °GL.

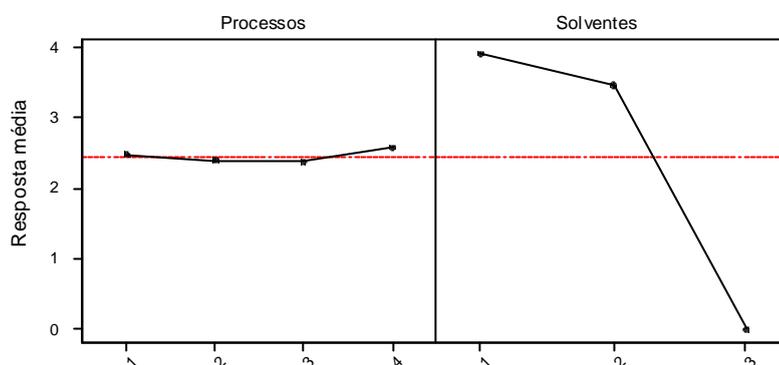


Figura 25. Análise independente de valores médios quantitativos da atividade antimicrobiana de frutos de *S. cumini* frente a *S. aureus*, em milímetros, obtidos pelos diferentes métodos extrativos: 1- turbólise, 2 – maceração 5 dias, 3 – maceração 10 dias, 4 – percolação e empregando-se diferentes solventes: 1 – etanol 50 °GL, 2 – etanol 70 °GL, 3 – etanol 96 °GL

Considerando-se a análise de interação inibição bacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, melhor processo extrativo e melhor solvente, pode-se considerar como melhor sistema extrativo, a percolação empregando-se o etanol 50 °GL como solvente. A figura 26 demonstra tal afirmação de forma bastante evidente.

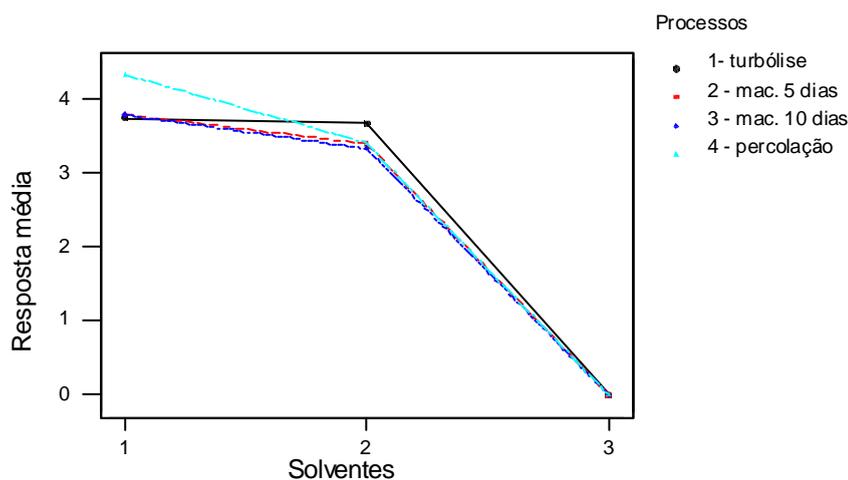


Figura 26. Análise gráfica considerando a interação entre os processos extrativos – solventes – atividade antimicrobiana para *S. aureus* obtidos em milímetro

A melhor atividade antimicrobiana para *S. aureus* é apresentada pela coloração intensa observada nas representações gráficas nas figuras 27 e 28. Desta forma, observa-se que a melhor atividade ocorre utilizando-se percolação como processo extrativo, no entanto os outros processos não apresentam grandes diferenças.

Da mesma maneira, as figuras 27 e 28 destacam o etanol 50 °GL como o melhor solvente extrator.

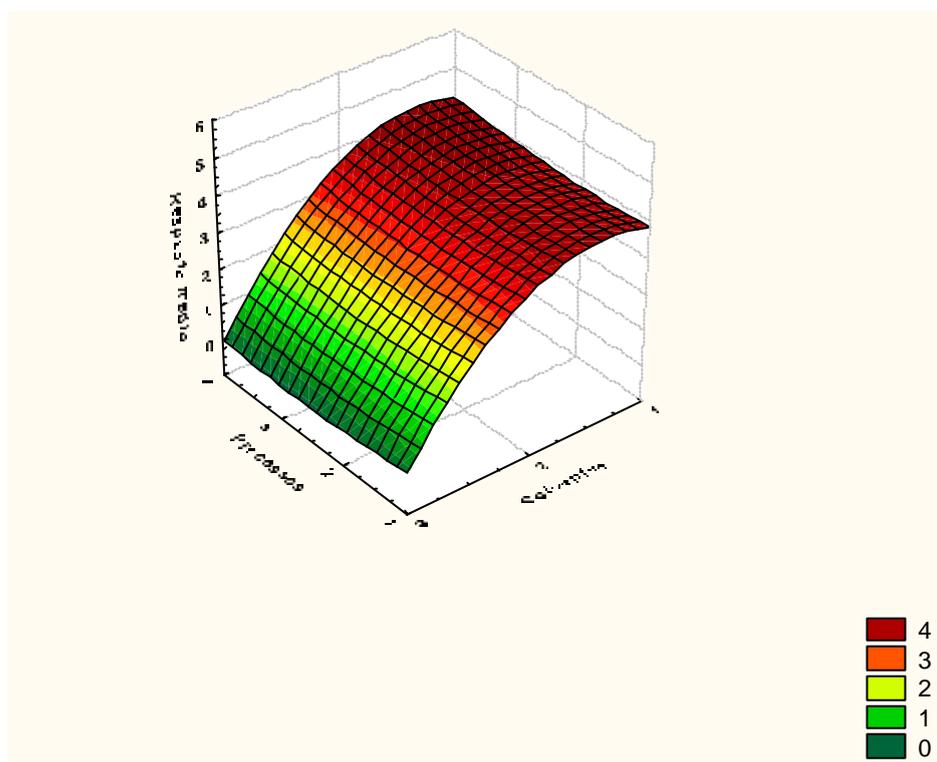


Figura 27. Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *S. aureus* obtida em relação ao processo extrativo e solvente

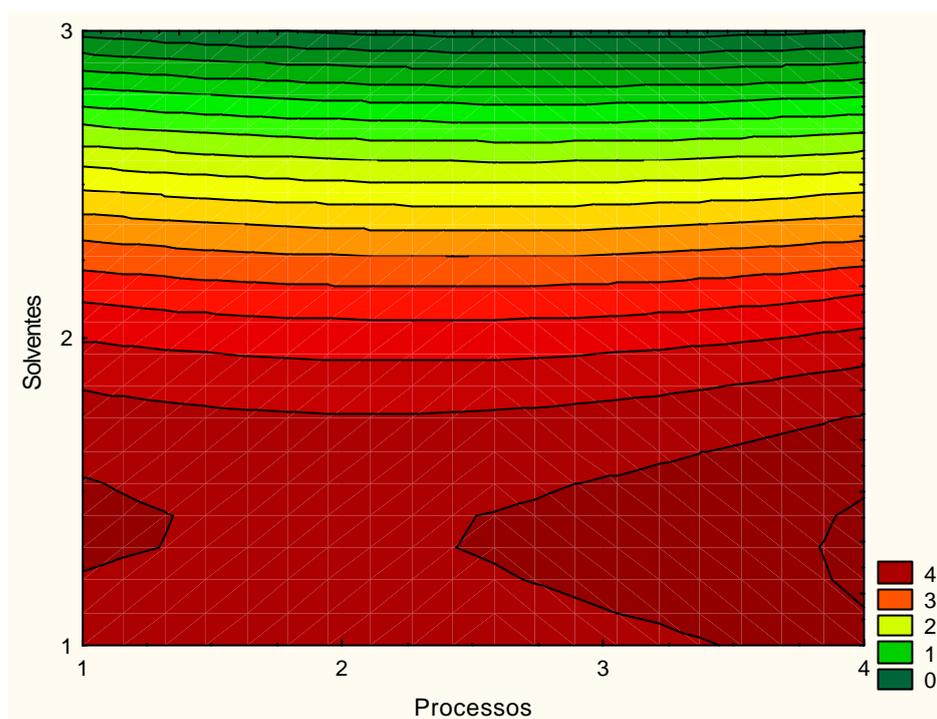


Figura 28. Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente à *S. aureus* obtida em relação ao processo extrativo e solvente

O histograma referente à figura 29 demonstra uma distribuição normal, dos resultados obtidos, situados entre mais ou menos duas vezes o desvio padrão.

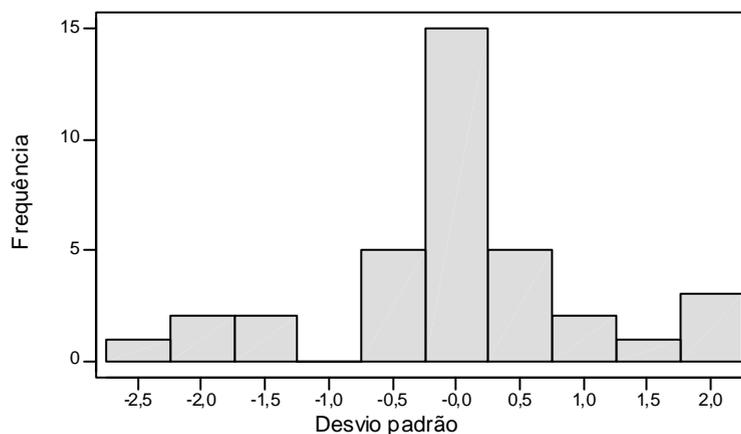


Figura 29. Histograma demonstrando a distribuição dos resultados da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente à *S. aureus* em relação a frequência e desvio padrão

Considerando-se os resultados de inibição frente ao *S. epidermidis* e observando-se as figuras 30 e 31, pode-se inferir que, apesar da pequena variação em relação aos métodos

extrativos, a percolação constitui-se no melhor processo seguida dos outros processos em que os valores estão bastante próximos. Novamente, o melhor solvente constitui-se no etanol 50 °GL.

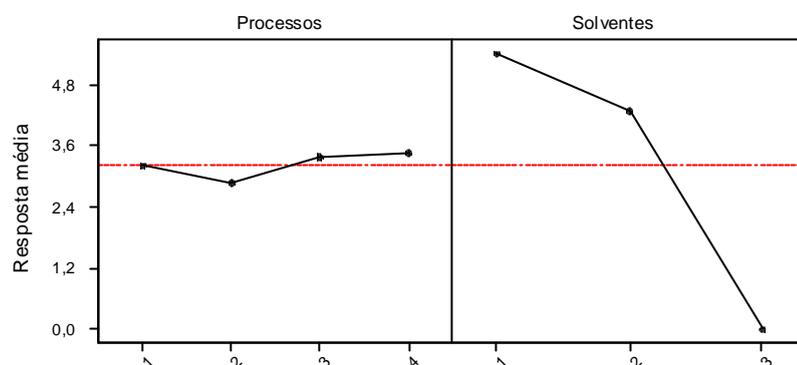


Figura 30. Análise independente de valores médios quantitativos da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *S. epidermidis*, em milímetros, obtidos pelos diferentes métodos extrativos: 1 - turbólise, 2 - maceração 5 dias, 3 - maceração 10 dias, 4 - percolação e empregando-se diferentes solventes: 1 - etanol 50 °GL, 2 - etanol 70 °GL, 3 - etanol 96 °GL

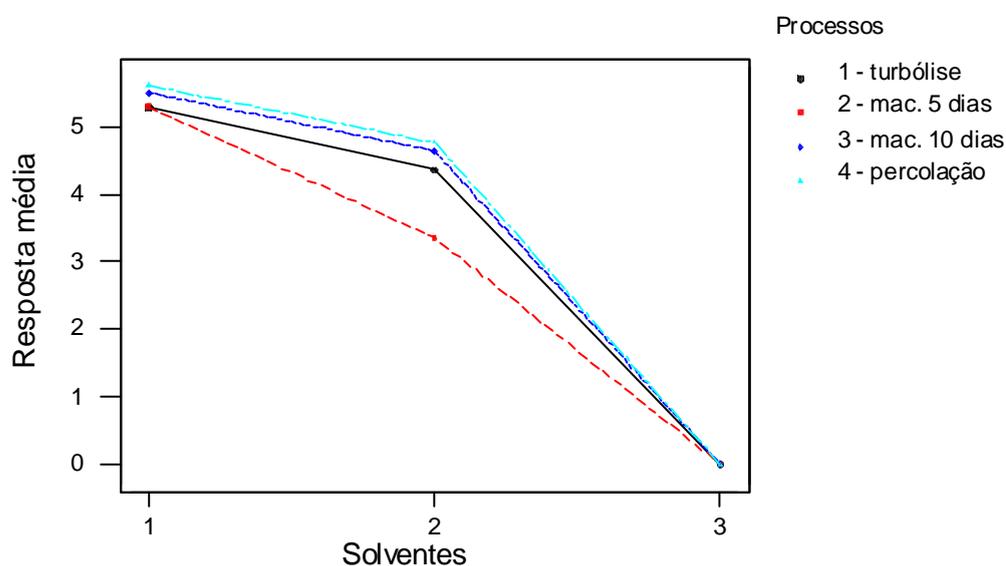


Figura 31. Análise gráfica considerando a interação entre os processos extrativos – solventes – atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *S. epidermidis* obtidos em milímetro

A melhor atividade antimicrobiana para *S. epidermidis* é apresentada pela coloração intensa observada nas representações gráficas na figura 32 e 33. Desta forma, observa-se que a melhor atividade ocorre utilizando-se a percolação como processo extrativo, seguida dos outros processos extrativos em que os valores estão bastante próximos.

Da mesma maneira as figuras 32 e 33 destaca o etanol 50 °GL como o melhor solvente extrator.

