

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE
PREPARAÇÕES COSMÉTICAS CONTENDO O EXTRATO
DE FOLHAS DE *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (MYRTACEAE)
E DE CASCA DE *Stryphnodendron adstringens* (Mart.)
Coville (LEGUMINOSAE-MIMOSOIDAE)**

TATIANA MARIA DE SOUZA

ARARAQUARA – SP

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE PREPARAÇÕES COSMÉTICAS
CONTENDO O EXTRATO DE FOLHAS DE *Myrciaria cauliflora* O. Berg.
(MYRTACEAE) E DE CASCA DE *Stryphnodendron adstringens* (Mart.)
Coville (LEGUMINOSAE-MIMOSOIDAE)**

TATIANA MARIA DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

ARARAQUARA – SP
2007

Ficha Catalográfica

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

S729e Souza, Tatiana Maria de
Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (Myrtaceae) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). / Tatiana Maria de Souza. – Araraquara, 2007
171 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

1.Myrciaria cauliflora. 2.Stryphnodendron adstringens. 3.Preparações cosméticas. 4.Atividade antimicrobiana. I.Pietro, Rosemeire Cristina L. R., orient. .II. Título.

CDD: 660.6

CAPES:40300005

TERMO DE APROVAÇÃO

TATIANA MARIA DE SOUZA

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE PREPARAÇÕES COSMÉTICAS
CONTENDO O EXTRATO DE FOLHAS DE *Myrciaria cauliflora* O. Berg.
(MYRTACEAE) E DE CASCA DE *Stryphnodendron adstringens* (Mart.)
Coville (LEGUMINOSAE-MIMOSOIDAE)**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara –
SP

Profa. Dra. Ana Lucia da Costa Darini

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP – Ribeirão Preto –
SP

Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara –
SP

Araraquara, 08 de fevereiro de 2007

A Deus e sua corte pelo seu Amor sempre presente e visível das mais diversas formas.

“Com muito custo, podemos conhecer o que está na terra e com dificuldade encontramos o que está ao alcance da mão. Mas quem poderá investigar o que está no céu?” (Sabedoria, 9)

À minha família por sua confiança, apoio e incentivo incondicionais.

“Filho meu, ouve a instrução de teu pai, e não deixes o ensino de tua mãe. Porque eles serão uma grinalda de graça para a tua cabeça, e colares para o teu pescoço.”(Provérbios, 1; 8-9)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro por ter me guiado por caminhos que a princípio pareciam intransponíveis, mas que na sua companhia puderam servir de ponte para a aquisição contínua do conhecimento.

À Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac por ter me encaminhado no caminho da pesquisa desde o começo da minha faculdade e pelo apoio antes e durante o Mestrado.

À Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira pela amizade e pelo apoio durante o Mestrado.

À Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado por ceder o Laboratório de Controle de Qualidade para alguns experimentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Victor Silva do Sacramento pelo companheirismo e pela ajuda em tantos experimentos.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Côrrea pelas valiosas dicas.

Aos funcionários e amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Luís Eduardo, Osmar, Fátima, Angélica, Margarethi e Pedro.

Ao Laboratório de Química Orgânica do Prof. Dr. Wagner Vilegas pelo apoio aos estudos fitoquímicos.

Ao laboratório de Microbiologia da Profa. Dra. Clarice Queico pelo apoio aos estudos de citotoxicidade.

Aos meus amigos de laboratório, Emerson, Viviana, Estêvão e Mariana que tanta paciência tiveram e incontáveis vezes me ajudaram.

Ao Célio (Haishu), por ter me acompanhado em tantos experimentos.

Às minhas amigas e família de Araraquara, Juliana, Silvia e Tamara: gostaria que soubessem o quanto foram e são importante na minha vida.

Ao meu pai e à Angélica (Tatoo) por terem me acompanhado de um lugar tão especial.

À D. Maria de Lourdes e toda a família Droga Nova, de Américo Brasiliense, por terem me dado muito mais do que a experiência do meu primeiro trabalho.

À Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À CAPES, pela bolsa concedida.

“Ama-se o que se conquista com esforço.”

Aristóteles (384 - 322 a.C)

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABELAS.....	7
ABREVIATURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1. <i>Myrciaria cauliflora</i> O. Berg. (Myrtaceae)	24
2.2. <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae)	25
2.3. Considerações	30
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo Geral.....	33
3.2. Objetivos Específicos	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. MATERIAL	35
4.1.1. Solventes, reagentes e meios de cultura	35
4.1.2. Material vegetal	37
4.1.3. Cepas padrão	37
4.1.5. Equipamentos	38

4.2. METODOLOGIAS.....	39
4.2.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	39
4.2.1.1. Granulometria.....	39
4.2.1.3. Determinação do teor de umidade.....	40
4.2.1.4. Determinação do teor de extrativos.....	40
4.2.1.5. Determinação do teor de cinzas totais.....	41
4.2.2. ANÁLISES FITOQUÍMICAS.....	41
4.2.2.2. Perfil cromatográfico.....	45
4.2.2.3. Perfil espectrofotométrico na região de ultravioleta.....	46
4.2.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	46
4.2.4. ANÁLISE QUANTITATIVA.....	47
4.2.4.1. Determinação do teor de fenóis totais.....	47
4.2.4.2. Determinação do teor de flavonóides totais.....	48
4.2.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	48
4.2.5.1. Verificação da atividade antioxidante por CCD.....	48
4.2.5.2. Determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres.....	49
4.2.6. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	50
4.2.6.1. Preparo dos antimicrobianos.....	50
4.2.6.2. Solução estoque de extrato.....	50
4.2.6.3. Preparo da suspensão de bactéria.....	50
4.2.6.4. Preparo da suspensão de levedura.....	50
4.2.6.5. Teste de difusão em ágar.....	51
4.2.6.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima por meio do método de diluição em microplaca e Concentração Bactericida Mínima... 51	51
4.2.6.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de diluição em microplaca e Concentração Fungicida Mínima.....	52
4.2.6.8. Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de macrodiluição e da concentração bactericida mínima.....	55
4.2.6.9. Bioautografia.....	56
4.2.7. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE.....	58
4.2.7.1. Preparo das amostras.....	58
4.3.2. Avaliação da citotoxicidade dos extratos.....	58
4.2.8. PREPARAÇÕES COSMÉTICAS.....	59

4.2.8.1. Preparo do sabonete líquido	59
4.2.8.2. Preparo do sabonete em barra	61
4.2.8.3. Preparo da loção	62
4.2.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SÉPTICA DAS PREPARAÇÕES COSMÉTICAS.....	64
4.2.9.1. Teste de difusão em ágar	64
4.2.10. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS PREPARAÇÕES.....	65
4.2.10.1. Teste de centrifugação	65
4.2.10.2. Estabilidade preliminar.....	65
4.2.11. CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DAS PREPARAÇÕES	66
4.2.11.1. Contagem do número total de microrganismos.....	67
4.2.11.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Escherichia coli</i>	67
4.2.11.3. Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
4.2.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
5. RESULTADOS.....	70
5.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	71
5.1.1. Granulometria	71
5.1.2. Determinação do pH	72
5.1.3. Determinação do teor de umidade.....	72
5.1.4. Determinação do teor de extrativos	73
5.1.5. Determinação do teor de cinzas totais.....	73
5.2. ANÁLISES FITOQUÍMICAS.....	74
5.2.1. Triagem fitoquímica preliminar das principais classes de metabólitos secundários.....	74
5.2.2. Perfil cromatográfico	76
5.2.3. Perfil espectrofotométrico na região de ultravioleta.....	80
5.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	81
5.4. ANÁLISE QUANTITATIVA.....	82
5.4.1. Determinação do teor de fenóis totais	82
5.4.2. Determinação do teor de flavonóides totais	85
5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	87

5.5.1. Verificação da atividade antioxidante por CCD	87
5.5.2. Determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres	87
5.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	88
5.6.1. Teste de difusão em ágar	88
5.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de diluição em microplaca e concentração bactericida mínima	91
5.6.3. Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de macrodiluição e concentração bactericida mínima	93
5.6.4. Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de diluição em microplaca e concentração fungicida mínima	94
5.6.5. Bioautografia	96
5.7. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE	97
5.8. PREPARAÇÕES COSMÉTICAS	99
5.8.1. Sabonete líquido	99
5.8.2. Sabonete em barra	99
5.8.3. Loção	100
5.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SÉPTICA DAS PREPARAÇÕES COSMÉTICAS	100
5.9.1. Teste de difusão em ágar	100
5.10. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS PREPARAÇÕES	105
5.10.1. Teste de centrifugação	105
5.10.2. Estabilidade preliminar	106
5.11. CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DAS PREPARAÇÕES	117
6. DISCUSSÃO	116
7. CONCLUSÃO	140
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração retirada de “ <i>Botanicon. Plantarum Historieae...</i> ”, de Adamum Lonicerum (Lonitzer) (Frankfurt, 1565).	15
Figura 2: Vaso estribo Pré-Colombiano da antiga civilização Moche do norte do Peru representando as cascas de “mandioca” (<i>Manihot esculenta</i>)....	16
Figura 3: Arbusto de <i>Taxus brevifolia</i> Nutt.	20
Figura 4: Fotografias de <i>M. cauliflora</i>	25
Figura 5: Fotografia da árvore de <i>S. adstringens</i>	27
Figura 6: Esquema da microplaca utilizada para determinação da concentração inibitória mínima para bactérias e leveduras	54
Figura 7: Esquema da metodologia de bioautografia.....	57
Figura 8: Comparação da granulometria percentual das folhas pulverizadas de <i>M. cauliflora</i> em moinho de facas, em moinho de bola e das cascas de <i>S. adstringens</i> adquiridas comercialmente	71
Figura 9: Teor de extrativos das drogas analisadas.	73
Figura 10: Cromatograma das frações acetato de etila das drogas e dos extratos obtidos das folhas de <i>M. cauliflora</i> e <i>S. adstringens</i> revelado com anisaldeído sulfúrico	76
Figura 11: Cromatograma das frações acetato de etila das drogas e dos extratos obtidos das folhas de <i>M. cauliflora</i> e <i>S. adstringens</i> revelado com cloreto férrico 2% em metanol.....	77
Figura 12: Perfil espectrofotométrico, na região de ultravioleta, de ácido gálico e ácido tânico.	80
Figura 13: Perfil espectrofotométrico, na região de ultravioleta, dos extratos de folhas de <i>M. cauliflora</i> e da casca de <i>S. adstringens</i>	81
Figura 14: Curva analítica de absorbância da solução padrão de ácido tânico.....	82
Figura 15: Variação sazonal de fenóis totais de folhas de <i>M. cauliflora</i>	83
Figura 16: Variação do teor de fenóis totais dos extratos de folhas de <i>M. cauliflora</i>	84
Figura 17: Variação do teor de fenóis totais dos extratos de casca de <i>S. adstringens</i>	84
Figura 18: Curva analítica de absorbância da solução padrão de rutina.....	85
Figura 19: Variação sazonal de flavonóides totais de folhas de <i>M. cauliflora</i>	86
Figura 20: Variação do teor de flavonóides dos extratos de folhas de <i>M. cauliflora</i>	86

Figura 22: Atividade anti-radicalar percentual das substâncias padrão e dos extratos estudados	88
Figura 23: Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar dos extratos de <i>M. cauliflora</i> contra <i>E. coli</i>	89
Figura 24: Determinação de CIM e CBM pelo método de microfiluição em microplaca	91
Figura 25: Ilustração de resultado do método de avaliação da atividade antimicrobiana por bioautografia.....	96
Figura 26: Representação dos resultados de citotoxicidade dos extratos obtidos de folhas de <i>M. cauliflora</i> e de casca de <i>S. adstringens</i>	97
Figura 27: Fotografia de ilustração das preparações de sabonete líquido. ..	99
Figura 28: Fotografia de ilustração das preparações de sabonete em barra.	99
Figura 29: Fotografia de ilustração das preparações de loção..	100
Figura 30: Placas de avaliação da atividade anti-séptica de diferentes amostras das preparações frente a alguns dos microrganismos ensaiados	104
Figura 31: Variação de pH das preparações de sabonete líquido controle, com extrato de folhas de <i>M. cauliflora</i> e com extrato de casca de <i>S. adstringens</i>	109
Figura 32: Variação de pH das preparações de loção controle, com extrato de folhas de <i>M. cauliflora</i> e com extrato de casca de <i>S. adstringens</i>	109
Figura 33: Variação de densidade das preparações de sabonete líquido controle, com extrato de folhas de <i>M. cauliflora</i> e com extrato de casca de <i>S. adstringens</i>	113
Figura 34: Variação de densidade das preparações de loção controle, com extrato de folhas de <i>M. cauliflora</i> e com extrato de casca de <i>S. adstringens</i>	113
Figura 35: Reograma da preparação de sabonete líquido de controle.	114
Figura 36: Reograma da preparação de sabonete líquido com extrato EtOH 70 de folhas de <i>M. cauliflora</i> a 0,25%.	115
Figura 37: Reograma da preparação de sabonete líquido com extrato EtOH 50 de casca de <i>S. adstringens</i> a 0,25%.	115
Figura 38: Reograma da preparação de loção de controle.	115
Figura 39: Reograma da preparação de loção com extrato EtOH 50 de folhas de <i>M. cauliflora</i> a 0,25%.	116
Figura 40: Reograma da preparação de sabonete líquido com extrato EtOH 50 de casca de <i>S. adstringens</i> a 0,50%.	116

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Cepas de bactérias e leveduras utilizadas no trabalho.....	38
Tabela 2: Fórmula percentual da preparação de sabonete líquido e função de cada componente.	60
Tabela 3: Fórmula percentual da preparação de sabonete em barra e função de cada componente.....	61
Tabela 4: Fórmula percentual da preparação de loção e função de cada componente.....	63
Tabela 5: Valor de pH de folhas de <i>M. cauliflora</i> e de casca de <i>S. adstringens</i>	72
Tabela 6: Valor do teor de umidade para as drogas em estudo.	72
Tabela 7: Teor de cinzas totais de folhas de <i>M. cauliflora</i> e de casca de <i>S. adstringens</i>	73
Tabela 8: Metabólitos secundários presentes em <i>M. cauliflora</i> e <i>S. adstringens</i>	75
Tabela 9: Fator de retenção das manchas apresentadas nos cromatogramas.	78
Tabela 10: Rendimento dos extratos de <i>M. cauliflora</i> e de <i>S. adstringens</i> , obtidos com diferentes solventes, em % de massa obtida de extrato/massa inicial de droga (p/p).....	82
Tabela 11: Média dos halos de inibição dos extratos de folhas de <i>M. cauliflora</i> , de casca de <i>S. adstringens</i> e de ampicilina.....	90
Tabela 12: Moda dos valores de CIM e CBM dos extratos testados e da ampicilina.	92
Tabela 13: Média dos valores de CIM por macrodiluição e CBM.....	94
Tabela 14: Moda dos valores de CIM e CFM dos extratos de <i>M. cauliflora</i> e <i>S. adstringens</i> contra cepas de <i>Candida</i> sp.....	95
Tabela 15: Valor de IC dos extratos de folhas de <i>M. cauliflora</i> e de casca de <i>S. adstringens</i> frente a células de macrófagos da linhagem J774.	98
Tabela 16: Halos de inibição de crescimento microbiano das preparações de sabonete líquido contra as bactérias e leveduras testadas.....	101
Tabela 17: Halos de inibição de crescimento microbiano das preparações de loção contra as bactérias e leveduras testadas.....	102
Tabela 18: Variação de pH da preparação de sabonete líquido de controle, com extrato de folhas de <i>M. cauliflora</i> e com extrato de casca de <i>S. adstringens</i>	107
Tabela 19: Variação de pH da preparação de loção de controle, com extrato de folhas de <i>M. cauliflora</i> e com extrato de casca de <i>S. adstringens</i>	108

Tabela 20: Variação de densidade da preparação de sabonete líquido de controle, com extrato de folhas de <i>M. cauliflora</i> e com extrato de casca de <i>S. adstringens</i>	111
Tabela 21: Variação de densidade da preparação de loção de controle, com extrato de folhas de <i>M. cauliflora</i> e com extrato de casca de <i>S. adstringens</i>	112
Tabela 22: Controle de qualidade microbiológico das preparações de sabonete líquido, sabonete em barra e loção de controle, com extrato de <i>M. cauliflora</i> e com extrato de <i>S. adstringens</i>	118
Tabela 23: Panorama geral dos extratos obtidos e dos ensaios físico-químicos e biológicos realizados.....	115

ABREVIATURAS

Ac:H₂O: acetona:água 7:3

ATCC: “American Type Culture Collection”

BHI: “Brain-Heart Infusion”

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CCDC: Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CFM: Concentração Fungicida Mínima

CHCl₃: clorofórmio

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EMB: meio Eosina Azul de Metileno (“Eosin Methylen Blue”)

EtOH 50: etanol 50%

EtOH 70: etanol 70%

FrAcOEt: Fração acetato de etila

IC: Índice de Citotoxicidade

MOPS: ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico

NCCLS: National Committe for Clinical Laboratory Standards

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde

TSI: meio Ferro-Triplo-Açúcar (“Triple-Sugar-Iron”)

TTC: 2,3,5-trifenil tetrazólio

USP: United State Pharmacopeia

XLD: meio xilose lisina desoxicolato

WHO: World Health Organization

RESUMO

No decorrer dos últimos 60 anos, o desenvolvimento de agentes antimicrobianos eficazes e seguros para lidar com infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico. Entretanto, pela própria evolução dos organismos e, com auxílio do uso indiscriminado dos antibióticos, muitas espécies de microrganismos foram selecionadas, apresentando resistência aos agentes antimicrobianos utilizados. Como uma tentativa de contornar tal situação e ampliar o arsenal de compostos ativos contra microrganismos patógenos, o estudo de plantas tornou-se crescente no cenário científico. Muitas destas plantas já eram utilizadas pela população de modo geral; outras foram estudadas devido à sua fácil disponibilidade e/ou constituição química propícia para esta atividade. Neste trabalho, foram estudadas as folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. e a casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville quanto ao potencial que extratos, obtidos das mesmas, podem apresentar contra bactérias e leveduras e, a partir desta propriedade, aplicá-los ao cotidiano da população através de preparações cosméticas, tendo sido avaliada a citotoxicidade dos extratos contra células de mamíferos. Para tanto, foram realizadas a padronização das drogas e seus extratos através de ensaios físico-químicos, qualitativos e quantitativos. Após a padronização, foi avaliada a atividade antimicrobiana dos extratos determinando sua Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Índice de Citotoxicidade por métodos previamente preconizados para estas áreas. Com base nestes dados, foram prosseguidos os estudos, incorporando os extratos mais promissores em formulações de sabonete líquido, sabonete em barra e loção, avaliando a atividade anti-séptica e quais as preparações com resultados mais significativos. Estas foram submetidas a condições de estresse analisando sua estabilidade por parâmetros organolépticos e físico-químicos a fim de predizer sua adequabilidade para consumo. Por fim, foi possível avaliar a qualidade das preparações através de ensaios de controle de qualidade microbiológico.

Palavras-chave: *Myrciaria cauliflora*, *Stryphnodendron adstringens*, atividade antimicrobiana, preparações cosméticas.

ABSTRACT

In the last 60 years, the development of safe and effective antimicrobial agents against bacterial infections has changed the clinical therapy. However, as organism evolution as antibiotics indiscriminate use, many microorganism species have been selected showing resistance to drugs used until the moment. As an attempt to avoid this situation and to enlarge the pool of active compounds against pathogenic microorganisms, plant studies have increased in scientific scenario. Many of these plants had already been used by population in general; others have been studied due their easy availability and/or chemical composition suitable to this activity. In this work, it was studied the extracts of the leaves of *Myrciaria cauliflora* O. Berg. and the bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville to evaluate their possible potential against bacteria and yeasts and, from this property, to employ them to daily use by population in cosmetic preparations after the extracts citotoxicity assay had been made against mammalian cells. For that, it was done drugs and extracts standardizations by physico-chemical, qualitative and quantitative assays. After the standardization, it was evaluated antimicrobial activity of the extracts determining Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC) and Cytotoxicity Inhibitory by previous methodology assays for these areas. Based on these data, the promising extracts were incorporated in liquid soap, bar soap and lotion, and the antiseptic activity was evaluated. The more efficient preparations were taken to stress conditions and their stability was evaluated by organoleptic and physical-chemical features to predict their suitable to be used by people. Finally, it was possible to evaluate preparations quality by microbiological quality control assay.

Key-words: *Myrciaria cauliflora*, *Stryphnodendron adstringens*, antimicrobial activity, cosmetics.

1. INTRODUÇÃO

Segundo Prieto (2005), as pessoas da Espanha rural no século XVII não tinham acesso a pomadas e poções preparadas com condimentos orientais, medicamentos e resinas, tendo que depender da flora local e da culinária, entre outros ingredientes disponíveis facilmente para o tratamento de suas enfermidades. Ou seja, naquela época, as pessoas não tinham condições de ter acesso às formas de medicamentos comercializadas, dependendo apenas dos tratamentos pela forma de conhecimento popular.

Em muitos países em desenvolvimento assim é até os dias atuais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que um terço da população global ainda não tem acesso a medicamentos essenciais e, mais do que isso, nas áreas mais pobres da África e Ásia, esse valor sobe para 50% da população. Em todas estas regiões, o uso da medicina tradicional é, portanto, muito freqüente devido a sua fácil disponibilidade (WHO, 2002).

A saber, medicina tradicional consiste em diversas práticas de saúde, conhecimento e crenças que são compostos por medicamentos baseados em plantas, animais e minerais, além de terapias espirituais, técnicas manuais e exercícios aplicados a fim de manter o bem-estar ou para tratar, diagnosticar ou prevenir doenças (WHO, 2002).

Entretanto, na Austrália, Europa e América do Norte, a medicina tradicional passou a ser usada como ‘medicina alternativa e complementar’, sendo muito utilizada em paralelo à alopatia, particularmente em tratamento de doenças crônicas. A difusão e o uso crescente da medicina tradicional acabou por criar mudanças na saúde pública, em termos de política, segurança, eficácia e qualidade, acesso e uso racional (WHO, 2002).

Analisando sob a perspectiva da indústria farmacêutica, a mesma não vem tendo tantas inovações quanto o pretendido, além dos altos custos dos processos de aprovação, inserção e, às vezes, retirada do mercado de seus produtos. Estes fatores acabam por refletir sobre o aumento do custo dos medicamentos, tornando-os de difícil acessibilidade para a maioria da população, tanto de países desenvolvidos quanto de países em desenvolvimento (PATWARDHAN, 2005).

A etnofarmacologia torna-se, então, uma importante ferramenta para a indústria farmacêutica na busca de medicamentos de origem natural

(PATWARDHAN, 2005). Na verdade, existe uma retomada da valorização do uso de plantas no sentido de curar, tratar e prevenir, após um longo período advindo da Revolução Industrial e avanços da química orgânica, em que os produtos sintéticos foram preferidos por serem de fácil obtenção (RATES, 2001).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), são plantas medicinais (ARIAS, 1999; RATES, 2001): a) qualquer planta usada para aliviar, prevenir ou curar uma doença ou uma alteração fisiológica ou um processo patológico; b) qualquer planta empregada como fonte de fármacos ou seus precursores.

As plantas medicinais podem ser usadas na forma de chás ou preparações feitas em casa. Além disso, podem ser utilizadas na forma de extratos brutos ou frações enriquecidas em preparações farmacêuticas como tinturas, extratos fluidos, pós ou cápsulas. Também podem passar por um processo de sucessiva extração e purificação para isolamento dos compostos ativos que podem ser usados diretamente em formas farmacêuticas ou servirem como protótipos ou precursores de outras moléculas ativas (RATES, 2001).

Já no primeiro século da era Cristã, Dioscórides, médico-cirurgião grego, publicava “*De Materia Medica*”, um catálogo contendo cerca de 600 plantas do Mediterrâneo, incluindo informações de como os gregos as utilizavam para fins médicos, locais onde poderiam ser encontradas, informações sobre uso e se eram comestíveis ou venenosas (WIKIPEDIA, 2006a).

Foi durante a Renascença (séculos XIV a XVI) que apareceram as primeiras farmacopéias, com o propósito de padronizar a composição e a forma de preparações prescritas pelos médicos da época. A primeira farmacopéia europeia foi publicada em 1498, em Florença: “*Nuovo Receptario Compositio*”; sendo que a segunda foi publicada em Barcelona, em 1511: “*Concordie apothecariorum Barchinone medicines Compositis*” (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2006).

Além dos compêndios puramente científicos da época, também é possível coletar informações sobre o uso de plantas medicinais, e até seu

preparo, por meio de livros de literatura. Um exemplo é a famosa obra de Miguel de Cervantes, “*El Ingenioso Hidalgo Don Quijote de La Mancha*” (1605/1615), a qual foi estudada por vários autores a fim de ampliar o conhecimento sobre doenças e tratamentos da época barroca, na qual prevaleciam os estudos de Galeno (129-200) (PUERTO, 1997). O mais notável remédio utilizado pela personagem era conhecido como Bálamo de *Fierabras*, o qual tinha em sua constituição a planta conhecida, popularmente, como “alecrim” (*Rosmarinus officinalis* L.). Atualmente, esta planta é reconhecida por suas atividades coleréticas e diuréticas, sendo estudada pelas atividades antiespasmódica, bactericida e fungicida que seu óleo, constituído por borneol, apresenta (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2006).

A Figura 1 ilustra a coleta, preparo e administração de plantas medicinais na Idade Média.



Figura 1: Ilustração retirada de “*Botanicon. Plantarum Historieae...*”, de Adamum Lonicerum (Lonitzer). Nesta figura, observa-se grupos de médicos e farmacêuticos coletando ervas, obtendo extratos e administrando a pacientes (FRANKFURT, 1565 *apud* LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2006).

Afirma-se que o uso de plantas medicinais em culturas indígenas baseia-se em uma longa tradição. No entanto, em culturas sem formas de escrita, praticamente não existem evidências históricas disponíveis de quão

antigo é o uso de certas plantas em sua medicina tradicional uma vez que tradições orais têm limitada profundidade de tempo (COX, 2000; PIERONI, 2002; LEONTI et al., 2003). Em estudos arqueobotânicos, muitas vezes é difícil estabelecer o exato uso medicinal de certas espécies e seu contexto, sendo que materiais vegetais encontrados junto a artefatos artísticos como pinturas, amuletos, esculturas em pedra, artefatos de cerâmica e monumentos contribuem para o entendimento de que certas plantas eram utilizadas em cerimônias mágico-religiosas (Figura 2). De certa forma, as evidências mais confiáveis existem para algumas espécies isoladas e importantes de plantas utilizadas como estimulantes e alucinógenos, mas não para a utilização de plantas com atividade medicinal no seu sentido restrito (LEONTI et al., 2003). Mesmo assim, o estudo arqueológico do uso de plantas medicinais também pode ser visto como auxiliar para novas fontes de pesquisa da indústria farmacêutica (LEONTI et al., 2003).



Figura 2: Vaso estribo Pré-Colombiano da antiga civilização Moche do norte do Peru representando as cascas de “mandioca” (*Manihot esculenta*). Altura 18 cm, 450 AD. Museu voor Volkenkunde, Rotterdam (DE SMERT, 1998).

A diversidade e a disponibilidade são fatores muito importantes para o uso de fontes naturais na área da saúde e outras áreas. A grande diversidade da flora das florestas tropicais proporcionou às comunidades que viviam nestas áreas tornarem-se excepcionais conhecedoras da ecologia e, assim, do uso e dos nomes das plantas por elas utilizadas na medicina

(VANDEBROEK, 2004). Segundo a literatura (VANDEBROEK, 2004), na América Latina, bem como em outras regiões habitadas por populações indígenas, a transmissão do conhecimento e das habilidades em relação às plantas medicinais são feitas aos pajés, ou curandeiros, principalmente, de quatro formas: 1) herança familiar; 2) aprendizado com espíritos ancestrais; 3) experiências próprias; 4) aprendizado com outros curandeiros, geralmente, de diferentes comunidades.

Os primeiros povoadores, náufragos, degredados, aventureiros e colonos deixados no Brasil por Martim Afonso, tiveram de valer-se de recursos da natureza para combater as doenças, curar ferimentos e neutralizar picadas de insetos, aprendendo com os pajés a preparar os remédios da terra para tratar seus próprios males. No tempo da Real Botica de São Paulo (construída em 1796 e demolida em 1916), os remédios eram, na sua grande maioria, plantas medicinais, embora desde 1730 o brasileiro usava o mercúrio e o arsênico importados da Europa. O “ópio” (*Papaver somniferum* Linné), a “escamonéia” (*Convolvulus scamonia* L.), a “rosa” (*Rosa* spp), o “sene” (*Cassia angustifolia* L.), o “manacá” (*Tibouchina mutabilis* Cogn) e a “ipeca” (*Hybanthus ipecacuanha* A. Rich) já faziam parte dos remédios necessários para funcionamento de uma botica. Pomadas e linimentos tinham grande consumo, aliás, o produto mais consumido era a pomada alvíssima, além do bálsamo católico (feito com flores de *Angelica archangelica* L.) contra úlceras, bálsamo de “copaíba” (*Alchornea triplinervia*), e a Água Vienense (laxante composto por folíolos de “sene” e conserva de frutos de “tamarindo” (*Tamarindus indica* L.)), que só reduziu seu uso no começo deste século (HISTÓRIA, 2006).

Em 1929 foi oficializado o Código Farmacêutico Brasileiro, ou seja, a primeira edição da Farmacopéia Brasileira, apresentada pelo Farmacêutico e Professor de Farmácia Rodolpho Albino Dias da Silva, sendo uma obra de um único autor, equiparando-se às farmacopéias dos países tecnologicamente desenvolvidos, mas diferenciando-se por conter descrições de mais de 200 plantas medicinais, a maioria delas de origem brasileira (AGÊNCIA..., 2004). Parte destas plantas foi suprimida da segunda edição e outra parte foi destinada ao Formulário Nacional. Atualmente, a quarta

edição da Farmacopéia Brasileira (1988 e seus suplementos publicados em 1997, 2000, 2002) conta com apenas 23 monografias atualizadas que, na sua grande maioria, são monografias de plantas importadas (FARIAS, 2004).

Nos diferentes biomas do Brasil como o Cerrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica, a população local permanece fazendo uso das plantas medicinais para o tratamento primário de doenças tropicais como leishmaniose, malária, esquistossomose e infecções bacterianas e fúngicas (ALVES et al., 2000; DUARTE et al., 2005). Além disso, muitas plantas exóticas, introduzidas após a colonização foram incorporadas a esta medicina popular. Essas plantas são utilizadas, principalmente na forma de extratos brutos, infusões e emplastos (BIGHETTI et al., 2005).

Com a intenção de identificar novos agentes terapêuticos (BIGHETTI et al., 2005), bem como de tornar seguro e eficaz o uso de plantas medicinais no tratamento primário de saúde (PHILLIPSON, 2001; WHO, 2002), diferentes grupos de estudos vêm se dedicando a avaliar diferentes propriedades terapêuticas e tóxicas de diversas plantas, nativas e exóticas, por todo o mundo (BIGHETTI et al., 2005).

Diversos estudos fitoquímicos, toxicológicos e terapêuticos sobre diferentes plantas já foram e estão sendo feitos até os dias atuais; no entanto, frente à biodiversidade, muitos outros ainda são necessários serem realizados. Acredita-se que a maioria das 250.000 plantas superiores ainda não foi estudada quanto ao seu potencial farmacológico, sendo que parte destas foram estudadas para uma atividade específica, mas não em relação a outras atividades (PHILLIPSON, 2001; RATES, 2001).

Em 22 de junho de 2006, o então presidente da República Federativa do Brasil, senhor Luiz Inácio Lula da Silva assinou o Decreto nº 5.813, no qual é aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que tem o papel de garantir à população acesso seguro e uso correto de plantas medicinais e de remédios fitoterápicos. A medida também busca promover a utilização sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria do setor (BRASIL, 2006).

A Organização Mundial da Saúde em seu documento WHO/Pharm/92.559 (WHO..., 2004) apontou um roteiro básico para analisar a qualidade de plantas medicinais abrangendo tópicos que vão desde a classificação e identificação da espécie botânica, doseamento de princípios ativos (quando conhecidos) até as possíveis e prováveis contaminações radioativas provenientes dos processos de esterilização do produto ou de suas contaminações ambientais. Os controles físico-químico, químico e microbiológico são apontados no documento da OMS como relevantes e imprescindíveis (FITOTERÁPICOS, 2004).