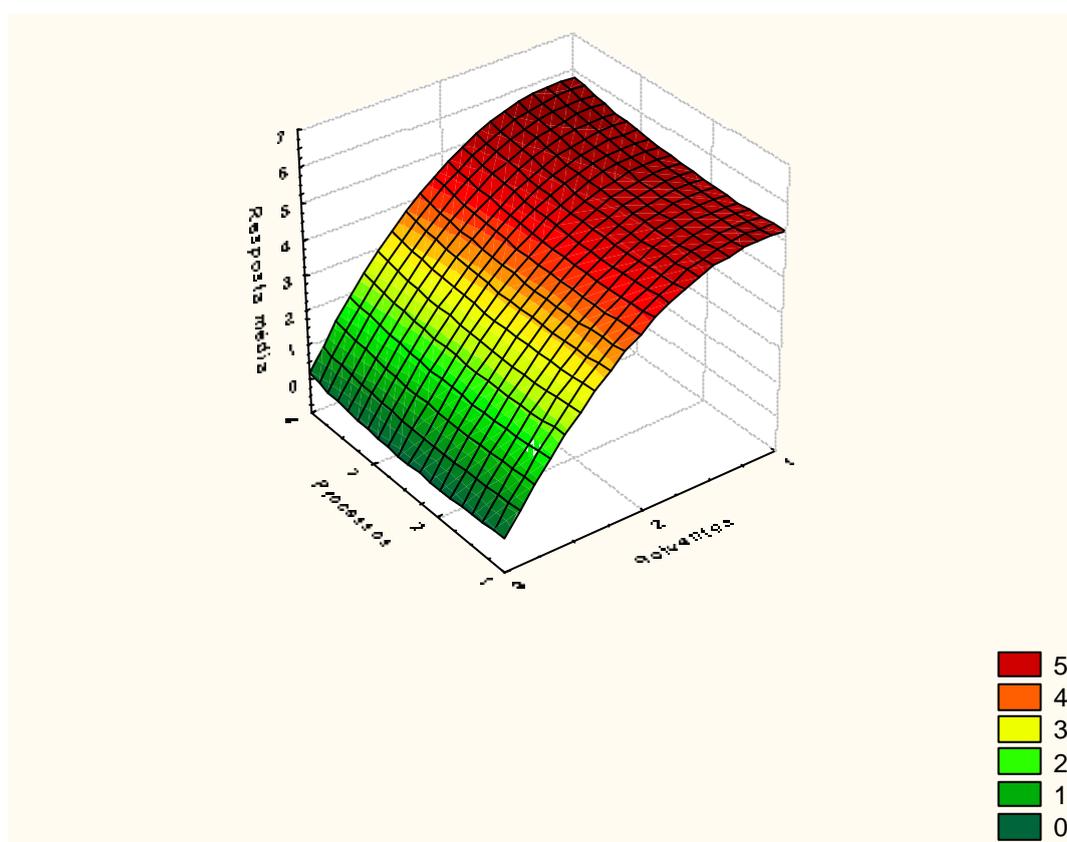


Figura 32. Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *S. epidermidis* obtida em relação ao processo extrativo e solvente

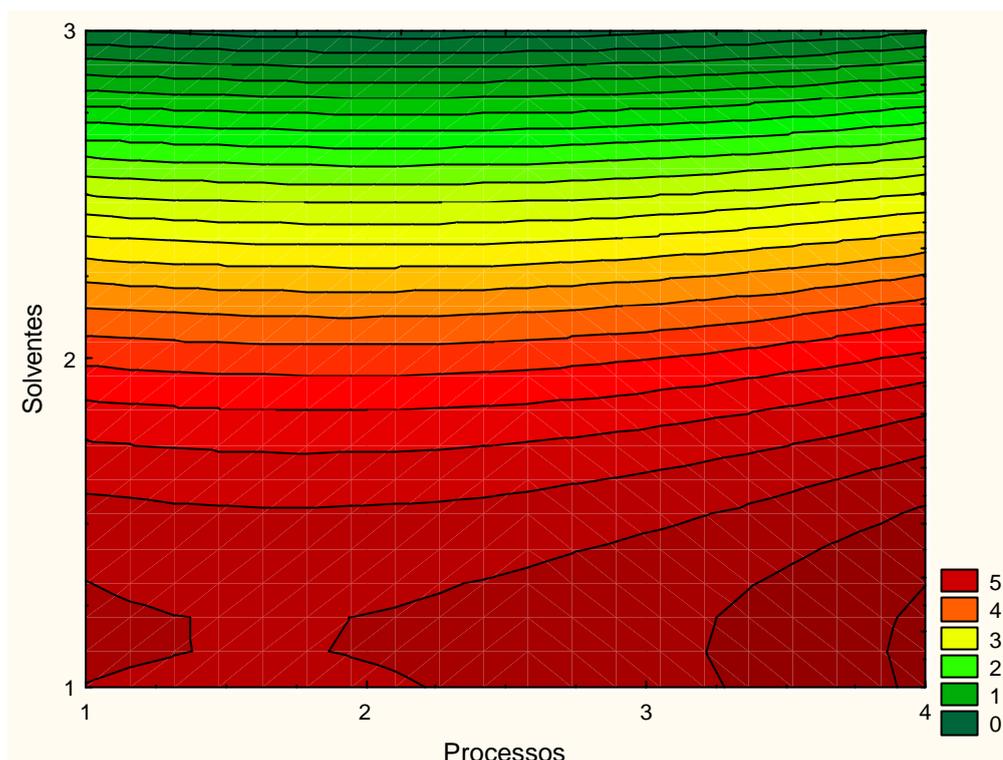


Figura 33. Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *S. epidermidis* obtida em relação ao processo extrativo e solvente

A análise estatística dos resultados observados para o *S. epidermidis* expressa pela figura 34, também apresentou uma distribuição normal, estando os resultados situados entre mais ou menos duas vezes o desvio padrão.

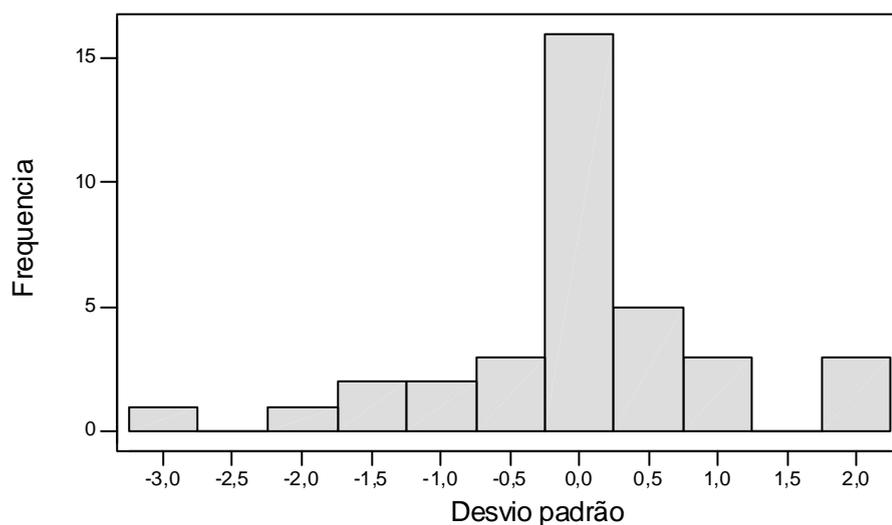


Figura 34. Histograma demonstrando a distribuição dos resultados da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente à *S. epidermidis* em relação a frequência e desvio padrão

Considerando-se os resultados de inibição de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *P. aeruginosa*, e observando-se a figura 35, pode-se verificar que os extratos produzidos através dos processos turbólise e maceração por 10 dias resultaram em melhores atividades antibacterianas. O melhor solvente constitui-se no etanol 50 °GL

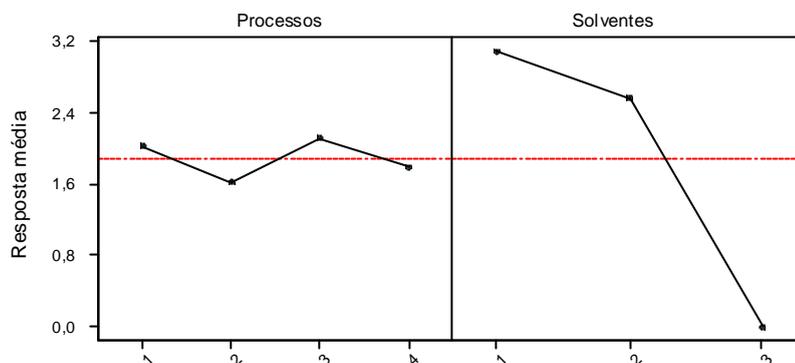


Figura 35. Análise independente de valores médios quantitativos da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *P. aeruginosa*, em milímetros, obtidos pelos diferentes métodos extrativos: 1 – turbólise, 2 – maceração 5 dias, 3 – maceração 10 dias, 4 – percolação e empregando-se diferentes solventes: 1 – etanol 50 °GL, 2 – etanol 70 °GL, 3 – etanol 96 °GL

A interpretação, considerando a inter-relação dos resultados, expressa uma repetição das informações verificadas através da figura 36, ou seja, os melhores processos extrativos constituem-se na turbólise e maceração 10 dias, porém ao considerar-se os solventes, observa-se pela figura 36 resultados muito bons para o solvente etanol 70 °GL frente a tais processos. Chama atenção, ainda, o fato de se verificar uma equivalente capacidade inibitória frente a bactéria proposta, do extrato obtido por maceração 5 dias e tendo como solvente o etanol 50 °GL.

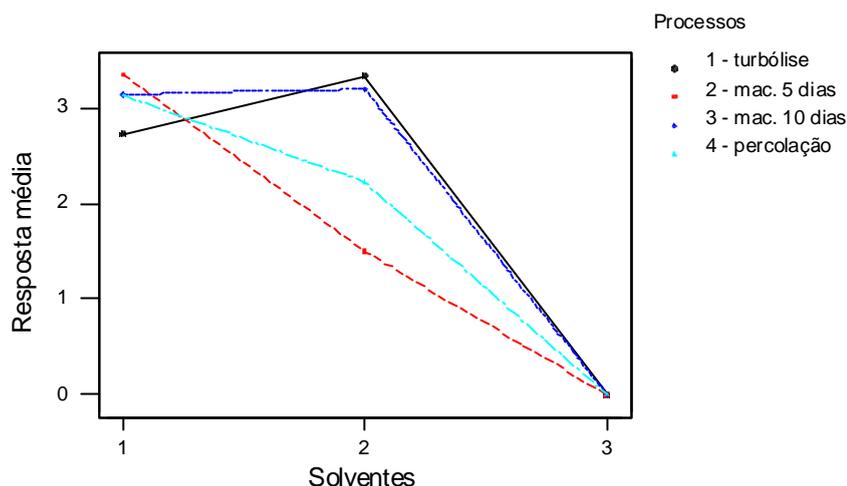


Figura 36. Análise gráfica considerando a interação entre os processos extrativos – solventes – atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *P. aeruginosa* obtidos em milímetro

A melhor atividade antimicrobiana para *P.aeruginosa* é apresentada pela coloração intensa observada nas representações gráficas nas figuras 37 e 38. Desta forma, observa-se que a melhor atividade ocorre utilizando-se a percolação, porém os outros processos estão bastante próximos.

Da mesma maneira, as figuras 37 e 38 destaca o etanol 50 °GL como o melhor solvente extrator.

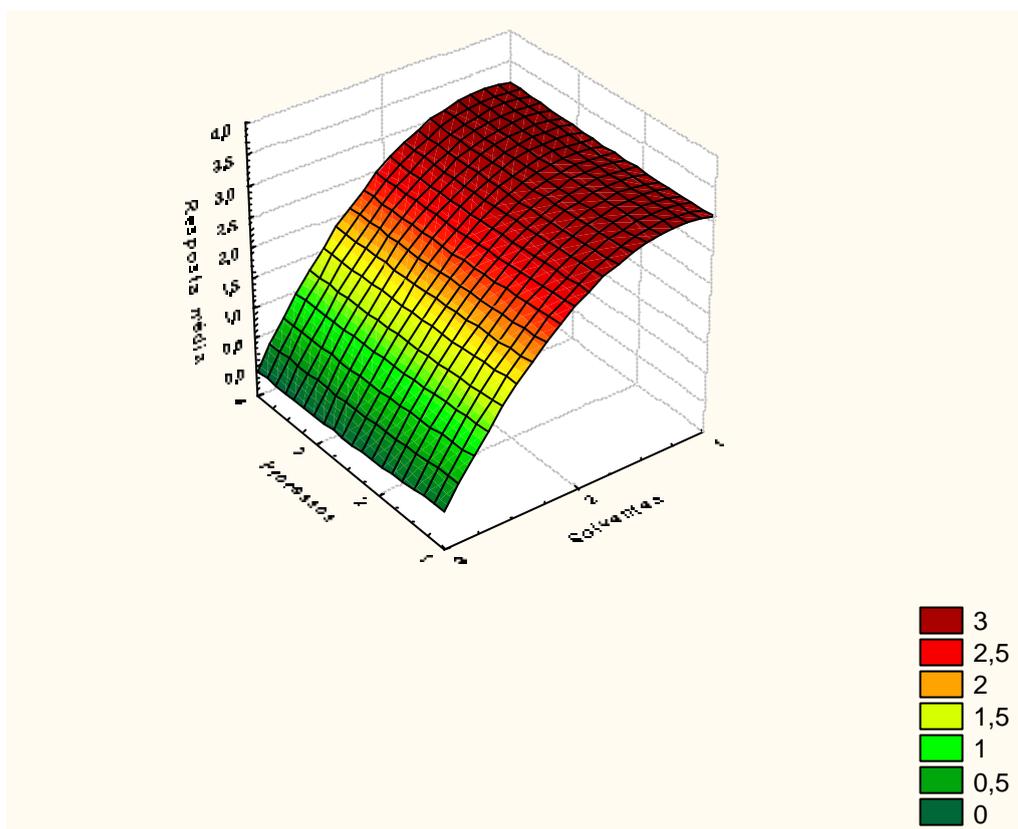


Figura 37. Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *P. aeruginosa* obtida em relação ao processo extrativo e solvente

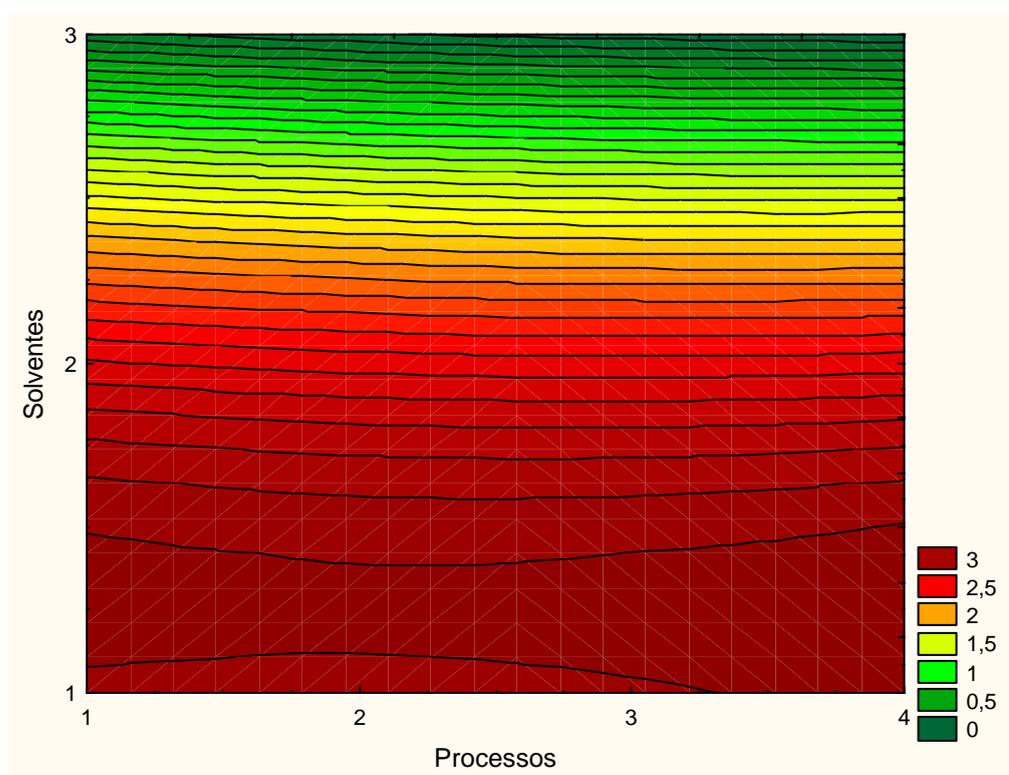


Figura 38. Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *P. aeruginosa* obtida em relação ao processo extrativo e solvente

A frequência de distribuição de resultados de atividade antibacteriana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *P. aeruginosa*, ilustrada na figura 39, apresenta perfil de distribuição normal.