Antes da Segunda Guerra Mundial (1939-1945), uma série de produtos naturais foi isolada das plantas superiores e alguns são usados até hoje, como a quinina, provinda das cascas de *Cinchona*. Nos anos seguintes à guerra, poucas descobertas foram feitas a partir de plantas. Um exemplo é a vimblastina e a vincristina, dois antineoplásicos isolados de *Catharanthus roseus*. Pode-se citar como razões para este abandono o fato de que compostos puros eram facilmente obtidos, modificações estruturais possibilitavam aumentar a potência e a segurança e, segundo o novo estilo de vida da sociedade ocidental, as plantas medicinais eram vistas como produtos para as pessoas carentes ou, simplesmente, como superstição (RATES, 2001).

Nota-se, no entanto, que, recentemente, a atenção da indústria farmacêutica tornou a voltar-se para as fontes naturais, o que pode ser exemplificado pelo isolamento da molécula de taxol. O taxol é um derivado di-terpênico obtido das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt. e seu isolamento e elucidação estrutural deram-se em virtude da atividade contra células cancerosas que o extrato bruto das cascas apresentou em laboratório (Figura 3). A complexa estrutura do taxol demonstra uma das dificuldades quanto à síntese laboratorial de compostos derivados de fontes naturais (PHILLIPSON, 2001), sendo que outra dificuldade encontra-se no rendimento de ativo que consegue-se isolar. Dessa forma, para produzir 2,5 kg de taxol são requeridas 27.000 toneladas de cascas de *Taxus brevifolia*, sendo necessário o corte de 12.000 arbustos (RATES, 2001).

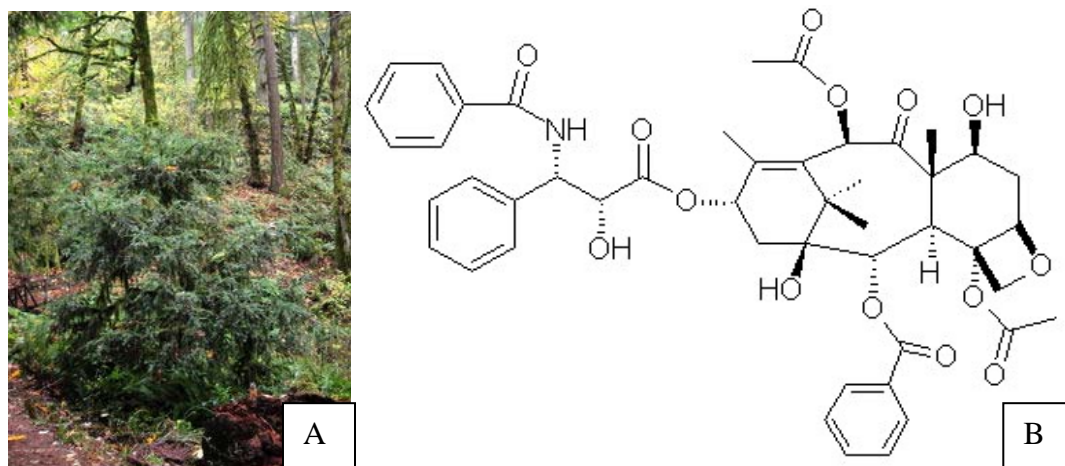


Figura 3: A - Arbusto de *Taxus brevifolia* Nutt. (WIKIPEDIA, 2006b). B - estrutura do taxol (AMERICAN..., 2005).

Existem pesquisas que mostram que uma planta que possui determinada atividade, não necessariamente, vai apresentar um único composto ativo (PHILLIPSON, 2001). Um estudo conduzido por Phillipson (1995) demonstrou que artemisinina, um potente antimalárico, isolado de *Artemisia annua* tem sua atividade aumentada quando é administrado na forma de extrato bruto, e não isoladamente, uma vez que o extrato também é constituído por flavonóides que potencializam a atividade da artemisinina. Da mesma forma que *Panax ginseng*, quando utilizado na forma de extrato bruto ou suas frações saponínicas, é mais ativo do que quando são utilizados seus compostos isolados (RATES, 2001).

As folhas de espécies de *Mikania* (Asteraceae), popularmente conhecida como “guaco”, são muito utilizadas pela população de regiões tropicais da África, Ásia e América do Sul como anti-espasmódica, anti-ulcerogênica e anti-reumática. Estudo de Bighetti *et al.* (2005) demonstrou que *Mikania laevigata* possui atividade anti-ulcerogênica indicando que deve-se à presença de cumarinas. No entanto, relata que *Mikania cordata* também apresenta esta atividade, mas devido a alcalóides, os quais não estão presentes na primeira.

A escolha de qual planta deve ser estudada baseia-se nos usos tradicionais observados, isto é, etnofarmacologia, sua composição química

através de classes de metabólitos secundários com já conhecida atividade, na toxicidade apresentada ou através de um estudo randomizado, no qual o pesquisador utiliza várias espécies para uma determinada atividade, escolhendo as que se mostraram mais efetivas para prosseguir a pesquisa. Alguns compostos, como a morfina e digitoxina, foram obtidos por sua característica tóxica para uso terapêutico, enquanto que outros estão sob estudo, como os canabinóides, também para uso terapêutico (PÉREZ et al., 1999; RATES, 2001).

Observa-se que existe uma maior tendência nas publicações descrevendo a pesquisa de plantas e seus compostos ativos contra câncer, doenças tropicais, infecções, antiinflamatórios, imunomodulatórios e para usos psiquiátricos (HAMBURGER e HOSTETTMAN, 1991; RATES, 2001). Muitos extratos e óleos essenciais vegetais têm demonstrado *in vitro* e *in vivo* atividades descritas pela medicina tradicional, inclusive quanto à atividade antimicrobiana (DUARTE et al., 2005).

Um dos efeitos da globalização foi o aumento da velocidade e facilidade com que as doenças infecciosas e os microrganismos resistentes se espalharam entre os continentes. Da mesma forma, o rápido aumento da população e da urbanização sem um aumento correspondente dos recursos e serviços resultou em um superpovoamento, muitas vezes com precárias condições de higiene e sanitização, o que também facilita a difusão dessas doenças e bactérias (BYARUGABA, 2004).

O uso indevido dos antibióticos, entretanto, favoreceu a pressão seletiva a fim de que, através de cepas selecionadas, fosse conferida resistência a vários agentes antibacterianos (CHRISTENSEN et al., 2001). Outro fator que muito contribui para a seleção de bactérias resistentes é o uso de antimicrobianos por auto-medicação. Nos países em desenvolvimento, um fator também importante, é a pobreza e a falta de investimentos na melhoria da qualidade de vida da população, que não tem acesso, inclusive, à educação e à saúde (BYARUGABA, 2004).

Em vista da múltipla resistência que muitos patógenos humanos apresentam devido à seleção a que passaram pelo uso indiscriminado de medicamentos antimicrobianos, a emergência de infecções incomuns até

então e efeitos adversos apresentados por alguns medicamentos, as pesquisas tornaram-se mais focadas nas plantas medicinais, sendo que muitas estão se mostrando como potenciais fontes de agentes antimicrobianos (ZAMPINI et al., 2005).

Com o apoio de organizações como a Organização Mundial da Saúde (WHA 42.43, 1989), e devido à emergência da resistência de microrganismos resistentes aos antimicrobianos utilizados, cada vez mais tem-se estudado a propriedade antimicrobiana que certas espécies vegetais apresentam (ESQUENAZI et al., 2002; YUNES e CALIXTO, 2001). Muitos experimentos *in vitro* têm sido realizados a fim de permitir a seleção de vegetais com potencial atividade antimicrobiana (ELOFF, 1998). Desta forma, pode-se citar, por exemplo, a atividade antimicrobiana obtida para o extrato hidroalcoólico das folhas de *Piper regnellii* Miq. contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (HOLETZ et al., 2002).

Enfim, deve-se salientar que para a escolha de um material biológico a ser analisado em busca de compostos ativos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de um medicamento ou outro produto, tem-se que levar em consideração as necessidades regionais e mundiais em novos agentes eficientes e seguros enquanto que também sejam preservados a biodiversidade e o meio-ambiente (RATES, 2001). Portanto, o uso de fontes naturais em saúde deve avaliar quantidades disponíveis, facilidade de acesso, preservação e replantio. Deve-se considerar a possibilidade de utilizar plantas cultivadas, uma vez que isto permite a produção de material cultivado sob as mesmas condições tornando mais garantida a homogeneidade química, qualitativa e quantitativa. É preciso que também existam estímulos para projetos de genética dessas plantas a fim de preservá-las e garantir seguramente a homogeneidade do material a ser trabalhado (LABADIE, 1986; RATES, 2001).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (Myrtaceae)

Myrciaria cauliflora é uma planta pertencente à família Myrtaceae e conhecida popularmente como “jaboticaba”. A família foi descrita por Antoine Laurent de Jussieu, a qual inclui cerca de 129 gêneros e 4620 espécies. Estas espécies são arbustivas ou arbóreas, estando presentes em regiões de clima temperado, Austrália, oeste da Índia e América tropical. A família Myrtaceae, por sua vez, pertence à ordem Myrtales, que reúne doze famílias botânicas (LORENZI, 2000; STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

As várias espécies da família Myrtaceae fornecem importantes produtos, como óleos essenciais, temperos, alimentos e, além disso, muitas são utilizadas na medicina tradicional (STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Outros gêneros pertencentes à família Myrtaceae são: *Psidium*, *Eugenia*, *Eucalyptus*, *Melaleuca*, *Myrtus*, *Pimenta* e *Syzygium* (STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Plinia cauliflora (Mart.) Kausel, é uma das sinonímias científicas pela qual a planta em estudo, *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg, foi identificada. Outras sinonímias são: *Myrtus cauliflora* Mart., *Myrciaria cauliflora* (DC.) Berg., *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg., *Eugenia cauliflora* DC. *Myrciaria jaboticaba* Berg., *Myrciaria tenella* Berg. e *Myrciaria trunciflora* Berg.. É conhecida pelos nomes populares de “jaboticabeira”, “jaboticaba”, “jaboticaba paulista”, “jaboticaba-açu”, “jaboticaba-do-mato” e “jaboticaba-sabará” (LORENZI, 2000; JABOTICABA, 2004; CITADIN et al., 2005).

Morfológicamente, é uma árvore de altura entre 10-15 m, com tronco liso de 30-40 cm de diâmetro, cuja casca descama anualmente. As folhas são simples, de 6-7 cm de comprimento por 2-3 cm de largura e as flores e frutos são afixados ao caule, característica pela qual atribui-se seu nome (Figura 4). Planta perenifólia, mesófita ou heliófita e seletiva higrófita, ocorrendo, preferencialmente, em planícies aluviais e matas abertas, sendo encontrada nas formações florestais do complexo atlântico e das florestas estacionais semidecíduais do Brasil, Argentina e Paraguai. Produz grande quantidade de frutos duas ou mais vezes ao ano, os quais são comestíveis e saborosos, também sendo consumidos na forma de geléias, licor, vinagre e

chás medicinais (BARROS et al., 1996; MAGALHÃES et al., 1996; DONADIO, 2000; LORENZI, 2000; PEREIRA, 2003; JABOTICABA, 2004).

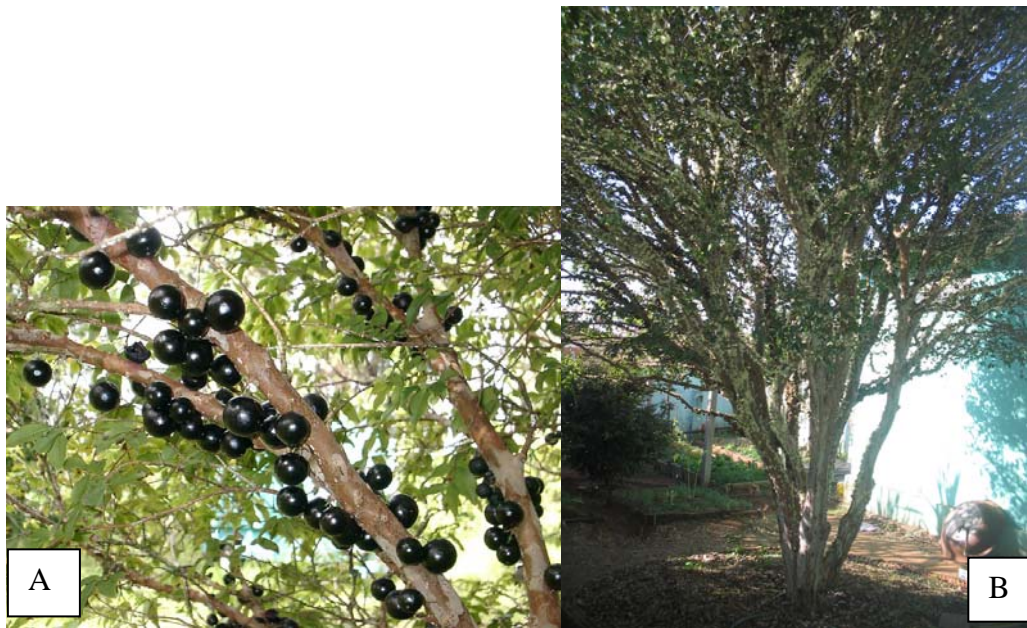


Figura 4: Fotografias de *M. cauliflora*. A) destaque para os frutos (FRUITS lovers nursery, 2006). B) árvore de *M. cauliflora* (foto tirada por: Adriana Baraldo Lotrario).

A casca de *M. cauliflora* é adstringente e o seu decocto é útil contra diarreia e irritações da pele (JABOTICABA, 2004; LORENZI, 2000). Tem-se informações de que, na medicina caseira, o “chá-da-casca” é utilizado no tratamento de anginas, disenterias e erisipelas, enquanto que o chá da entrecasca do fruto destina-se a tratamento de asma (JABUTICABA, 2006).

2.2. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae)

Stryphnodendron adstringens, conhecido popularmente como “barbatimão”, pertence à família Leguminosae-Mimosoidae. A família Leguminosae está incluída na ordem Fabales (LORENZI, 2000; STASI et al., 2002). Tendo sido descrita por Antoine Laurent de Jussieu, inclui 642 gêneros de plantas distribuídas entre árvores, arbustos, lianas e ervas. Assim, a família Leguminosae é uma das maiores e mais importantes famílias botânicas, sendo fonte de produtos alimentares, medicinais, ornamentais, madeiras e outros (STASI et al., 2002).

Leguminosae compreende três subfamílias, de acordo com o arranjo de Kubitzki a partir do sistema de Cronquist: Caesalpinioideae, ou Leguminosae I, ou família Caesalpinaceae; Mimosoidae, ou Leguminosae II, ou família Mimosaceae; e Papilionoideae, ou Leguminosae III, ou família Fabaceae (STASI et al., 2002).

A família Mimosoidae compreende 64 gêneros, entre os quais os gêneros *Acacia*, *Adenantha*, *Calliandra*, *Inga*, *Mimosa* e *Stryphnodendron* (STASI et al., 2002).

Os sinônimos botânicos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville são: *Acacia adstringens* Martius, *Mimosa barbadetiman* Vellozo, *Mimosa virginalis* Arruda, *Stryphnodendron barbatiman* Martius e *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Mart.. Possui como nomes populares: “barbatimão”, “barbatimão-verdadeiro”, “barba-de-timão”, “charãozinho-roxo”, “casca-da-virgindade”, “casca-da-mocidade”, “barbatimão-vermelho”, “uabatimô”, “paricarana”, “abaramotemo” e “ibatimô”. É também chamado de “barbatimão-verdadeiro” (LORENZI, 2000; LORENZI e MATOS, 2002). O nome deriva do termo indígena “Iba Timó”, ou seja, a árvore que aperta (PANIZZA, 1997).

S. adstringens é uma árvore decídua, de copa alongada, de 4 a 5 m de altura, com tronco cascudo e tortuoso de 20 a 30 cm de diâmetro. As folhas são compostas bipinadas, com 5-8 jugas; folíolos ovalados, em número de 6-8 pares por pina (juga). Flores pequenas, amareladas, dispostas em racemos axilares (Figura 5). Os frutos são vagens cilíndricas, indeiscentes, de 6-9 cm de comprimento, com muitas sementes de cor parda (LORENZI, 2000; LORENZI et al., 2002). Existem no Brasil mais duas espécies deste gênero com características, propriedades e nomes populares similares: *Stryphnodendron coriaceum* Benth e *Stryphnodendron polyphyllum* Martius (LORENZI et al., 2002).

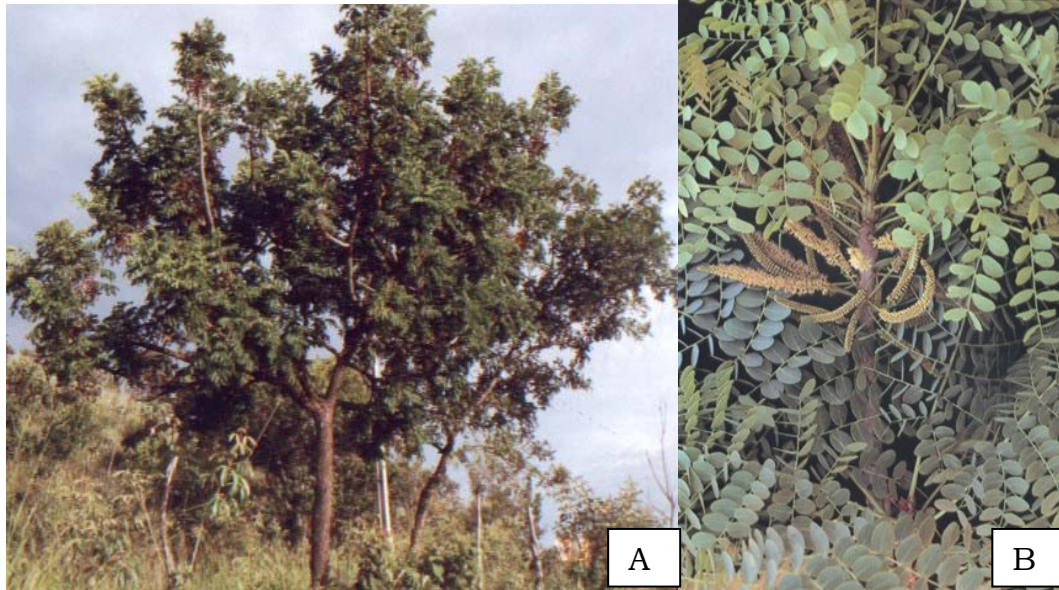


Figura 5: A - Fotografia da árvore de *S. adstringens* (ÁRVORES do Cerrado, 2006). B - Fotografia detalhando as folhas e flores (SIGRISTI, 2006).

De crescimento lento, é bem resistente a locais secos, não exigindo muita água (PANIZZA, 1997). É uma planta característica de formações abertas, como campos e cerrados; apresenta nítida preferência por solos arenosos e de drenagem rápida, como os situados em encostas suaves e topos de morros. Nativa dos cerrados do Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, estende-se do Pará até São Paulo e Mato Grosso do Sul (LORENZI, 2000; LORENZI et al., 2002; PANIZZA, 1997).

Na sua composição química citam-se substâncias tânicas (20-30%), mucilagens, flavonóides nas folhas (SANTOS et al., 2002), corante vermelho, açúcar solúvel e alcalóides não determinados (LORENZI et al., 2002). A Farmacopéia do Brasil determina que a casca de barbatimão contenha, no mínimo, 20% de taninos (COSTA, 1994). Mello et al. (1996a, 1996b e 1999) em diferentes trabalhos, e Toledo (2002) isolaram e elucidaram a estrutura de taninos condensados presentes na casca de *S. adstringens*, como galocatequina, epigalocatequina, 4'-O-metil-galocatequina, epigalocatequina-3-O-galato, epigalocatequina-3-O-(3'',5''-dimetil)-galato, epigalocatequina-3-O-(3''-metoxi-4''-hidroxibenzoato), 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina, 4'-O-metil-robinetidinol-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina e 4'-O-metil-robinetidinol-(4 α →8)-4'-O-metil-epigalocatequina.

Sua casca é rica em taninos de grande ação estíptica, aos quais se deve a ação farmacológica, sendo amplamente empregada na medicina caseira na maioria das regiões do país. O seu decocto é indicado contra leucorréia, hemorragias, diarreia, hemorróidas, para limpeza de ferimentos e na forma de gotas contra conjuntivite. É indicado o chá de sua casca em uso externo contra hemorragias uterinas, corrimento vaginal, feridas ulcerosas e para pele excessivamente oleosa (LORENZI, 2000; LORENZI et al., 2002).

Segundo estudo de Toledo (2002), diferentes subfrações de extrato acetona:água (7:3; v/v) da casca de *S. adstringens* demonstraram alta atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Concentração Inibitória Mínima abaixo de 1000 µg/mL). No entanto, diferentes taninos condensados derivados de galocatequina e epigalocatequina não apresentaram atividade antimicrobiana quando testados, isoladamente, no mesmo estudo.

Estudo de Neves *et al.* (1992) demonstrou que o extrato aquoso da casca de *S. adstringens* apresenta efeito cicatrizante significativo. Outros estudos demonstraram que o extrato aquoso também apresenta propriedades antiinflamatória, analgésica e protetora da mucosa gástrica (REBECCA et al., 2003). Rebecca *et al.* estudaram a toxicidade de diferentes doses orais do extrato aquoso, apresentando 2,7 g/kg como dose letal oral e que as concentrações na faixa de 800 a 1600 mg/kg são concentrações tóxicas a longo prazo, isto é, 30 dias de estudo, acarretando em perda de peso, involução tímica e aumento da concentração plasmática de glicose e de aspartato-aminotransferase (REBECCA et al., 2002; REBECCA et al., 2003).

É apontado que a coleta da casca de *S. adstringens* está sendo feita de forma desordenada, sem critério de escolha das árvores, o que coloca a espécie sob risco de extinção, caso a expansão agrícola e urbana intensifiquem-se. Verifica-se que a coleta da casca em caules finos provoca deformações estruturais na planta, tornando-as frágeis fisicamente, o que faz com que elas se quebrem facilmente com a ação dos ventos. A coleta da casca pode também afetar a longevidade da planta, pois nela estão presentes os tecidos condutores da seiva elaborada (floema), que funciona como protetora do tecido meristemático do câmbio, responsável pelo crescimento

secundário, prejudicando, assim, o desenvolvimento da planta (BORGES FILHO e FELFILI, 2003; GUEDES, 1993).

É possível obter a casca através de podas e cortes e, fazendo isso, ao mesmo tempo, propicia-se o crescimento das árvores que serviram para a coleta. Unidades de conservação encontram-se sem a devida fiscalização, estrutura de proteção e de aplicação dos objetivos para os quais foram criadas, como os de conservação *in situ* da biota existente, educação ambiental e pesquisas ecológicas, facilitando o acesso para a coleta da casca (BORGES FILHO e FELFILI, 2003).

2.3. Considerações

A anti-sepsia é um processo de desinfecção, ou seja, redução da carga microbiana de tal forma que o material tratado deixa de representar um risco de disseminação de microrganismos e, conseqüentemente, de moléstias infecciosas no caso de patógenos empregando-se, geralmente, substâncias químicas, os anti-sépticos, que, por sua vez, devem destruir ou inibir os microrganismos em tecidos vivos. Por esta razão, devem ser substâncias de baixa toxicidade (ALTERTHUM e CARVALHAL, 1999).

Os desinfetantes e anti-sépticos, entre outras características, devem possuir alta eficácia germicida, entendendo-se por isto, ser de efeito rápido, ter amplo espectro antimicrobiano, ação prolongada, apresentar estabilidade química e ser inodoro ou ter odor agradável (ALTERTHUM e CARVALHAL, 1999).

É reconhecido que uma anti-sepsia regular e adequada é de grande importância no controle de infecções, embora ainda apresente alguns desafios, como a eficácia do produto e a incorporação do ato na rotina das pessoas. Profissionais, instituições e governos, inclusive o brasileiro, regulamentam procedimentos de anti-sepsia, entretanto, poucas são as regulamentações baseadas em pesquisas científicas e, muitas vezes, os procedimentos de anti-sepsia apresentam lacunas de quando e como a mesma deve ser feita (LARSON et al., 1995; WENDT, 2001; SATTAR et al., 2002).

A atividade dos produtos anti-sépticos contra bactérias, nem sempre refletem atividade contra fungos, protozoários ou vírus, uma vez que estas células eucarióticas são maiores e mais complexas que as de bactérias e que os vírus são menores e por vezes têm a habilidade de se manterem nos sulcos da pele (WENDT, 2001).

Extratos de plantas ou seus componentes vêm despertando interesse no uso como anti-sépticos e agentes antimicrobianos em dermatologia principalmente devido ao aumento da resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos utilizados até então (NORTON, 2000; AUGUSTIN e

HOCH, 2004; BLASCHEK et al., 2004). Esta alternativa foi baseada em princípios de convenções internacionais, das quais fez parte o Brasil, como a Atenção Primária em Saúde, firmada na Conferência da OMS em Alma-Ata, no ano de 1978 e na de Chiang-Mai, em 1988, reafirmadas na Conferência Mundial de Saúde de 1997. A OMS recomenda que as tecnologias de saúde devam ser postas ao alcance de toda a comunidade, com segurança científica, aceitabilidade social e sustentabilidade econômica (OMS, 1980; AKERELE, 1988; WHO, 2006).

Estudo prévio, ainda não publicado, indicou que as folhas de *M. cauliflora* apresentam alto teor de compostos fenólicos orientando a avaliação da atividade antimicrobiana desta droga vegetal, visto, inclusive, sua ampla disponibilidade pelo território nacional. Outra droga vegetal disponível no Brasil e rica em composição fenólica é o *S. adstringens*, cuja casca, como apresentado anteriormente, é utilizada pela população para diversas finalidades, inclusive a antimicrobiana.

Sendo assim, tornou-se de grande interesse o estudo destas drogas vegetais para que, de forma eficaz e segura, fosse possível desenvolver produtos anti-sépticos com a propriedade de controlar a transmissão de microrganismos e combater infecções.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens* e a atividade anti-séptica de preparações cosméticas contendo os mesmos, avaliando o potencial citotóxico, a estabilidade das preparações e realizando controle de qualidade microbiológico.

Para isto, foram necessários os seguintes Objetivos Específicos:

3.2. Objetivos Específicos

- Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários das drogas vegetais *M. cauliflora* e *S. adstringens* por meio de reações químicas de caracterização.
 - Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos de *M. cauliflora* e *S. adstringens*.
 - Doseamento do teor de metabólitos secundários, prováveis responsáveis pela atividade antimicrobiana, dos extratos de *M. cauliflora* e *S. adstringens*.
 - Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica dos extratos de *M. cauliflora* e *S. adstringens*.
 - Desenvolvimento das preparações de sabonete líquido, sabonete em barra e loção com os referidos extratos.
 - Avaliação da atividade anti-séptica das preparações desenvolvidas.
 - Avaliação da estabilidade e controle de qualidade microbiológico das preparações que se apresentaram eficazes para os propósitos desejados.
-

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Solventes, reagentes e meios de cultura

- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) – Vetec
 - 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) – Merck
 - acetato de chumbo – Reagen
 - acetato de etila – Labsynth
 - acetona – Labsynth
 - ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico (MOPS) – Acros Organics
 - ácido bórico – Labsynth
 - ácido clorídrico – Labsynth
 - ácido fosfomolibdico – Vetec
 - ácido gálico – Vetec
 - ácido oxálico – Labsynth
 - ácido sulfúrico – Labsynth
 - ácido tânico – Vetec
 - ágar desidratado – Acumedia
 - água destilada
 - água MILI-Q
 - água oxigenada - Labsynth
 - Alamar Blue™ – Biosource International
 - ampicilina – Medley genéricos, comprimidos de 500 mg de ampicilina
 - anfotericina B de *Streptomyces* – Sigma-Aldrich
 - anidrido acético - Labsynth
 - *p*-anisaldeído – Carlo Erba
 - azul de metileno – Labsynth
 - carbonato de sódio – Vetec
 - cloreto de alumínio – Reagen
 - cloreto férrico – Reagen
 - clorofórmio – Labsynth
 - d-glicose anidra – Labsynth
 - dimetilsulfóxido – Labsynth
 - etanol – Labsynth
-

- éter de petróleo – Labsynth
 - éter etílico – Labsynth
 - extrato de *Ginkgo biloba* – Santos Flora
 - fosfato dibásico de sódio – Labsynth
 - fosfato monobásico de sódio – Labsynth
 - gelatina – Kraft Foods
 - glicerina – Labsynth
 - hidróxido de amônia – Labsynth
 - hidróxido de sódio – Labsynth
 - magnésio metálico – Reagen
 - meio ágar Sabouraud – Acumedia
 - meio ágar Vogel-Johnson – Acumedia
 - meio ágar-cetrimida – Acumedia
 - meio ágar-EMB – Acumedia
 - meio ágar-McConkey – Acumedia
 - meio ágar-Mueller-Hinton – Acumedia
 - meio ágar-TSI – Acumedia
 - meio ágar-verde brilhante – Acumedia
 - meio ágar-XLD – Acumedia
 - meio Casoy – Acumedia
 - meio de infusão de cérebro e coração (BHI) – Biobrás
 - meio RPMI-1640 – Sigma-Aldrich
 - meio selenito cistina – Acumedia
 - meio Tetracionato – Acumedia
 - meio tioglicolato – Acumedia
 - metanol – Labsynth
 - n-butanol – Labsynth
 - n-propanol – Labsynth
 - peptona de carne obtida por digestão de pancreatina – Merck
 - polissorbato 80 – Labsynth
 - reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand
 - resazurina – Sigma-Aldrich
 - rutina – Vetec
-

- saponina – Vetec
- solução de iodo
- solução de Telurito
- sulfato de sódio anidro – Labsynth
- tungstato de sódio di-hidratado – Vetec
- vitamina C – Vetec
- zinco metálico – Reagen

4.1.2. Material vegetal

As folhas de *Myrciaria cauliflora* foram coletadas na cidade de São Carlos, estado de São Paulo (posicionamento geográfico: 22°01'16,6"S; 47°53'57,0"W) e, após as exsiccatas desta espécie serem identificadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara, SP, um exemplar foi depositado no Herbário da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ – USP – Piracicaba, SP (ESA n° 96038). As folhas foram coletadas nos meses de abril, agosto, outubro e dezembro de 2005, ou seja, os meses referentes às quatro estações do ano: outono, inverno, primavera e verão, respectivamente.

As folhas foram secas durante quatro dias em estufa de ar circulante a 40 °C, pulverizadas em moinho de facas e armazenadas em local fresco sem umidade.

A casca seca e pulverizada de *Stryphnodendron adstringens* foi obtida da empresa Sítio da Mata, Cássia dos Coqueiros-SP no primeiro semestre de 2005. O laudo (Anexo A) contém o lote do produto e a identificação do responsável. Foram armazenadas em local fresco sem umidade.

4.1.3. Cepas padrão

Os microrganismos selecionados para o projeto, obtidos do American Type Culture Collection (ATCC), são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Cepas de bactérias e leveduras utilizadas no trabalho

Microrganismo	ATCC	Observações
<i>Bacillus subtilis</i>	9362	Gram-positiva
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Gram-positiva
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	Gram-positiva
<i>Escherichia coli</i>	10536	Gram-negativa
<i>Candida albicans</i>	64548	Levedura
<i>Candida parapsilosis</i>	22019	Levedura
<i>Candida tropicalis</i>	750	Levedura

4.1.4. Células

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas células de macrófagos da linhagem J774.

4.1.5. Equipamentos

- Agitador – Superohm G-25
- Autoclave vertical – Fabbe 103
- Balança analítica – Micronal AB 204
- Balança de infra-vermelho – Mettler LP12
- Balança semi-analítica – Owa Labor
- Banho de aquecimento – Fistom
- Bomba de vácuo – Motores Elétricos Brasil
- Câmara de fluxo laminar – Veco
- Câmara de ultravioleta 254 nm
- Centrifuga – Excelsa Baby
- Cilindros de aço de 6 mm de diâmetro interno
- Espectrofotômetro – Shimadzu-1603
- Estufa de ar circulante – Fanem
- Estufa de CO₂ – Thermo Electron Corporation – Forma Series II Hepa Class 100
- Estufa de esterilização – Fanem 315 SE
- Estufa de incubação bacteriológica – Olidef cz
- Evaporador rotatório – Marconi TE120

- Liofilizador – Solab
- Microscópio – Carl Zeiss Jena
- Moinho de bola – Maneso&Ranieri
- Moinho de facas - Fabbe
- Peagômetro – Micronal B374
- Picnômetro – Satélite
- Placa de alumínio de gel de sílica F₂₅₄ – Merck
- Placas de 96-wells – TPP 92096
- Reômetro – Brookfield DV III + V 5.0 RV
- Templates de aço (peça única) com 6 orifícios de 6 mm de diâmetro interno
- Vidrarias em geral
- Vórtex – Biomixer Mult-Mixer MVS-1

4.2. METODOLOGIAS

4.2.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.2.1.1. Granulometria

Foram pesadas amostras, em triplicata, de 25,00 g das folhas de *M. cauliflora*, pulverizadas em moinho de bola e em moinho de facas, e de *S. adstringens* e colocadas sobre os tamises de abertura nominal da malha de 1700, 355, 250, 180 e 150 µm com tampa e recipiente coletor. Os tamises foram colocados em dispositivo mecânico durante 30 minutos. Foram pesados, cuidadosamente, os pós remanescentes em cada tamis e recolhidos no recipiente coletor. Os resultados equivalem à média de três determinações (FARMACOPÉIA, 1988).

4.2.1.2. Determinação do pH

Foram preparadas três soluções aquosas a 1% com cada droga coletada de *M. cauliflora* e *S. adstringens*. Em erlenmeyer, 99,00 g de água foram pesados e colocados sobre uma chapa-elétrica para ebulir durante 5 minutos. Em seguida, a água foi vertida sobre 1,00 g das drogas, o recipiente foi fechado e deixado em infusão por cerca de 15 minutos. Após este tempo, as misturas foram filtradas, e, depois de esfriarem, foi feita a leitura do pH em peagômetro calibrado em pH de 4 a 7. Os resultados equivalem à média de três determinações (FARMACOPÉIA, 1988).

4.2.1.3. Determinação do teor de umidade

Para determinar o teor de umidade de folhas de *M. cauliflora*, coletadas nas diferentes estações, e de casca de *S. adstringens*, foi utilizado o método de perda por dessecação em balança com infravermelho. Neste método, 4,0000 g das drogas foram pesados na balança com infravermelho e submetidos a temperatura de 110 °C pelo período de aproximadamente uma hora. Após este período, foi feita a leitura do peso, a qual foi repetida a cada uma hora até que o peso das amostras não variasse mais do que 0,25%. Os valores foram expressos em porcentagem (%; p/p) e equivalem à média de três determinações (VIGO et al., 2004, com modificações).

4.2.1.4. Determinação do teor de extrativos

Foi pesado 1,0000 g de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens* sendo submetido à decocção com 100,00 g de água destilada durante 10 minutos. Após resfriamento, o volume foi completado para 100 mL, a mistura foi filtrada e os primeiros 20 mL foram desprezados. Do restante, foram pesados 20,00 g, sendo evaporados em banho de aquecimento até secura, colocados em estufa a 105 °C por 2 h, resfriados em dessecador e pesados. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de três determinações, relativa à massa inicial de amostra (FARMACOPÉIA, 1988).

4.2.1.5. Determinação do teor de cinzas totais

Cadinhos de porcelana foram calcinados em mufla a 450 °C por 30 minutos, resfriados e seu peso foi determinado em balança analítica. A diferentes cadinhos foi adicionada uma amostra de 3,0000 g de cada droga que foram então incinerados e submetidos à calcinação em mufla a 450 °C por 2 h. Após arrefecimento em dessecador, foram pesados até peso constante. Os valores foram expressos em porcentagem de peso de cinzas na droga (%; p/p) e equivalem à média de três determinações (FARMACOPÉIA, 1988).

4.2.2. ANÁLISES FITOQUÍMICAS

4.2.2.1. Triagem fitoquímica preliminar das principais classes de metabólitos secundários

A triagem fitoquímica preliminar das principais classes de metabólitos secundários das folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens* foi realizada segundo as metodologias estabelecidas por Costa (1994), Souza et al. (2003) e Simões et al. (2004).

4.2.2.1.1. Pesquisa de alcalóides

Foram colocados 5,00 g de folhas de *M. cauliflora*, coletadas nas diferentes épocas do ano, e de casca de *S. adstringens* em gral, alcalinizando com carbonato de sódio a 10% e, posteriormente, foram adicionados 25 mL de clorofórmio. A mistura foi filtrada em funil de separação através de papel previamente embebido em clorofórmio e agitada com 7 mL de ácido clorídrico 2%. A camada ácida foi separada e com ela as reações de caracterização foram realizadas colocando uma gota do reagente de Dragendorff, Bouchardat, Mayer ou Bertrand ao lado de outra da solução ácida em lâmina de microscópio e depois unindo-as. Foi observado como resultado positivo as precipitações sobre fundo escuro.

4.2.2.1.2. Pesquisa de antraquinonas

4.2.2.1.2.1. Antraquinonas livres

Foi agitado 1,00 g de folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens* com 10 mL de éter etílico, filtrando posteriormente. À solução etérea, foi adicionado 1 mL de amônia diluída, agitando. A camada aquosa deve tornar-se rósea para resultado positivo.

4.2.2.1.2.2. Glicosídeos antraquinônicos (reação de Borntrager)

Aos pós anteriormente obtidos, secos, foram adicionados 20 mL de água, fervendo por 5 minutos. A mistura foi resfriada e filtrada, juntando 10 mL de ácido clorídrico e 3 mL de água oxigenada 30% ao filtrado; após ferver por 5 minutos, foi esfriada e filtrada, sendo feitas duas extrações com 5 mL de éter etílico. Foram unidas as fases etéreas agitando com 3 mL de amônia diluída. Para resultado positivo, a camada aquosa deve tornar-se rósea.

4.2.2.1.3. Pesquisa de flavonóides

Foram tratados 3,00 g de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens* com 20 mL de éter de petróleo sob aquecimento em banho de aquecimento. Após filtrados, foram adicionados 20 mL de metanol, aquecendo em banho de aquecimento, com posterior filtração e evaporação. Ao final, o resíduo foi recuperado com 10 mL de etanol.

4.2.2.1.3.1. Reação de Shinoda

Foram colocados 1 mL do extrato final em tubo de ensaio e foi adicionado um fragmento de magnésio metálico, foram colocadas gotas de ácido clorídrico concentrado. Após o desprendimento de hidrogênio nascente, há o aparecimento de coloração rósea ou vermelha.

4.2.2.1.3.2. Reação de Taubock

Foram evaporados, em banho de aquecimento, 3 mL do extrato até *secura*, esfriando e umedecendo o resíduo com algumas gotas de acetona. Foram adicionados alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Foram evaporados, em banho de aquecimento, novamente, até a *secura* evitando aquecimento prolongado. O resíduo foi dissolvido em 5 mL de éter etílico e a mistura foi observada sob luz ultravioleta (254 nm). Em caso positivo, ocorre aparecimento de fluorescência amarelo esverdeada.

4.2.2.1.3.3. Reação de Pew

Foram evaporados, em banho de aquecimento, 3 mL do extrato em tubo de ensaio até a *secura*; ao resíduo foram adicionados 3 mL de metanol e uma pequena porção de zinco metálico. Foram colocadas algumas gotas de ácido clorídrico concentrado. Deve aparecer coloração vermelha.

4.2.2.1.3.4. Reação do cloreto férrico

Foram adicionadas, a 1 mL do extrato, algumas gotas de cloreto férrico a 2%. Deve aparecer coloração verde ou amarelo ou ainda violáceo dependendo do flavonóide presente.

4.2.2.1.3.4. Reação do cloreto de alumínio

Foram umedecidas áreas diferentes de papel de filtro com o extrato. Foi colocada sobre uma das manchas uma gota de cloreto de alumínio a 5% em etanol. Deve-se observar sob luz ultravioleta a intensificação da fluorescência ou fluorescência verde-amarelada.

4.2.2.1.4. Pesquisa de glicosídeos cardiotônicos

Foram adicionados 5,00 g de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens* a 50 mL da solução etanol:água 70% e esta foi submetida a aquecimento em banho de aquecimento por 10 minutos, completando o volume para 30 mL após resfriamento. Ao filtrado, foram adicionados 30 mL de água e 15 mL de acetato de chumbo a 10%. Após agitação e repouso, a

mistura foi filtrada e foi adicionado 10 mL de fosfato ácido de sódio a 10%, agitando bem para filtrar. O filtrado foi colocado em um funil de separação para fazer duas extrações com 15 mL de clorofórmio. As fases orgânicas foram unidas, tratando com sulfato de sódio anidrido e evaporando até a metade do volume.

4.2.2.1.4.1. Reação de Liebermann-Burchard (reação com o núcleo esteroidal)

Foram evaporados 2 mL do extrato em um tubo de ensaio. Ao resíduo foi adicionado 1 mL de anidrido acético e 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Deve aparecer coloração castanha.

4.2.2.1.5. Pesquisa de saponinas

Foram fervidos 2,00 g de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens* com 10 mL de água destilada durante 3 minutos, filtrando através de algodão para um tubo de ensaio, o qual foi agitado vertical e vigorosamente durante 20 segundos. Após repouso de 20 minutos, ainda deve existir espuma no tubo e esta não deve desaparecer com a adição de 1 mL de HCl 2 N.

4.2.2.1.5.1. Purificação da amostra

Amostra de extrato de casca de *S. adstringens* obtido com etanol 50% foi ressuspensa em 20 mL de água destilada e foi feita uma partição líquido-líquido com 20 mL de *n*-butanol por três vezes. As fases foram separadas e a uma alíquota da fração butanólica foi adicionado acetato de etila, com posterior centrifugação para verificar a formação de precipitado (NAMIESIK e GORECKI, 2000). Ambas as frações, aquosa e butanólica, foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) em placa de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄, eluída no sistema clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água (5:6:1:4; v/v, fase orgânica) e revelada com anisaldeído sulfúrico, utilizando saponina como marcador.

4.2.2.1.6. Pesquisa de taninos

Foram preparados decoctos com 5,00 g de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens* em 100 mL de água destilada.

4.2.2.1.6.1. Reação da gelatina

A 2 mL da solução extrativa foram adicionadas 2 gotas de ácido clorídrico (HCl) diluído e solução de gelatina 2,5% gota a gota. A formação de precipitado demonstra reação positiva para taninos.

4.2.2.1.6.2. Reação com sais de ferro

A 2 mL da solução extrativa foram adicionados 10 mL de água destilada e 2-4 gotas de solução de cloreto férrico (FeCl_3) a 1% em metanol. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto a coloração verde indica a presença de taninos condensados.

4.2.2.1.6.3. Reação com acetato de chumbo

A 5 mL da solução extrativa foram adicionados 10 mL de solução de ácido acético 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo 10%. A formação de precipitado esbranquiçado indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

4.2.2.2. Perfil cromatográfico

Para realizar a cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) das folhas de *M. cauliflora* coletadas nas quatro estações do ano e da casca de *S. adstringens*, previamente, foi preparado decocto por 15 minutos de 5,00 g de cada droga com 100 mL de água destilada. Os decoctos obtidos foram filtrados e submetidos à extração líquido-líquido com acetato de etila (20 mL, 3 vezes). A fração aquosa e orgânica foram, posteriormente, evaporadas em banho de aquecimento e ressuspensas em metanol para

serem analisadas por CCDC. Os extratos obtidos de ambas as drogas em estudo também foram analisados por CCDC.

A fase móvel foi composta pela fase orgânica da mistura clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água (5:6:1:4; v/v). A fase estacionária utilizada foi placa de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄. As amostras foram aplicadas em duplicata e reveladas com cloreto férrico 1% em metanol e a outra com anisaldeído sulfúrico, a qual foi aquecida e observada sob luz ultravioleta (UV) de 254 nm.

4.2.2.3. Perfil espectrofotométrico na região de ultravioleta

Foram pesados, exatamente, 10,00 mg de ácido gálico, de ácido tânico e de cada extrato, dissolvidos em 1 mL de água:metanol (1:1; v/v) e diluídos 1:1000 em metanol. A concentração final das soluções de leitura das substâncias padrão e dos extratos foi de 0,01 mg/mL. A leitura de absorbância foi realizada em faixa de 190 a 400 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro Shimadzu-1603 com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As amostras foram lidas frente a branco de metanol (CHOI et al., 2006).

4.2.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O processo de obtenção dos extratos foi o de percolação, segundo o Processo Geral P, descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 1926. Foram utilizados como solventes extratores etanol 50% (EtOH 50), etanol 70% (EtOH 70), acetona:água (7:3; v/v) (Ac:H₂O) e clorofórmio (CHCl₃). Cada percolação foi realizada com 20,00 g de folhas de *M. cauliflora* e 20,00 g de casca de *S. adstringens*.

Todos os extratos assim obtidos foram rotaevaporados. Após rotaevaporação, o fim da secagem do extrato clorofórmico foi realizado a temperatura ambiente, enquanto que os outros extratos foram liofilizados.

Os extratos obtidos foram pesados e armazenados em dessecador para evitar que incorporassem umidade.

4.2.4. ANÁLISE QUANTITATIVA

4.2.4.1. Determinação do teor de fenóis totais

A análise do extrato foi feita em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 760 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, segundo metodologias extraídas de AOAC (1984) e TEIXEIRA et al. (1990).

Como branco foi utilizada solução obtida pela mistura entre 0,5 mL do reagente de Folin-Denis e 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio, ajustando o volume a 10 mL com água destilada.

A concentração de fenóis totais do extrato foi determinada utilizando uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida de ácido tânico. Os resultados foram expressos, pela média de três determinações, em porcentagem da concentração de fenóis totais frente à concentração inicial de leitura das amostras.

4.2.4.1.1. Preparo da solução padrão de ácido tânico

Foram dissolvidos 0,2000 g de ácido tânico em água destilada, completando o volume para 10 mL; desta primeira solução, 100 µL foram diluídos em 20 mL de água. Aliquotas de 0,2 a 0,8 mL desta última solução, recém-preparada, foram adicionadas a 7 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de Folin-Denis. Após 3 minutos de agitação, foi adicionado 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio e o volume foi ajustado para 10 mL com água destilada (as concentrações de leitura foram 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µg/mL). A leitura foi feita 30 minutos após a reação colorimétrica, no escuro, a que a solução foi submetida, em triplicata.

4.2.4.1.2. Preparo das soluções de amostra

Foi realizada a determinação de fenóis totais de extratos de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens* obtidos por maceração, por dois dias, com etanol 50%, rotaevaporados e secos a temperatura ambiente. Com os extratos de etanol 50%, etanol 70%, acetona 7:3 e clorofórmio, obtidos com as folhas de *M. cauliflora* e casca de *S. adstringens* também foi feita a determinação de fenóis totais.

Foram dissolvidos 0,2000 g dos extratos em água destilada completando o volume para 10 mL; desta primeira solução, 100 µL foram diluídos em 20 mL de água. Aliquotas de 0,2 a 0,5 mL desta solução, recém-preparada, foram adicionadas a 7 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de Folin-Denis. Após 3 minutos de agitação, foi adicionado 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio e ajustou-se o volume a 10 mL com água destilada. A leitura foi feita 30 minutos após a reação colorimétrica a que a solução foi submetida, em triplicata.

4.2.4.2. Determinação do teor de flavonóides totais

A determinação do teor de flavonóides foi conduzida para amostras obtidas das drogas (coletadas nas quatro estações) e dos extratos de folhas de *M. cauliflora*. Foram pesados, exatamente, 20,00 mg de todas as amostras e foram adicionados 2 mL de metanol 80%. Após 2 h, as misturas foram centrifugadas e o volume do sobrenadante completado para 10 mL com metanol 80%. A 2 mL desta última solução foram adicionados 2 mL de uma solução de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2% em metanol. Depois de 15 minutos, foi realizada a leitura espectrofotométrica em 430 nm utilizando uma solução de 2 mL de amostra adicionada de 2 mL de metanol 80% como branco. Rutina foi utilizada como padrão na construção da curva analítica, nas concentrações de 30, 40, 50, 60 e 70 µg/mL, em triplicata (DJERIDANE et al., 2006).

4.2.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.2.5.1. Verificação da atividade antioxidante por CCD

Foi aplicada uma alíquota de rutina e de cada um dos quatro extratos obtidos a partir de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens*, ressuspendidos em metanol, sobre placa de alumínio de gel de sílica F₂₅₄. A fase móvel foi composta pela fase orgânica da mistura clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água (5:6:1:4; v/v). A placa foi revelada com solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) a 0,2% em metanol.

As substâncias com atividade anti-radicalar aparecem na forma de manchas amareladas sobre fundo violeta (SANCHES, 2004).

4.2.5.2. Determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres

O potencial de atividade antioxidante do extrato foi determinado baseado na atividade seqüestrante da solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (MACHADO, 2005; FALCÃO et al., 2006).

Foram utilizados ácido gálico, rutina e vitamina C, na concentração de 250 µg/mL em metanol, como substâncias com reconhecida atividade antioxidante (BROGGINI, 2006).

O extrato de *Ginkgo biloba* L., adquirido da empresa Santosflora (Anexo B) também foi utilizado neste teste, na concentração de 250 µg/mL em metanol, por ter uma reconhecida atividade antioxidante (FALCÃO et al., 2006).

Os testes foram feitos com os quatro extratos obtidos de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens*, todos na concentração de 250 µg/mL, em metanol.

A 1 mL das soluções de amostra foram adicionados 2,5 mL da solução de DPPH 0,004% em metanol. As soluções foram agitadas em vórtex e mantidas no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi feita posteriormente a este período, a 517 nm, em espectrofotômetro, com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A solução utilizada como branco consistiu em 1 mL da solução metanólica de amostra e 2,5 mL de metanol. Foi utilizada solução de 1 mL de metanol e 2,5 mL de solução de DPPH como controle negativo.

A atividade anti-radicalar foi calculada como a porcentagem de descoloração do radical DPPH, segundo a equação:

$$\% = 100. (1 - Aa - Ad),$$

onde:

Aa = absorbância da amostra;

Ad = absorbância da solução de DPPH (controle negativo).

4.2.6. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.2.6.1. Preparo dos antimicrobianos

O antibiótico ampicilina foi utilizado como substância controle, uma vez que as cepas bacterianas utilizadas são sensíveis à sua ação. Procedeu-se a dissolução de 500 mg de ampicilina em 1000 mL de água destilada diluindo 1:10 em água destilada, de forma que a concentração desta solução de estoque fosse de 50 µg/mL.

Anfotericina B foi o antifúngico usado como controle para as cepas de *Candida* sp. Foram dissolvidos 16 mg de anfotericina B em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) sendo diluídos, posteriormente, duas vezes na proporção 1:5 em meio RPMI-1640, de forma que a concentração da solução de estoque fosse 32 µg/mL.

4.2.6.2. Solução estoque de extrato

Foram ressuspensos 100 mg dos quatro diferentes extratos obtidos das duas drogas em estudo em 1 mL de DMSO. A partir destas soluções, foram feitas as diluições necessárias para cada um dos testes de avaliação da atividade antimicrobiana, como indicado em cada item referente aos testes.

4.2.6.3. Preparo da suspensão de bactéria

Uma colônia de cada cepa bacteriana utilizada foi inoculada em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubada a 37 °C durante 24 horas. A partir deste inóculo foi realizada turvação até escala 0,5 de McFarland (cerca de $1,5 \cdot 10^8$ células/mL) em caldo BHI.

4.2.6.4. Preparo da suspensão de levedura

Cinco colônias com diâmetro de cerca de 1 mm de cultura de 24 h a 35 °C foram ressuspensas em 5 mL de solução salina 0,9% esterilizada e, após agitada em vórtex por 15 minutos, esta suspensão foi utilizada para obtenção de suspensão de turvação na escala 0,5 de McFarland ($1 \cdot 10^6$ a $5 \cdot 10^6$ leveduras/mL) em salina.

4.2.6.5. Teste de difusão em ágar

O teste de difusão em ágar foi realizado baseado na Norma M2-A8 do National Committee For Clinical Laboratory Standards, atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), porém com modificações descritas neste item (NCCLS, 2003a).

As suspensões bacterianas preparadas anteriormente foram diluídas 1:100 com base na quantidade de ágar Müeller Hinton colocado nas placas. Sobre estes meios, foram adicionados 50 µL das amostras dos extratos das folhas de *M. cauliflora* diluídos 1:1 em BHI utilizando “templates” com 6 orifícios de 6 mm de diâmetro interno. Foi observado que as amostras dos extratos das cascas de *S. adstringens* não se difundiam facilmente do “template” para o ágar, portanto, os testes de difusão em ágar foram realizados através de orifícios feitos no ágar com cilindros de aço de 6 mm de diâmetro interno, colocando 50 µL das amostras. As soluções de todos os extratos foram aplicadas na concentração de 50 mg/mL. Antes da incubação a 37 °C por 24 h, as placas foram deixadas duas horas a temperatura de 4 °C para permitir a difusão das amostras. Foram utilizados 20 µL de DMSO como controle negativo e 20 µL de ampicilina como controle positivo. Após a incubação, o diâmetro do halo de inibição foi considerado como medida do poder inibitório da amostra contra o microrganismo testado. Os testes foram feitos em triplicata.

4.2.6.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima por meio do método de diluição em microplaca e Concentração Bactericida Mínima

Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando diluição em microplaca, segundo a Norma M7-A6 do National Committee For Clinical Laboratory Standards, atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), porém com modificações descritas neste item (NCCLS, 2003b).

Em todos os poços foram colocados 100 µL de BHI.

Os extratos foram diluídos 1:5 em BHI a partir da solução estoque de 100 mg/mL, obtendo-se soluções teste de 20 mg/mL. Foram pipetados 100

μL de cada uma destas soluções nos respectivos poços da primeira linha da microplaca (colunas 1 a 8). Um poço foi utilizado para adição de 100 μL de DMSO:BHI (1:1; v/v) para controle do solvente (coluna 9) e em outro poço foram colocados 100 μL da solução de ampicilina anteriormente preparada (coluna 10). Foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 100 μL do poço anterior para o poço subsequente. A coluna 11 foi utilizada para controle positivo do crescimento bacteriano e para controle negativo de esterilidade do meio. Na coluna 12 foram colocados 50 μL da solução teste dos extratos para controle microbiológico destes. A todos os poços, exceto os de controle de esterilidade do meio e microbiológico dos extratos, foram adicionados 100 μL da suspensão bacteriana diluída 1:200 em BHI, sendo que a concentração final foi de $2,5 \cdot 10^5$ células/mL (Figura 6). As microplacas foram incubadas por 24 h a 37 °C. A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela adição de 20 μL de uma solução aquosa de 0,01% de resazurina após incubação a 37 °C por 1 h, e foi determinada como concentração inibitória mínima a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em triplicata.

Foi realizada uma subcultura de cada microplaca, utilizando ágar Müeller Hinton em placa de Petri de 12 cm de diâmetro, determinando o valor da concentração bactericida mínima. As placas de Petri foram incubadas por 24 h a 37 °C. A concentração bactericida mínima foi então observada pela ausência ou presença de crescimento bacteriano.

4.2.6.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de diluição em microplaca e Concentração Fungicida Mínima

Foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* utilizando diluição em microplaca, segundo a Norma M27-A2 do National Committee For Clinical Laboratory Standards, atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), porém com modificações descritas neste item (NCCLS, 2002).

O meio de cultura em caldo apropriado para ser utilizado para cultivo de *Candida* sp é o RPMI-1640 contendo glutamina e vermelho de fenol, mas sem bicarbonato, suplementado de ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico (MOPS) na concentração de 0,165 mol/L, com pH 7,0 e esterilizado por filtração, enquanto que o meio sólido apropriado é Sabouraud.

Foram colocados 100 µL de meio RPMI-1640 já completo em cada poço da microplaca. No primeiro poço da coluna 1 a 8 foram colocados 100 µL das soluções de extrato diluídas 1:5 em RPMI a partir da solução estoque de 200 mg/mL em DMSO. Uma alíquota de 100 µL do solvente foi colocada no primeiro poço da coluna 9 e 100 µL da solução anteriormente preparada de anfotericina B foram colocados na linha H. Foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 100 µL do poço anterior para o poço subsequente. Metade da coluna 11 foi utilizada para controle positivo do crescimento de levedura e a outra para controle negativo de esterilidade do meio. Na coluna 12 foram colocados 100 µL da solução teste dos extratos para controle microbiológico destes (Figura 6). A partir da suspensão de cerca de $5 \cdot 10^6$ células/mL de levedura (escala 0,5 McFarland) foi realizada uma diluição 1:10 e uma alíquota foi retirada apenas para contagem do número de células em Câmara de Neubauer. Posteriormente, foi realizada a diluição necessária para ser obtida uma suspensão de $5 \cdot 10^3$ células/mL, da qual foram aplicados 100 µL nos respectivos poços das microplacas (concentração final de $2,5 \cdot 10^3$ células/mL) após a diluição seriada das amostras e dos controles. As microplacas foram incubadas por 48 h a 25 °C sob agitação constante. A inibição do crescimento fúngico foi evidenciada pela adição de 20 µL de uma solução aquosa a 2% de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) após incubação a 30 °C por cerca de 3 h, e foi determinada como concentração inibitória mínima a menor concentração que inibiu o crescimento fúngico, evidenciado pela presença de coloração rósea no fundo do poço. Os testes foram realizados em triplicata.

Foi realizada uma subcultura de cada microplaca, utilizando meio Sabouraud-ágar em placa de Petri de 12 mm diâmetro, determinando o valor da concentração fungicida mínima. As placas de Petri foram incubadas por

24 h a 25 °C. A concentração fungicida mínima foi então observada pela ausência ou presença de crescimento da levedura.

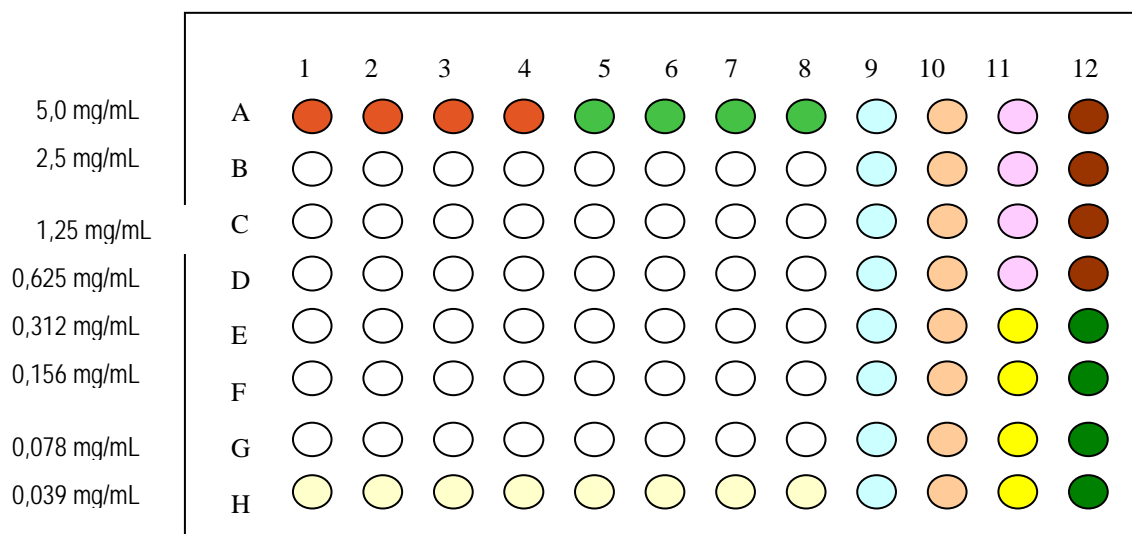


Figura 6: Esquema da microplaca utilizada para determinação da concentração inibitória mínima para bactérias e leveduras*, separadamente (*a primeira concentração é de 10 mg/mL com subsequente diluição 1:1).

- ampicilina
- anfotericina B
- Controle negativo DMSO
- Controle negativo meio de cultura
- Controle negativo extratos da casca de *S. adstringens* (A-EtOH 50; B-EtOH 70; C-Ac:H₂O; D-CHCl₃)
- Controle negativo extratos das folhas de *M. cauliflora* (E-EtOH 50; F-EtOH 70; G-Ac:H₂O; H-CHCl₃)
- Controle positivo microrganismo
- Coluna 1: extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens*
Coluna 2: extrato EtOH 70 de casca de *S. adstringens*
Coluna 3: extrato Ac:H₂O de casca de *S. adstringens*
Coluna 4: extrato CHCl₃ de casca de *S. adstringens*
- Coluna 5: extrato EtOH 50 de folhas de *M. cauliflora*
Coluna 6: extrato EtOH 70 de folhas de *M. cauliflora*
Coluna 7: extrato Ac:H₂O de folhas de *M. cauliflora*
Coluna 8: extrato CHCl₃ de folhas de *M. cauliflora*

4.2.6.8. Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de macrodiluição e da concentração bactericida mínima

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de macrodiluição foi realizada segundo a Norma M7-A6 do National Committee For Clinical Laboratory Standards, atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), porém com modificações descritas neste item (NCCLS, 2003b).

4.2.6.8.1. Solução estoque de extrato

Foram ressuspendidos 200,0 mg dos extratos hidroalcoólicos e do extrato acetona:água obtidos das duas drogas vegetais em estudo em 1 mL de DMSO, diluindo 1:1 com BHI. A tubos contendo 1 mL de BHI foi adicionada quantidade suficiente desta solução estoque de extrato a fim de que a concentração final fosse de 10, 7,0, 5,0, 3,0, 2,5, 2,0 e 1,0 mg/mL para o ensaio de determinação de CIM por macrodiluição.

4.2.6.8.2. Preparo da suspensão de bactéria

Uma colônia de cada cepa bacteriana utilizada foi inoculada em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubada a 37 °C durante 24 h. A partir deste inóculo foi realizada turvação até escala 0,5 de McFarland (cerca de $1,5 \cdot 10^8$ células/mL) em caldo BHI e posterior diluição 1:100 em BHI.

4.2.6.8.3. Determinação da concentração inibitória e bactericida mínima

Foram adicionados 100 µL da suspensão bacteriana aos tubos de BHI contendo as amostras de extrato, posteriormente, os tubos foram incubados a 37 °C por 24 h e a atividade antibacteriana foi avaliada pela turvação. Depois, uma alçada foi retirada e estriada em placas contendo meio Müeller Hinton, as quais foram incubadas a 37 °C por 24 h sendo determinada a concentração bactericida mínima pela presença ou ausência de crescimento. Paralelamente, foram conduzidos controles de crescimento das bactérias, do meio, dos extratos e também controle de verificação da atividade antimicrobiana do DMSO. Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.2.6.9. Bioautografia

Os testes de bioautografia foram realizados com amostras dos extratos das folhas de *M. cauliflora* e das cascas de *S. adstringens* obtidos com EtOH 50, EtOH 70, Ac:H₂O e CHCl₃, ressuspensas em metanol a uma concentração final de 50 mg/mL.

Foram aplicados 5 µL das amostras em placas de alumínio gel de sílica 60 F₂₅₄. As placas foram eluídas no sistema clorofórmio:metanol:n-propanol:água (5:6:1:4; v/v; fase orgânica). Foram feitas uma placa para cada bactéria a ser testada e outra para ser revelada com anisaldeído sulfúrico.

Previamente, foram feitos inóculos das cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* e *E. coli* em caldo BHI por 24 h a 37 °C, dos quais foi realizada a turvação até escala 0,5 de McFarland (cerca de 1,5.10⁸ células/mL).

As placas cromatográficas, após eluição e volatilização dos solventes, foram colocadas no interior de placas de Petri e sobre elas foram adicionados 15 mL do meio de cultura ágar Müeller Hinton já inoculado com a bactéria, em diluição 1:100, de forma a obter-se uma concentração de 1,5.10⁶ UFC/mL. Junto ao meio foram adicionados 0,5 mL de solução aquosa de TTC 1% como indicador de crescimento. As placas foram deixadas a 4 °C por 2 h, permitindo a difusão das amostras pelo meio de cultura sendo, posteriormente, incubadas a 37 °C por 24 h. A formação de halos incolores indica inibição do crescimento bacteriano e, portanto, atividade antimicrobiana do(s) composto(s) presente em determinado fator de retenção (R_f) (Figura 7) (MOULARI et al., 2006; SARTORATTO et al., 2004).