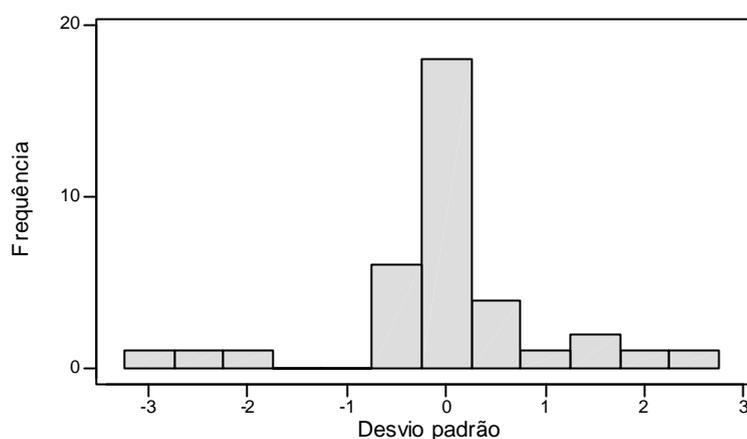


Figura 39. Histograma demonstrando a distribuição dos resultados da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *P. aeruginosa*, em relação a frequência e desvio padrão

Com relação às culturas de *C. krusei*, a figura 40 demonstra não ser significativa a diferença em relação ao processo e indica a turbólise e a percolação como os procedimentos que resultam em extratos mais ativos frente a esta levedura. Já em relação ao solvente, a mesma figura 40, indica o etanol 70 GL como o mais indicado.

Uma análise envolvendo a inter-relação dos parâmetros estabelecidos (figura 41), evidenciam a turbólise e a maceração 5 dias, juntamente com o solvente etanol 70 GL como os procedimentos extrativos mais indicados. Apesar disto, a maceração 10 dias, com o solvente etanol 50 GL oferece respostas quantitativas próximas aos resultados obtidos com a maceração 5 dias e turbólise – etanol 70 GL. Considerando-se agora, a percolação-etanol 50 GL, como procedimento extrativo, verifica-se resultados aproximados à maceração 10 dias.

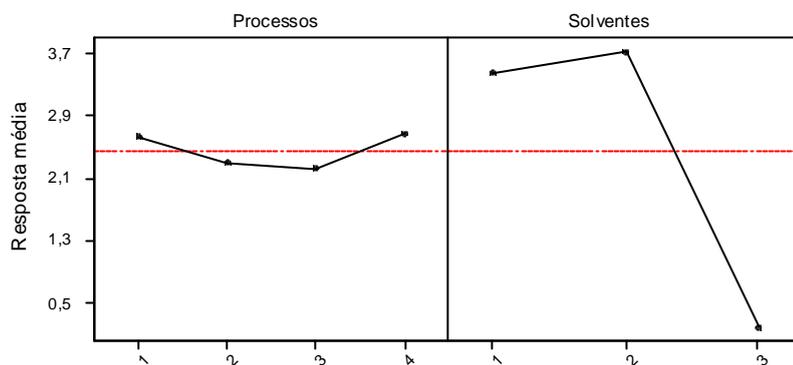


Figura 40. Análise independente de valores médios quantitativos da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *C. krusei*, em milímetros, obtidos pelos diferentes métodos extrativos: 1- turbólise, 2 – maceração 5 dias, 3 – maceração 10 dias, 4 – percolação e empregando-se diferentes solventes: 1 – etanol 50 °GL, 2 – etanol 70 °GL, 3– etanol 96 °GL

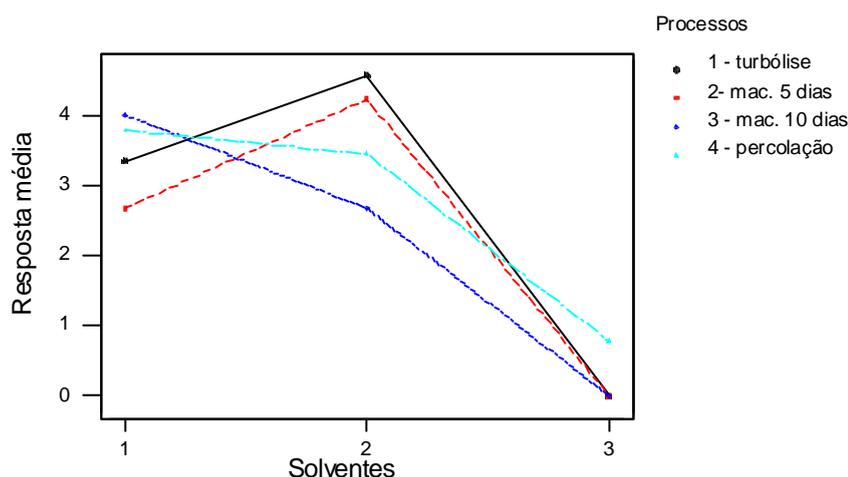


Figura 41. Análise gráfica considerando a interação entre os processos extrativos – solventes – atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *C. krusei* obtidos em milímetro

A melhor atividade antimicrobiana para *C. krusei* é apresentada pela coloração intensa observada nas representações gráficas nas figuras 42 e 43. Desta forma, observa-se que os melhores rendimentos ocorrem utilizando-se a percolação e a turbólise como processos extrativos.

Da mesma maneira as figuras 42 e 43 destacam o etanol 50 °GL e 70 °GL como melhores solventes extratores.

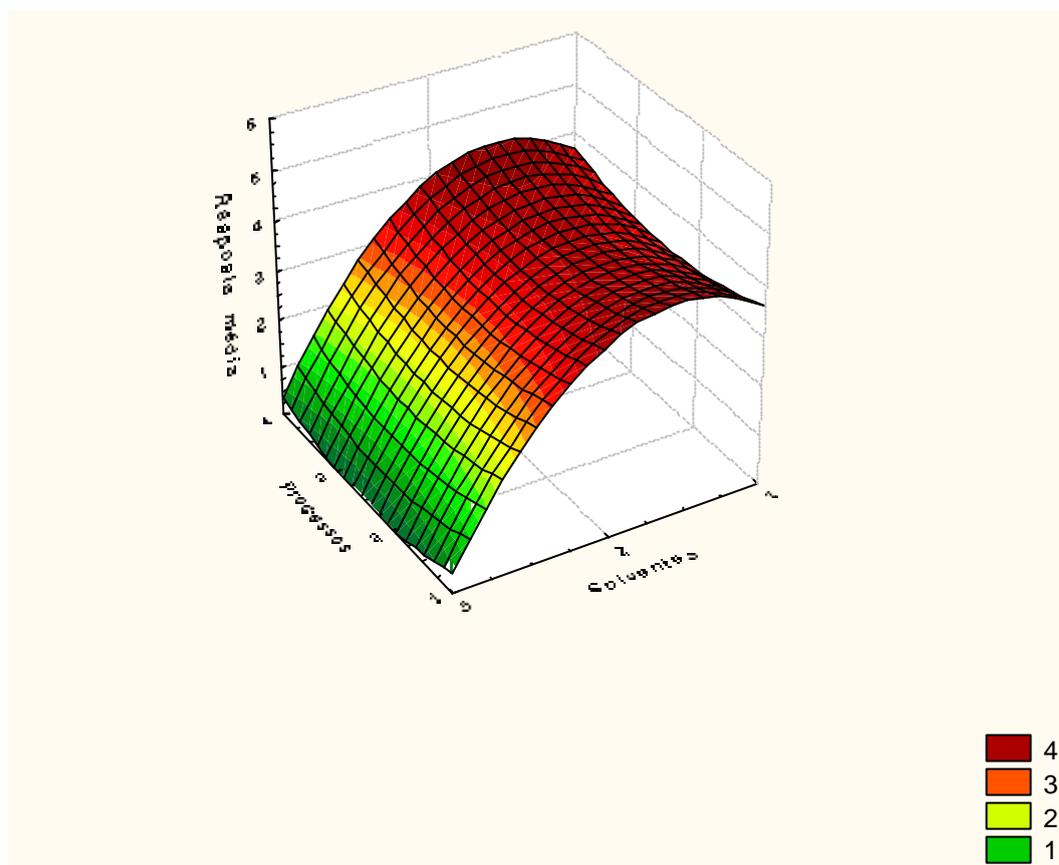


Figura 42. Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *C. krusei* obtida em relação ao processo extrativo e solvente

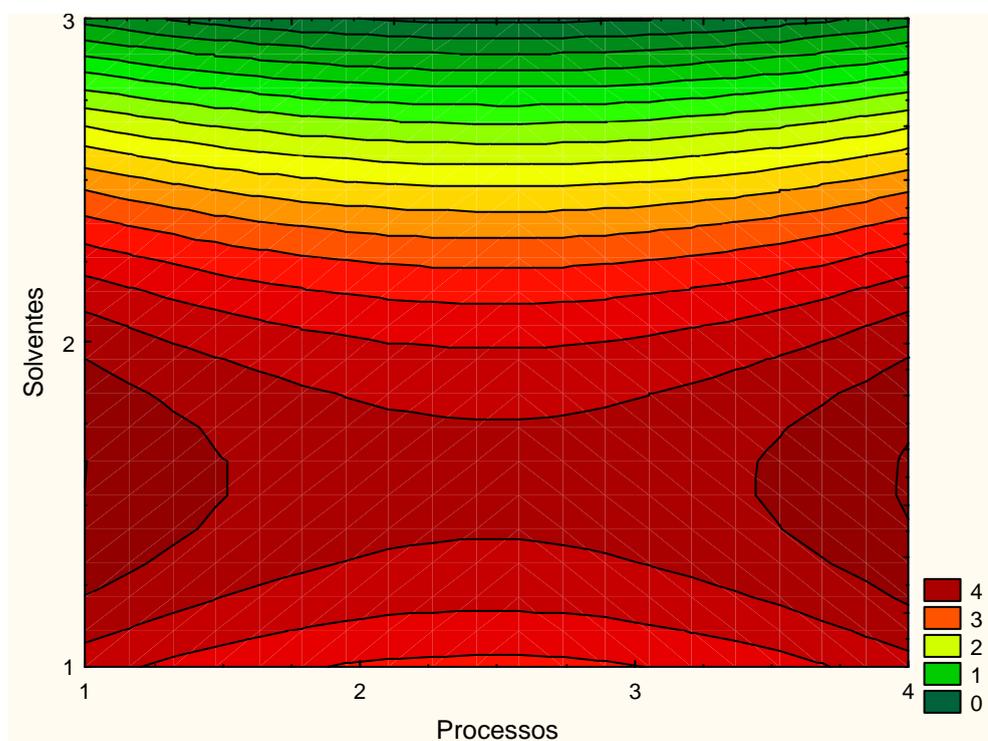


Figura 43. Atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *C. krusei* obtida em relação ao processo extrativo e solvente

A análise estatística, mais uma vez, indica a validade da metodologia aplicada e demonstra, através do histograma relativo à figura 44 a distribuição normal dos resultados, com desvios padrão dentro do esperado.

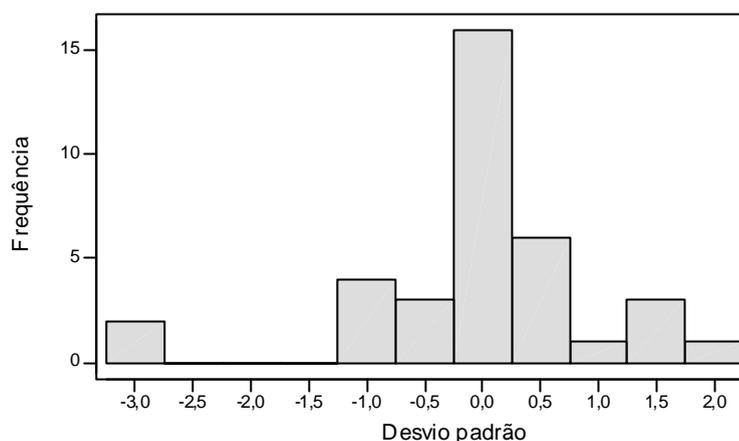


Figura 44. Histograma demonstrando a distribuição dos resultados da atividade antimicrobiana de extrato de frutos de *S. cumini* frente a *C. krusei* em relação a frequência e desvio padrão

De acordo com a avaliação antimicrobiana realizada, foi possível identificar o melhor processo extrativo e o melhor solvente ou líquido extrator, conforme demonstra a Tabela 22.