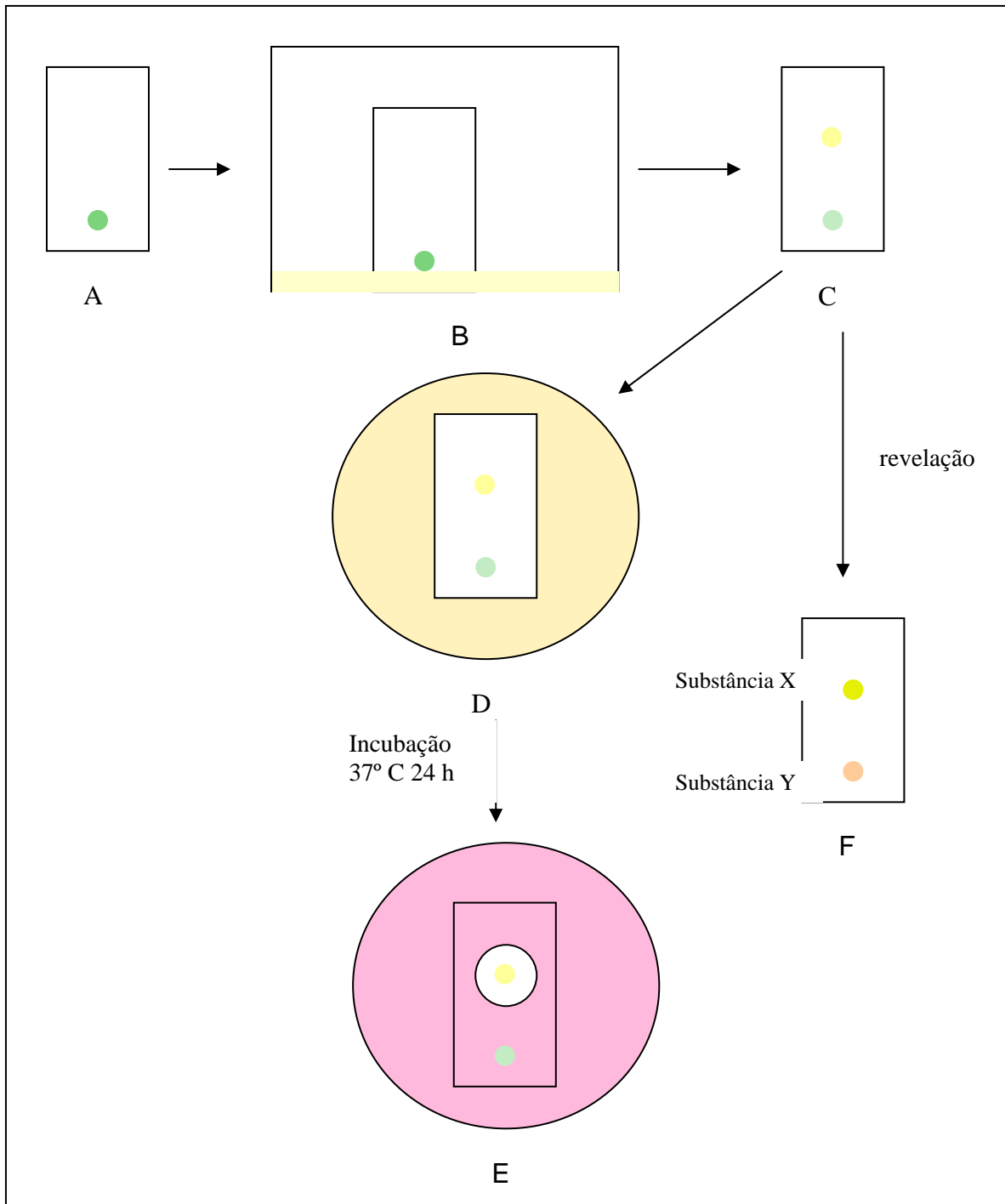


Figura 7: Esquema da metodologia de bioautografia. A- aplicação da amostra em placa cromatográfica (CCD). B- eluição da CCD. C- CCD eluída. D- CCD incubada em meio sólido inoculado. E- revelação com solução de TTC. F- revelação da CCD com solução de anisaldeído sulfúrico.

4.2.7. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade foi realizada frente a células mamíferas de macrófagos da linhagem J774. Estas células foram mantidas em garrafas em estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ em meio RPMI-1640 (pH 7) adicionado de 10% soro fetal. Ao acondicionamento das garrafas foram adicionados 0,1% de solução de estreptomicina e 0,1% de solução de anfotericina B.

4.2.7.1. Preparo das amostras

Os extratos de *M. cauliflora* e *S. adstringens* foram dissolvidos em DMSO a fim de obter uma solução de 100 mg/mL, sendo posteriormente diluídos 1:20 (v/v) em RPMI-1640 no primeiro poço da microplaca de 96 poços, para então serem diluídos, sucessivamente, até o último poço da placa, 1:1 (v/v) em RPMI-1640. A máxima concentração atingida no ensaio foi de 2,5 mg/mL e a mínima foi de 0,0195 mg/mL.

4.3.2. Avaliação da citotoxicidade dos extratos

A técnica consistiu em coletar as células por tripsinização, centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos e contagem do número de células, com auxílio do corante Turk, ajustando para a concentração de 1×10^5 células/mL em meio RPMI-1640. Desta suspensão, as células foram incubadas em microplaca de 96 poços a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 48 h. Após este período, observou-se a formação de tapete celular, retirou-se o meio RPMI existente (já inadequado para a manutenção celular), colocando 100 µL de meio novo e 100 µL das amostras já preparadas. Incubou-se a microplaca por 24 h a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Todo esse procedimento foi feito de forma a causar a menor perturbação possível no tapete celular formado. Posteriormente, adicionou-se 20 µL do corante Alamar Blue diluído em RPMI-1640 1:1 (v/v). Novamente, incubou-se a microplaca em estufa sob atmosfera a 5 % de CO₂ a 37 °C para leitura após 5 a 24 h. A coluna 11 foi utilizada como controle negativo, sem a presença de células e a coluna 12, como controle positivo do crescimento celular. Uma coluna foi utilizada como controle de citotoxicidade

do DMSO, sendo diluído 1:1 (v/v) em RPMI-1640 no primeiro poço com subsequente diluição 1:1 no mesmo meio. A leitura dos resultados foi feita visualmente pela diferenciação entre a cor azul (ausência de células vivas) e cor-de-rosa (presença de células vivas) (AHMED et al., 1994; O'BRIEN et al., 2000; DEBBASCH et al., 2005 com modificações).

4.2.8. PREPARAÇÕES COSMÉTICAS

Para manipulação das preparações, foram utilizados os extratos hidroalcoólicos, uma vez que, no panorama geral de atividade antimicrobiana e determinação de CIM, apresentaram os menores valores de CIM e por terem apresentado menor custo de preparo. As formulações finais foram apresentadas com o respectivo extrato que apresentou, de forma geral, melhor halo de inibição de crescimento das bactérias e leveduras.

4.2.8.1. Preparo do sabonete líquido

A formulação do sabonete líquido foi baseada em composição básica, com a presença de tensoativos que proporcionem detergência e quantidade e qualidade de espuma, agentes de viscosidade, sobreengordurantes, conservantes e seqüestranes de íons (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999). Para o preparo do sabonete líquido, a fórmula apresentada na Tabela 2 foi desenvolvida.

Tabela 2: Fórmula percentual da preparação de sabonete líquido e função de cada componente.

Nome INCI	Matéria-prima	Função	Composição
Sodium laureth sulphate	lauril éter sulfato de sódio	Tensoativo aniônico	20,00%
Sodium astrocaryum murumurate	astrocarium murumuruato de sódio	Qualidade sensorial de espuma	0,20%
Cocamidopropylbetaine	cocoamidopropilbetaína	Tensoativo espessante	4,00%
Laurylpolyglucose	laurilpoliglicosídeo	Tensoativo espessante, estabilizador de espuma e qualidade sensorial de espuma	2,00%
Decylpoluglucose	decilpoliglicosídeo	Tensoativo espessante, estabilizador de espuma e qualidade sensorial de espuma	2,00%
Laurylpolyglucose	dietanolamida ácido graxo de coco	Sobreengordurante, estabilizador de espuma, espessante, solubilizante	3,00%
Lanolin alcohol	álcool de lanolina	Co-emulsificante e agente de viscosidade	1,00%
Methylparaben	metilparabeno	Conservante antimicrobiano	0,20%
Disodium EDTA	EDTA dissódico	Quelante	0,05%
Citric acid	ácido cítrico (solução aquosa a 10%)	Corretivo de pH	q.s. pH 6
	extrato vegetal	Ativo anti-séptico	0,25% ^{1,2}
Sodium chloride	cloreto de sódio	Espessante	q.s.
Water	água destilada		q.s.p. 100%

¹extrato das folhas de *M. cauliflora* obtido com etanol 70%.

²extrato da casca de *S. adstringens* obtido com etanol 50%.

Os componentes da fórmula, exceto o extrato, ácido cítrico e NaCl, foram aquecidos até completa solubilização. Após resfriamento, foram adicionados a solução de ácido cítrico até pH 6 e o extrato, solubilizado em 5% do total de água utilizado, e a viscosidade da preparação foi ajustada pela adição de cloreto de sódio.

Para verificação da atividade anti-séptica do sabonete líquido, foram manipuladas diferentes preparações, contendo 0,25%, 0,50% e 1,00% dos extratos das folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens* obtidos com EtOH 50 e EtOH 70, cada um, separadamente.

Também foi manipulada uma preparação sem adição de nenhum dos extratos para ser tomada como preparação controle, a fim de comparação dos resultados obtidos com os sabonetes contendo extrato.

4.2.8.2. Preparo do sabonete em barra

A formulação do sabonete em barra foi baseada na definição de sabonete, uma vez que o mesmo é resultante da saponificação de ácidos graxos, sendo adicionado dos adjuvantes sobreengordurantes, umectantes, agentes de dureza e transparência (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999). Para o preparo do sabonete em barra, a fórmula apresentada na Tabela 3 foi desenvolvida.

Tabela 3: Fórmula percentual da preparação de sabonete em barra e função de cada componente.

Nome INCI	Matéria-prima	Função	Composição
	massa base	Ácidos graxos saponificados	35,00%
Sodium astrocaryum murumuruatate	astrocarium murumuruato de sódio	Qualidade sensorial	1,50%
Alcohol	etanol	Transparência e dureza	15,00%
Glycerin	glicerina	Transparência	10,00%
Sucrose	sacarose	Transparência e dureza	10,00%
<i>Orbignya oleifera</i> seed oil	óleo de babaçu	Emoliente	3,00%
	extrato vegetal	Ativo anti-séptico	0,25% ^{1,2}
Water	água destilada		q.s.p. 100%

¹extrato das folhas de *M. cauliflora* obtido com etanol 50%.

²extrato da casca de *S. adstringens* obtido com etanol 50%.

Os componentes da fórmula, exceto o extrato, foram levados à chapa aquecedora sob agitação constante até fusão da massa base. O extrato foi dissolvido em 5% do total de etanol e 5% do total de água, sendo incorporado ao restante da preparação após fusão da massa base, para então o sabonete ser colocado em molde apropriado para enrijecimento.

Para verificação da atividade anti-séptica do sabonete em barra, foram manipuladas diferentes preparações, contendo 0,25%, 0,50% e 1,00% dos extratos das folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens* obtidos com EtOH 50 e EtOH 70, cada um, separadamente.

Também foi manipulada uma preparação sem adição de nenhum dos extratos para ser tomada como preparação padrão, a fim de comparação dos resultados obtidos com os sabonetes contendo extrato.

4.2.8.3. Preparo da loção

A formulação da loção foi obtida por desenvolvimento de emulsão óleo/água, sendo que na fase aquosa foram incorporados o conservante e o ativo (extrato) e na fase oleosa, emolientes, umectantes, antioxidantes e demais componentes, como previsto na literatura (PRISTA et al., 2002). Para o preparo da loção, a fórmula apresentada na Tabela 4 foi desenvolvida.

Tabela 4: Fórmula percentual da preparação de loção e função de cada componente.

	Matéria-prima	Função	Composição
FASE OLEOSA			
Cetareth-20	álcool cetosteárico etoxilado 20 OE	Tensoativo não-iônico	1,00%
Cetyl alcohol	álcool cetílico	Espessante	1,50%
Cetyl lactate	lactato de cetila	Espessante e emoliente	3,00%
<i>Atrocaryum murumuru</i> butter	óleo de murumuru	Emoliente	3,00%
BHT	butilhidroxidotolueno	Antioxidante	0,05%
Propylparaben	propilparabeno	Conservante antimicrobiano	0,02%
Lanolin alcohol	álcool de lanolina	Co-emulsificante e agente de viscosidade	1,00%
FASE AQUOSA			
Methylparaben	metilparabeno	Conservante antimicrobiano	0,18%
	Extrato vegetal	Ativo anti-séptico	0,25% ¹ ; 0,50% ²
Water	água destilada		q.s.p. 100%

¹extrato das folhas de *M. cauliflora* obtido com etanol 50%.

²extrato da casca de *S. adstringens* obtido com etanol 50%.

As fases aquosa (sem extrato) e oleosa foram aquecidas, separadamente, até 80 °C, para completa fusão do material graxo, sendo posteriormente, adicionadas e agitadas até redução da temperatura para incorporação do extrato dissolvido em 5% do total de água utilizado na preparação, prosseguindo a agitação até resfriamento da preparação.

Para verificação da atividade anti-séptica da loção, foram manipuladas diferentes preparações, contendo 0,25%, 0,50% e 1,00% dos extratos das folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens* obtidos com EtOH 50 e EtOH 70, cada um, separadamente.

Também foi manipulada uma preparação sem adição de nenhum dos extratos para ser tomada como preparação padrão, a fim de comparação dos resultados obtidos com as loções contendo extrato.

4.2.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SÉPTICA DAS PREPARAÇÕES COSMÉTICAS

4.2.9.1. Teste de difusão em ágar

As suspensões bacterianas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, preparadas como descrito no item 4.2.6.3, foram diluídas 1:100 com base na quantidade de meio ágar-Müeller Hinton colocado nas placas, enquanto que foram aplicados 100 µL da suspensão das leveduras *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, a partir da escala 0,5 de McFarland, sobre a placa de Petri (preparadas como no item 4.2.6.4.) contendo meio ágar-Müeller Hinton acrescido de 2% de d-glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno (NCCLS, 2003c). Foram feitos poços nos meios de cultura com cilindros de aço de 6 mm de diâmetro interno e nestes foram adicionados 100 µL das amostras de sabonete líquido, do sabonete em barra fundido e da loção. Antes de serem colocadas no meio de cultura, as amostras de sabonete líquido e loção foram adicionadas de 1% de Tween® 80 para inativação dos conservantes derivados de parabenos utilizados nas preparações. Em cada poço foram colocadas as diferentes amostras das três preparações, que consistiam de amostras sem extrato, amostras com extrato EtOH 50 de *M. cauliflora* a 0,25%, 0,50% e 1,00%, amostras com extrato EtOH 70 de *M. cauliflora* a 0,25%, 0,50% e 1,00%, amostras com extrato EtOH 50 de *S. adstringens* a 0,25%, 0,50% e 1,00% e amostras com extrato EtOH 70 de *S. adstringens* a 0,25%, 0,50% e 1,00%. Antes de incubadas a 37 °C por 24 h (bactérias) e 25 °C por 48 h (leveduras), as placas foram deixadas duas horas a 4 °C para permitir a difusão das amostras. Foram adicionados 50 µL de ampicilina (50 µg/mL) como controle de inibição do crescimento bacteriano e anfotericina B (32 µg/mL) como controle de inibição do crescimento das leveduras. A atividade anti-séptica das preparações foi verificada pela medida do halo de inibição de crescimento bacteriano e fúngico e comparada com o halo formado pelas amostras das preparações sem os extratos. Todos os testes foram feitos em triplicata (CORDEIRO, 2005; LOPES et al., 2005).

Após o período a que as preparações, que apresentaram melhor atividade anti-séptica, foram submetidas aos testes de estabilidade, novo teste de avaliação da atividade anti-séptica foi realizado frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* pela mesma metodologia apresentada acima.

4.2.10. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS PREPARAÇÕES

A partir das preparações obtidas, os parâmetros organolépticos e físico-químicos foram avaliados por meio de testes de centrifugação e estabilidade preliminar, submetendo as preparações a condições extremas de temperatura a fim de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas. Ao final, os dados obtidos foram analisados estatisticamente (AGÊNCIA..., 2004).

4.2.10.1. Teste de centrifugação

Antes de iniciar os testes de estabilidade, as preparações de sabonete líquido e loção foram submetidas, sem e com os extratos, a centrifugação a 3000 rpm durante 30 minutos.

4.2.10.2. Estabilidade preliminar

A estabilidade das preparações de sabonete líquido e loção contendo os extratos foi avaliada comparando com a estabilidade das preparações sem os extratos. As preparações foram submetidas às seguintes condições de estresse:

- Alta temperatura: 37 ± 2 °C, em estufa;
- Baixa temperatura: 5 ± 2 °C, em geladeira.

Para avaliação da estabilidade preliminar, os parâmetros organolépticos e físico-químicos foram observados antes de submeter as

preparações às condições de estresse (dia zero) e todos os dias, durante os 15 dias de teste, sendo 15º dia o último dia de medição.

Parâmetros organolépticos: aspecto, cor e odor foram comparados entre as amostras sem os extratos (controle) e as amostras incorporadas com os extratos antes de submetidas às condições de estresse e depois, por 15 dias.

Avaliação do valor de pH: para a determinação do pH, a cada medição, foi feita uma solução a 10% com as amostras, que foram analisadas em peagômetro (DAVIS, 1977).

Avaliação da densidade: foi utilizado um picnômetro com capacidade de 5 mL, previamente calibrado pela determinação de sua massa vazia e com água destilada e fervida. Após colocada a amostra no picnômetro, o excesso foi retirado e o picnômetro cheio foi pesado, sendo a massa da amostra obtida através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio (FARMACOPÉIA, 1988). O cálculo da densidade, então, foi feito segundo a fórmula:

$$\text{densidade (g/mL)} = \text{massa (g)} / \text{volume (mL)}$$

Avaliação do comportamento reológico das amostras: antes das amostras serem submetidas às condições de estresse, foi avaliado o comportamento reológico das mesmas em viscosímetro Brookfield RVD-VIII utilizando o spindle SC4 -21 para as preparações de sabonete líquido e SC4-29 para as preparações de loção.

4.2.11. CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DAS PREPARAÇÕES

O controle de qualidade microbiológica das preparações consiste na determinação do número total de microrganismos e pesquisa de *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Nestas análises foram utilizadas amostras representativas do conteúdo dos produtos conforme métodos preconizados na Farmacopéia Brasileira (1988), British Pharmacopeia (2001) e USP (UNITED, 2003).

O controle de qualidade microbiológico foi aplicado às amostras das três preparações de ambos os extratos (total de 6 amostras), após verificação da atividade anti-séptica.

Uma vez que as preparações foram formuladas com metilparabeno, utilizou-se, nos testes de controle de qualidade microbiológico, 1% de Tween® 80 como inativante do referido conservante.

4.2.11.1. Contagem do número total de microrganismos

Foram transferidos, assepticamente, 10,00 g de cada amostra para 90 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, para a contagem dos microrganismos totais. Após 10 minutos sob agitação para homogeneização, foi pipetado 1 mL para placas de Petri, adicionando 20 mL ágar-tioglicolato para contagem do número total de bactérias e ágar-Sabouraud para contagem do número total de fungos. O material foi colocado em estufa incubadora de 35 °C durante 24 h e 25 °C durante 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi observada a formação e contado o número de colônias com o auxílio de contador, calculando o número de unidades formadoras de colônias.

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

Foram transferidos, assepticamente, 10,00 g de cada amostra para 90 mL de caldo lactosado, para pesquisa de *Salmonella* e *E. coli*. O caldo foi incubado a 35 °C durante 24 h. Após este período, foi observado o meio quanto ao crescimento e foi transferido 1 mL do caldo lactosado para tubos contendo caldo tetracionato e caldo selenito cistina, incubando a 35 °C durante 24 h. Após este período, amostra do caldo tetracionato foi semeado com alça de platina para um tubo contendo ágar inclinado verde brilhante, outro tubo contendo ágar bismuto sulfito e uma placa de Petri contendo ágar xilose lisina desoxicolato (XLD). Foi feito da mesma forma com a amostra inoculada no caldo selenito cistina, transferindo para os três meios e incubando a 35 °C durante 24 h. O crescimento e as características das colônias foram observados. As colônias suspeitas foram semeadas com alça

reta em tubo contendo ágar inclinado de ferro-triplo-açúcar (TSI). Foram incubadas a 35 °C durante 24 h. Para a confirmação da presença de *Salmonella*, o método de coloração de Gram foi utilizado.

Para a pesquisa de *E. coli*, foi transferido 1 mL do caldo lactosado para placa de Petri contendo ágar MacConkey. Foi incubado a 35 °C durante 24 h. O crescimento e as características das colônias foi observado. As colônias suspeitas foram semeadas com alça de platina em placa de Petri contendo ágar eosina azul de metileno (EMB) e as placas foram incubadas a 35 °C durante 24 h. Para a confirmação da *E.coli* o método de coloração de Gram foi utilizado.

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

Foram transferidos, assepticamente, 10,00 g de cada amostra para 90 mL de caldo peptonado, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, incubando a 35 °C durante 24 h. Após este período, o meio foi observado quanto ao crescimento e foi transferido 1 mL do caldo para placas de Petri contendo ágar Vogel Johnson, para a pesquisa de *S. aureus* e ágar cetrimida, para a pesquisa de *P. aeruginosa*, incubando a 35 °C durante 24 h. Foram observados o crescimento e as características das colônias. Foi feita a confirmação através de método de coloração de Gram. Além disto, foi realizado o teste da coagulase e da oxidase, para a confirmação de *S. aureus* e de *P. aeruginosa*, respectivamente.

Todos os ensaios de controle de qualidade microbiológico das preparações contendo o extrato de *M. cauliflora* e de *S. adstringens* foram feitos em triplicata.

4.2.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão dos valores obtidos. A significância estatística foi avaliada usando o teste t, sendo que foi tomado como significativamente diferente $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

5.1.1. Granulometria

A distribuição granulométrica percentual, pela média de três determinações, para as folhas de *M. cauliflora* pulverizadas em moinho de facas, para as folhas de *M. cauliflora* pulverizadas em moinho de bola e para a casca de *S. adstringens* adquirida comercialmente é apresentada na Figura 8.

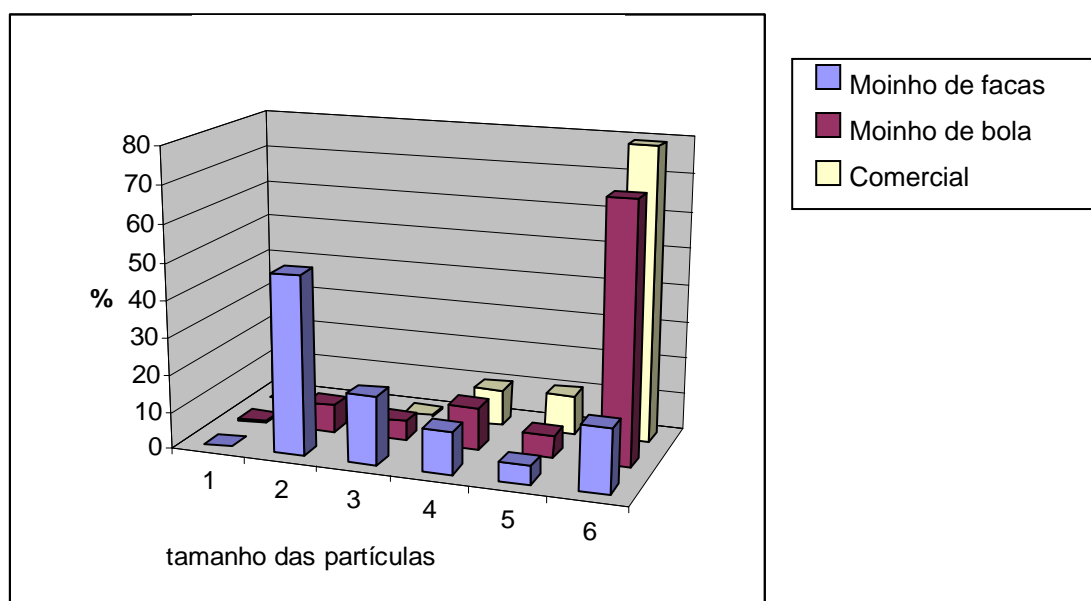


Figura 8: Comparação da granulometria percentual das folhas pulverizadas de *M. cauliflora* em moinho de facas, em moinho de bola e das cascas de *S. adstringens* adquiridas comercialmente. A porcentagem de distribuição é dada em função da abertura da malha dos tamises, na seguinte ordem: (1) >1700 µm; (2) 1700 - 355 µm; (3) 355 - 250 µm; (4) 250 - 180 µm; (5) 180 - 150 µm; (6) <150 µm.

A partir dos dados apresentados na figura, pode-se observar que as folhas que foram pulverizadas em moinho de facas apresentam-se distribuídas em maior percentual nas partículas de tamanho compreendido entre 1700 e 355 µm, enquanto que as folhas pulverizadas em moinho de bola e a casca adquirida comercialmente apresentam-se mais distribuídas entre as partículas de tamanho menor que 150 µm. Desta forma, quando a droga foi pulverizada em moinho de facas, ela apresentou, em maior porcentagem, um tamanho de partícula maior do que as drogas que foram pulverizadas em moinho de bola e adquiridas comercialmente.

5.1.2. Determinação do pH

Em relação ao pH de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens*, apresenta-se o valor da média das três determinações e o desvio-padrão na Tabela 5.

Tabela 5: Valor de pH de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens*.

Droga	<i>M. cauliflora</i>				<i>S. adstringens</i>
	primavera	verão	outono	inverno	
pH ^a	5,05 ± 0,05	5,04 ± 0,01	5,11 ± 0,06	5,01 ± 0,03	4,73 ± 0,08

a) média±desvio-padrão

O pH medido da água destilada, utilizada para os testes, foi de 5,8 ± 0,06.

5.1.3. Determinação do teor de umidade

Após três determinações, a média de teor de umidade, em balança com infravermelho, para as drogas em estudo estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Valor do teor de umidade para as drogas em estudo.

Droga	Teor de umidade ^a (%; p/p)
Folhas de <i>M. cauliflora</i> (primavera)	7,60±0,50
Folhas de <i>M. cauliflora</i> (verão)	4,16±0,70
Folhas de <i>M. cauliflora</i> (outono)	5,18±0,82
Folhas de <i>M. cauliflora</i> (inverno)	6,00±1,40
Casca de <i>S. adstringens</i>	8,18±0,70

a) média±desvio-padrão

5.1.4. Determinação do teor de extrativos

O resultado do teor de extrativos das folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens* pode ser visualizado, em porcentagem, na Figura 9.

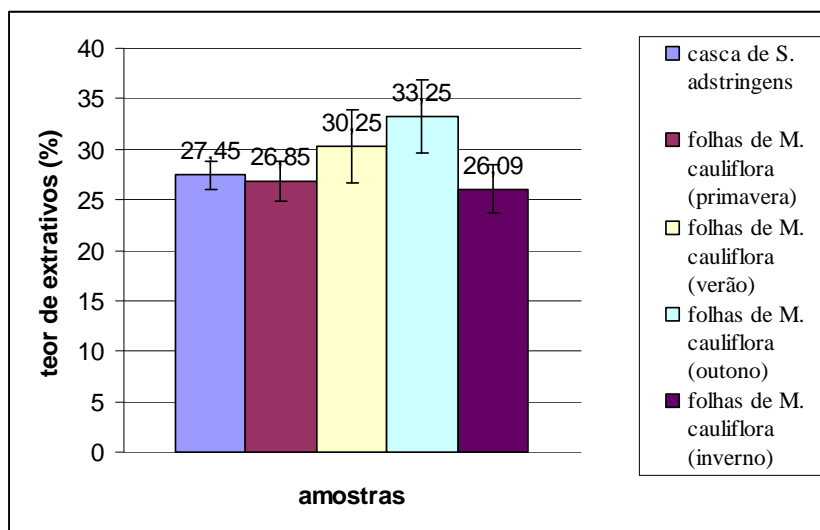


Figura 9: Teor de extrativos das drogas analisadas, em %, e desvio-padrão.

5.1.5. Determinação do teor de cinzas totais

A Tabela 7 apresenta a média de três determinações, em porcentagem relativa à massa de amostra inicialmente pesada, do teor de cinzas totais apresentado pelas folhas de *M. cauliflora* coletadas nas quatro estações e de casca de *S. adstringens*.

Tabela 7: Teor de cinzas totais de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens*.

	<i>M. cauliflora</i>				<i>S. adstringens</i>
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
Teor ^a	89,67±0,47	90,65±0,01	90,07±0,04	89,97±0,20	89,45±0,47

a) média±desvio-padrão (%; p/p)

5.2. ANÁLISES FITOQUÍMICAS

5.2.1. Triagem fitoquímica preliminar das principais classes de metabólitos secundários

Classicamente, a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais tem sido conseguida pela realização de reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitação característico (FALKENBERG et al., 2004), e desta forma, os resultados obtidos com as drogas em análise para cada classe dos principais metabólitos secundários são demonstrados na Tabela 8.

No entanto, embora o teste de formação de espuma tenha apresentado resultado positivo para saponinas, o resultado não se manteve positivo para a fração purificada nos testes de precipitação e na CCDC, não confirmando a presença da mesma, pois, segundo Wagner et al. (1984), quando revelada com anisaldeído sulfúrico, a mancha de saponina deve apresentar-se cor-de-rosa, o que não ocorreu.

Tabela 8: Metabólitos secundários presentes em *M. cauliflora* e *S. adstringens*.

Classes	Reações	<i>M. cauliflora</i>				<i>S. adstringens</i>
		Primavera	Verão	Outono	Inverno	
Alcalóides	Bertrand	-	-	-	-	-
	Bouchardat	-	-	-	-	-
	Dragendorff	-	-	-	-	-
	Mayer	-	-	-	-	-
Antraquinonas	Livres	-	-	-	-	-
	Glicosiladas	-	-	-	-	-
Flavonóides	Shinoda	-	-	-	-	-
	Taubock	-	+	-	+	-
	Pew	-	-	-	-	-
	Cloreto férrico	-	-	-	-	-
	Cloreto de alumínio	-	+	-	+	-
Glicosídeos cardiotônicos	Liebermann	-	-	-	-	-
	Burchard	-	-	-	-	-
Saponinas	Formação e permanência de espuma	-	-	-	-	+
Taninos	Gelatina	+++	+++	+++	+++	+++
	Sais de ferro	+++ hidrolisável	+++ hidrolisável	+++ hidrolisável	+++ hidrolisável	+++ hidrolisável e condensado
	Acetato de chumbo	+++ hidrolisável	+++ hidrolisável	+++ hidrolisável	+++ hidrolisável	+++ hidrolisável e condensado

-: presença do metabólito não caracterizada; +: presença do metabólito caracterizada; +++: presença do metabólito caracterizada em abundância.

5.2.2. Perfil cromatográfico

Nas Figuras 10 e 11 pode-se visualizar os cromatogramas obtidos da partição com acetato de etila das drogas em estudo (frações acetato de etila = FrAcOEt) e dos extratos obtidos a partir das mesmas, comparando com substâncias padrão das classes que foram evidenciadas na triagem fitoquímica.

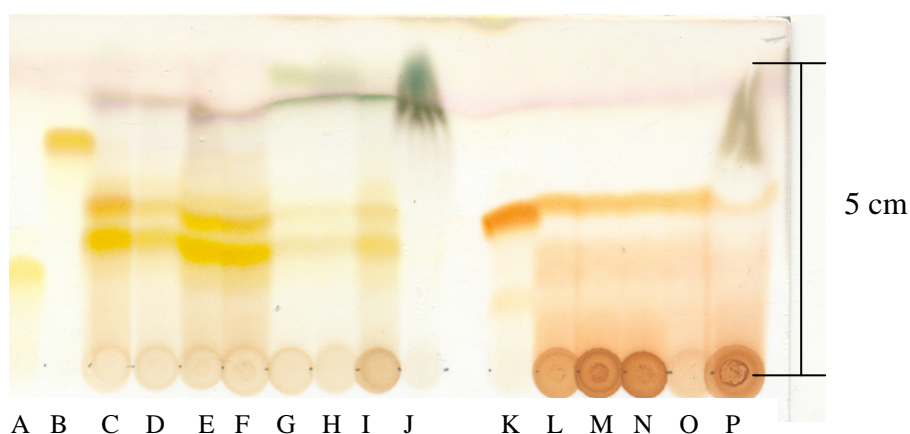


Figura 10: Cromatograma das frações acetato de etila das drogas e dos extratos obtidos das folhas de *M. cauliflora* e *S. adstringens* revelado com anisaldeído sulfúrico. Sistema eluente: CHCl_3 : metanol: *n*-propanol: H_2O 5:6:1:4, v/v, fase orgânica. Revelador: anisaldeído sulfúrico. (A) rutina (B) quercetina; (C) FrAcOEt folhas de *M. cauliflora* coletadas na primavera; (D) FrAcOEt folhas de *M. cauliflora* coletadas no verão; (E) FrAcOEt folhas de *M. cauliflora* coletadas no outono; (F) FrAcOEt folhas de *M. cauliflora* coletadas no inverno; (G) extrato EtOH 50 folhas de *M. cauliflora*; (H) extrato EtOH 70 folhas de *M. cauliflora*; (I) extrato Ac: H_2O folhas de *M. cauliflora*; (J) extrato CHCl_3 folhas de *M. cauliflora*; (K) catequina; (L) FrAcOEt casca de *S. adstringens*; (M) extrato EtOH 50 casca *S. adstringens*; (N) extrato EtOH 70 casca *S. adstringens*; (O) extrato Ac: H_2O casca *S. adstringens*; (P) extrato CHCl_3 casca *S. adstringens*.

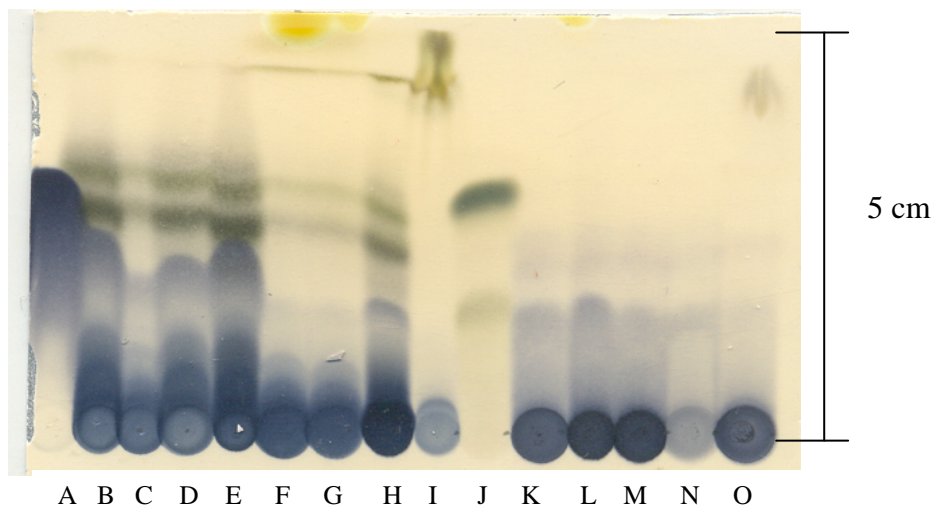


Figura 11: Cromatograma das frações acetato de etila das drogas e dos extratos obtidos das folhas de *M. cauliflora* e *S. adstringens* revelado com cloreto férrico 2% em metanol. Sistema eluente: CHCl₃: metanol: *n*-propanol: H₂O 5:6:1:4, v/v, fase orgânica. Revelador: FeCl₃ 1 % em metanol. (A) ácido gálico; (B) FrAcOEt folhas de *M. cauliflora* coletadas na primavera; (C) FrAcOEt folhas de *M. cauliflora* coletadas no verão; (D) FrAcOEt folhas de *M. cauliflora* coletadas no outono; (E) FrAcOEt folhas de *M. cauliflora* coletadas no inverno; (F) extrato EtOH 50 folhas de *M. cauliflora*; (G) extrato EtOH 70 folhas de *M. cauliflora*; (H) extrato Ac:H₂O folhas de *M. cauliflora*; (I) extrato CHCl₃ folhas de *M. cauliflora*; (J) catequina; (K) FrAcOEt casca de *S. adstringens*; (L) extrato EtOH 50 casca *S. adstringens*; (M) extrato EtOH 70 casca *S. adstringens*; (N) extrato Ac:H₂O casca *S. adstringens*; (O) extrato CHCl₃ casca *S. adstringens*.

Na Tabela 9 encontramos o valor do fator de retenção (Rf) das manchas apresentadas por cada uma das amostras e das substâncias padrão.

Tabela 9: Fator de retenção das manchas apresentadas nos cromatogramas.

Amostra	Rf
rutina	0,26
quercetina	0,66
FrAcOEt folhas de <i>M. cauliflora</i> – primavera	1: 0,0 2: 0,34 3: 0,45
FrAcOEt folhas de <i>M. cauliflora</i> – verão	1: 0,0 2: 0,34 3: 0,45
FrAcOEt folhas de <i>M. cauliflora</i> – outono	1: 0,0 2: 0,32 3: 0,42
FrAcOEt folhas de <i>M. cauliflora</i> – inverno	1: 0,0 2: 0,34 3: 0,42
extrato etanol 50 folhas de <i>M. cauliflora</i>	1: 0,0 2: 0,37 3: 0,42
extrato etanol 70 folhas de <i>M. cauliflora</i>	1: 0,0 2: 0,34 3: 0,40
extrato acetona 7:3 folhas de <i>M. cauliflora</i>	1: 0,0 2: 0,37 3: 0,45
extrato clorofórmico folhas de <i>M. cauliflora</i>	0,0
ácido gálico	0,42
catequina	0,45
FrAcOEt casca de <i>S.adstringens</i>	1: 0,0 2: 0,47
extrato etanol 50 casca <i>S.adstringens</i>	1: 0,0 2: 0,47
extrato etanol 70 casca <i>S.adstringens</i>	1: 0,0 2: 0,47
extrato acetona 7:3 casca <i>S.adstringens</i>	1: 0,0 2: 0,47
extrato clorofórmico casca <i>S.adstringens</i>	0,0

A partir das Figuras 10 e 11, pode-se confirmar os dados obtidos na triagem fitoquímica das folhas de *M. cauliflora*, os quais indicam a presença de taninos hidrolisáveis e de flavonóides.

As manchas alaranjadas apresentadas na Figura 10 para as amostras de (L) a (P), ou seja, nas amostras relativas à fração acetato de etila das amostras de *S. adstringens*, confirmam os dados obtidos na triagem

fitoquímica, que indicavam a presença de taninos condensados na droga. Já as manchas azuis, visualizadas na Figura 11 indicam a presença de taninos hidrolisáveis, como o ácido gálico, também confirmando os resultados da triagem fitoquímica.

Na Figura 10, observa-se o cromatograma revelado com anisaldeído sulfúrico, substância utilizada por revelar diferentes classes de compostos devido à coloração diferente que apresenta para cada classe. As manchas relativas à rutina e à quercetina e às manchas intermediárias (C) a (I), são amarelo-esverdeadas e apresentam fluorescência quando visualizadas sob luz UV de 254 nm, indicando que são substâncias pertencentes à classe dos flavonóides (WAGNER et al., 1984). Tais manchas de (C) a (I) apresentam valores de Rf parecidos indicando serem as mesmas substâncias ou substâncias com pequenas diferenças estruturais e de polaridade semelhante. O valor de Rf dessas manchas são intermediários ao das substâncias padrão rutina e quercetina, o que permite afirmar que a polaridade dessas substâncias é intermediária a um flavonóide diglicosilado (rutina) e outro na forma de aglicona (quercetina).

A mancha relativa à catequina, na Figura 10, apresenta-se com coloração marrom-avermelhada (WAGNER et al., 1984), da mesma forma que as manchas superiores de (L) a (P), que possuem Rf semelhantes entre si e próximos ao valor de Rf da catequina, portanto, indicando ser uma substância ou um conjunto de substâncias derivadas de taninos condensados.

O cloreto férrico é utilizado como revelador de polifenóis (WAGNER et al., 1984). Assim, as manchas da Figura 11 que se apresentam azuis indicam ser derivadas de ácido gálico, ou seja, derivados de taninos hidrolisáveis, estando presentes nas amostras de folhas de *M. cauliflora* e amostras da casca de *S. adstringens*. Já as manchas que se apresentaram esverdeadas, assim como a catequina, indicam ser derivadas de unidades flavan-3-ol ou flavan-3,4-diol, presente nos taninos condensados, também chamados de proantocianidina (SANTOS e MELLO, 2004); por isso, as manchas que se apresentaram esverdeadas nas amostras de (B) a (G) têm a possibilidade de ser os mesmos flavonóides revelados pelo anisaldeído

sulfúrico na coloração amarelo-esverdeada ou derivados de taninos condensados. Pelos cromatogramas desenvolvidos confirmou-se a presença de derivados flavonoídicos e tânico nas folhas de *M. cauliflora* e nos extratos obtidos, exceto o extrato clorofórmico, devido à diferença de polaridade entre o solvente e os constituintes. Da mesma forma, confirmou-se a presença de derivados de taninos hidrolisáveis e condensados na casca e nos extratos obtidos de *S. adstringens*.

5.2.3. Perfil espectrofotométrico na região de ultravioleta

O perfil espectrofotométrico dos compostos padrão da classe dos taninos, ácido gálico e ácido tânico, está mostrado na Figura 12 e o perfil dos extratos na Figura 13.

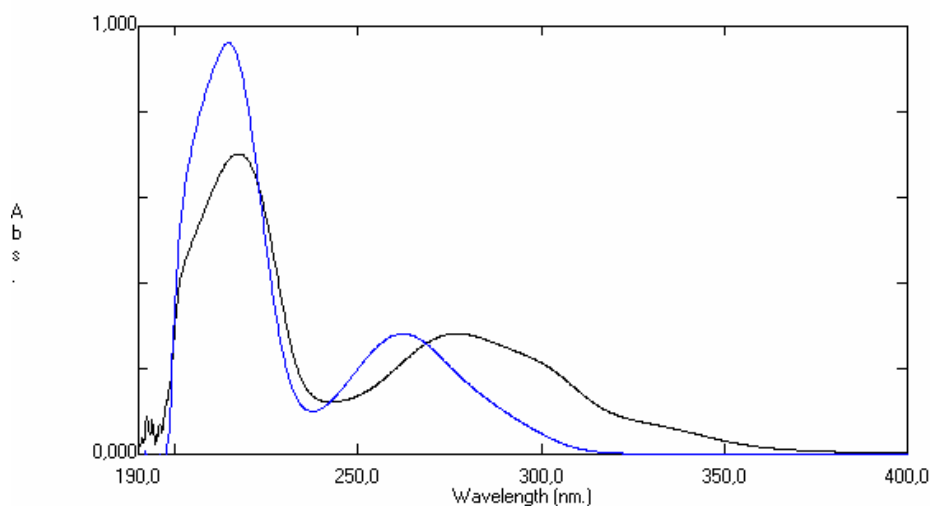


Figura 12: Perfil espectrofotométrico, na região de ultravioleta, de ácido gálico e ácido tânico. Espectro em azul: ácido gálico. Espectro em preto: ácido tânico.

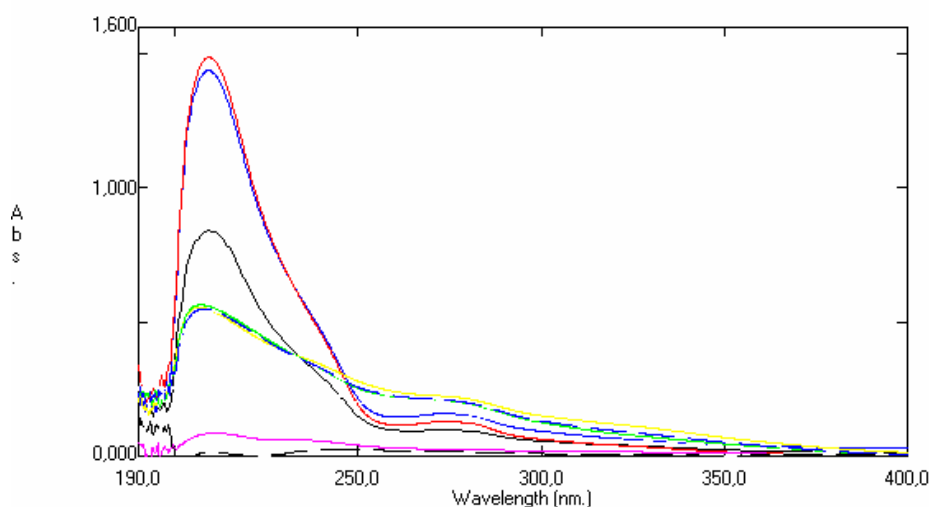


Figura 13: Perfil espectrofotométrico, na região de ultravioleta, dos extratos de folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens*. Espectros em azul, verde, amarelo e cor-de-rosa são, respectivamente, os extratos de folhas: EtOH 50, EtOH 70, Ac:H₂O e CHCl₃. Espectros em preto, azul turquesa, vermelho e preto pontilhado são, respectivamente, os extratos de casca: EtOH 50, EtOH 70, Ac:H₂O e CHCl₃.

Assim, observando os espectros apresentados nas Fig. 12 e 13, verifica-se a similaridade entre os espectros dos fenóis padrão e dos extratos de *S. adstringens*, uma vez que, como visto anteriormente, os taninos são os compostos presentes majoritariamente nestes extratos.

Observa-se, também que existe uma correspondência do pico de máxima absorção entre todos os extratos e os padrões que corresponde à faixa de comprimento de onda de 206 a 217 nm. No entanto, como não foi isolada nenhuma substância dos extratos, não é possível afirmar a constituição dos mesmos com base nos espectros de ultravioleta.

5.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Utilizando a percolação como metodologia de obtenção dos extratos visando obter um maior rendimento de extrato, a partir de 20,00 g de folhas de *M. cauliflora* e de 20,00 g de casca de *S. adstringens*, obteve-se diferentes rendimentos, segundo o líquido extrator utilizado como pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10: Rendimento dos extratos de *M. cauliflora* e de *S. adstringens*, obtidos com diferentes solventes, em % de massa obtida de extrato/massa inicial de droga (p/p).

Extrato	<i>M. cauliflora</i>				<i>S. adstringens</i>			
	EtOH 50	EtOH 70	Ac:H ₂ O (7:3)	CHCl ₃	EtOH 50	EtOH 70	Ac:H ₂ O (7:3)	CHCl ₃
Rendimento (%, p/p)	40-28	30-25	20	2	40-30	40	30	<1

5.4. ANÁLISE QUANTITATIVA

5.4.1. Determinação do teor de fenóis totais

As leituras de absorvância da solução padrão de ácido tânico e do extrato foram feitas em triplicata, portanto, os resultados apresentados referem-se à média da absorvância, para cada concentração (em µg/mL) utilizada nas leituras.

A Figura 14 apresenta a curva analítica construída com diferentes concentrações da solução padrão de ácido tânico.

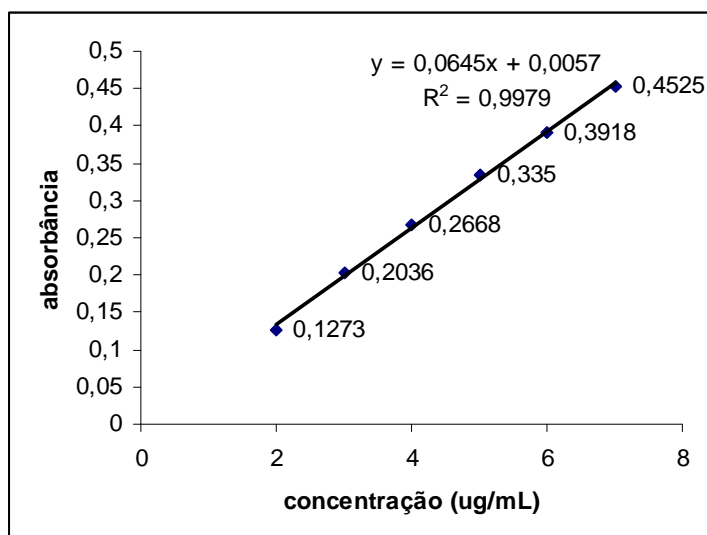


Figura 14: Curva analítica de absorvância da solução padrão de ácido tânico.

A partir da curva analítica obtida com a solução padrão de ácido tânico pôde-se calcular a porcentagem de fenóis totais existentes nas amostras de folhas de *M. cauliflora* coletadas em diferentes estações do ano e dos extratos obtidos de ambas as drogas utilizando a equação da reta da solução padrão de ácido tânico e levando em consideração as diluições realizadas. As porcentagens finais são expressas pela média dos valores de porcentagem da absorbância de cada solução de leitura das amostras.

A Figura 15 mostra a variação sazonal de fenóis totais de folhas de *M. cauliflora*.

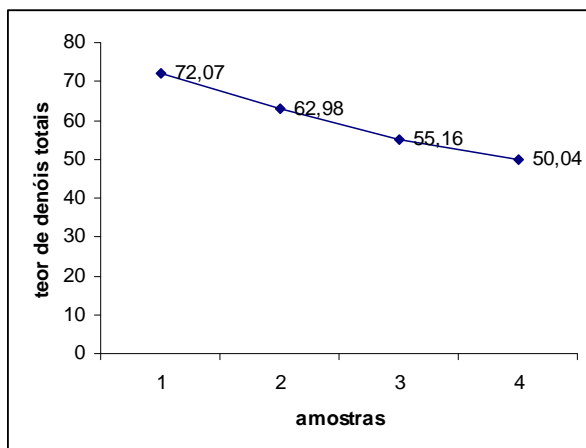


Figura 15: Variação sazonal de fenóis totais de folhas de *M. cauliflora*.

1- coletadas na primavera; 2- coletadas no verão; 3- coletadas no outono; 4- coletadas no inverno.

As Figuras 16 e 17 mostram o teor de fenóis, em porcentagem, dos extratos de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens*, respectivamente.

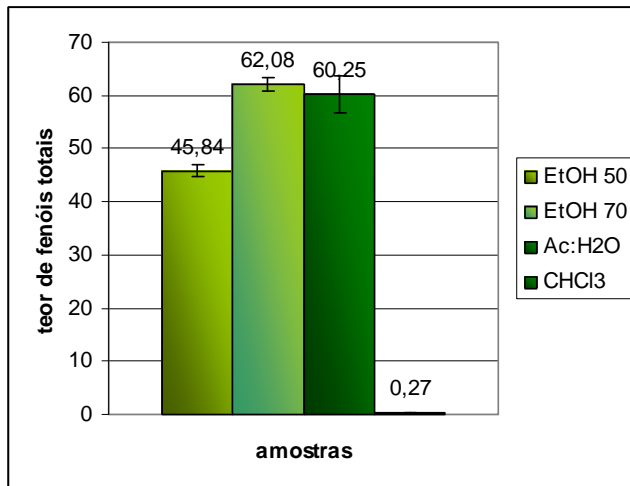


Figura 16: Variação do teor de fenóis totais dos extratos de folhas de *M. cauliflora*.

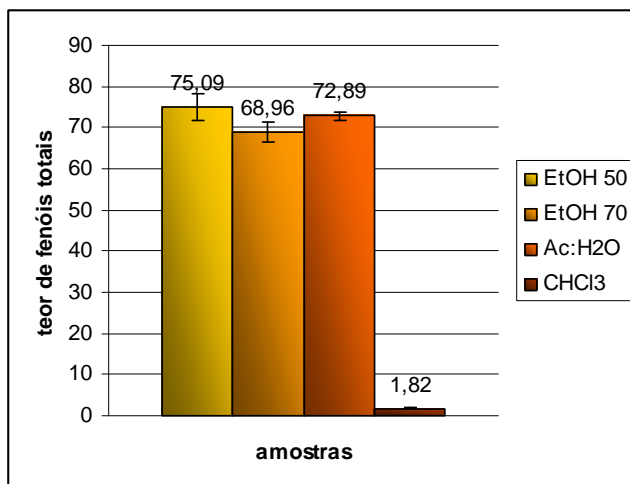


Figura 17: Variação do teor de fenóis totais dos extratos de casca de *S. adstringens*.

5.4.2. Determinação do teor de flavonóides totais

O teor de flavonóides foi determinado para as folhas de *M. cauliflora*, pois a presença destas substâncias foi identificada através da triagem fitoquímica e CCDC, não sendo identificada sua presença na casca de *S. adstringens*, assim como se encontra descrito na literatura.

A Figura 18 mostra a curva analítica construída com a solução padrão de rutina, após verificação de linearidade com a curva de Ringbom, em diferentes concentrações.

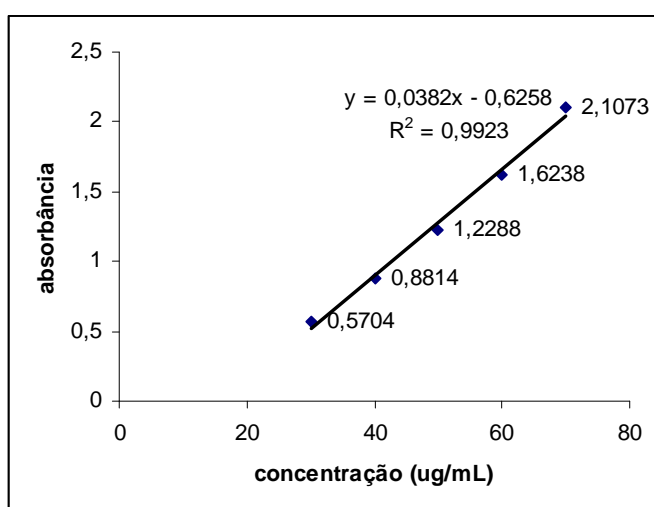


Figura 18: Curva analítica de absorvância da solução padrão de rutina.

A partir da equação de reta obtida pela curva analítica foi calculado o teor de flavonóides dos extratos de folhas de *M. cauliflora*. A Figura 19 apresenta a comparação do teor de flavonóides nas folhas nas quatro estações do ano, enquanto que a Figura 20 compara o teor nos diferentes extratos das folhas.

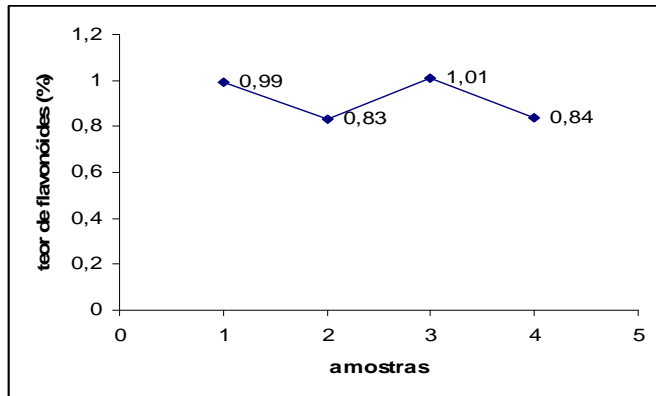


Figura 19: Variação sazonal de flavonóides totais de folhas de *M. cauliflora*.

1- coletadas na primavera; 2- coletadas no verão; 3- coletadas no outono; 4- coletadas no inverno.

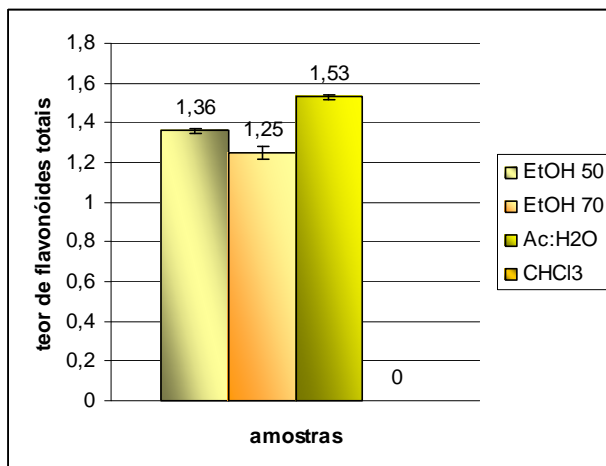


Figura 20: Variação do teor de flavonóides dos extratos de folhas de *M. cauliflora*.

5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.5.1. Verificação da atividade antioxidante por CCD

Através da cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível verificar a existência de atividade antioxidante de alguns extratos estudados, como observado na Figura 21.

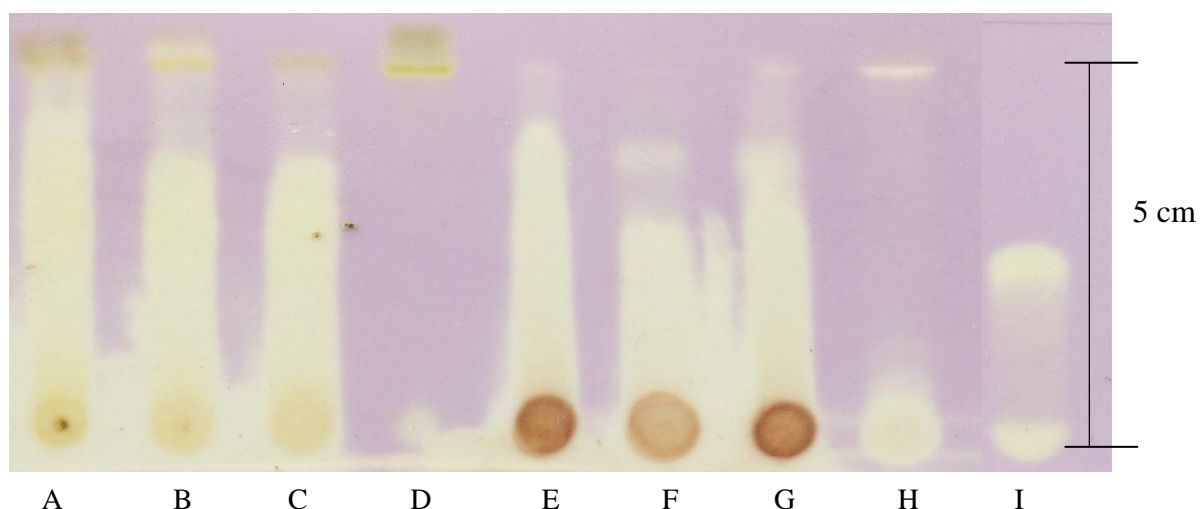


Figura 21: Cromatograma dos extratos de *M. cauliflora* e *S. adstringens* revelado com solução de DPPH. Sistema eluente: CHCl_3 : metanol: *n*-propanol: H_2O 5:6:1:4, v/v, fase orgânica. Revelador: DPPH 1 % em metanol. (A) extrato EtOH 50 das folhas de *M. cauliflora*; (B) extrato EtOH 70 das folhas de *M. cauliflora*; (C) extrato Ac:H₂O das folhas de *M. cauliflora*; (D) extrato CHCl_3 das folhas de *M. cauliflora*; (E) extrato EtOH 50 da casca de *S.adstringens*; (F) extrato EtOH 70 da casca de *S. adstringens*; (G) extrato Ac:H₂O da casca de *S.adstringens*; (H) extrato CHCl_3 da casca de *S.adstringens*; (I) padrão: rutina.

Ao revelar a CCD com DPPH, as amostras que possuem atividade antioxidante tornam-se amareladas, contra fundo violeta, indicativo de ausência de atividade antioxidante (SANCHES, 2004).

5.5.2. Determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres

O potencial da atividade antioxidante do extrato foi determinado baseado na atividade seqüestrante da solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), utilizando concentrações definidas de substâncias com reconhecida atividade antioxidante e avaliando o potencial dos extratos obtidos neste trabalho. A atividade anti-radicalar, em porcentagem, dos padrões e das amostras, em suas definidas concentrações, está apresentado na Figura 22.

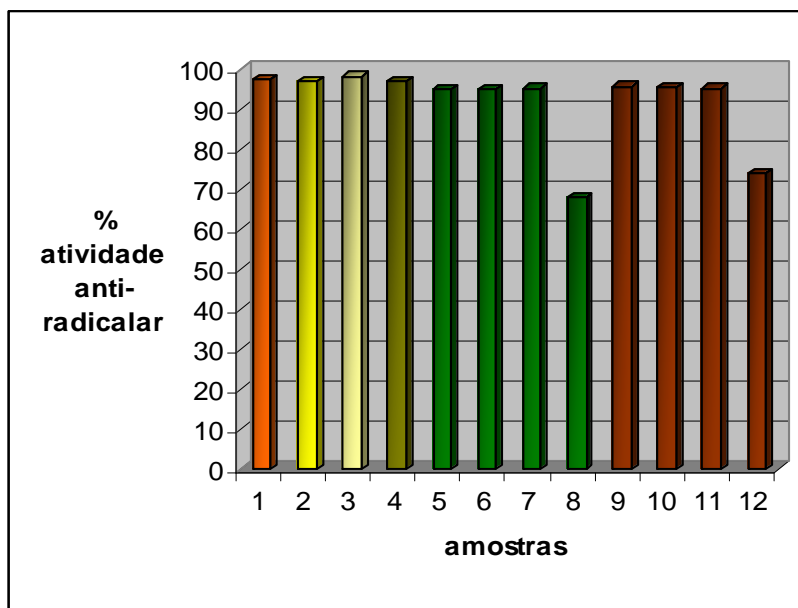


Figura 22: Atividade anti-radicalar percentual das substâncias padrão e dos extratos estudados na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (1) ácido gálico; (2) rutina; (3) vitamina C; (4) extrato de *Ginkgo biloba*; (5) extrato EtOH 50 das folhas de *M. cauliflora*; (6) extrato EtOH 70 de folhas de *M. cauliflora*; (7) extrato Ac:H₂O (7:3) de folhas de *M. cauliflora*; (8) extrato CHCl₃ de folhas de *M. cauliflora*; (9) extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens*; (10) extrato EtOH 70 de casca de *S. adstringens*; (11) extrato Ac:H₂O (7:3) de casca de *S. adstringens*; (12) extrato CHCl₃ de casca de *S. adstringens*.

5.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.6.1. Teste de difusão em ágar

A solução de controle de atividade do DMSO não apresentou formação de halo de inibição contra as bactérias em estudo, portanto, este solvente não foi interferente da atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos utilizados neste estudo. A identificação dos halos de inibição podem ser visualizados na Figura 23.

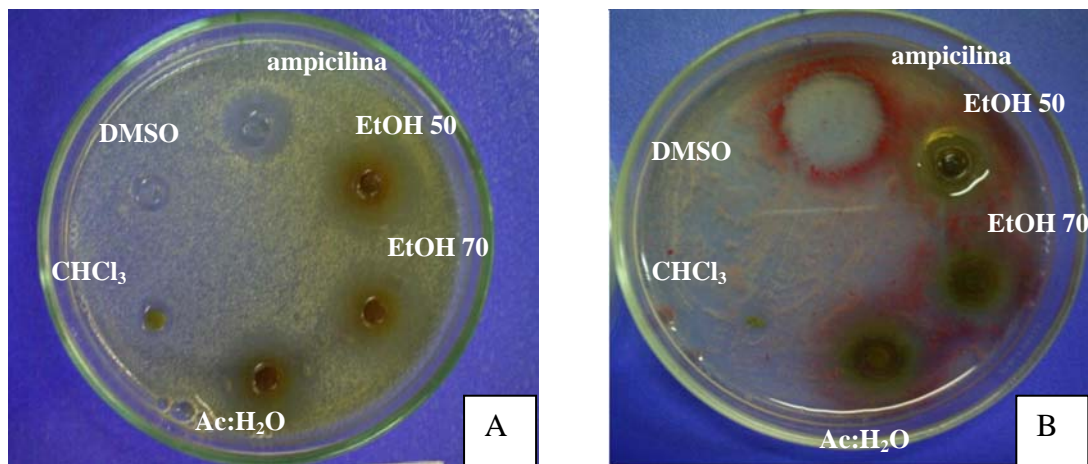


Figura 23: Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar dos extratos de *M. cauliflora* contra *E. coli*. A- antes de revelação com TTC. B- após revelação com TTC 2 %.