Tabela 22. Representação do melhor método de extração e líquido extrator

MICROORGANISMO	PROCESSO	SOLVENTE
<i>S. aureus</i>	4	1
<i>S. epidermidis</i>	4	1
<i>P. aeruginosa</i>	1 e 3	1
<i>C. krusei</i>	1 e 4	1 e 2

Processo 1- turbólise 3 - maceração 10 dias 4 - percolação
Solvente 1- etanol 50 GL 2 - etanol 70 GL

Como evidencia a Tabela 22, e baseado na atividade antimicrobiana, o processo de percolação empregando-se como solvente o etanol 50 GL constituiu-se no melhor ou se situou entre os melhores procedimentos extrativos. Uma análise mais profunda deste comportamento se torna bastante complexa ao considerar-se a constituição química existente nos extratos vegetais

de forma geral. No caso específico do extrato de frutos de *S. cumini*, a presença de taninos pode justificar os resultados positivos em relação à atividade antimicrobiana.

Taninos são tóxicos para fungos e bactérias, e esta atividade é devida a algumas de suas propriedades como a inibição de enzimas extracelulares, deprivação de substrato, inibição da fosforilação oxidativa, além de mecanismos que envolvem deprivação de ferro (SANCHES, 2004). Além disto, a literatura revela a similaridade de ação dos taninos em comparação ao apresentado pelos compostos fenólicos e bi-fenólicos sintéticos, materiais estes largamente empregados como anti-sépticos na atualidade.

Apesar disto, estas propriedades antimicrobianas apresentadas pelos taninos, parecem apresentar um espectro de ação limitado. Scalbert (1991) relata que muitos microrganismos podem crescer em presença de materiais ricos em taninos. Nossos resultados de certa forma não contradizem este tipo de afirmação, uma vez que não foi encontrada atividade antimicrobiana, frente aos microrganismos *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A reduzida atividade frente a *P. aeruginosa*, também bactéria Gram negativa, pode, também, ser justificada ao se considerar uma possível ação dos taninos frente à membrana dos microrganismos e à complexidade da membrana celular apresentada por este tipo de microrganismo.

O impacto das doenças infecciosas, na evolução humana, é de difícil avaliação, tanto pela sua complexidade em si, como pela escassez de dados e pontos obscuros.

O interesse em conseguir novos fármacos com atividade antibacteriana e antifúngica levou à realização de testes em busca desta atividade com o extrato seco de frutos de *S. cumini*. Tal interesse é diretamente relacionado com os usos populares descritos para o jambolão. A planta desta família se destaca por ser rica em vários constituintes, sendo, portanto, muito empregada na medicina popular.

Após ter sido avaliado como melhor procedimento extrativo a percolação-etanol 50 °GL, procedeu-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) oferecida pelo extrato que apresentou o melhor rendimento de resíduo seco e a melhor atividade antimicrobiana. Observando a dificuldade de metodologias para a determinação da concentração inibitória mínima tentou-se utilizar uma técnica padronizada seguindo as normas do NCCLS e adaptando para a aplicação com extratos vegetais.

Um ensaio com agentes antibacterianos e antifúngicos de referência serviu de controle do processo, de modo a se confirmar que as cepas dos microrganismos utilizados não eram resistentes. Os valores obtidos foram comparados com a CIM dos antimicrobianos descritos pela literatura (MURRAY *et al.*, 2003; NCCLS, 1997; NCCLS, 2000) permitindo considerar a metodologia empregada adequada para a avaliação e adaptação da CIM para o extrato vegetal.

Os resultados dos ensaios realizados para verificação do perfil de sensibilidade das bactérias e leveduras utilizando como controle o ciprofloxacino para as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* e a anfotericina B para as leveduras, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, indicaram as concentrações inibitórias mínimas, respectivamente de 1 µg/mL e 0,25 µg/mL.

Os ensaios para realizar a CIM do extrato vegetal tanto para bactérias como para leveduras, iniciaram empregando-se concentração de 10000 µg/100 µL de extrato, seguidas por diluições adequadas. A CIM do extrato foi testada tanto empregando-se a solução aquosa de DMSO a 5% (v/v), como também, propilenoglicol diluído em água a 80% (v/v). Como já citado no item anterior, o DMSO foi diluído para que não interferisse na amostra testada e o propilenoglicol foi diluído com o objetivo de reduzir sua viscosidade e desta forma facilitar a solubilidade.

Esta metodologia foi adaptada como citada anteriormente e os resultados iniciais não puderam ser avaliados. O caldo empregado recebeu o extrato e o inóculo, e após a incubação não

foi possível interpretar os resultados obtidos pela leitura visual e pela espectrofotometria. O extrato avaliado apresentou coloração muito intensa e mesmo após sofrer as diluições propostas, continuou a interferir na interpretação dos resultados (figuras 45 e 46).

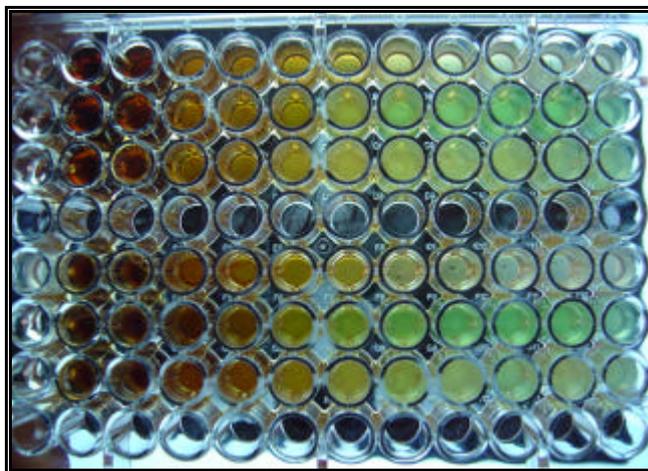


Figura 45. Concentração inibitória mínima de extrato de frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels para bactérias

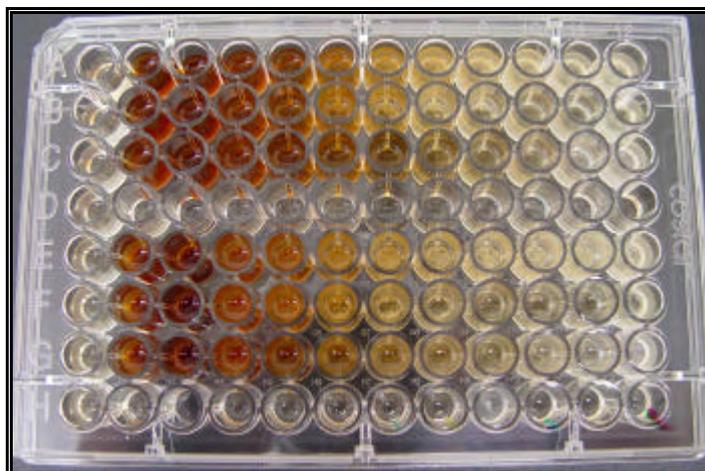


Figura 46. Concentração inibitória mínima de extrato de frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels para leveduras

Em razão ao exposto, foi proposto empregar a metodologia para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM), realizadas em placas, cuja interpretação dos resultados foi possível de ser realizada.

Os resultados obtidos do extrato percolação-etanol 50 °GL da concentração bactericida e fungicida mínima estão apresentados na Tabela 23. Estes resultados estão descritos tanto para o extrato solubilizado em DMSO como em propilenoglicol.

Tabela 23. Concentração bactericida e fungicida mínima para o extrato de frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (µg/ 100iL)									
	10000	5000	2500	1250	625	312,5	156,25	78,12	39,06	19,53
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

+ crescimento do microrganismo; - ausência de crescimento de microrganismo

A ilustração dos resultados referidos na Tabela 23 encontra-se dispostos nas figuras 47 e 48.

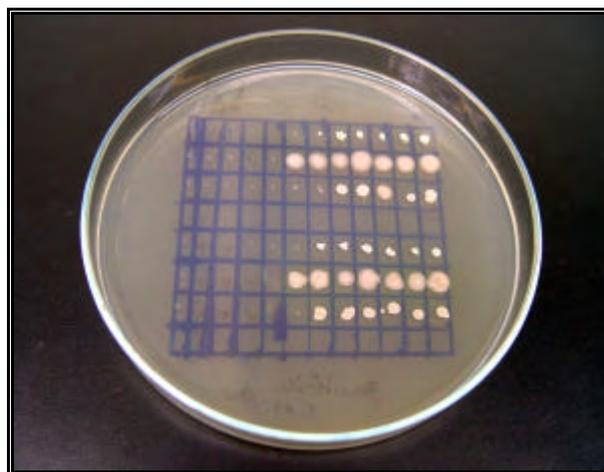


Figura 47. Concentração bactericida mínima do extrato de frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

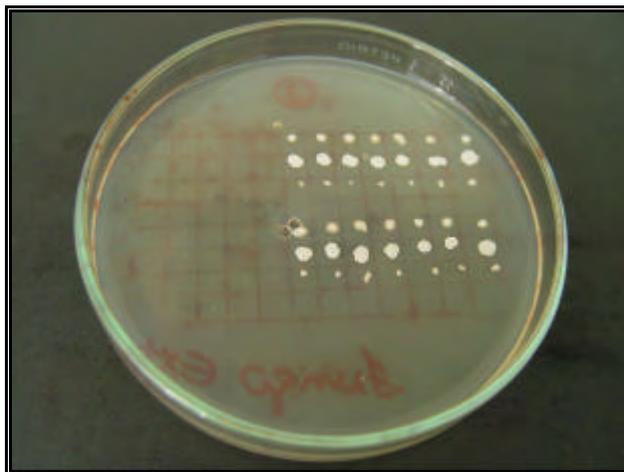


Figura 48. Concentração fungicida mínima do extrato de frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Para as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, e para os solventes (DMSO 5%, propilenoglicol) utilizados, foi possível observar a ação bactericida numa concentração igual ou superior a 1250 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ para *S. aureus* e 625 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ para *S. epidermidis*. Já para a *P. aeruginosa* a CBM encontrada foi de 2500 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, mostrando que as bactérias Gram-negativas são mais difíceis de serem inibidas conforme demonstra a figura 47.

Para as leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, e para os dois tipos de solventes utilizados foi possível observar ação fungicida somente em concentrações igual ou superior a 2.500 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$.

5.3. Preparação do sabonete líquido e avaliação da atividade antimicrobiana

Após a etapa de obtenção da concentração inibitória mínima, concentração bactericida e fungicida mínima do extrato foi estudada a incorporação deste extrato a um sabonete líquido.

O interesse em incorporar o extrato vegetal a uma formulação de sabonete líquido está na preocupação de resistência microbiana, pois o número de microrganismos resistentes vem aumentando muito e o número de infecções hospitalares torna-se preocupante. É importante ressaltar que atualmente o anti-séptico mais utilizado é o triclosan, que não possui ação sobre microrganismos Gram-negativos, como *Pseudomonas aeruginosa* (MEADE *et al.*, 2001).

Os sabonetes líquidos apresentam como principal característica o fato de serem composições semelhantes aos xampus, com elevadas concentrações de detergentes. Estes produtos podem ser transparentes ou perolados.

A evolução dos sabonetes líquidos permitiu que tais produtos adquirissem valores mais amplos, como a veiculação de aditivos com funções diversas e específicas como anti-sépticos, antiinflamatórios, entre outros.

Na formulação do sabonete foi utilizado lauril éter sulfato de sódio que é um dos detergentes sintéticos mais utilizados no preparo de sabonetes líquidos. Foi associado outro tipo de detergente, o cocamido propilbetaína, que é normalmente associado à formulação, pois melhora a qualidade espumógena e auxilia na viscosidade da composição. Para proporcionar adequado sobreengorduramento e maior suavidade ao sabonete líquido, foi utilizada dietanolamida de ácido graxo de coco que além de sobreengordurar, é um importante auxiliar de viscosidade, um solubilizante e estabilizador de espuma. Além disso, para abrandar o efeito desengordurante, propôs-se enriquecer a preparação com um emoliente hidrossolúvel como o cocoato de glicerila PEG 7 e o óleo de amêndoas etoxilado. Para que o sabonete tenha o pH próximo ao pH da pele, estabeleceu-se o valor de pH 6,0 para a preparação proposta. Para isto empregou-se o ácido cítrico.

Em uma formulação normal deveria ser utilizado conservante, porém como a função do sabonete foi avaliar a atividade antimicrobiana, este foi preparado sem a presença de conservantes para que não interferisse na avaliação seguindo as boas práticas de manipulação e sendo analisado no mesmo dia.

A análise da atividade antimicrobiana do sabonete líquido contendo extrato de frutos de *S. cumini* foi realizada utilizando-se o extrato seco solubilizado em propilenoglicol 80%, para que não perdesse a propriedade espumógena do sabonete líquido. O ensaio ocorreu frente às bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*), Gram-

negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) e leveduras (*Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*).

O método empregado foi difusão em ágar e a concentração de extrato empregada correspondeu a 5000 µg/50 mL. Foi considerado para esta escolha, os valores de CIM obtidos durante a avaliação do extrato, que determinou serem necessárias as concentrações mínimas de 625 µg/100 mL e 1250 µg/100 mL frente às bactérias e 2500 µg/100 mL frente às leveduras. Apesar da concentração escolhida estar bem acima do indicado, seu valor foi estabelecido aleatoriamente, e procurou garantir que a proposta do sabonete líquido anti-séptico fosse positiva. Outro fator a ser considerado, diz respeito aos problemas técnicos em relação ao sabonete líquido. Concentrações superiores à escolhida podem afetar a estrutura da fórmula e comprometer a capacidade espumógena da preparação e desta forma, interferir negativamente sobre sua viscosidade. A manutenção destes parâmetros é fator determinante para a boa aceitação do produto, de tal forma que não devem ser desprezados.

Com o objetivo de se ter um controle positivo, inseriu-se nas placas referentes a cada microrganismo, um padrão de sensibilidade. O triclosan foi o anti-séptico escolhido para essa função, e a concentração estabelecida seguiu a determinação usual para este tipo de material em preparações que sofrem enxágüe. A concentração estabelecida foi de 500 µg/50 mL em solução de propilenoglicol 80% e no sabonete líquido.