O halo de inibição dos extratos obtidos das folhas e da casca de *M. cauliflora* e *S. adstringens*, na concentração de 50 mg/mL, está demonstrado na Tabela 11, em milímetros, pela média de três determinações, bem como os halos apresentados pela ampicilina contra as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* e *E. coli*.

Tabela 11: Média dos halos de inibição dos extratos de folhas de *M. cauliflora*, de casca de *S. adstringens* e de ampicilina.

Microrganismo	<i>M. cauliflora</i>				<i>S. adstringens</i>				Ampicilina (50 µg/mL)
	EtOH 50	EtOH 70	Ac:H ₂ O (7:3)	CHCl ₃	EtOH 50	EtOH 70	Ac:H ₂ O (7:3)	CHCl ₃	
<i>S. aureus</i>	18,1±1,6 ^a	18,4±1,0	18,7±1,2	0	13,5±1,5	12,5±0,60	13,7±1,5	0	15±0,85
<i>S. epidermidis</i>	19,3±2,0	18,7±0,5	20,1±1,5	0	14,5±0,70	13,7±1,5	12±1,0	0	14,7±0,60
<i>B. subtilis</i>	19,1±1,2	18,1±0,20	19,5±0,35	0	11,5±0,70	11±0,0	10,5±2,0	0	15,1±0,20
<i>E. coli</i>	19±1,7	18,1±2,0	19,6±1,7	0	13,5±0,70	14,3±0,60	14±1,0	0	15±0,60

a) as medidas são apresentadas em média de três determinações de halo±desvio-padrão, em mm.

A Tabela 11 mostra que os menores halos de inibição foram obtidos com os extratos da casca de *S. adstringens*, o que pode ser devido à complexação existente entre taninos e proteínas presentes na constituição do meio de cultura. Verificou-se que os extratos clorofórmicos de ambas as espécies não apresentaram halos de inibição e que os maiores halos foram obtidos com os extratos hidroalcoólicos e acetônicos de ambas as espécies vegetais em estudo.

5.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de diluição em microplaca e concentração bactericida mínima

Abaixo, a Figura 24 mostra uma microplaca incubada com *E. coli*, segundo o esquema apresentado na Figura 6 e sua respectiva subcultura em meio sólido de Müeller Hinton.

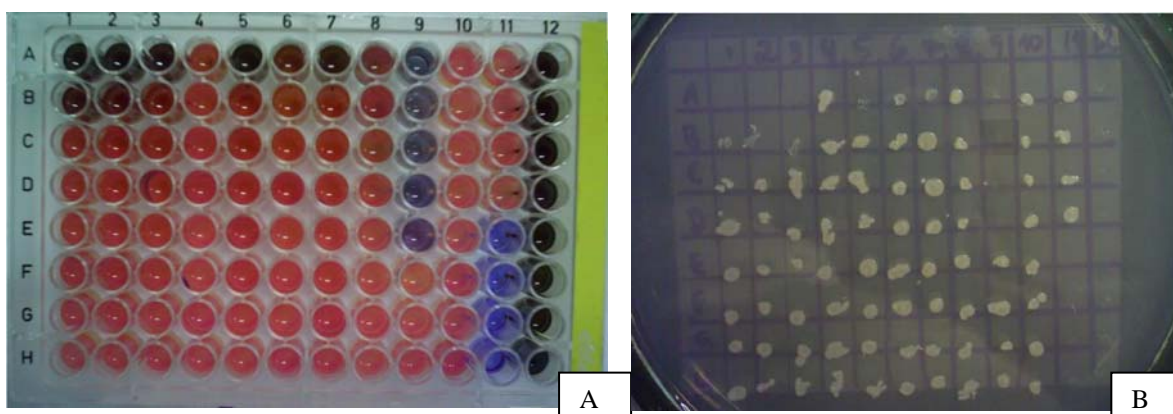


Figura 24: Determinação de CIM e CBM pelo método de microdiluição em microplaca. (A) Fotografia de microplacas de determinação de CIM dos extratos pelo método de microdiluição contra *E. coli*. (B) Fotografia de placa de Petri de 12 cm de diâmetro para determinação de CBM dos respectivos extratos da microplaca.

A Tabela 12 mostra a moda dos valores de CIM e CBM dos quatro extratos obtidos das folhas de *M. cauliflora*, das cascas de *S. adstringens* e do controle antibiótico ampicilina.

Tabela 12: Moda dos valores de CIM e CBM dos extratos testados e da ampicilina.

amostras	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>E. coli</i>	
	CIM ^a	CBM ^a	CIM ^a	CBM ^a	CIM ^a	CBM ^a	CIM ^a	CBM ^a
<i>M. cauliflora</i>								
EtOH 50	5,0	5,0	5,0	5,0	>5,0	>5,0	5,0	5,0
EtOH 70	5,0	5,0	5,0	5,0	>5,0	>5,0	5,0	> 5,0
Ac:H ₂ O	5,0	5,0	5,0	5,0	>5,0	>5,0	5,0	> 5,0
CHCl ₃	> 5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	> 5,0	> 5,0
<i>S. adstringens</i>								
EtOH 50	5,0	5,0	2,5	2,5	2,5	5,0	5,0	5,0
EtOH 70	5,0	5,0	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5
Ac:H ₂ O	5,0	5,0	2,5	2,5	5,0	5,0	2,5	2,5
CHCl ₃	> 5,0	> 5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	> 5,0	> 5,0
ampicilina ^b	3,125	3,125	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56

a) os resultados de CIM e CBM expressos em mg/mL e representam a média de triplicatas.

b) valores expressos em µg/mL.

Houve crescimento bacteriano nos poços selecionados para controle positivo de crescimento. Nota-se ausência de crescimento bacteriano nos poços que não receberam o inóculo, indicando a esterilidade do meio de cultura (controle negativo) e a ausência de contaminação dos extratos tanto das folhas como das cascas. Houve crescimento bacteriano nos poços onde foram colocados os controles de solvente DMSO indicando que este solvente não foi interferente dos resultados de inibição do crescimento bacteriano apresentados pelos extratos.

Pode-se observar pela Tabela 12 que o extrato clorofórmico das folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens* não apresentou atividade antibacteriana na maior concentração testada (5,0 mg/mL).

Observa-se pela Tabela 12, que os valores apresentados de CIM para todos os extratos que apresentaram atividade foram, geralmente, semelhantes aos valores de CBM. Pôde-se verificar que os extratos hidroalcoólicos de *M. cauliflora* apresentaram-se mais ativos que o extrato acetônico; entretanto, o extrato obtido com EtOH 50 da casca de *S. adstringens* apresentou menor atividade que os extratos obtidos com EtOH 70 e Ac:H₂O (7:3).

5.6.3. Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de macrodiluição e concentração bactericida mínima

Pelo método de diluição em tubo, também conhecido como macrodiluição, obteve-se os valores de CIM e CBM apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Média dos valores de CIM por macrodiluição e CBM.

EXTRATOS	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>E. coli</i>	
	CIM ^a	CBM ^a	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>M. cauliflora</i>								
EtOH 50	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	10,0	10,0
EtOH 70	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	10,0	10,0
Ac:H ₂ O	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	10,0	10,0
<i>S. adstringens</i>								
EtOH 50	4,0	4,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
EtOH 70	4,0	4,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Ac:H ₂ O	4,0	4,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

a) resultados de CIM e CBM expressos em mg/mL.

O controle negativo realizado com DMSO apresentou crescimento bacteriano, indicando não ter atividade inibitória na concentração testada. O controle de meio não apresentou crescimento, indicando sua esterilidade e o controle positivo de crescimento das bactérias utilizadas teve crescimento, indicando que as condições de crescimento estavam adequadas.

Este experimento não foi conduzido com o extrato CHCl₃, uma vez que nos testes anteriores de difusão em ágar e de diluição em microplaca, o extrato não apresentou atividade antimicrobiana.

5.6.4. Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de diluição em microplaca e concentração fungicida mínima

A Tabela 14 mostra os valores de CIM e CFM dos extratos contra as cepas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.

Tabela 14: Moda dos valores de CIM e CFM dos extratos de *M. cauliflora* e *S. adstringens* contra cepas de *Candida* sp.

EXTRATOS	<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	CIM ^a	CFM ^a	CIM ^a	CFM ^a	CIM ^a	CFM ^a
<i>M. cauliflora</i>						
EtOH 50	0,625	>10,0	0,625	>10,0	0,625	1,25
EtOH 70	0,625	>10,0	0,625	>10,0	0,625	2,50
Ac:H ₂ O	0,625	>10,0	0,625	>10,0	0,625	1,25
CHCl ₃	> 10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
<i>S. adstringens</i>						
EtOH 50	0,3125	>10,0	0,156	>10,0	0,625	5,0
EtOH 70	0,3125	>10,0	0,156	>10,0	0,625	2,5
Acetona	0,3125	>10,0	0,156	>10,0	0,625	2,5
Ac:H ₂ O	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
anfotericina B ^b	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

a) resultados de CIM e CFM expressos em mg/mL.

b) resultados de CIM e CFM expressos em µg/mL.

Desta forma, pela Tabela 14 observamos que a concentração inibitória mínima é de 0,625 mg/mL para a maioria dos extratos, exceto o extrato EtOH 70 das folhas de *M. cauliflora*, ao qual a levedura apresentou-se mais sensível. Os extratos CHCl₃ de ambas as plantas, não apresentaram atividade na maior concentração testada.

5.6.5. Bioautografia

Foi possível visualizar manchas incolores, como exemplificado na Figura 25, referentes à ausência de crescimento bacteriano, ao redor dos pontos de aplicação dos extratos. No entanto, os cromatogramas revelados com anisaldeído mostram, na região central das placas, que outras substâncias foram eluídas (derivados de flavonóides e de taninos condensados), mas, aparentemente, não apresentam atividade antimicrobiana ou não apresentam na concentração em que estão presentes. Também foi possível observar que não houve formação de halo nítido em torno da mancha correspondente à amostra dos extratos clorofórmicos.

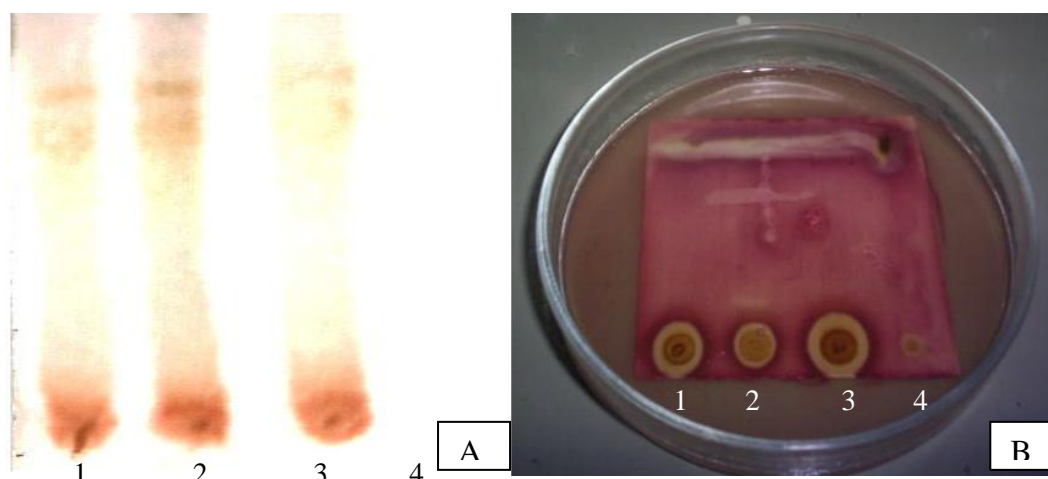


Figura 25: Ilustração de resultado do método de avaliação da atividade antimicrobiana por bioautografia. (A) Cromatograma dos extratos de folhas de *M. cauliflora* revelado com anisaldeído sulfúrico; (B) Fotografia do cromatograma dos extratos de folhas de *M. cauliflora* incubado com *S. aureus*.

1- Ext. EtOH 50; 2- Ext. EtOH 70; 3- Ext. Ac:H₂O; 4- Ext. CHCl₃.

5.7. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

Observou-se, visualmente, que os quatro extratos obtidos de casca de *S. adstringens* apresentaram índice de citotoxicidade (IC) na concentração de 0,156 mg/mL. O extrato de folhas de *M. cauliflora* obtido com etanol 50% apresentou-se citotóxico a partir da concentração de 0,625 mg/mL, enquanto que os extratos obtidos com etanol 70% e com acetona:água (7:3; v/v) apresentaram-se citotóxicos na concentração de 0,312 mg/mL e o extrato clorofórmico apresentou citotoxicidade na concentração de 0,156 mg/mL. A Figura 26 representa os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade dos extratos.

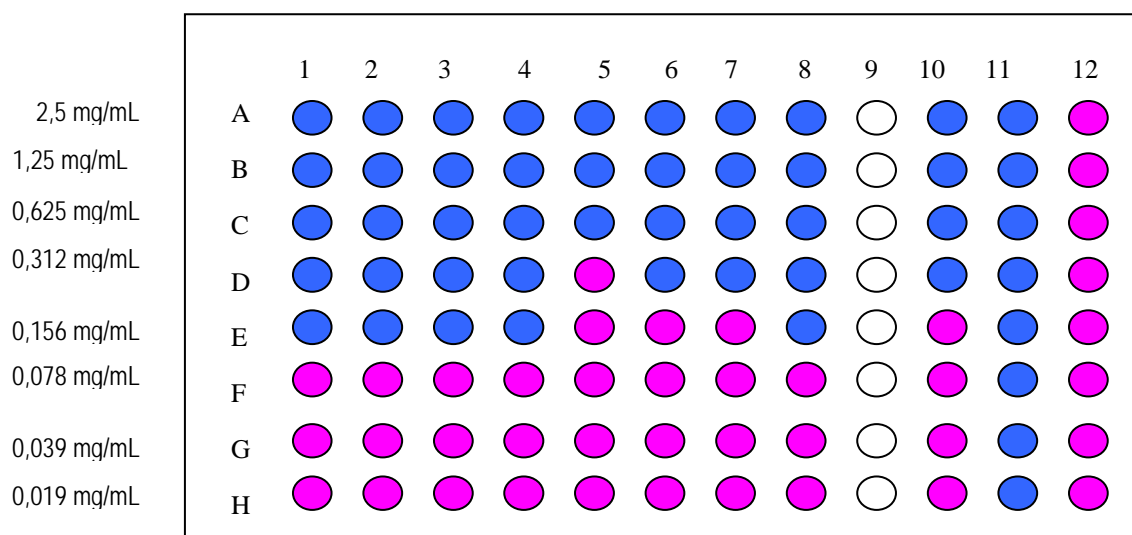


Figura 26: Representação dos resultados de citotoxicidade dos extratos obtidos de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens*.

● Ausência de células vivas.

● Presença de células vivas.

Coluna 1: EtOH 50 de casca de *S. adstringens*.

Coluna 2: EtOH 70 de casca de *S. adstringens*.

Coluna 3: Ac:H₂O de casca de *S. adstringens*.

Coluna 4: CHCl₃ de casca de *S. adstringens*.

Coluna 5: EtOH 50 de folhas de *M. cauliflora*.

Coluna 6: EtOH 70 de folhas de *M. cauliflora*.

Coluna 7: Ac:H₂O de folhas de *M. cauliflora*.

Coluna 8: CHCl₃ de folhas de *M. cauliflora*.

Coluna 10: controle de DMSO.

Coluna 11: controle de ausência de células vivas.

Coluna 12: controle de presença de células vivas.

A Tabela 15 apresenta os valores de IC dos extratos e do solvente DMSO.

Tabela 15: Valor de IC dos extratos de folhas de *M. cauliflora* e de casca de *S. adstringens* frente a células de macrófagos da linhagem J774.

amostras	IC
<i>M. cauliflora</i>	
EtOH 50	0,625 mg/mL
EtOH 70	0,312 mg/mL
Ac:H ₂ O	0,312 mg/mL
CHCl ₃	0,156 mg/mL
<i>S. adstringens</i>	
EtOH 50	0,156 mg/mL
EtOH 70	0,156 mg/mL
Ac:H ₂ O	0,156 mg/mL
CHCl ₃	0,156 mg/mL
DMSO	1:16 (v/v)

Os extratos obtidos de casca de *S. adstringens* apresentaram citotoxicidade semelhante. O extrato de folhas de *M. cauliflora* obtido com etanol 50% foi o que se apresentou menos citotóxico, enquanto que o extrato obtido com clorofórmico foi o que apresentou maior citotoxicidade.

No ensaio de controle da citotoxicidade do solvente DMSO, o mesmo apresentou-se citotóxico até a diluição de 1:16 em RPMI-1640. entretanto, este resultado não interfere nos resultados de citotoxicidade dos extratos, uma vez que após dissolvidos em DMSO, foram diluídos 1:20 em RPMI-1640.

5.8. PREPARAÇÕES COSMÉTICAS

Certamente, a melhor forma de entender a obtenção das preparações cosméticas é por meio da visualização da mesma.

5.8.1. Sabonete líquido

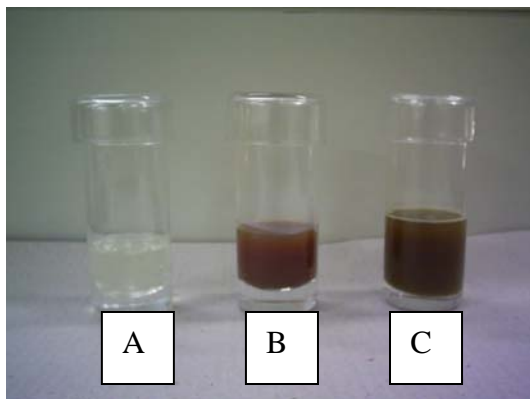


Figura 27: Fotografia de ilustração das preparações de sabonete líquido. A- sabonete líquido controle; B- sabonete líquido com extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* a 0,25%; C- sabonete líquido com extrato EtOH 70 de folhas de *M. cauliflora* a 0,25%.

5.8.2. Sabonete em barra

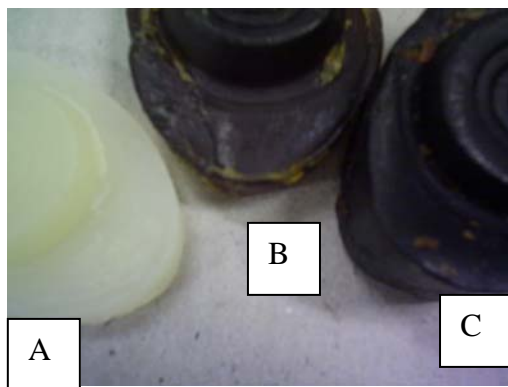


Figura 28: Fotografia de ilustração das preparações de sabonete em barra. A- sabonete em barra controle; B- sabonete em barra com extrato EtOH 70 de folhas de *M. cauliflora* a 0,25%; C- sabonete em barra com extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* a 0,25%.

5.8.3. Loção

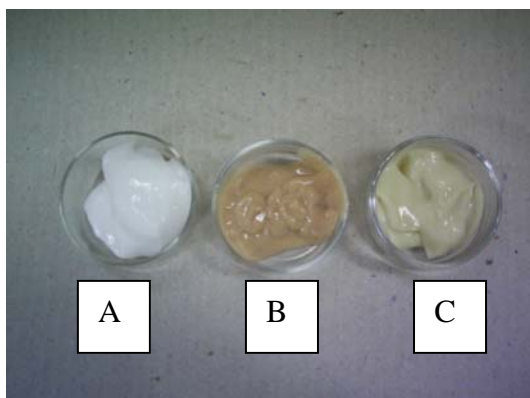


Figura 29: Fotografia de ilustração das preparações de loção. A- loção controle; B- loção com extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* a 0,50%; C- sabonete líquido com extrato EtOH 50 de folhas de *M. cauliflora* a 0,50%.

5.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SÉPTICA DAS PREPARAÇÕES COSMÉTICAS

5.9.1. Teste de difusão em ágar

A maioria das preparações incorporadas com os extratos de folhas de *M. cauliflora* apresentaram atividade anti-séptica contra as bactérias ensaiadas, enquanto que apenas uma das preparações de sabonete líquido e uma de loção com extrato de *S. adstringens* apresentaram atividade. Entretanto, contra as cepas de *Candida* spp, as preparações de sabonete líquido de ambos os extratos mostraram significativa atividade, embora as preparações de loção, também com os extratos de ambas as plantas, não mostraram atividade anti-séptica. As Tabelas 16 e 17 apresentam a média dos valores dos halos de inibição de crescimento microbiano, em mm, das preparações de sabonete líquido e de loção, respectivamente.

Tabela 16: Halos de inibição de crescimento microbiano das preparações de sabonete líquido contra as bactérias e leveduras testadas.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>M. cauliflora</i>						
EtOH 50 0,25%	13,0±1,4 ^a	13,7±1,2	13,5±0,7	21,3±1,5	25,0±2,1	20±3,8
EtOH 50 0,50%	13,0±1,7	13,3±1,5	14,0±1,0	23,3±2,1	25,0±4,2	redução ^b
EtOH 50 1,00%	13,0±1,0	14,7±2,1	13,3±0,6	22,3±3,8	25,0±3,8	redução
EtOH 70 0,25%	14,7±2,1	14,0±2,0	15,0±1,0	23,5±2,1	25,0±3,8	redução
EtOH 70 0,50%	0,0	18,0±1,0	0,0	20,0±2,8	redução	redução
EtOH 70 1,00%	14,0±1,0	15,3±0,6	14,3±1,5	20,5±3,8	25,0±2,1	redução
<i>S. adstringens</i>						
EtOH 50 0,25%	14,7±2,5	14,0±4,2	15,0±1,0	24,0±1,4	25,5±0,7	24,7±2,1
EtOH 50 0,50%	- ^c	-	-	-	-	-
EtOH 50 1,00%	-	-	-	-	-	-
EtOH 70 0,25%	-	-	-	-	-	-
EtOH 70 0,50%	-	-	-	-	-	-
EtOH 70 1,00%	-	-	-	-	-	-
Sabonete controle	11,0±1,0	10,0±0,7	10,0±1,0	redução	redução	redução

a) valores expressos em mm pela média±desvio-padrão.

b) redução= redução do crescimento microbiano, mas sem formação nítida de halo de inibição.

c) -: ausência de formação de halo de inibição de crescimento.

Tabela 17: Halos de inibição de crescimento microbiano das preparações de loção contra as bactérias e leveduras testadas.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>M. cauliflora</i>						
EtOH 50 0,25%	0,0 ^a	12,0±1,4	15,0±0,0	- ^b	-	-
EtOH 50 0,50%	11,0±2,1	12,0±1,0	13,0±1,4	-	-	-
EtOH 50 1,00%	11,0±1,0	14,0±1,4	13,0±1,4	-	-	-
EtOH 70 0,25%	10,0±0,7	12,0±1,4	13,5±2,1	-	-	-
EtOH 70 0,50%	10,0±1,0	14,0±1,4	14,5±0,7	-	-	-
EtOH 70 1,00%	11,0±1,4	14,0±1,4	16,0±1,2	-	-	-
<i>S. adstringens</i>						
EtOH 50 0,25%	-	-	-	-	-	-
EtOH 50 0,50%	12,0±1,0	12,5±0,7	12,3±0,6	-	-	-
EtOH 50 1,00%	-	-	-	-	-	-
EtOH 70 0,25%	-	-	-	-	-	-
EtOH 70 0,50%	-	-	-	-	-	-
EtOH 70 1,00%	-	-	-	-	-	-
Sabonete controle	-	-	-	-	-	-

a) valores expressos em mm pela média±desvio-padrão.

b) -: ausência de formação de halo de inibição de crescimento.

A preparação de sabonete líquido apresentou pequena formação de halo de inibição do crescimento bacteriano. No entanto, as preparações contendo os extratos obtidos de folhas de *M. cauliflora* apresentaram atividade de cerca de 18% a 39% superior à preparação sem o extrato, enquanto que a preparação com extrato de *S. adstringens* que apresentou atividade, esta foi maior, em média, 45%. O sabonete líquido de controle também apresentou inibição do crescimento das leveduras, entretanto, não o suficiente para ocorrer formação de halo de inibição nítido.

Por outro lado, a preparação controle da loção não apresentou atividade contra nenhuma das cepas ensaiadas e nenhuma das preparações de loção apresentou atividade contra *Cândida* spp. A Figura 30 apresenta fotografias ilustrativas dos resultados de atividade anti-séptica das preparações frente a alguns dos microrganismos ensaiados.

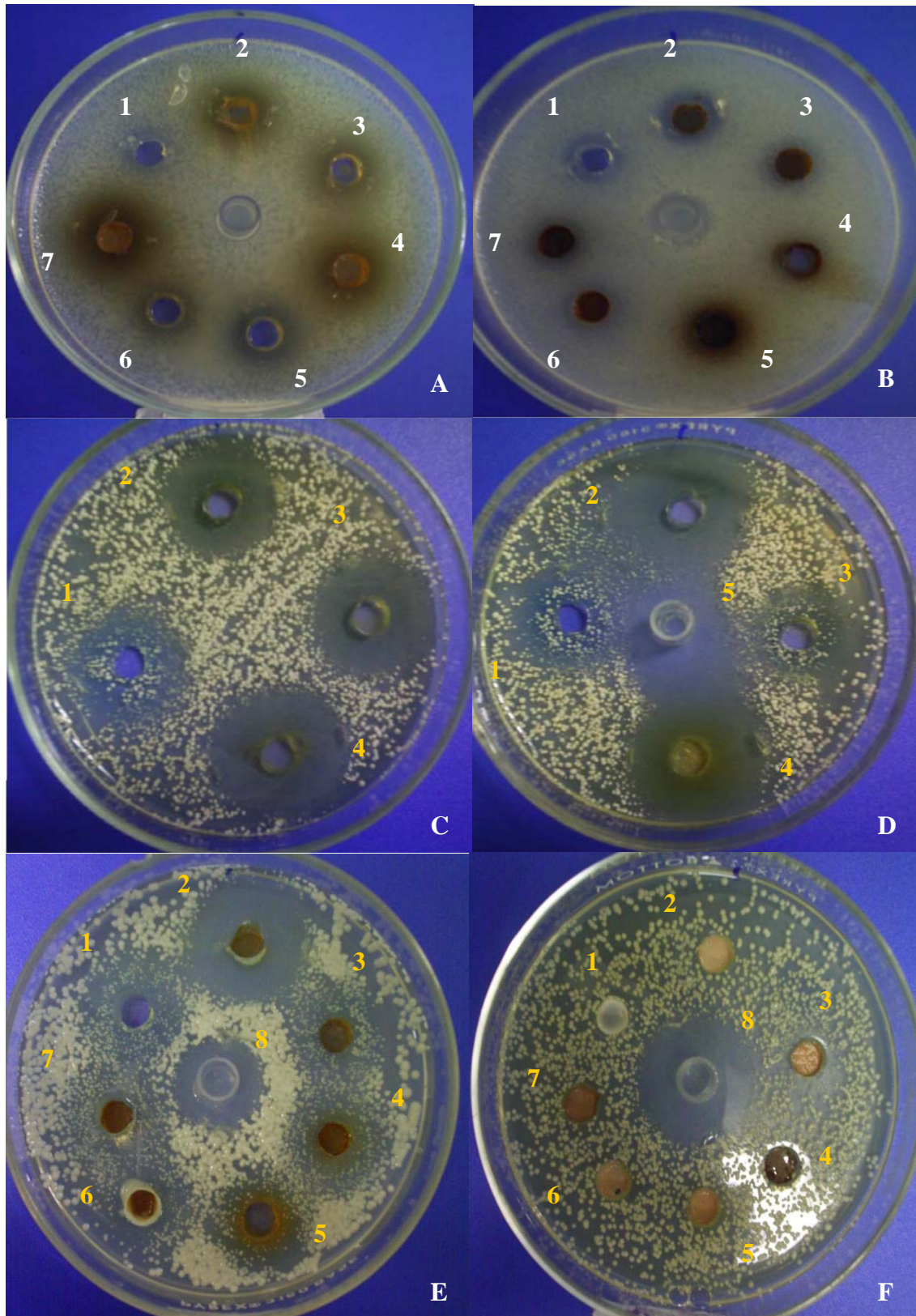


Figura 30: Placas de avaliação da atividade anti-séptica de diferentes amostras das preparações frente a alguns dos microrganismos ensaiados. A) Microrganismo: *E. coli*. 1- sabonete líquido controle; 2- sabonete líquido com 0,25% de extrato EtOH 50 de *M. cauliflora*; 3- sabonete líquido com 0,50% de extrato EtOH 50 de *M. cauliflora*; 4- sabonete líquido com 1,00% de extrato EtOH 50 de *M. cauliflora*; 5- sabonete líquido com 0,25% de extrato EtOH 70 de *M. cauliflora*; 6- sabonete líquido com 0,50% de extrato EtOH 70 de *M. cauliflora*; 7- sabonete líquido com 1,00% de extrato EtOH 70 de *M. cauliflora*. B)

Microrganismo: *S. aureus*. 1- sabonete líquido controle; 2- sabonete líquido com 0,25% de extrato EtOH 50 de *S. adstringens*; 3- sabonete líquido com 0,50% de extrato EtOH 50 de *S. adstringens*; 4- sabonete líquido com 1,00% de extrato EtOH 50 de *S. adstringens*; 5- sabonete líquido com 0,25% de extrato EtOH 70 de *S. adstringens*; 6- sabonete líquido com 0,50% de extrato EtOH 70 de *S. adstringens*; 7- sabonete líquido com 1,00% de extrato EtOH 70 de *S. adstringens*. C) Microrganismo: *C. parapsilosis*. 1- sabonete líquido; 2- sabonete líquido com 0,25% de extrato EtOH 50 de *M. cauliflora*; 3- sabonete líquido com 0,50% de extrato EtOH 50 de *M. cauliflora*; 4- sabonete líquido com 1,00% de extrato EtOH 50 de *M. cauliflora*. D) Microrganismo: *C. parapsilosis*. 1- sabonete líquido; 2- sabonete líquido com 0,25% de extrato EtOH 70 de *M. cauliflora*; 3- sabonete líquido com 0,50% de extrato EtOH 70 de *M. cauliflora*; 4- sabonete líquido com 1,00% de extrato EtOH 70 de *M. cauliflora*; 5- anfotericina B. E) Microrganismo: *C. tropicalis*. 1- sabonete líquido controle; 2- sabonete líquido com 0,25% de extrato EtOH 50 de *S. adstringens*; 3- sabonete líquido com 0,50% de extrato EtOH 50 de *S. adstringens*; 4- sabonete líquido com 1,00% de extrato EtOH 50 de *S. adstringens*; 5- sabonete líquido com 0,25% de extrato EtOH 70 de *S. adstringens*; 6- sabonete líquido com 0,50% de extrato EtOH 70 de *S. adstringens*; 7- sabonete líquido com 1,00% de extrato EtOH 70 de *S. adstringens*; 8- anfotericina B. F) Microrganismo: *C. albicans*. 1- sabonete líquido controle; 2- sabonete líquido com 0,25% de extrato EtOH 50 de *S. adstringens*; 3- sabonete líquido com 0,50% de extrato EtOH 50 de *S. adstringens*; 4- sabonete líquido com 1,00% de extrato EtOH 50 de *S. adstringens*; 5- sabonete líquido com 0,25% de extrato EtOH 70 de *S. adstringens*; 6- sabonete líquido com 0,50% de extrato EtOH 70 de *S. adstringens*; 7- sabonete líquido com 1,00% de extrato EtOH 70 de *S. adstringens*; 8- anfotericina B.

Após o período a que as preparações foram submetidas às condições de estresse, as mesmas não apresentaram mais atividade anti-séptica, indicando que os componentes ativos não mantiveram sua propriedade contra os microrganismos testados.

5.10. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS PREPARAÇÕES

5.10.1. Teste de centrifugação

As preparações de sabonete líquido de controle, com extrato EtOH 70 de folhas de *M. cauliflora* incorporado a 0,25% e a outra com extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* incorporado a 0,25% não apresentaram separação de componentes após submetidas à centrifugação. As preparações de loção de controle e com extrato EtOH 50 de folhas de *M. cauliflora* incorporado a 0,25% também não apresentaram separação de fases; contudo, a loção incorporada de 0,50% de extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* apresentou separação, indicando que a formulação desenvolvida não era adequada para a porcentagem e o tipo de extrato incorporado, provavelmente.

5.10.2. Estabilidade preliminar

Parâmetros organolépticos: aspecto, cor e odor não foram alterados durante o período de exposição às condições de estresse em relação à observação dos mesmos parâmetros das preparações antes de serem submetidas.