Outra consideração importante diz respeito à utilização do propilenoglicol (80%) como material para a solubilização do extrato seco. Na escolha deste material para os ensaios referentes à avaliação antimicrobiana do extrato, procurou-se prever a possível incorporação do extrato solubilizado no sabonete líquido. Em tal situação, deve-se estabelecer um material que permita a adequada suspensão e até solubilização do extrato, e que apresente a menor influência

possível sobre as propriedades do sabonete líquido, ou seja, não deve interferir sobre a viscosidade, poder espumógeno e fundamentalmente sobre a capacidade de limpeza ou detergência. O propilenoglicol (80%), escolhido qualitativamente e quantitativamente para solubilizar o extrato dos frutos de *S. cumini* que apresentou melhor atividade percolação-etanol 50 °GL, também foi utilizado nas placas como controle. Tal procedimento objetivou certificar-se que a presença deste material não apresentasse qualquer atividade antimicrobiana.

Como controle negativo, empregou-se o sabonete líquido isento de triclosan e de extrato.

Os resultados obtidos da avaliação da atividade pelo método de difusão em ágar estão apresentados na tabela 24.

Tabela 24. Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição produzido pela presença do sabonete com extrato de frutos de *S. cumini*, sabonete, sabonete com triclosan, solução de triclosan, propilenoglicol e extrato sobre o crescimento dos microrganismos

Microrganismos	Sabonete	Propilenoglicol	Sol. Extrato	Sabonete Extrato	Sol. Triclosan	Sabonete Triclosan
<i>S. aureus</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	11,0 ± 1,0	11,0 ± 1,12	21,6 ± 0,4	23,6 ± 0,87
<i>S. epidermidis</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	5,0 ± 1,04	5,6 ± 0,74	25,0 ± 1,38	23,6 ± 0,78
<i>P. aeruginosa</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,5	8,0 ± 1,04	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>C. albicans</i>	4,0 ± 0,57	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,0 ± 0,94	8,6 ± 0,61	8,0 ± 0,5
<i>C. krusei</i>	3,0 ± 0,41	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,6	2,7 ± 1,14	12,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
<i>C. parapsilosis</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,8	3,0 ± 0,41	6,6 ± 0,57	0,0 ± 0,0

Valores expressos em mm
Desvio padrão ±

Ao observarmos os resultados apresentados na Tabela 24 verifica-se que quando seu valor for nulo significa que houve ausência de atividade antimicrobiano na substância proposta e por outro lado quando os resultados apresentaram-se em valores maiores significa que houve um aumento da atividade antimicrobiana na substância ou produto proposto.

As ilustrações dos resultados referidos na Tabela 24 encontram-se dispostos nas figuras 49 a 54.

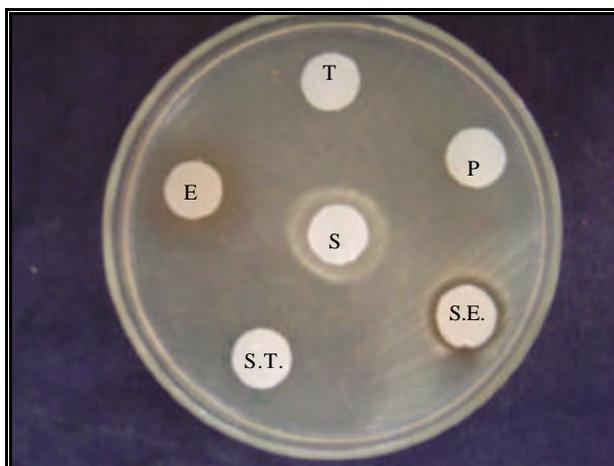


Figura 49. Atividade antimicrobiana do sabonete líquido com extrato de frutos de *S. cumini* e com triclosan sobre *Staphylococcus aureus*

S (Sabonete); T (Sol. de Triclosan); P (Sol. Propilenoglicol)
S.E. (Sabonete com extrato); S.T. (Sabonete com Triclosan), E (Sol. Extrato)

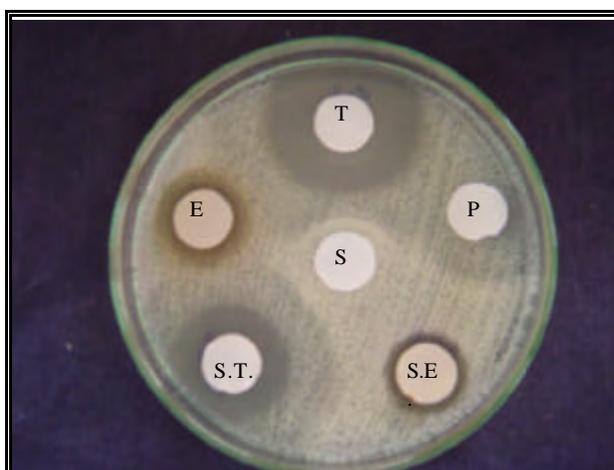


Figura 50. Atividade antimicrobiana do sabonete líquido com extrato de frutos de *S. cumini* e com triclosan sobre *Staphylococcus epidermidis*

S (Sabonete); T (Sol. de Triclosan); P (Sol. Propilenoglicol)
S.E. (Sabonete com extrato); S.T. (Sabonete com Triclosan), E (Sol. Extrato)

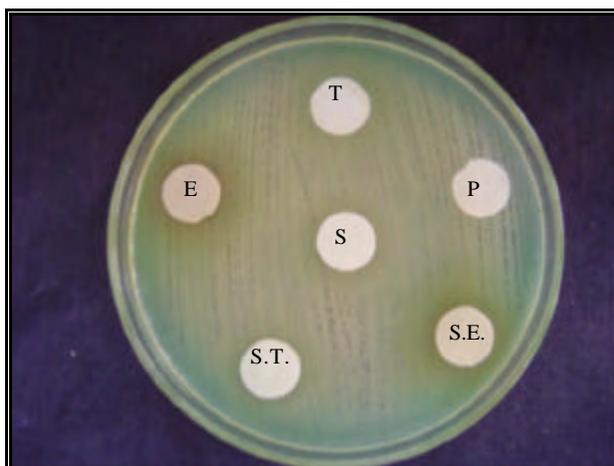


Figura 51. Atividade antimicrobiana do sabonete líquido com extrato de frutos de *S. cumini* e com triclosan sobre *Pseudomonas aeruginosa*

S (Sabonete); T (Sol. de Triclosan); P (Sol. Propilenoglicol)
S.E. (Sabonete com extrato); S.T. (Sabonete com Triclosan), E (Sol. Extrato)

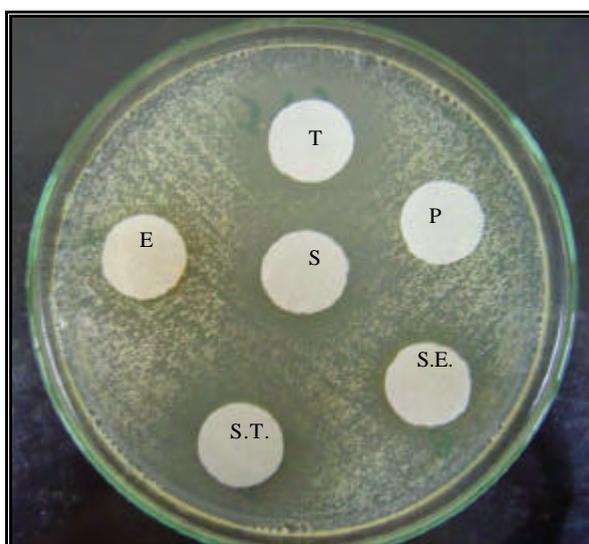


Figura 52. Atividade antimicrobiana do sabonete líquido com extrato de frutos de *S. cumini* e com triclosan sobre *Candida albicans*

S (Sabonete); T (Sol. de Triclosan); P (Sol. Propilenoglicol)
S.E. (Sabonete com extrato); S.T. (Sabonete com Triclosan), E (Sol. Extrato)



Figura 53. Atividade antimicrobiana do sabonete líquido com extrato de frutos de *S. cumini* e com triclosan sobre *Candida krusei*

S (Sabonete); T (Sol. de Triclosan); P (Sol. Propilenoglicol)

S.E. (Sabonete com extrato); S.T. (Sabonete com Triclosan), E (Sol. Extrato)

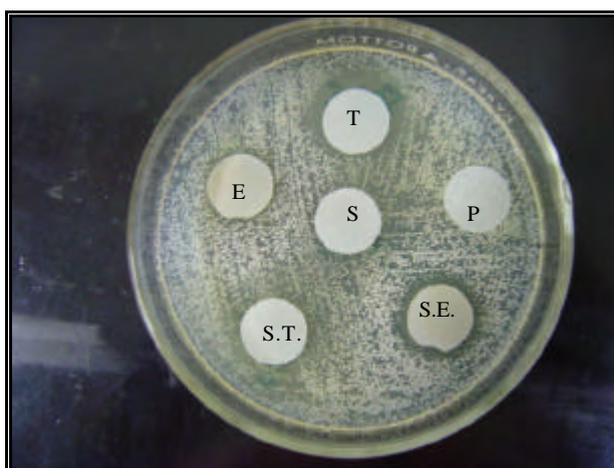


Figura 54. Atividade antimicrobiana do sabonete líquido com extrato de frutos de *S. cumini* e com triclosan sobre *Candida parapsilosis*

S (Sabonete); T (Sol. de Triclosan); P (Sol. Propilenoglicol)

S.E. (Sabonete com extrato); S.T. (Sabonete com Triclosan), E (Sol. Extrato)

A avaliação dos resultados visualizados numericamente através da Tabela 24, mostrou a melhor atividade antibacteriana do extrato frente às bactérias testadas, porém demonstrou pouca atividade frente às leveduras, demonstrando, inclusive nenhuma eficiência frente a *C. albicans*. É importante observar que este aspecto negativo, de certa forma, é contornado quando este material é incorporado ao sabonete líquido. Os resultados demonstram que o sabonete líquido contendo

extrato de jambolão apresenta atividade frente às bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, e leveduras testadas *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizou-se uma técnica padronizada seguindo as normas do NCCLS e adaptada para a aplicação do sabonete líquido contendo extrato vegetal e sabonete líquido contendo triclosan. Para isto empregaram-se as técnicas de microdiluição e a concentração bactericida e fungicida mínima (CBM/ CFM). A técnica de microdiluição, apesar de ser considerada importante para este tipo de avaliação, não permitiu realizar leituras nos ensaios tanto visuais como espectrofotométrica. Desta forma, optou-se novamente por realizar a técnica da determinação da concentração bactericida e fungicida mínima, de modo a garantir confiabilidade nas leituras realizadas.

Os resultados referentes a este ensaio estão expressos nas Tabelas 25 e 26, salientando-se que as concentrações tomadas como ponto de partida para as diluições subseqüentes e necessárias foram de 2500 µg/100 µL (2,5%) com relação ao extrato seco e 1000 µg/100 µL para o triclosan. Estas concentrações são consideradas elevadas, mas justificam-se pela necessidade de se coletar concentrações em microlitro para a realização da técnica de microdiluição. Desta forma, ao transferir 100 µL do sabonete contendo a concentração de extrato seco acima descrita, trabalhou-se com a concentração inicial de 2500 µg/100 µL e a partir dela promoveu-se as demais diluições. O mesmo procedimento foi realizado com o sabonete líquido contendo triclosan e resultou na concentração inicial de 1000 µg/100 µL.

Tabela 25. Concentração bactericida e fungicida mínima para o sabonete com extrato de frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (µg/ 100µL)						
	2500	1250	625	312,5	156,25	78,12	39,06
<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	+	+	+	+	+

+ crescimento do microrganismo; - ausência de crescimento de microrganismo

Tabela 26. Concentração bactericida e fungicida mínima para o sabonete com triclosan

Microrganismos	CONCENTRAÇÕES (µg/mL)						
	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625
<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	+	+	+	+

+ crescimento do microrganismo; - ausência de crescimento de microrganismo

As figuras 55 e 56, ilustram os resultados obtidos da CIM para bactérias e leveduras do sabonete contendo extrato vegetal de frutos de *S. cumini* e sabonete contendo o anti-séptico sintético triclosan.

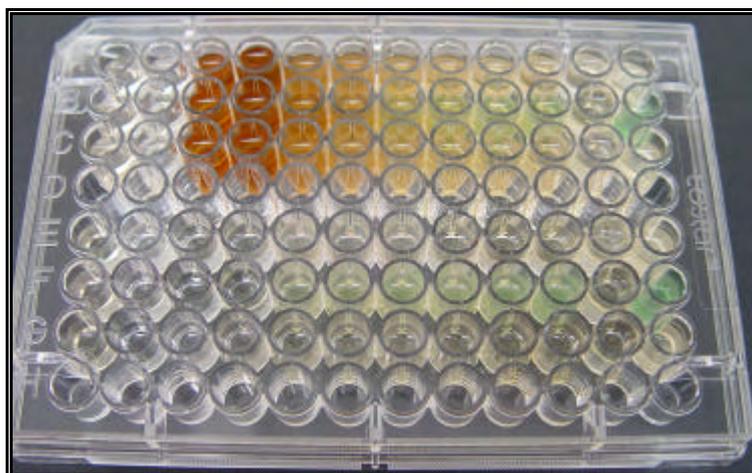


Figura 55. Concentração inibitória mínima do sabonete com extrato de frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e do sabonete com triclosan para bactérias

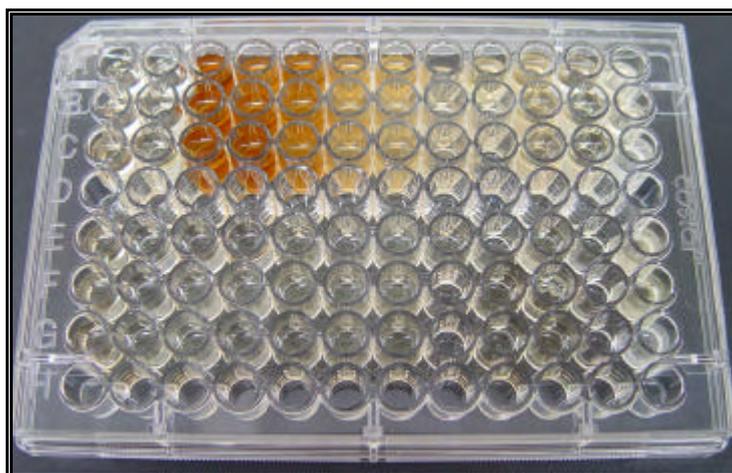


Figura 56. Concentração inibitória mínima do sabonete com extrato de frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e sabonete com triclosan para leveduras

As figuras 57 e 58 ilustram os resultados obtidos da CBM e CFM para bactérias e leveduras do sabonete contendo extrato vegetal de frutos de *S. cumini* e sabonete contendo o anti-séptico sintético triclosan.

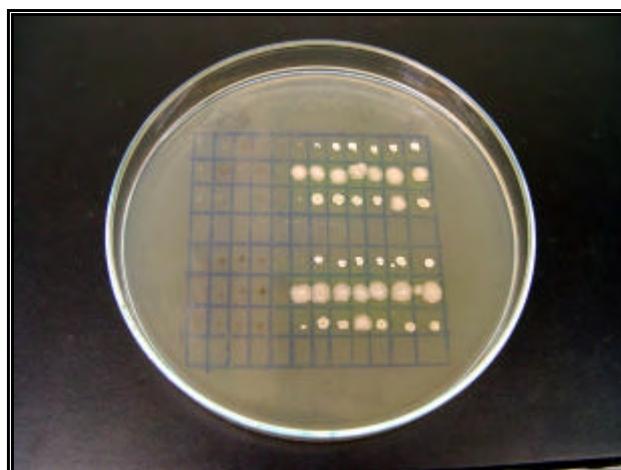


Figura 57. Concentração bactericida mínima do sabonete com extrato de frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e sabonete com triclosan

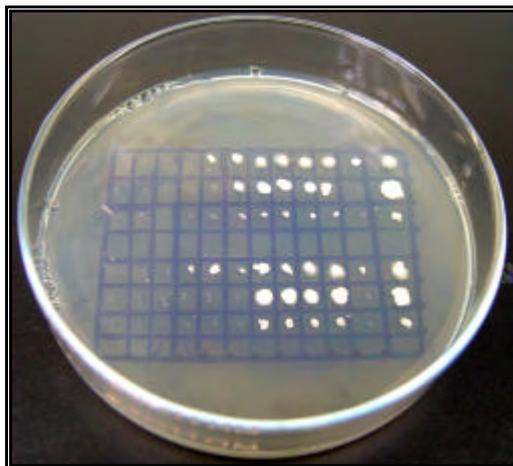


Figura 58. Concentração fungicida mínima do sabonete com extrato de frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e sabonete com triclosan

No presente trabalho comparou-se o efeito antimicrobiano do extrato de frutos de *S. cumini* (L.) Skeels na concentração de 2,5%, com o efeito antimicrobiano do triclosan na concentração de 1,0%, ambos incorporados ao sabonete líquido.

A análise dos resultados obtidos revelou que o sabonete líquido contendo extrato vegetal de frutos de *S. cumini* apresentou atividade frente às bactérias e às leveduras testadas.

A determinação da CBM para as bactérias testadas demonstrou a necessidade de concentrações mais elevadas de extrato vegetal em relação aos resultados obtidos com triclosan, porém os valores obtidos revelaram-se bastante promissores.

A diferença quantitativa do extrato de frutos de *S. cumini* (L.) Skeels necessária para um efeito similar ao triclosan, não ultrapassa a três vezes a quantidade deste último material. Tal preocupação revela-se bastante importante ao considerarem-se aspectos farmacotécnicos e tecnológicos, uma vez que, elevadas concentrações de extrato vegetal interferem em importantes características como viscosidade e capacidade espumógena, além do fator referente ao custo final da preparação que obviamente torna-se bastante atrativa ao empregar-se a menor concentração efetiva possível do material proposto.

Outro aspecto importante diz respeito à crescente necessidade de novos materiais com atividade antimicrobiana a serem empregados como anti-séptico. Tal afirmativa baseia-se no fato do aumento de resistência microbiana frente aos produtos atuais.

Ao considerar-se, porém, a CFM frente às leveduras testadas, observa-se que o sabonete líquido contendo triclosan é cinco vezes mais potente, com exceção a *C. albicans*, onde o sabonete líquido com extrato de frutos de *S. cumini* (L.) Skeels mostrou-se mais efetivo que o sabonete líquido contendo triclosan. Vale ressaltar que nos testes realizados o sabonete líquido contendo triclosan mostrou-se ineficiente no combate ao desenvolvimento desta levedura.

6. CONCLUSÕES

Seguindo as exigências da resolução ANVISA - RDC n. 48/2004 e dada a ausência de estudos de controle da qualidade, foi traçado o perfil da droga vegetal *S. cumini* (L.) Skeels, em consonância com as exigências legislativas

Condições ótimas para a extração foram obtidas empregando-se a percolação como método extrativo, e utilizando-se do etanol 50 °GL como líquido extrator.

O extrato obtido por percolação utilizando etanol 50 °GL dos frutos de *Syzygium cumini* apresentou concentração bactericida mínima de 1250 µg/100 µL para *S. aureus*, 625 µg/100 µL, para *S. epidermidis* e 2500 µg/ 100µL para *P. aeruginosa*. A concentração fungicida mínima obtida foi de 2500 µg/100 µL para as leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

A incorporação do extrato de frutos de *S. cumini* à formulação de sabonete líquido com atividade anti-séptica mostrou-se promissora em função dos resultados positivos obtidos. A formulação proposta apresentou atividade bactericida frente à *S. aureus* na concentração de 625 µg/100 µL, *S. epidermidis* na concentração de 312,5 µg/100 µL e *P. aeruginosa* na concentração de 1250 µg/100 µL. A atividade fungicida frente às leveduras citadas anteriormente necessitou de concentrações de 1250 µg/100 µL.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **J. Ethnopharmacol.**, v. 74, p. 113 - 123, 2001.

AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMAZAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v. 48, n. 4, p. 487 - 491, 2001.

ALBERTON, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L. V. S.; FRANCO, S. L. Caracterização farmacognóstica do jãbolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 11, n.1, p. 37 - 50, 2001.

ALMEIDA, A. M. F. **Análise do cariótipo eletroforético de diferentes amostras de *Cryptococcus neoformans* e correlação com suscetibilidade a drogas antifúngicas.** 2000. p. 10 - 11. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2000.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Farmacotécnica:** formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. p. 516 – 518.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, BRASIL, Leis, decretos, etc... Resolução nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da (República Federativa do Brasil)**, Brasília, março. 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, BRASIL, Leis, decretos, etc... Resolução RE nº 88, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da "Lista de referências bibliográficas para

avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos". **Diário Oficial da (República Federativa do Brasil)**, Brasília, março. 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos, Brasília, fev. 2003.

BANDEIRA, K. F. **Otimização e comparação de metodologias de extração de casearinas em *Casearia sylvestris***. 2004. p. 11 - 16. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2004.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991. v.2, p. 114 - 126.

BAUER, A. W.; KYRBY, E.; SHERRIS, E. M.; TURK, M. Antibiotic by standardized single disk method. **Am. J. Clin.**, v. 45, p. 493 - 496, 1966.

BHATIA, I. S.; BAJAJ, K. L. Chemical constituents of the seeds and bark of *Syzygium cumini*. **Planta Med.**, v. 28, p. 346 - 352, 1975.

BUELGA, C. S.; SCALBERT, A. Proantocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J. Sci. Food Agr.**, London, v. 80, p. 1094 - 1117, 2000.

CARTURAN, G. F. **Guia ABC de microbiologia**: controle microbiológico na indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. 2.ed. São Paulo: ABC, 1999. p. 39 - 58.

CESTARI, I. M. **Desenvolvimento de prestação emulsiva, contendo óleo essencial de *Tagetes minuta* para tratamento da pediculose (*Pediculus capilis*)**. 2002. f. 42 - 43. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2002.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolana* seeds. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, p. 105 – 108, 2004.

CLARKE, G. M.; KEMPSON, R. E. **Introduction to the design & analysis of experiments**. London: Arnold, 1997. p. 344.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4. ed. Lisboa: Fund. Calouste Gulbenkian, v. II, 1994. p. 1038 – 1042, 1057 – 1063.

DAMASCENO, D. C.; LIMA, P. H. O.; GALHIANE, M. S.; VOLPATO, G. T.; RUDGE, M. V. C. Avaliação do efeito hipoglicemiante da saponina extraída de sementes de *Eugenia jambolana* Lam. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 4, n. 2, p. 46 - 54, 2002.

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

DÄR, A. **Tecnologia farmacêutica**. Zaragoza: Acribia, 1981. p. 141 – 142, 144 – 152, 366.

DEVIENNE, K. F. **Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides***. 2000, p. 2 - 15. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2000.

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

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

FAOAGALI, J.; FONG, J.; GEORGE, N.; MAHONEY, P.; O'ROURKE, V. Comparison of the immediate, residual, and cumulative antibacterial effects of Novaderm R, Novascrub R, Betadine Surgical Scrub, Hibiclens, and liquid soap. **Am. J. Infect. Control**, v. 26, n. 6, p. 337 - 343, 1995.

Farmacopéia Brasileira. 2. ed., São Paulo: Siqueira, 1959.

Farmacopéia Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

Farmacopéia Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

Farmacopéia Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FRANCO, S. L. **Própolis:** otimização do processo extrativo, desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade e produção de forma farmacêutica sólida. 2001. p. 41. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2001.

GALINA, K. J. *Guazuma ulmifolia* Lam., **Sterculiaceae:** estudo botânico, químico e microbiológico. 2003. p. 20 - 21,27 - 32, 35 - 37, 58, 61. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, 2003.

GALLOWAY, D. F. **The biological significance of tannins:** an overview. In: HEMINGWAY, R. W.; KARCHESY, J. J. Chemistry and significance of condensed tannins. New York: Plenum Press, 1989. p. 447.

GARCIA, C. G.; POLO, A. S.; IHA, N. Y. M. Photoelectrochemical solar cell using extract of *Eugenia jambolana* Lam as a natural sensitizer. **Annals Braz. Acad. Sci.**, v. 75, n. 2, p. 163 - 165, 2003.

GÊNERO Syzygium. Disponível em: www.arbolesornamentales.com/Myrtaceae.htm. Acesso em: 17 fev. 2005.

GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung- 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 123, p. 1979 - 1987, 1983.

GROVER, J. K.; VATS, V.; RATHI, S. S.; DAWAR, R. Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 233 - 238, 2001.

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **J. Ethnopharmacol.**, v.81, p. 81 - 100, 2002.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed. London: Chapman and Hill, 1998. 288 p.

HASLAM, E.; HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The flavonoids, chapman and hall**, London, v. 9, 1975, p. 505-560.

HASLAM, E.; LILLEY, T. H.; YA, C.; GAFFNEY, S. H.; SPENCER, C. M.; MARTÍN, R.; MAGNOLATO, D. Some observations on the role of plant polyphenols in tradicional herbal medicines. **Farmac. Tijdschrift voor Belgie** (Brussels), v. 66, p. 21, 1989.

HASWELL, S. J. **Practical guide to chemometrics**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 324.

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

JAMBOLÃO. Disponível em:
www.vivernatural.com.br/arvore/informa/medicinas_jambolao.htm. Acesso em 07 dez. 2003.

JAWETZ, E **Microbiologia médica**. 21.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 142 - 143.

KABARA, J. J. **Cosmetic and drug preservation**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 700 - 701.

KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 3 – 8, 14.

KOKOSKA, L.; POLESNY, Z.; RADA, V.; NEPOVIM, A.; VANEK, T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 82, p. 51 – 53, 2002.

KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; LATTÉ, K. P.; FERREIRA, D. Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using the microdilution broth method. **Planta Med.**, n. 65, p. 444 – 446, 1999.

LIMA, E. O.; GUERRA, M. F. L.; SILVA, M. G. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). **Rev. Bras. Farm.**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 3/4, p. 95 - 97, 2000.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J. Ethnopharmacol.**, v. 49, p. 57 -68, 1995.

LUNDMARK, L. The evolution of liquid soap. **Cosmetics & Toiletries**, v.107, p. 49-53, 1992.

MACHADO, A.; FERRAZ, A. A. B.; FERRAZ, E.; ARRUDA, E., NOBRE, J.; KONKEWICZ, L. R.; PIMENTEL, M. L.; LEÃO, M. T. C.; TRABASSO, P.; GRIMBAUM, R. S. B.; RODRIGUES, E. A. C. Prevenção da Infecção Hospitalar. **Soc. Bras. Infectol.**, agost, 2001.

MACHADO, J. O.; SANTOS, E.; LEFEVRE, A. F. V. Atividade antibacteriana de extratos de *Bidens pilosa* L. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.10, p. 55 - 62, 1988.

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

MAKKAR, H. P. S.; GAMBLE, G.; BECKER, K. Limitation of the butanol-hydrochloric acid-iron assay for bound condensed tannins. **Food Chem.**, v. 66, p. 129 - 133, 1999.

MASIKA, R. J.; AFOLAYAN, A. J. Antimicrobial activity of some plants used for treatment of levestock disease in the Eastern Cape, South Africa. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, n. 1 - 2, p 129 - 134, 2002.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; DEMING, S. N.; MICHOTTE, Y.; KAUFMAN, L. **Chemometrics: a textbook**. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 255 - 291.

MCDENNELL, G.; HAINES, K.; KLEIN, D.; RIPPEN, M.; WALMSLEY, R. Clinical correlation of a skin antiseptis model. **J. Microbiol. Method.**, v.35, p. 31 - 35, 1999.

MCMURRY, L. M.; OETHINGER, M.; LEVY, S. B. Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.166, p. 305 - 309, 1998.

MEADE, M. J.; WADDELL, R. L.; CALLAHAN, T. M. Soil bacteria *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *Denitrificans* inactivate triclosan in liquid and solid substrates. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 204, p. 45-48, 2001.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2003. p. 615 - 656.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farm. Bonaerense**,v. 19, n. 3, p. 211 - 215, 2000.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 11, n.1, p. 21 - 35, 2001.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Probe, 1999. 116 p.

MIMS, C. **Microbiologia médica**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1999. 313 p.

MORGANTI, P. Natural soap and syndet bars. **Cosmetics & Toiletries**, v.110, p. 89 – 97, nov., 1995.

MORTON, J. Jambolan. IN: --- Fruit of warm climates. Miami, 1987, p. 375 – 378. Disponível em <http://newcrop.hort.purdue.edu/newcrop/morton/jambolan.html>. Acesso em 17 fev. 2005.

MOSS, T.; HOWES, D.; WILLIAMS, F. M. Percutaneous penetration and dermal metabolism of triclosan (2,4,4-trichloro-2-hydroxydiphenyl ether). **Food Chem. Toxicol.**, v.38, p. 361 -370, 2000.