Avaliação do valor de pH: pelas medidas de pH das preparações de sabonete líquido e de loção, através de peagômetro, os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas e Figuras a seguir.

A Tabela 18 apresenta a variação de pH das preparações de sabonete líquido de controle, com extrato EtOH 70 de *M. cauliflora* a 0,25% na formulação e com extrato EtOH 50 de *S. adstringens* a 0,25% na formulação, desde o dia 0 (zero) até o último dia em que as preparações foram submetidas às condições de estresse. Em conseguinte, a Tabela 19 apresenta a variação de pH das preparações de loção de controle, com extrato EtOH 50 de *M. cauliflora* a 0,25% na formulação e com extrato EtOH 50 de *S. adstringens* a 0,50% no mesmo período referido.

Tabela 18: Variação de pH da preparação de sabonete líquido de controle, com extrato de folhas de *M. cauliflora* e com extrato de casca de *S. adstringens*.

DIAS	Controle		<i>M. cauliflora</i>		<i>S. adstringens</i>	
	37 ± 2 °C	5 ± 2 °C	37 ± 2 °C	5 ± 2 °C	37 ± 2 °C	5 ± 2 °C
0	6,53±0,06 ^a		6,22±0,04		6,25±0,00	
1	6,43±0,06	6,47±0,04	6,18±0,02	6,16±0,07	6,25±0,05	6,02±0,25
2	6,28±0,07	6,48±0,00	6,27±0,02	6,20±0,01	6,35±0,04	6,28±0,04
3	6,44±0,04	6,46±0,02	6,15±0,01	6,18±0,03	6,24±0,03	6,25±0,08
4	6,46±0,03	6,33±0,10	6,16±0,03	6,18±0,00	6,17±0,07	6,19±0,02
5	6,61±0,05	6,36±0,01	6,18±0,02	6,17±0,03	6,14±0,01	6,25±0,00
6	6,39±0,05	6,28±0,07	6,18±0,02	6,15±0,06	6,15±0,03	6,24±0,01
7	6,48±0,14	6,38±0,05	6,11±0,06	6,18±0,01	6,17±0,04	6,28±0,06
8	6,58±0,07	6,37±0,03	6,17±0,00	6,18±0,02	6,15±0,00	6,23±0,00
9	6,41±0,03	6,32±0,02	6,16±0,03	6,18±0,01	6,18±0,01	6,19±0,05
10	6,42±0,06	6,40±0,01	6,09±0,05	6,15±0,03	6,21±0,06	6,21±0,01
11	6,40±0,03	6,36±0,01	6,13±0,02	6,19±0,01	6,15±0,02	6,23±0,03
12	6,50±0,05	6,34±0,01	6,18±0,01	6,08±0,07	6,12±0,01	6,21±0,04
13	6,40±0,02	6,46±0,03	6,18±0,00	6,13±0,06	6,15±0,02	6,27±0,02
14	6,42±0,01	6,50±0,05	6,18±0,02	6,18±0,03	6,14±0,04	6,25±0,03
15	6,54±0,12	6,48±0,01	6,17±0,03	6,21±0,05	6,06±0,01	6,28±0,02

a)média±desvio-padrão.

Tabela 19: Variação de pH da preparação de loção de controle, com extrato de folhas de *M. cauliflora* e com extrato de casca de *S. adstringens*.

DIAS	Controle		<i>M. cauliflora</i>		<i>S. adstringens</i>	
	37 ± 2 °C	5 ± 2 °C	37 ± 2 °C	5 ± 2 °C	37 ± 2 °C	5 ± 2 °C
0	4,00±0,11 ^a		3,83±0,01		3,89±0,19	
1	3,68±0,02	3,69±0,01	3,73±0,01	3,81±0,05	3,75±0,01	3,73±0,01
2	3,66±0,02	3,29±0,80	3,89±0,17	3,17±0,10	3,81±0,14	3,90±0,04
3	3,66±0,01	3,60±0,06	3,72±0,08	3,71±0,05	3,66±0,02	3,70±0,01
4	3,68±0,01	3,67±0,03	3,70±0,03	3,77±0,02	3,73±0,08	3,81±0,05
5	3,74±0,07	3,77±0,11	3,73±0,01	3,74±0,04	3,81±0,08	3,72±0,01
6	3,71±0,14	3,69±0,14	3,69±0,10	3,75±0,01	3,78±0,00	3,71±0,02
7	3,68±0,01	3,61±0,03	3,76±0,01	3,77±0,00	3,66±0,03	3,88±0,01
8	3,58±0,07	3,59±0,08	3,67±0,04	3,79±0,02	3,66±0,08	3,77±0,03
9	3,60±0,06	3,55±0,01	3,73±0,08	3,67±0,01	3,70±0,06	3,66±0,03
10	3,45±0,05	3,63±0,09	3,73±0,03	3,70±0,06	3,45±0,17	3,68±0,10
11	3,61±0,02	3,57±0,05	3,72±0,01	3,72±0,09	3,76±0,09	3,71±0,02
12	3,55±0,01	3,61±0,07	3,66±0,02	3,69±0,01	3,64±0,01	3,61±0,07
13	3,58±0,08	3,46±0,01	3,71±0,1	3,16±0,14	3,87±0,10	3,27±0,17
14	3,50±0,00	3,55±0,06	3,63±0,07	3,70±0,02	3,68±0,05	3,65±0,02
15	3,55±0,01	3,67±0,03	3,66±0,04	3,69±0,02	3,62±0,03	3,73±0,17

a)média±desvio-padrão.

A Figura 31 apresenta a variação de pH das preparações de sabonete líquido desde o dia 0 (zero) até o último dia sob condições de estresse (dia 15). A Figura 32 apresenta a variação de pH das preparações de loção no mesmo período.

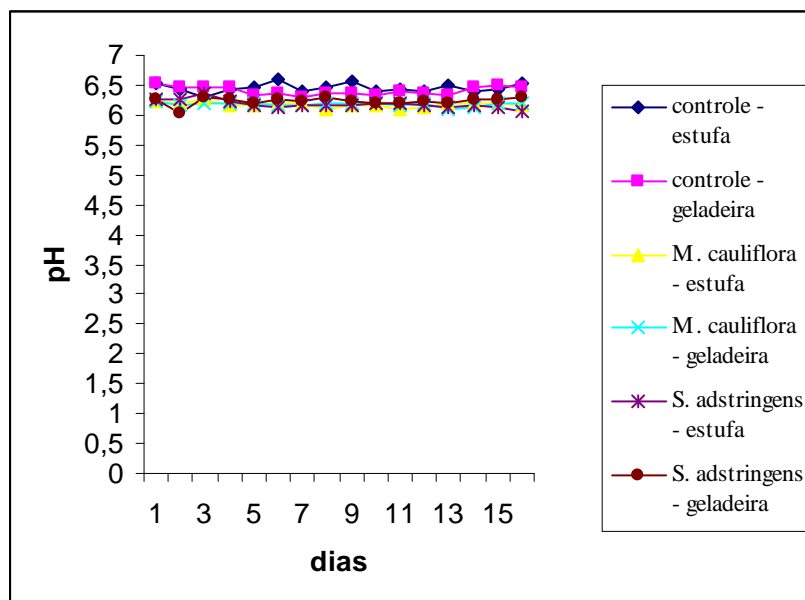


Figura 31: Variação de pH das preparações de sabonete líquido controle, com extrato de folhas de *M. cauliflora* e com extrato de casca de *S. adstringens* do dia 0 ao dia 15, sob condições de estresse.

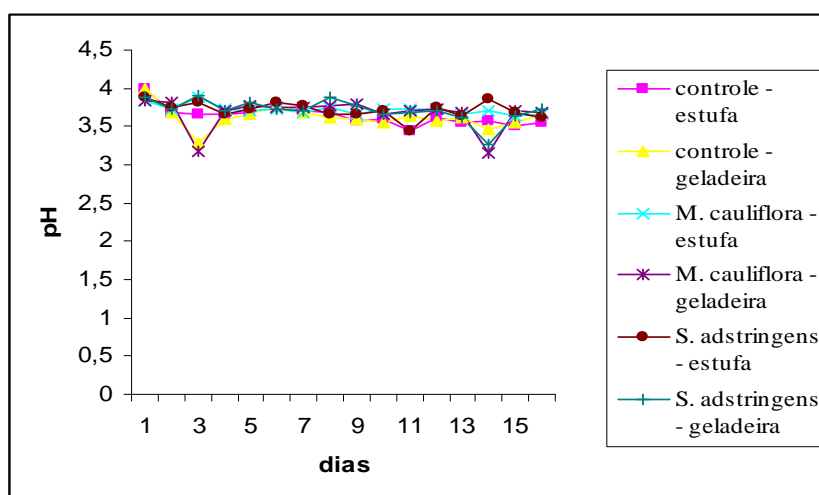


Figura 32: Variação de pH das preparações de loção controle, com extrato de folhas de *M. cauliflora* e com extrato de casca de *S. adstringens* do dia 0 ao dia 15, sob condições de estresse.

Pelos valores de pH obtidos de ambas as preparações, observou-se que a incorporação dos extratos nas fórmulas não alterou significativamente o valor de pH das preparações em relação à preparação controle. Observou-se, da mesma forma, que não houve alteração significativa durante o período de exposição das preparações às condições de estresse, o que permitiu indicar estabilidade das preparações de sabonete líquido e loção com e sem os extratos quanto ao parâmetro físico-químico de pH.

Avaliação da densidade: após o cálculo da densidade de cada medida das amostras de sabonete líquido e loção, os valores, em g/mL, são apresentados nas Tabelas e Figuras em seqüência.

A Tabela 20 apresenta a variação de densidade das preparações de sabonete líquido de controle, com extrato EtOH 70 de *M. cauliflora* a 0,25% na formulação e com extrato EtOH 50 de *S. adstringens* a 0,25% na formulação, desde o dia 0 (zero) até o último dia em que as preparações foram submetidas às condições de estresse. Em conseqüente, a Tabela 21 apresenta a variação de densidade das preparações de loção de controle, com extrato EtOH 50 de *M. cauliflora* a 0,25% na formulação e com extrato EtOH 50 de *S. adstringens* a 0,50% no mesmo período referido.

Tabela 20: Variação de densidade da preparação de sabonete líquido de controle, com extrato de folhas de *M. cauliflora* e com extrato de casca de *S. adstringens*.

DIAS	Controle		<i>M. cauliflora</i>		<i>S. adstringens</i>	
	37 ± 2 °C	5 ± 2 °C	37 ± 2 °C	5 ± 2 °C	37 ± 2 °C	5 ± 2 °C
0	1,20±0,01 ^a		1,23±0,00		1,20±0,01	
1	1,20±0,00	1,20±0,01	1,22±0,00	1,21±0,01	1,20±0,01	1,19±0,01
2	1,19±0,02	1,20±0,00	1,22±0,01	1,21±0,00	1,19±0,01	1,20±0,00
3	1,20±0,01	1,20±0,01	1,22±0,02	1,22±0,00	1,21±0,00	1,20±0,00
4	1,20±0,01	1,21±0,00	1,22±0,00	1,20±0,01	1,20±0,01	1,22±0,00
5	1,20±0,00	1,21±0,00	1,21±0,00	1,22±0,00	1,20±0,01	1,21±0,00
6	1,21±0,00	1,20±0,01	1,21±0,00	1,19±0,02	1,21±0,00	1,22±0,02
7	1,20±0,01	1,19±0,01	1,22±0,00	1,22±0,01	1,20±0,02	1,20±0,00
8	1,20±0,00	1,20±0,01	1,22±0,01	1,22±0,00	1,20±0,00	1,20±0,01
9	1,20±0,00	1,21±0,00	1,20±0,01	1,23±0,02	1,22±0,00	1,20±0,01
10	1,20±0,00	1,22±0,00	1,22±0,00	1,20±0,00	1,20±0,00	1,21±0,00
11	1,20±0,00	1,22±0,03	1,23±0,01	1,21±0,01	1,21±0,00	1,21±0,00
12	1,20±0,00	1,21±0,01	1,22±0,01	1,22±0,01	1,21±0,00	1,20±0,00
13	1,19±0,02	1,20±0,00	1,20±0,00	1,22±0,00	1,21±0,00	1,19±0,02
14	1,20±0,01	1,20±0,00	1,22±0,00	1,21±0,01	1,21±0,00	1,23±0,00
15	1,20±0,02	1,20±0,00	1,22±0,00	1,22±0,00	1,20±0,01	1,20±0,01

a)média (mg/mL)±desvio-padrão.

Tabela 21: Variação de densidade da preparação de loção de controle, com extrato de folhas de *M. cauliflora* e com extrato de casca de *S. adstringens*.

DIAS	Controle		<i>M. cauliflora</i>		<i>S. adstringens</i>	
	37 ± 2 °C	5 ± 2 °C	37 ± 2 °C	5 ± 2 °C	37 ± 2 °C	5 ± 2 °C
0	1,14±0,01		1,12±0,02		1,11±0,00	
1	1,06±0,01	1,08±0,01	1,13±0,00	1,13±0,00	1,12±0,01	1,14±0,00
2	1,08±0,01	1,07±0,02	1,12±0,00	1,11±0,02	1,14±0,00	1,15±0,01
3	1,08±0,00	1,07±0,01	1,12±0,01	1,11±0,00	1,14±0,00	1,14±0,00
4	1,10±0,00	1,08±0,00	1,09±0,01	1,13±0,00	1,09±0,00	1,14±0,01
5	1,11±0,00	1,12±0,01	1,12±0,00	1,12±0,00	1,14±0,01	1,14±0,00
6	1,10±0,01	1,10±0,00	1,13±0,00	1,13±0,01	1,13±0,01	1,15±0,00
7	1,08±0,02	1,10±0,00	1,13±0,00	1,14±0,00	1,14±0,00	1,14±0,01
8	1,13±0,00	1,13±0,00	1,13±0,01	1,13±0,01	1,14±0,00	1,14±0,01
9	1,08±0,00	1,10±0,00	1,10±0,01	1,09±0,00	1,14±0,01	1,11±0,01
10	1,09±0,00	1,08±0,00	1,11±0,00	1,11±0,00	1,14±0,00	1,12±0,01
11	1,09±0,00	1,11±0,00	1,11±0,00	1,08±0,00	1,11±0,00	1,14±0,00
12	1,09±0,01	1,10±0,00	1,13±0,00	1,13±0,00	1,15±0,00	1,14±0,00
13	1,08±0,00	1,10±0,01	1,13±0,01	1,14±0,01	1,13±0,00	1,14±0,00
14	1,10±0,01	1,12±0,00	1,13±0,01	1,13±0,01	1,15±0,00	1,12±0,01
15	1,13±0,01	1,11±0,01	1,09±0,03	1,14±0,00	1,15±0,00	1,14±0,00

a)média (mg/mL)±desvio-padrão.

A Figura 33 apresenta a variação de densidade das preparações de sabonete líquido desde o dia 0 (zero) até o último dia sob condições de estresse (dia 15). A Figura 34 apresenta a variação de densidade das preparações de loção no mesmo período.

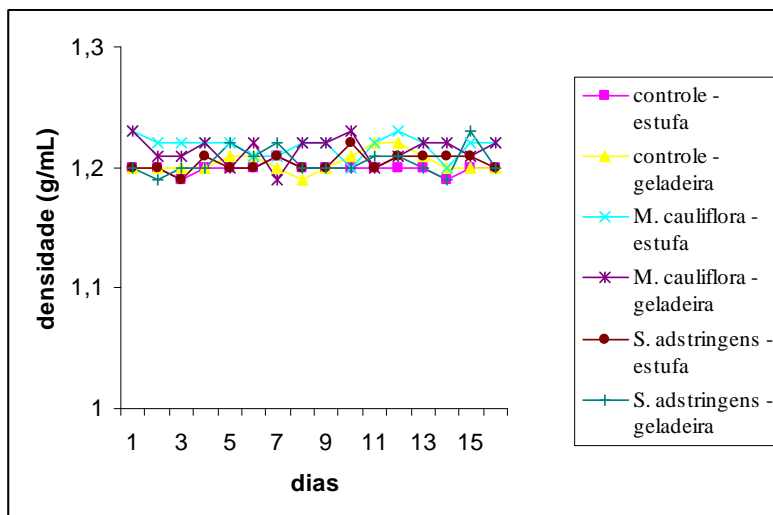


Figura 33: Variação de densidade das preparações de sabonete líquido controle, com extrato de folhas de *M. cauliflora* e com extrato de casca de *S. adstringens* do dia 0 ao dia 15, sob condições de estresse.

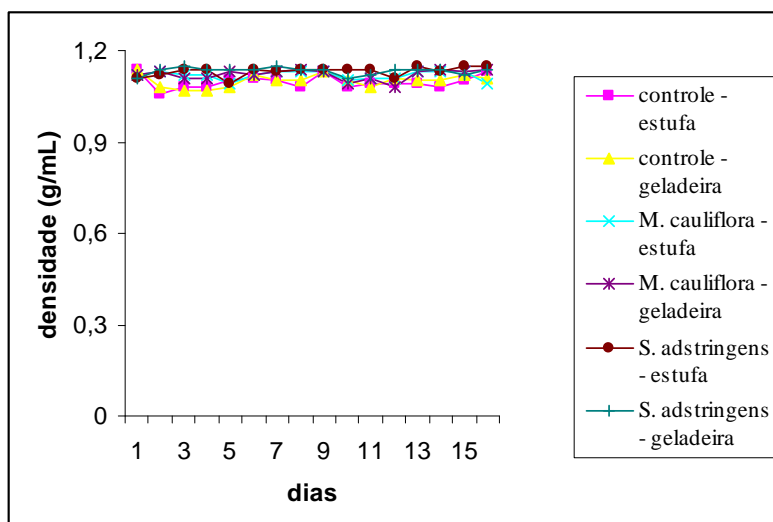


Figura 34: Variação de densidade das preparações de loção controle, com extrato de folhas de *M. cauliflora* e com extrato de casca de *S. adstringens* do dia 0 ao dia 15, sob condições de estresse.

Pelos valores de densidade obtidos de ambas as preparações, observou-se que a incorporação dos extratos nas fórmulas não alterou significativamente a densidade das preparações em relação à preparação de controle. Observou-se, da mesma forma, que não houve alteração significativa durante o período de exposição das preparações às condições de estresse, o que permitiu indicar estabilidade das preparações de sabonete líquido e loção com e sem os extratos quanto ao parâmetro físico-químico de densidade.

Avaliação do comportamento reológico das amostras: com as amostras de sabonete líquido e de loção, de controle e incorporadas com o respectivo extrato das folhas de *M. cauliflora* e com o extrato de casca de *S. adstringens*, verificou-se o seu comportamento reológico, o qual pode ser observado nas Figuras a seguir.

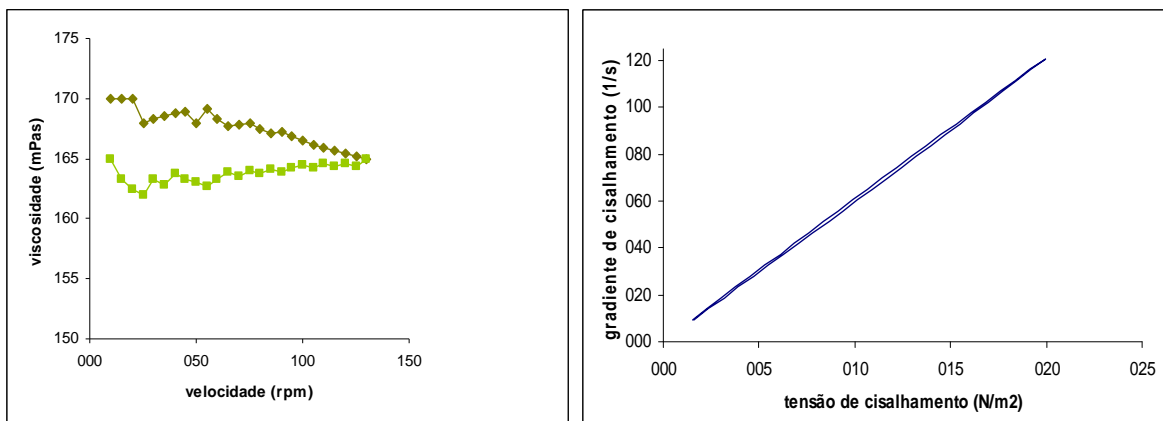


Figura 35: Reograma da preparação de sabonete líquido de controle.

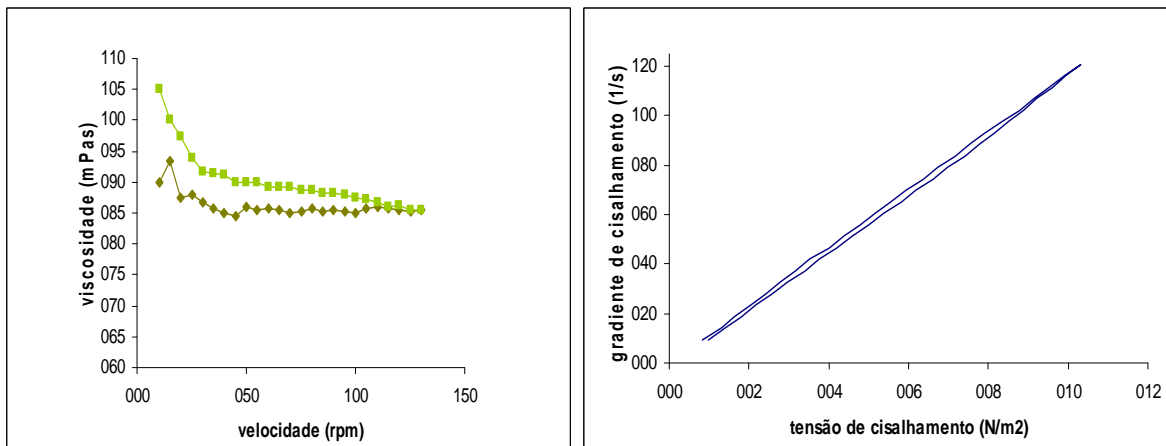


Figura 36: Reograma da preparação de sabonete líquido com extrato EtOH 70 de folhas de *M. cauliflora* a 0,25%.

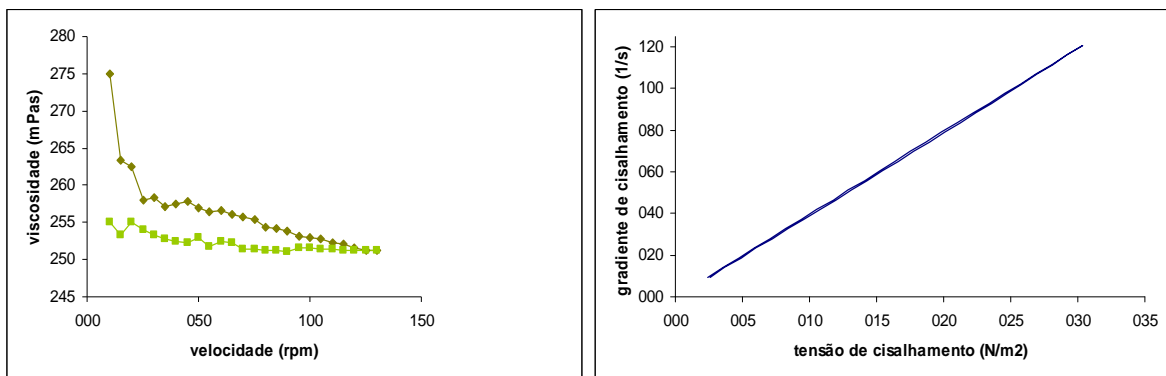


Figura 37: Reograma da preparação de sabonete líquido com extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* a 0,25%.

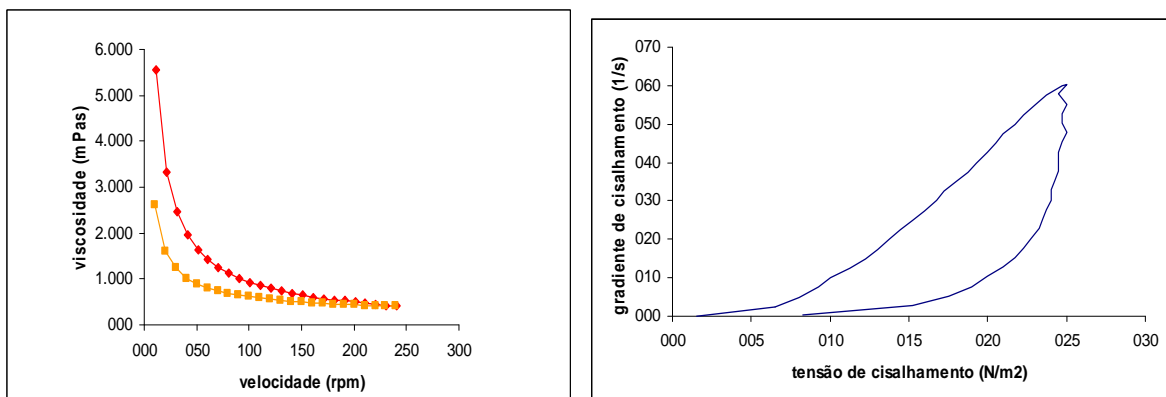


Figura 38: Reograma da preparação de loção de controle.

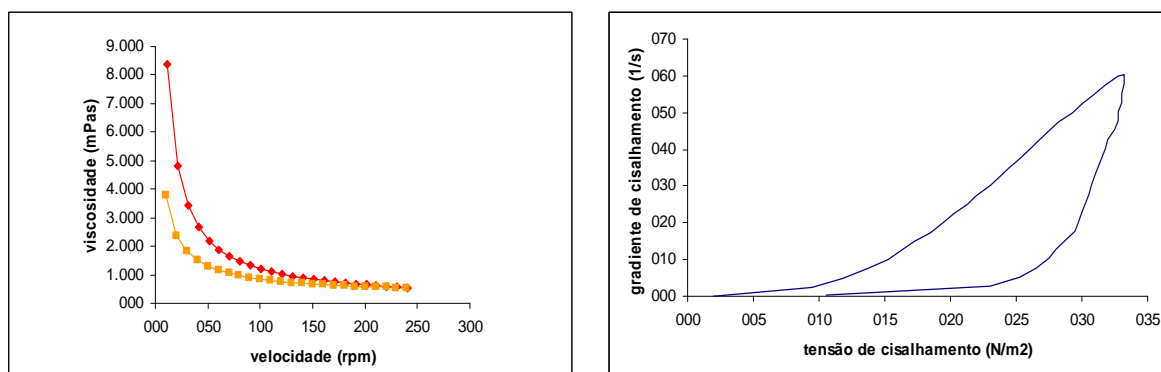


Figura 39: Reograma da preparação de loção com extrato EtOH 50 de folhas de *M. cauliflora* a 0,25%.

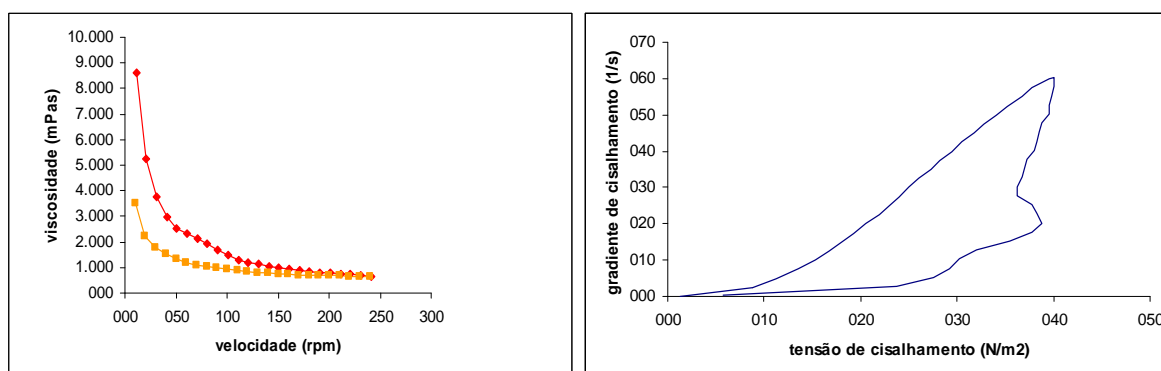


Figura 40: Reograma da preparação de sabonete líquido com extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* a 0,50%.

Através dos reogramas apresentados nas Figuras 35, 36 e 37, observou-se que a reologia das preparações de sabonete líquido não apresentaram diferenças com a incorporação dos extratos de *M. cauliflora* e *S. adstringens*, enquanto que o sabonete com extrato de *M. cauliflora* foi o que apresentou menor viscosidade, seguido do sabonete controle e o sabonete com extrato de *S. adstringens* foi o que apresentou maior viscosidade.

Pelas Figuras 38, 39 e 40, verificou-se que a reologia das preparações de loção são semelhantes, e que a viscosidade da loção de controle é menor que a viscosidade das loções com o extrato de *M. cauliflora* e com o extrato de *S. adstringens*.

Comparando as Figuras de 35 a 40, observou-se que a área de histerese das preparações de loção, ou seja, a área entre a curva ascendente e descendente, é maior que a área de histerese das preparações de sabonete

líquido, indicando que o grau de tixotropia das preparações de loção é maior que o grau de tixotropia do sabonete líquido.

5.11. CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DAS PREPARAÇÕES

Observou-se que não houve crescimento dos microrganismos patogênicos específicos, ou seja, *Salmonella* sp, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* nas amostras analisadas. Também observou-se que na contagem do número total de microrganismos não houve crescimento, o que permite a sua aprovação, segundo as recomendações oficiais para produtos não estéreis (BRASIL, 1999). A Tabela 22 demonstra os resultados obtidos no controle de qualidade microbiológico.

Tabela 22: Controle de qualidade microbiológico das preparações de sabonete líquido, sabonete em barra e loção de controle, com extrato de *M. cauliflora* e com extrato de *S. adstringens*.

amostra	Contagem do número total de microrganismos		Presença de <i>Salmonella</i> sp e <i>E. coli</i>		Presença de <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	
	Limite de aceitabilidade	Resultado obtido	Limite de aceitabilidade	Resultado obtido	Limite de aceitabilidade	Resultado obtido
Sabonete líquido	5.10 ² UFC/g ou mL		Ausente		Ausente	
Controle		Ausente		Ausente		Ausente
extrato de <i>M. cauliflora</i>		Ausente		Ausente		Ausente
extrato de <i>S. adstringens</i>		Ausente		Ausente		Ausente
Sabonete em barra	5.10 ² UFC/g ou mL		Ausente		Ausente	
Controle		Ausente		Ausente		Ausente
extrato de <i>M. cauliflora</i>		Ausente		Ausente		Ausente
extrato de <i>S. adstringens</i>		Ausente		Ausente		Ausente
Loção	5.10 ³ UFC/g ou mL		Ausente		Ausente	
Controle		Ausente		Ausente		Ausente
extrato de <i>M. cauliflora</i>		Ausente		Ausente		Ausente
extrato de <i>S. adstringens</i>		Ausente		Ausente		Ausente

Na Tabela 23, apresenta-se um panorama geral dos extratos obtidos e ensaios realizados.

Tabela 23: Panorama geral dos extratos obtidos e dos ensaios físico-químicos e biológicos realizados no desenvolvimento do presente trabalho.