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. **J. Ethnopharmacol**, v. 60, p. 85 - 89, 1998.

MURRAY, P. R.; BARRON, E. J.; PFALLER, M. A.; TECNOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 8 ed. Washington: ASM, 2003. p.1102 - 1106.

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

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 2000.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard, 1997. M27-A.

NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos na ciência e na indústria.** Campinas: Unicamp, 2001. p. 01 – 198.

NISSEN, H. P.; OCHS, D. Triclosan an antimicrobial active ingredient with anti-inflammatory activity. **Cosmetic & Toiletries**, v. 113, p. 61 - 64, 1998.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 67 - 139.

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

ORTH, D. S. Microbiologia da pele. **Cosmetics & Toiletries**, v. 2, p. 26 – 31, jul./ago., 1990.

ORTH, D. S.; KABARA, J. J. Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs. **Cosmetics & Toiletries**, v.113, n.4, p. 51 - 58, 1998.

OS EXTRATOS vegetais: história, noções e novidades. **Cosméticos e Perfumes**, n. 21, p. 28 – 36, out./nov., 2002.

PELCZAR Jr, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia.** 2. ed. São Paulo: Mc Graw Hill do Brasil, 1997. v. 1, p. 212 – 220, 566.

PENNA, M. **Notas sobre plantas brasileiras.** 2. ed. Rio de Janeiro: Araújo Penna & Cia, 1930. p. 439 – 440.

PEPATO, M. T.; FOLGADO, V. B. B.; KETTELHUT, I. C.; BRUNETTI, I. L. Lack of antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 34, n. 3, p. 389 – 395, mar., 2001.

PINTO, P. A. **Noções de botânica aplicada à farmácia.** 4 ed. Rio de Janeiro: Científica, [1956?]. p. 148 - 149.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 81 - 98, 261 - 280.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica.** 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. I, 1996. p. 1113 – 1115, 1127.

PRUNIERAS, M. **Manual de cosmetologia dermatológica.** 2. ed. São Paulo: Organização Andrei, 1994, p. 31 - 43.

ROCHA FILHO, P. A. Fitocosméticos. **Cosmetic & Toiletries**, v.7, p. 18 - 20, mar./abr., 1995.

ROSS, I. A. **Medicinal plants of the world:** Chemical constituents, traditional and modern uses. Totowa: Human, 1999. p. 283 - 289.

SANCHES, A. C. C. **Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos.**

2004. p. 61 – 63, 167 - 168. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2004.

SANTOS, P. R. V.; OLIVEIRA, A. C. X.; TOMASSINI, T. C. B. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. **Rev. Farm. Bioquím. Universidade de São Paulo**, v.31, n.1, p. 35 -38, jan./jun, 1995.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochem.**, v. 30, n. 12, p. 1875 – 1883, 1991.

SCHAPOVAL, E. E. S.; ALICE, C. B.; ZUANAZZI, J. A.; SILVA, G. A. A. B.; HENRIQUES, A. T. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de *Syzygium cumini*. **Rev. Port. Farm.**, v. 28, n. 4, p. 55 - 57, 1988.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia racional**: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. Barueri: Manole, 2002, p. 05 - 08.

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

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2003. p. 232 - 235, 263 - 288, 289 - 319.

SOARES, L. A. L.; GONZÁLEZ, O. G.; PETROVICK, P. R.; BASANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. **Cad. Farm.**, v. 14, n. ½, p. 21-26, 1998.

SOULIMANI, R.; YOUNO, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnate* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **J. Ethnopharmacol.**, v. 57, n. 1, p. 11 – 20, 1997.

SWEETMAN, S. C. **MARTINDALE: the complete drug reference**. 33th ed. London: The Pharmaceutical Press, 2002. 1159p.

TAVARES, W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: __. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 115 - 120.

TEIXEIRA, P. C. **Do herbalismo tribal aos remédios florais do Dr. Bach**. São José do Rio Preto: São José, 1994. 33 p.

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

TOLEDO, C. E. M. **Estudos anatômico, químico e biológico das cascas e extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae.** 2002. p. 2 - 28. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999. p. 81 – 82.

United States Pharmacopeia. 26th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convection, 2003. p. 1877-1879, 2380.

VIGLIOGLIA, P. A.; RUBIN, J. **Cosmiatria II.** Buenos Aires: AP Am. de Publ. S.A, 1989. p. 22 – 37.

VILA, R.; MUNDINA, M.; TOMI, F.; FURLAN, R.; ZACCHINO, S.; CASANOVA, J.; CANIGUERAL, S. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. **Planta Med.**, v. 68, n. 2, p. 164 – 167, feb, 2002.

VILEGAS, W. **Fitoquímica de plantas brasileiras.** 1998. 109 f. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 1998.

VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. **Tratado de tecnologia farmacêutica.** Zaragoza: Acribia, 1982. p. 496 – 513, 769.

VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes Mellitus. **Rev. Bras Plantas Med.**, v.4, n. 2, p. 35 - 42, 2002.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Harry's cosmetology**. 7. ed. New York: Chemical Publ., 1982. p. 1 – 16, 92 – 110, 653 – 674.

WOLF, R.; WOLF, D.; TÜZÜN,B.; TÜZÜN,Y. Soaps, shampoos, and detergents. **Clin. Dermatol.**, v. 19, p. 393 - 397, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regional office for the western pacific research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. Manila, 1998.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. **Rev. Racine**, v. 43, p. 50 - 51, 1998.

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

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 2nd ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984. p. 162 – 184.

ZAUPA, C.; CARRASCHI, L.; SILVA, E. A.; CHANCKE, A L. S.; USHIROBIRA, T. M. A.; MARQUES, L. C. Controle de qualidade farmacobotânico e legal de fitoterápicos comercializados nas farmácias de Maringá (PR). **Rev. Racine**, v.58, p. 32 – 37, set./Out. 2000.

ZHOU, J.; SAKR, A.; LICHTIN, J. L. Triclosan em desodorantes comerciais. **Cosmetics & Toiletries**, v. 5, p. 44 – 48, mai/ jun, 1993.

ANEXO 1

Tabela 27: Determinação em triplicata do resíduo seco, média dos resultados e desvio padrão do extrato de frutos de *S. cumini* utilizando planejamento experimental completo

ORDEM PADRÃO	ORDEM EXECUÇÃO	PROCESSO	SOLVENTE	RESULTADO (g)			MÉDIA DOS RESULTADOS	DESVIO PADRÃO
				1	2	3		
1	19	1	1	0,7561	0,7415	0,7412	0,7463	0,0085
2	1	1	2	0,6893	0,6652	0,6626	0,6724	0,0147
3	12	1	3	0,4950	0,4916	0,5020	0,4962	0,0053
4	32	2	1	0,8165	0,8098	0,8021	0,8095	0,0072
5	4	2	2	0,7289	0,7662	0,7196	0,7382	0,0247
6	22	2	3	0,5399	0,5528	0,5474	0,5467	0,0065
7	35	3	1	0,7666	0,7502	0,7571	0,7580	0,0082
8	18	3	2	0,7493	0,6759	0,6760	0,7004	0,0423
9	20	3	3	0,4990	0,5140	0,5060	0,5063	0,0075
10	25	4	1	0,9560	0,9771	0,9760	0,9697	0,0119
11	8	4	2	0,8496	0,8511	0,8437	0,8481	0,0039
12	14	4	3	0,6063	0,6059	0,6212	0,6111	0,0087
13	13	1	1	0,7556	0,7555	0,7574	0,7562	0,0011
14	34	1	2	0,7054	0,6970	0,7150	0,7058	0,0090
15	36	1	3	0,5374	0,5343	0,5461	0,5393	0,0061
16	24	2	1	0,8369	0,8214	0,8175	0,8253	0,0103
17	17	2	2	0,7507	0,7390	0,7425	0,7441	0,0060
18	5	2	3	0,5420	0,5452	0,5477	0,5450	0,0029
19	23	3	1	0,7398	0,7539	0,7632	0,7523	0,0118
20	10	3	2	0,6502	0,6703	0,6756	0,6654	0,0134
21	6	3	3	0,4876	0,5164	0,4967	0,5002	0,0147
22	7	4	1	0,7985	0,7924	0,7962	0,7957	0,0031
23	3	4	2	0,8251	0,8519	0,8129	0,8300	0,0200
24	31	4	3	0,6008	0,6225	0,6448	0,6227	0,0220
25	33	1	1	0,7579	0,7626	0,7663	0,7623	0,0042
26	11	1	2	0,6301	0,6127	0,6460	0,6296	0,0167
27	26	1	3	0,4814	0,4859	0,4841	0,4838	0,0023
28	2	2	1	0,8276	0,8203	0,8072	0,8184	0,0103
29	29	2	2	0,7296	0,7297	0,7486	0,7360	0,0109
30	28	2	3	0,5302	0,5352	0,5339	0,5331	0,0026
31	15	3	1	0,8060	0,7338	0,7435	0,7611	0,0392
32	9	3	2	0,7326	0,6836	0,7181	0,7114	0,0252
33	27	3	3	0,5508	0,5160	0,5647	0,5438	0,0251
34	30	4	1	0,7631	0,7621	0,7645	0,7632	0,0012
35	16	4	2	0,8980	0,9171	0,9050	0,9067	0,0097
36	21	4	3	0,6013	0,6075	0,6083	0,6057	0,0038

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FONTE DE VARIÂNCIA	GRAU DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	VALOR DO TESTE F	VALOR DA PROBABILIDADE
FATOR	2	0,0002	0,0001	0,01	0,993
ERRO	105	1,6727	0,0159		
TOTAL	107	1,6729			

NIVEL	NÚMERO DE ENSAIOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
RESULTADO 1	36	0,6942	0,1285
RESULTADO 2	36	0,6908	0,1274
RESULTADO 3	36	0,6934	0,1227

MÉDIA DO DESVIO PADRÃO = 0,1262

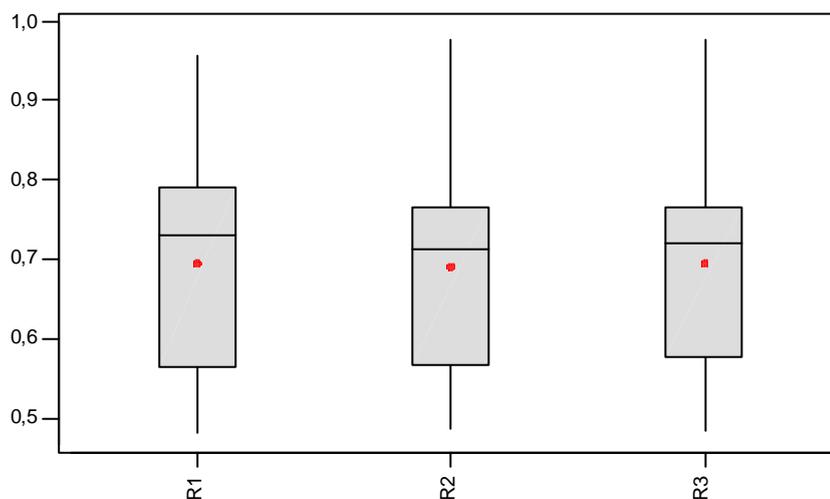


Figura 59: Média dos resultados do resíduo seco obtido em relação ao processo extrativo e solvente realizado em triplicata

ANEXO 2

Tabela 28: Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição, média dos resultados e desvio padrão produzido pela presença do extrato de fruto de *S. cumini* sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*, utilizando planejamento experimental completo

ORDEM PADRÃO	ORDEM EXECUÇÃO	PROCESSO	SOLVENTE	RESULTADO (g)			MÉDIA DOS RESULTADOS	DESVIO PADRÃO
				1	2	3		
1	19	1	1	4,9	4,4	4,3	4,51	0,31
2	1	1	2	3,9	3,8	3,8	3,81	0,07
3	12	1	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
4	32	2	1	3,6	3,6	3,8	3,66	0,09
5	4	2	2	3,7	3,8	3,4	3,63	0,23
6	22	2	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
7	35	3	1	4,7	4,4	4,6	4,55	0,13
8	18	3	2	3,2	3,0	3,3	3,13	0,17
9	20	3	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
10	25	4	1	4,2	4,8	4,4	4,48	0,33
11	8	4	2	3,3	3,2	3,5	3,34	0,12
12	14	4	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
13	13	1	1	2,8	2,9	3,0	2,88	0,12
14	34	1	2	3,3	3,9	3,5	3,56	0,31
15	36	1	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
16	24	2	1	3,4	3,2	3,3	3,28	0,12
17	17	2	2	3,6	3,8	2,8	3,73	0,11
18	5	2	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
19	23	3	1	2,9	2,1	2,3	3,06	0,22
20	10	3	2	3,4	3,1	3,0	3,14	0,20
21	6	3	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
22	7	4	1	3,6	3,7	3,6	3,65	0,08
23	3	4	2	3,2	3,6	3,2	3,32	0,22
24	31	4	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
25	33	1	1	3,6	3,9	4,1	3,85	0,30
26	11	1	2	3,7	3,5	3,8	3,66	0,14
27	26	1	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
28	2	2	1	4,1	4,4	4,8	4,43	0,35
29	29	2	2	3,2	2,9	2,5	2,85	0,34
30	28	2	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
31	15	3	1	3,6	4,0	3,7	3,75	0,19
32	9	3	2	3,7	4,0	3,6	3,74	0,20
33	27	3	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
34	30	4	1	4,2	5,2	5,2	4,87	0,55
35	16	4	2	3,5	3,7	3,6	3,58	0,11
36	21	4	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FONTE DE VARIÂNCIA	GRAUDE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	VALOR DO TESTE F	VALOR DA PROBABILIDADE
FATOR	2	0,11	0,06	0,02	0,983
ERRO	105	349,43	3,33		
TOTAL	107	349,54			

NIVEL	NÚMERO DE ENSAIOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
RESULTADO 1	36	2,415	1,780
RESULTADO 2	36	2,492	1,855
RESULTADO 3	36	2,466	1,836

MÉDIA DO DESVIO PADRÃO = 1,824

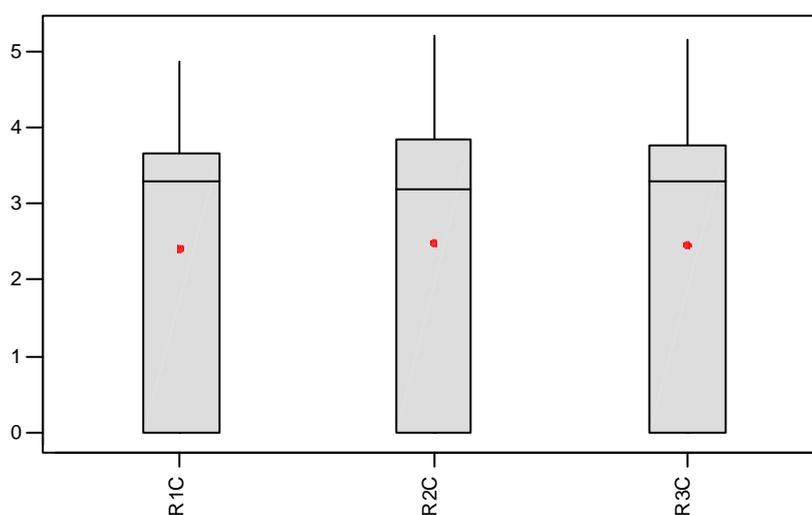


Figura 60: Média dos resultados da atividade antimicrobiana frente à *S. aureus* obtido em relação ao processo extrativo e solvente realizado em triplicata

ANEXO 3

Tabela 29: Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição, média dos resultados e desvio padrão produzido pela presença do extrato de fruto de *S. cumini* sobre o crescimento de *Staphylococcus epidermidis*, utilizando planejamento experimental completo

ORDEM PADRÃO	ORDEM EXECUÇÃO	PROCESSO	SOLVENTE	RESULTADO (g)			MÉDIA DOS RESULTADOS	DESVIO PADRÃO
				1	2	3		
1	19	1	1	4,8	4,8	4,1	4,55	0,36
2	1	1	2	4,6	4,5	4,6	4,54	0,03
3	12	1	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
4	32	2	1	3,7	3,6	3,9	3,71	0,17
5	4	2	2	3,3	3,1	3,5	3,29	0,18
6	22	2	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
7	35	3	1	5,7	5,9	5,8	5,78	0,09
8	18	3	2	4,9	4,7	4,6	4,74	0,12
9	20	3	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
10	25	4	1	6,2	4,8	4,9	5,29	0,75
11	8	4	2	5,7	5,4	6,0	5,73	0,31
12	14	4	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
13	13	1	1	6,0	5,7	5,3	5,66	0,35
14	34	1	2	4,4	3,2	4,3	3,95	0,63
15	36	1	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
16	24	2	1	6,5	5,8	6,7	6,35	0,48
17	17	2	2	3,6	3,1	3,6	3,42	0,30
18	5	2	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
19	23	3	1	6,2	5,2	6,5	5,96	0,68
20	10	3	2	3,2	4,2	3,3	3,55	0,59
21	6	3	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
22	7	4	1	5,0	5,1	5,7	5,27	0,38
23	3	4	2	4,4	4,0	4,1	4,16	0,21
24	31	4	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
25	33	1	1	5,5	6,0	5,5	5,63	0,29
26	11	1	2	4,3	4,9	4,6	4,57	0,30
27	26	1	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
28	2	2	1	6,4	5,2	5,8	5,80	0,58
29	29	2	2	3,5	3,4	3,2	3,36	0,17
30	28	2	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
31	15	3	1	5,0	4,6	4,8	4,78	0,20
32	9	3	2	5,4	5,4	6,1	5,63	0,41
33	27	3	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
34	30	4	1	6,4	6,1	6,3	6,26	0,17
35	16	4	2	4,4	4,2	4,6	4,40	0,24
36	21	4	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FONTE DE VARIÂNCIA	GRAU DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	VALOR DO TESTE F	VALOR DA PROBABILIDADE
FATOR	2	0,54	0,27	0,04	0,957
ERRO	105	636,12	6,06		
TOTAL	107	636,66			

NIVEL	NÚMERO DE ENSAIOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
RESULTADO 1	36	3,298	2,515
RESULTADO 2	36	3,135	2,372
RESULTADO 3	36	3,265	2,494

MÉDIA DO DESVIO PADRÃO = 2,461

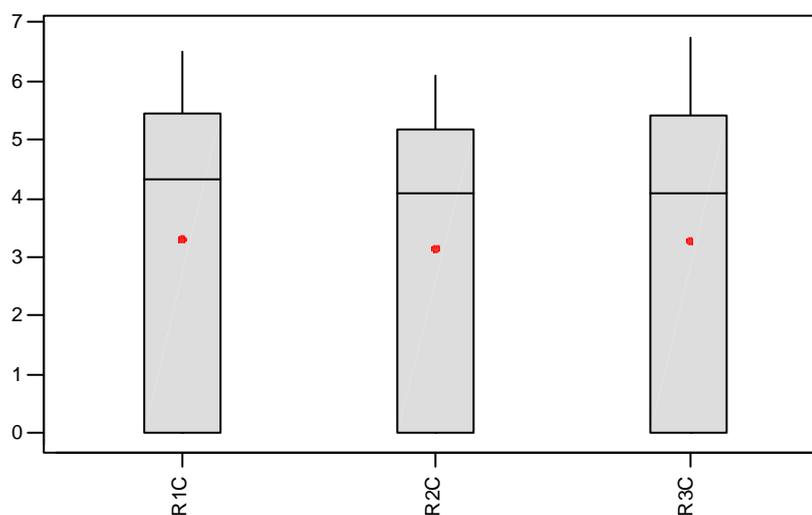


Figura 61: Média dos resultados da atividade antimicrobiana frente à *S. epidermidis* obtido em relação ao processo extrativo e solvente realizado em triplicata

ANEXO 4

Tabela 30: Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição, média dos resultados e desvio padrão produzido pela presença do extrato de fruto de *S. cumini* sobre o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando planejamento experimental completo

ORDEM PADRÃO	ORDEM EXECUÇÃO	PROCESSO	SOLVENTE	RESULTADO (g)			MÉDIA DOS RESULTADOS	DESVIO PADRÃO
				1	2	3		
1	19	1	1	3,9	3,7	3,5	3,70	0,21
2	1	1	2	3,7	3,6	3,6	3,62	0,06
3	12	1	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
4	32	2	1	3,1	3,2	3,2	3,16	0,08
5	4	2	2	3,4	3,2	3,4	3,32	0,11
6	22	2	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
7	35	3	1	4,2	0,0	3,9	2,72	2,36
8	18	3	2	2,8	2,7	3,0	2,83	0,13
9	20	3	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
10	25	4	1	2,3	3,0	2,9	2,76	0,36
11	8	4	2	3,8	3,8	3,0	3,51	0,47
12	14	4	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
13	13	1	1	3,6	3,4	3,6	3,52	0,09
14	34	1	2	3,0	3,1	3,3	3,12	0,14
15	36	1	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
16	24	2	1	3,6	3,2	3,4	3,41	0,20
17	17	2	2	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
18	5	2	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
19	23	3	1	3,3	2,9	3,0	3,06	0,18
20	10	3	2	3,5	3,1	3,1	3,24	0,22
21	6	3	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
22	7	4	1	3,4	2,1	3,1	3,17	0,17
23	3	4	2	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
24	31	4	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
25	33	1	1	2,9	0,0	0,0	0,97	1,67
26	11	1	2	3,0	3,4	3,4	3,27	0,21
27	26	1	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
28	2	2	1	3,7	3,5	3,3	3,48	0,20
29	29	2	2	3,5	0,0	0,0	1,17	2,03
30	28	2	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
31	15	3	1	3,6	3,7	3,7	3,64	0,07
32	9	3	2	3,8	3,4	3,3	3,53	0,27
33	27	3	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
34	30	4	1	3,6	3,6	3,2	3,47	0,21
35	16	4	2	3,4	3,0	3,2	3,17	0,20
36	21	4	3	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FONTE DE VARIÂNCIA	GRAU DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	VALOR DO TESTE F	VALOR DA PROBABILIDADE
FATOR	2	2,36	1,18	0,41	0,663
ERRO	105	300,07	2,86		
TOTAL	107	302,43			

NIVEL	NÚMERO DE ENSAIOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
RESULTADO 1	36	2,085	1,718
RESULTADO 2	36	1,733	1,677
RESULTADO 3	36	1,835	1,676

MÉDIA DO DESVIO PADRÃO = 1,691

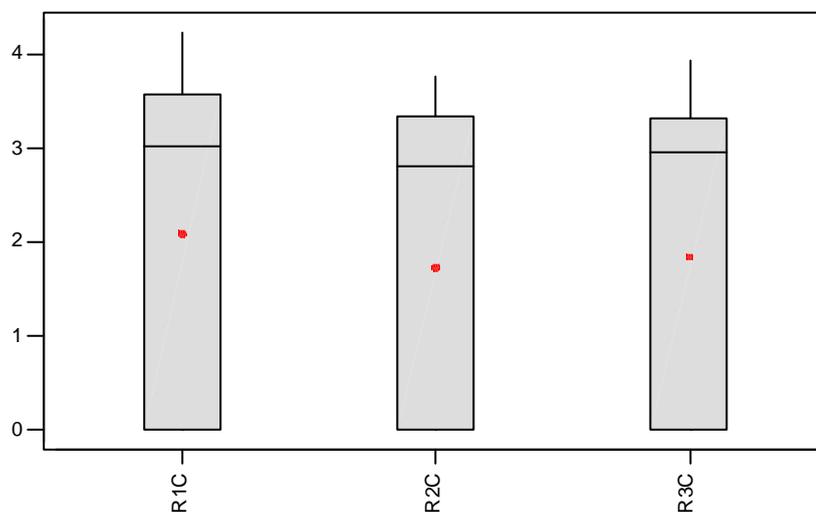


Figura 62: Média dos resultados da atividade antimicrobiana frente à *P. aeruginosa* obtido em relação ao processo extrativo e solvente realizado em triplicata

ANEXO 5

Tabela 31: Determinação da atividade antimicrobiana pela medida do halo de inibição, média dos resultados e desvio padrão produzido pela presença do extrato de fruto de *S. cumini* sobre o crescimento de *Candida krusei*, utilizando planejamento experimental completo

ORDEM PADRÃO	ORDEM EXECUÇÃO	PROCESSO	SOLVENTE	RESULTADO (g)			MÉDIA DOS RESULTADOS	DESVIO PADRÃO
				1	2	3		
1	19	1	1	3,9	3,7	3,5	3,3	1,53
2	1	1	2	3,7	3,6	3,6	4,7	0,58
3	12	1	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
4	32	2	1	3,1	3,2	3,2	4,0	1,00
5	4	2	2	3,4	3,2	3,4	4,0	1,00
6	22	2	3	0,0	0,0	0,0	0,0	2,31
7	35	3	1	4,2	0,0	3,9	4,3	2,52
8	18	3	2	2,8	2,7	3,0	3,7	0,58
9	20	3	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
10	25	4	1	2,3	3,0	2,9	3,0	1,00
11	8	4	2	3,8	3,8	3,0	4,0	2,08
12	14	4	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
13	13	1	1	3,6	3,4	3,6	3,0	0,00
14	34	1	2	3,0	3,1	3,3	4,0	1,00
15	36	1	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
16	24	2	1	3,6	3,2	3,4	0,0	0,00
17	17	2	2	0,0	0,0	0,0	4,3	0,58
18	5	2	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
19	23	3	1	3,3	2,9	3,0	4,3	1,15
20	10	3	2	3,5	3,1	3,1	0,0	0,00
21	6	3	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
22	7	4	1	3,4	2,1	3,1	4,3	0,58
23	3	4	2	0,0	0,0	0,0	2,7	0,58
24	31	4	3	0,0	0,0	0,0	2,3	1,73
25	33	1	1	2,9	0,0	0,0	3,7	0,58
26	11	1	2	3,0	3,4	3,4	5,0	0,00
27	26	1	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
28	2	2	1	3,7	3,5	3,3	4,0	0,00
29	29	2	2	3,5	0,0	0,0	4,3	0,58
30	28	2	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
31	15	3	1	3,6	3,7	3,7	3,3	0,58
32	9	3	2	3,8	3,4	3,3	4,3	0,58
33	27	3	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
34	30	4	1	3,6	3,6	3,2	4,0	1,00
35	16	4	2	3,4	3,0	3,2	3,7	0,58
36	21	4	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FONTE DE VARIÂNCIA	GRAU DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	VALOR DO TESTE F	VALOR DA PROBABILIDADE
FATOR	2	0,35	1,18	0,04	0,957
ERRO	105	424,42	4,04		
TOTAL	107	424,77			

NIVEL	NÚMERO DE ENSAIOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
RESULTADO 1	36	2,389	2,060
RESULTADO 2	36	2,528	2,021
RESULTADO 3	36	2,444	1,949

MÉDIA DO DESVIO PADRÃO = 2,010

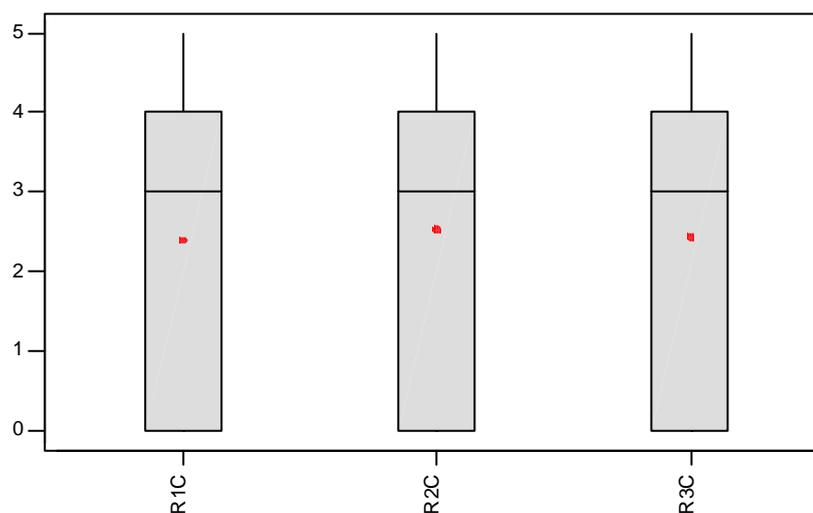


Figura 63: Média dos resultados da atividade antimicrobiana frente à *C. krusei* obtido em relação ao processo extrativo e solvente realizado em triplicata