Extratos	<i>M. cauliflora</i>				<i>S. adstringens</i>			
	EtOH 50	EtOH 70	Ac:H ₂ O	CHCl ₃	EtOH 50	EtOH 70	Ac:H ₂ O	CHCl ₃
Fitoquímica	Flavonóides e taninos	Flavonóides e taninos	Flavonóides e taninos	- ^a	Taninos	Taninos	Taninos	Taninos
Rendimento	40-28%	30-25%	20%	2%	40-30%	40%	30%	<1%
Teor de fenóis totais	45,84%	62,08%	60,25%	0,27%	75,09%	68,96%	72,89%	1,82%
Teor de flavonóides totais	1,36%	1,25%	1,53%	0,00	NR	NR	NR	NR
Atividade antioxidante	+ ^b	+	+	+	+	+	+	+
CIM/CBM (mg/mL)								
<i>S. aureus</i>	5,0/5,0	5,0/5,0	5,0/5,0	>5,0/>5,0	5,0/5,0	5,0/5,0	5,0/5,0	>5,0/>5,0
<i>S. epidermidis</i>	5,0/5,0	5,0/5,0	5,0/5,0	>5,0/>5,0	2,5/2,5	2,5/2,5	2,5/2,5	>5,0/>5,0
<i>B. subtilis</i>	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	>5,0/>5,0	2,5/5,0	2,5/5,0	5,0/5,0	>5,0/>5,0
<i>E. coli</i>	5,0/5,0	5,0/>5,0	5,0/>5,0	>5,0/>5,0	5,0/5,0	2,5/2,5	2,5/2,5	>5,0/>5,0
CIM/CFM (mg/mL)								
<i>C. albicans</i>	0,62/>10	0,62/>10	0,62/>10	>10/>10	0,31/>10	0,31/>10	0,31/>10	>10/>10
<i>C. parapsilosis</i>	0,62/>10	0,62/>10	0,62/>10	>10/>10	0,16/>10	0,16/>10	0,16/>10	>10/>10
<i>C. tropicalis</i>	0,62/1,250	0,62/2,50	0,62/1,25	>10/>10	0,62/5,00	0,62/2,50	0,62/2,50	>10/>10
IC (mg/mL)	1,250	0,625	0,625	0,312	0,312	0,312	0,312	0,312
Preparação cosmética de escolha								
Sabonete líquido	NE	0,25%	NR	NR	0,25%	NE	NR	NR
Sabonete em barra	NE	0,25%	NR	NR	0,25%	NE	NR	NR
Loção	0,25%	NE	NR	NR	0,50%	NE	NR	NR

a) resultado negativo; b) atividade presente; NR: não realizado; NE: não escolhido.

6. DISCUSSÃO

Agentes antimicrobianos vêm sendo utilizados desde o século XVII para o tratamento de doenças infecciosas. Um agente antimicrobiano ideal exibe toxicidade seletiva, e isto implica que uma substância deve ser nociva para um parasita e não para o hospedeiro. Frequentemente, a toxicidade seletiva é preferível, mas não absoluta. Assim, uma substância em concentração tolerada pelo hospedeiro pode danificar um microrganismo infectante (BROOKS et al., 2001; DAVIS, 1990).

No decorrer dos últimos 60 anos o desenvolvimento de agentes antimicrobianos eficazes e seguros para lidar com infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, com redução drástica na morbidade e mortalidade pelas doenças microbianas. Lamentavelmente, acompanhando o desenvolvimento das defesas quimioterápicas do homem contra as bactérias, estas também desenvolveram defesas contra os agentes quimioterápicos, com conseqüente aparecimento de resistência. Este fato não é surpreendente, uma vez que reflete o princípio evolutivo de que os organismos se adaptam geneticamente a mudanças no seu meio ambiente (RANG et al., 2001).

O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos contribui para o desenvolvimento de resistência em populações de microrganismos, principalmente através da eliminação dos microrganismos sensíveis a partir de ambientes saturados de antibióticos com subsequente substituição por microrganismos resistentes (BROOKS et al., 2001).

A resistência a antibióticos nas bactérias dissemina-se por transferência de bactérias entre pessoas, genes de resistência entre bactérias ou genes de resistência entre elementos genéticos no interior das bactérias. A compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência a antibióticos é importante tanto para o uso sensato desses fármacos na prática clínica, quanto para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos para vencer a resistência (RANG et al., 2001).

A presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores, bem como o seu uso para tratar infecções não são fatos recentes (BUHNER, 1999; COWAN, 1999; RODRIGUES, 1980; YUNES e CALIXTO, 2001).

Durante a sua vida, as plantas reagem a várias injúrias advindas do ambiente, e são capazes de produzir compostos antimicrobianos para protegê-las contra infecções causadas por patógenos como bactérias, fungos e vírus (ESQUENAZI et al., 2002; RODRIGUES, 1980; WOJTASZEK, 1997; YUNES e CALIXTO, 2001).

Em vista da resistência que muitos patógenos humanos apresentam devido à seleção a que passaram pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, da emergência de infecções incomuns até então e efeitos adversos apresentados por alguns medicamentos, as pesquisas tornaram-se mais focadas em plantas medicinais, sendo que muitas estão se mostrando como potenciais fontes de agentes antimicrobianos (ZAMPINI et al., 2005).

Entre tantas plantas nativas e aclimatadas no Brasil, o objetivo deste trabalho foi o estudo da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, a fim de que os mesmos sejam incorporados em formulações, como as preparações de sabonete, tornando-as eficazes no combate à transmissão e prevenção de doenças infecciosas.

Para que o objetivo principal deste trabalho fosse alcançado, estudos de caracterização físico-química, qualitativa e quantitativa das drogas utilizadas e dos extratos foram necessários.

Inicialmente, foi determinada a granulometria das drogas para padronização das mesmas a fim de otimizar os processos extrativos a que são submetidas (SONAGLIO et al., 2004). A granulometria, que é o grau de divisão de pós é expresso em referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado (FARMACOPÉIA, 1988). Segundo a literatura (LIST e SCHMIDT, 2000), a droga pulverizada que apresente partículas de tamanho superior à classificação de fino é mais adequada para os processos de extração, principalmente por percolação, pois a presença de pó pode favorecer o entupimento do percolador. Comparando os dados obtidos, o material com melhor granulometria para extração por percolação foi o material proveniente de moinho de facas, uma vez que apresenta maior porcentagem de distribuição granulométrica no tamanho de partícula entre

1700 a 355 μm , enquanto o material obtido em moinho de bola e o adquirido comercialmente apresentaram maior distribuição granulométrica em tamanho de partícula menor que 150 μm . Sendo assim, torna-se importante exigir o controle de granulometria da droga para o fornecedor da mesma.

Uma vez que os valores de pH apresentados situaram-se entre 4,73 e 5,11, pôde-se afirmar que ambas as drogas analisadas apresentam pH ácido. Foi observado que a diferença de pH entre as folhas coletadas nas diferentes estações do ano não é significativa.

A presença de quantidade excessiva de água em drogas vegetais propicia o desenvolvimento de microrganismos, insetos e hidrólise, com conseqüente deterioração dos constituintes da droga. Portanto, faz-se necessário o estabelecimento de limites de umidade para drogas vegetais que, em geral, devem estar na faixa de na faixa de 8 a 14% (SIMÕES, 2004). Com os valores apresentados pelo teor de umidade, pôde-se observar que as folhas de *M. cauliflora*, coletadas nas quatro estações do ano, e a casca de *S. adstringens* apresentaram-se dentro do permitido de teor de umidade, com valores até o limite de 8%. Com este resultado, em armazenamento adequado, é possível manter a qualidade das drogas evitando contaminações e decomposição dos constituintes.

O teor de extrativos avalia a quantidade de substâncias que podem ser extraídas aplicando-se o método de decocção e como líquido extrator água, que são preconizados pela Organização Mundial de Saúde e pela Farmacopéia Brasileira (1988) (SANCHES, 2004; VIGO et al., 2004). Verificou-se que houve um aumento do teor de extrativos nas folhas coletadas da primavera ao outono, decrescendo, novamente, no inverno. Quanto ao teor de extrativos das cascas de *S. adstringens*, observou-se que é menor que o teor de extrativos das folhas de *M. cauliflora* coletadas no verão e outono, entretanto, maior quando comparado às folhas coletadas no inverno e primavera.

A determinação do teor de cinzas totais permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes na droga como contaminantes (SIMÕES et al., 2004; VIGO et al., 2004). Como não existe valor de teor de cinzas totais, na literatura, para as folhas de *M.*

cauliflora, os resultados obtidos neste trabalho tornam-se importantes no processo de sua padronização. Quanto ao teor de cinzas da casca de *S. adstringens*, encontra-se na Farmacopéia Brasileira (1959) que a perda máxima de impurezas através do ensaio de resíduo por incineração deve ser de 5%, enquanto que o valor encontrado foi em torno de 11%, indicando a possibilidade de contaminação da droga.

Tem-se uma literatura muito escassa em relação à constituição fitoquímica das folhas de *M. cauliflora* coletadas em diferentes estações do ano, por isso, é de relevância a triagem fitoquímica realizada com esta planta, na qual verifica-se a presença de taninos hidrolisáveis nas folhas coletadas nas quatro estações e de traços de flavonóides nas folhas coletadas durante o inverno e durante o verão, porém não são observados através das mesmas reações para as folhas coletadas na primavera e no outono. Também não foi observada a presença de alcalóides, antraquinonas, glicosídeos cardiotônicos e saponinas. Em relação às cascas de *S. adstringens* foram confirmados os dados da literatura em relação à presença de taninos (PHARMACOPÉIA, 1926) e ausência dos outros metabólitos secundários.

Através do perfil cromatográfico é possível visualizar as classes de metabólitos secundários presentes nas drogas e nos extratos. O conhecimento da constituição fitoquímica das plantas e de seus extratos é importante porque se constitui em uma ferramenta a ser utilizada no controle de qualidade e permite avaliar e estudar atividades biológicas e/ou farmacológicas que uma determinada planta e seu extrato possam apresentar. Alguns derivados de flavonóides e taninos são reconhecidos por apresentarem propriedades antimicrobianas (PALACIOS et al., 1983; NISHINO et al., 1987; SCALBERT, 1991; HERNÁNDEZ et al., 2000; DALL'AGNOL et al., 2003).

A partir de perfil espectrofotométrico na faixa de comprimento de onda da radiação ultravioleta, observou-se correspondência do pico de máxima absorção entre todos os extratos e os padrões que corresponde à faixa de comprimento de onda de 206 a 217 nm. No entanto, como não foi isolada

nenhuma substância dos extratos, não é possível afirmar a constituição dos mesmos com base nos espectros de ultravioleta.

A percolação consiste em submeter uma substância em pó ou uma mistura de substâncias em um aparelho especial, percolador, à ação dissolvente de um líquido extrator de maneira que este, ao atravessar o pó em sua descida, arraste as substâncias solúveis e saia do percolador livre de substâncias insolúveis. Quando a operação é executada convenientemente, a primeira porção do líquido obtido, ou percolato, deve estar quase saturada dos constituintes solúveis da droga tratada e, se a quantidade do líquido extrator for suficiente para seu esgotamento, a última porção do percolato deve ser quase incolor, inodoro e sem sabor da droga esgotada (PHARMACOPEIA, 1926).

A escolha dos solventes para extração deve basear-se, principalmente, na seletividade que o mesmo apresenta pelos compostos a serem extraídos. No entanto, outras características não podem ser ignoradas, como a facilidade de manuseamento, custo, proteção ao ambiente e toxicidade (LIST e SCHMIDT, 2000). A partir dos rendimentos das extrações realizadas, observou-se que as drogas em estudo são constituídas, em grande parte, por compostos polares, uma vez que os maiores rendimentos foram obtidos com solventes mais polares que o clorofórmio, cuja característica é ser mais apolar que os outros utilizados.

O reagente de Folin-Denis, embora não específico para uma determinada classe de metabólitos, detecta todos os fenóis, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos presentes em uma planta. Desta forma, pode-se utilizar esta metodologia para a quantificação do total de fenóis, uma vez que ocorre a oxidação de qualquer fenol presente pela reação com o ácido fosfomolibídico e tungístico do reagente de Folin-Denis (TEIXEIRA et al., 1990, FERREIRA et al., 2004). A partir da curva analítica obtida com a solução padrão de ácido tânico pôde-se calcular, através da equação da reta, a porcentagem de fenóis totais existentes nas amostras das folhas de *M. cauliflora* coletadas em diferentes estações do ano e dos extratos obtidos de ambas as drogas. Pode-se visualizar a variação sazonal do teor de fenóis totais das folhas de *M. cauliflora*, observando que as folhas coletadas no

outono e no inverno apresentam menor teor do que as coletadas na primavera e no verão. É possível, portanto, que durante a primavera e o verão exista, na planta, uma maior síntese dos compostos que são classificados como polifenóis, como, por exemplo, flavonóides e taninos. De todos os extratos obtidos das folhas de *M. cauliflora*, o clorofórmico foi o que apresentou um valor muito baixo de fenóis totais. Este fato é explicado devido à diferença de polaridade entre os polifenóis (polares) e o solvente (apolar), o que dificulta a extração destes compostos pelo clorofórmio. Tal resultado aplica-se, da mesma forma, ao extrato clorofórmico obtido das cascas de *S. adstringens*. Também foi observado que o extrato das folhas de *M. cauliflora* obtido com etanol 50% apresenta menor teor que o obtido com etanol 70% e acetona:água, diferença que não é tão nítida em relação aos extratos obtidos com as cascas de *S. adstringens*.

O complexo estável formado entre alumínio e flavonóide em metanol, em análise espectrofotométrica, é absorvido em comprimento de onda maior (~430 nm) que os complexos formados entre alumínio e outros compostos fenólicos, geralmente presentes nas plantas que apresentam flavonóides. Esse fato torna possível quantificar o teor de flavonóides sem a interferência de substâncias fenólicas (MARCUCCI et al., 2005). Observou-se que os maiores teores de flavonóides foram obtidos nas folhas coletadas na primavera e no outono. Tal fato é interessante, pois é conhecido que os flavonóides são responsáveis pela proteção à planta contra a radiação ultravioleta, mais intensa durante o verão (SOUZA et al., 2003). Contudo, o teor de uma determinada classe de metabólitos secundários não se deve somente à estação do ano, mas também à disponibilidade de água, solo e intensidade solar a que a planta está exposta no seu local de cultivo (VIGO et al., 2004; FREIRE et al., 2006). De forma semelhante à determinação do teor de fenóis totais, o extrato clorofórmico foi o extrato que apresentou menor teor de flavonóides, enquanto que o acetônico foi o de maior teor e os extratos hidroalcoólicos apresentaram valores próximos.

Ainda com relação à caracterização fitoquímica dos extratos, procurou-se avaliar a atividade antioxidante dos mesmos. O DPPH é um radical livre estável que interage com substâncias antioxidantes, que, por sua vez,

transferem elétrons ou átomos de hidrogênio ao DPPH, neutralizando o radical livre. Quando o processo antioxidante ocorre, a coloração da reação muda de violeta a amarelo e a absorbância torna-se reduzida a 517 nm (BANERJEE et al., 2005).

Pela CCD, a substância padrão utilizada, rutina, apresentou-se amarelada quando revelada com DPPH e, da mesma forma, apresentaram-se as amostras dos diferentes extratos das folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens* que mostraram atividade antioxidante. Observa-se, no entanto, que os extratos obtidos com clorofórmio não apresentaram a mesma intensidade de coloração amarela que os extratos hidroalcoólicos e acetônicos, sendo sua menor atividade antioxidante comprovada pela determinação do porcentual de atividade anti-radicalar apresentada, sendo 67,84% para *M. cauliflora* e 73,86% para *S. adstringens*. Observou-se que os extratos hidroalcoólicos e acetônico de *M. cauliflora* e *S. adstringens* apresentaram valores semelhantes de atividade anti-radicalar quando comparados entre si e entre o extrato adquirido de *G. biloba*, também não diferindo em relação às substâncias padrão, isto é, ácido gálico, rutina e vitamina C. Desta forma, inferiu-se que os extratos EtOH 50, EtOH 70 e Ac:H₂O (7:3) das folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens* apresentam atividade antioxidante, segundo demonstrado pelos métodos de atividade seqüestrante do radical estável DPPH.

Dentre os objetivos, estava a verificação da atividade antimicrobiana. As bactérias utilizadas neste estudo estão freqüentemente ligadas à rotina do ser humano, seja por fazer parte da microbiota natural, como *Staphylococcus aureus*, ou por estarem presentes como contaminantes de alimentos como *Escherichia coli*, ou para utilização no controle de qualidade, como o *Bacillus subtilis*.

Staphylococcus aureus, bactéria Gram-positiva, está amplamente distribuído na natureza e faz parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves. É o agente mais comum de infecções piogênicas e em indivíduos debilitados pode causar doenças de caráter mais grave. É conhecido pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a diversos antibióticos (MARTINS, 1999). A primeira evidência de resistência de *S.*

aureus à penicilina ocorreu em 1941, apenas 2 anos após sua introdução na terapia clínica. O gene de resistência à penicilina encontra-se no plasmídeo, sendo facilmente disperso para outras cepas, de forma que na década de 80, aproximadamente 90% de *S. aureus* isolados de pacientes internados eram resistentes. Por outro lado, o gene de resistência à meticilina é cromossômico e, portanto, sua difusão é mais lenta, mas, no entanto, continua ocorrendo. Nos Estados Unidos, a prevalência de *S. aureus* resistente à meticilina entre pacientes internados cresceu de 2,1% em 1975 a 35% em 1991, sendo maior do que em isolados da bactéria de ambientes não-hospitalares (PESAVENTO et al., 2005).

Staphylococcus epidermidis (Gram-positiva) também é habitante normal da pele e mucosas, sendo considerada a espécie de estafilococos de maior persistência na pele humana (MARTINS, 1999). É um microrganismo aeróbico que usualmente está envolvido a processos de infecção dentro da unidade sebácea (CHOMNAWANG et al., 2005). Nos anos recentes, entretanto, vem apresentando-se como causa de infecções hospitalares, atingindo, principalmente, pacientes imunocomprometidos, “long-term hospitalized”, e/ou com doenças graves. A resistência a antibióticos apresentada por *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativos torna-se um agravante destas infecções. O fato de ser uma bactéria comensal também é um fator que dificulta para os clínicos decidirem quando sua presença em um material isolado indica que é o agente causativo de uma doença ou apenas uma contaminação do material. É uma bactéria que vive no limite entre comensalismo e patogenicidade, com a capacidade de ter desenvolvido estratégias, como formação de biofilme em equipamentos de internações e materiais introduzidos em pacientes, cepas de resistência e apresentação de flexibilidade genômica, que proporcionaram a conquista de ambientes hospitalares, sendo os indivíduos imunocomprometidos seus hospedeiros mais freqüentes. Por estes motivos, já devem ser seguidas as mesmas medidas restritivas de higiene que foram estabelecidas para *S. aureus* em hospitais (ZIEBUHR et al., 2006).

Bacillus subtilis, bactéria Gram-positiva, é utilizada no controle de qualidade em testes de esterilização por óxido de etileno e a vapor, pois é

capaz de sobreviver em condições muito adversas de dessecação, temperatura e pH devido à sua capacidade de produzir esporos, fato ao qual também se deve sua ampla distribuição na natureza (MÓS,1999). Recentemente, esta bactéria tem sido associada a incidentes de gastroenterites em bebês que receberam alimentos contaminados (ABDOU et al., 2007).

Provavelmente, nenhuma outra espécie bacteriana é tão versátil em sua patogenicidade quanto a *Escherichia coli*, bactéria Gram-negativa que pode causar infecções intestinais, urinárias, septicemias, meningites, além de outros tipos (CAMPOS et al., 1999). É a causa usual de infecções da via urinária, sendo tratada eficientemente com cotrimoxazol, mas resistência *in vitro* foi relatada para casos não resolvidos de tratamento em, aproximadamente, metade dos pacientes. Ciprofloxacino passa, então a ser uma alternativa economicamente acessível de tratamento de infecção urinária na comunidade. No entanto, tendo-se um fármaco de escolha para uma infecção, obviamente, seu consumo crescerá, aumentando, mais uma vez, a proporção de cepas resistentes, assim como em um círculo vicioso (BEOVIC, 2006). A resistência de bactérias Gram-negativas, junto à resistência de *S. aureus* à meticilina, são um grande problema, especialmente, nas unidades de tratamento intensivo (BEOVIC, 2006).

Muitos são os métodos propostos para as análises de atividade antimicrobiana, como o método de difusão em disco (NCCLS, 2003a) e de determinação de Concentração Inibitória Mínima contra bactérias (NCCLS, 2003b) e contra leveduras (NCCLS, 2002). Neste trabalho, foram introduzidas modificações nestas metodologias preconizadas, estando condicionadas à natureza das amostras que diferem em relação às amostras padronizadas pelo NCCLS. Portanto, as diluições preparadas das amostras dos extratos foram adequadas às necessidades deste trabalho, as placas de Petri do teste de difusão em ágar foram deixadas em repouso a 4 °C por 2 h antes da incubação e a leitura dos resultados de determinação de MIC foi realizada com a adição do corante resazurina, para bactérias, e de TTC, para leveduras.

O método de difusão em ágar baseia-se na difusão de uma determinada amostra em meio sólido, semeado com os microrganismos em questão, colocados em placas e incubados. Após a incubação, o diâmetro do halo de inibição é considerado como medida do poder inibitório da amostra contra o microrganismo testado (PINTO et al., 2003).

Pelos resultados obtidos, os menores halos de inibição de crescimento bacteriano foram obtidos com os extratos da casca de *S. adstringens*. Entretanto, deve ser esclarecido que este fato, provavelmente, deve-se a sua rica constituição de taninos, compostos que precipitam na presença de proteínas, as quais estão presentes no meio de cultura; assim, acredita-se que este fato possivelmente explique os halos de inibição menores, pois existe uma dificuldade de difusão pelo meio, sendo preciso, inclusive, que a amostra seja colocada em poços feitos no ágar, não em “templates”, como os extratos de *M. cauliflora*, para aumentar a superfície de contato entre os extratos e o meio de cultura, facilitando a difusão.

Em contrapartida, verificou-se que os extratos clorofórmicos de ambas as espécies não apresentaram halos de inibição, indicando ausência de atividade antimicrobiana. Uma vez que pelas determinações do teor de fenóis totais e flavonóides, os extratos clorofórmicos apresentaram os menores valores, pode-se afirmar que a atividade antimicrobiana não foi demonstrada pelos mesmos pelo baixo teor destes compostos. Encontra-se em trabalhos que muitas atividades biológicas, assim como a antimicrobiana, são devidas ao teor de fenóis totais, como taninos e flavonóides (CHOI et al., 2006). Portanto, a atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos neste trabalho deve-se à constituição de metabólitos secundários apresentada por cada espécie e o teor de cada um deles.

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida pela menor concentração de extrato que inibe o crescimento microbiano visível *in vitro* e cuja visualização é possível. Para aprimorar esta técnica foi desenvolvido o ensaio em microplaca, que pode ter a verificação da turvação dos poços com auxílio de alguns corantes, entre eles a resazurina, que apresenta-se azul na ausência de células vivas (NCCLS, 2003b; LOW et al., 2006). Também foi

determinada a concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos por meio de subcultivos das microplacas em placas de ágar Müeller Hinton, avaliando a presença ou ausência de crescimento microbiano. A concentração bactericida mínima é definida como a menor concentração que produz a morte de 99,9% das células bacterianas (KONEMAN et al., 2001).

Observou-se que os valores de CIM para todos os extratos que apresentaram atividade foram, geralmente, semelhantes aos valores de CBM e que os extratos hidroalcoólicos de *M. cauliflora* apresentaram-se mais ativos que o extrato acetônico; entretanto, o extrato obtido com EtOH 50 da casca de *S. adstringens* apresentou menor atividade que os extratos obtidos com EtOH 70 e acetona:água.

Ainda não existe, na literatura, referências conclusivas sobre as faixas de CIM e sua correspondência à atividade farmacológica. Holetz et al. (2002) estabeleceram alguns valores como referência de atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Em tal trabalho, para que um extrato apresente forte atividade, a CIM não deve ultrapassar 100 µg/mL; de 100 a 500 µg/mL a atividade é considerada como moderada; de 500 a 1000 µg/mL a atividade é fraca e maior que 1000 µg/mL, o extrato é considerado inativo. Entretanto, não podem ser desprezados outros trabalhos em que valores de CIM maiores são tidos como boa atividade para tais extratos. Duarte et al. (2005) apresentam em seu trabalho uma proposta de Aligiannis et al. (2001) de classificação para material vegetal baseada em resultados de CIM, no qual CIM menores que 0,5 mg/mL são considerados fortes inibidores, CIM entre 0,6 a 1,5 mg/mL são considerados moderados e acima de 1,6 mg/mL são fracos inibidores do crescimento microbiano. Bouamama et al. (2006) comprovam a utilização de folhas do gênero *Cistus* na medicina popular do Marrocos obtendo valores de CIM de 0,78 a 50 mg/mL para bactérias e de 0,19 a 200 mg/mL para cepas de *Candida*, utilizando as técnicas preconizadas pelo CLSI (2003b). Exemplificando um trabalho realizado com óleos essenciais, Celiktas et al. (2005) descrevem moderada atividade contra diferentes espécies de bactérias e *Candida albicans* com valores de CIM entre 2,5 a 20 mg/mL para os óleos essenciais obtidos das partes aéreas de *Rosmarinus officinalis*.

Em outro trabalho, Kolodziej et al. (1999) apresentam valores de CIM de polifenóis isolados pertencentes à classe dos taninos contra bactérias como *S. aureus* e *E. coli* e contra fungos como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Nele, descrevem que tais moléculas apresentam fraca atividade antimicrobiana, com CIM entre 1,0 a 2,0 mg/mL para algumas moléculas como ácido gálico, chegando a 8,0 mg/mL para catequina. No entanto, no mesmo trabalho, indicam que as plantas utilizadas com a finalidade de antimicrobianos, provavelmente, apresentam seu potencial devido à sua diversificada composição de polifenóis e a concentração dos mesmos nessa planta.

De forma geral, o extrato de uma planta contém baixa concentração de compostos ativos e um amplo número de outros compostos que podem ter atividades promissoras, necessitando de uma adequada sensibilidade dos testes, devido à variedade química destes compostos, embora em pequena quantidade (RATES, 2001).

Considerou-se que os extratos estudados que apresentaram valores de CIM entre 2,5 e 5,0 mg/mL não devem ser desprezados, seja pela diluição dos compostos ativos com outros compostos também extraídos, seja porque a própria literatura não descarta resultados de CIM maiores que 1,0 mg/mL, pois poderiam ser utilizados para outros propósitos.

Em comparação com os resultados obtidos pelo método de microdiluição, os valores de CIM e CBM obtidos pelo método de macrodiluição foram maiores, exceto os extratos hidroalcoólicos e acetônico de *S. adstringens* contra *S. aureus*. De forma geral, as bactérias testadas apresentam maior sensibilidade aos extratos de *S. adstringens* e que de todas, o *B. subtilis* e a *E. coli* foram as que apresentaram maior resistência tendo requerido, portanto, maior concentração de extrato para inibir seu crescimento.

A espécie de *Candida albicans* é a espécie de levedura mais freqüentemente isolada a partir de amostras biológicas. *C. albicans* é agente colonizador habitual de pele e mucosas humanas, sendo que 25 a 30 % dos indivíduos são seus portadores na cavidade oral, com maior incidência em lactentes, crianças pequenas e pessoas com AIDS. Falta de higiene bucal e

próteses dentárias aumentam a taxa de porte bucal sendo o porte vaginal particularmente prevalente durante a gravidez (KWON-CHUNG et al., 1992; KONEMAN et al., 2001).

A candidíase das mucosas pode afetar a cavidade oral, canal vaginal, traquéia, brônquios e canal alimentar. As infecções da pele envolvem áreas úmidas, como os espaços interdigitais das mãos, pés e axilas. São freqüentes a infecção das unhas e dermatite em recém-nascidos na área das fraldas. A candidíase sistêmica é, relativamente, rara, sendo um evento terminal em pacientes com doenças debilitantes, neoplásicas e imunossupressoras. São citadas cinco condições que predispõem à infecção por *C. albicans* (RIPPON, 1998): a) período anterior ao estabelecimento da microbiota normal (lactentes); b) gravidez, disfunção endócrina, diabetes melitus; c) administração prolongada de antimicrobiano que altera a microbiota normal e uso de anticoncepcionais; d) fatores que causam debilidade, como AIDS e alterações da função leucocitária; e) solução de continuidade em barreiras corpóreas causada por procedimentos cirúrgicos e inserção de cateter permanente (KONEMAN et al., 2001).

Outras espécies de *Candida* formam parte da microbiota normal de superfícies cutâneas e mucocutâneas, sendo raras vezes consideradas como agentes de doenças clínicas, embora tenham sido associadas a praticamente todas as formas de candidíase. *C. krusei*, raramente, é causadora de endocardites e vaginites; *C. parapsilosis* está associada a paroníquia, endocardite, otite externa, endoftalmite, artrite séptica e peritonite; enquanto que encontra-se *C. tropicalis* em casos de vaginite, infecções intestinais, broncopulmonares e sistêmicas (RIPPON, 1988; KONEMAN et al., 2001).

A emergência de outras cepas de leveduras como novos agentes infecciosos explica-se, principalmente, pelo uso de antibióticos de amplo espectro, agentes antineoplásicos, cateterismo endovenoso e o crescente número de pacientes com neutropenia e imunossupressão (KONEMAN et al., 2001).

Pelos mesmos motivos, o tratamento das candidíases vem se tornando difícil devido à emergência de cepas resistentes aos antifúngicos costumeiramente utilizados. Novos agentes têm-se demonstrado tóxicos e de

alto custo. A reincidência das infecções também tornou-se um fator preocupante do controle das candidíases. Todos esses fatores tornaram nítida a necessidade de novos agentes antifúngicos (RUNYORO et al., 2006). Tem crescido, significativamente, nos últimos 10 anos, a investigação de produtos naturais ativos contra *Candida* spp, com cerca de 258 espécies de plantas avaliadas, embora até recentemente não se tenha formulações efetivas para o uso em humanos e animais (DUARTE e FIGUEIRA, 2006). DUARTE et al. (2005) encontraram que o óleo essencial de 13, entre 35 plantas testadas utilizadas na medicina popular, apresentaram atividade contra *C. albicans*, como o óleo de *Achillea millefolium*, *Mykania glomerata* e *Stachys byzantina*, com CIM de 0,25 mg/mL.

Estudo realizado na tribo Yanomamĩ, situada na Venezuela, confirmou que as folhas da planta *Phyllanthus piscatorum*, utilizadas para facilitar a pescaria, têm potencial atividade contra *Candida albicans*, *Candida flavus* e *Aspergillus fumigatus*. Somente as mulheres desta tribo cultivam e realizam a pescaria com as folhas de *Phyllanthus piscatorum*. Aquelas que apresentam vulvovaginites entram na água dos lagos onde foram colocadas as folhas de *P. piscatorum* e esperam lá cerca de meia hora até que o primeiro peixe apareça flutuando na superfície da água (GERTSCH et al., 2004).

Na África, onde a epidemia de AIDS é devastadora, *Candida albicans* foi uma das primeiras infecções oportunistas em pacientes portadores do HIV. Várias plantas são usadas pelos curandeiros no tratamento de candidíase oral e alguns extratos foram testados, por microdiluição, contra *C. albicans*. Extratos aquosos de *Allium sativum* L. (Alliaceae) e *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae) apresentaram CIM entre 6,25 a 12,5 mg/mL. Estudos deste tipo e resultados favoráveis de CIM são fatores importantes para o tratamento de infecções fúngicas em um continente de população tão carente, onde os medicamentos do ocidente são excessivamente caros e de difícil acesso (FENNELL et al., 2004).

A Concentração Fungicida Mínima, para um fármaco, pode ser determinada como a menor concentração que resulta em 100% de inibição de crescimento. Um agente antifúngico pode ser considerado como agente fungicida se a razão entre a Concentração Fungicida Mínima e a

Concentração Inibitória Mínima não for maior do que 4 (HAZEN, 1998). Os valores de CIM apresentados pelos extratos hidroalcoólicos e acetônicos de ambas as drogas contra as três espécies de *Candida* encontram-se na faixa de 0,156 a 1,25 mg/mL. Como os valores de CFM foram em torno de 10 mg/mL, pode-se supor que os extratos que apresentaram atividade atuem de forma a inibir o crescimento, exercendo atividade fungistática, embora não matando as células. Assim, foi possível observar neste experimento, que os extratos testados apresentam atividade contra o crescimento da levedura enquanto presentes no meio de inoculação, no entanto, não são ativos a ponto de causar a morte das mesmas e, portanto, quando é feito o subcultivo, estas retomam o crescimento normal. Em outras palavras, os extratos polares testados apresentam-se como fungistáticos, mas não fungicidas. Deve-se ressaltar que *Candida tropicalis* foi uma exceção, uma vez que a razão entre os valores apresentados de CIM e de CFM para os diferentes extratos foi menor que 4.

A bioautografia é uma técnica utilizada como bioprospecção de frações de compostos com atividade antimicrobiana. Consiste em avaliar quais compostos ou classe de compostos são ativos por meio de uma separação cromatográfica realizada anteriormente à incubação da placa cromatográfica com o meio de cultura inoculado com determinado microrganismo (HAMBURGER e CORDELL, 1987; SARTORATTO et al., 2004). Entretanto, alguns compostos apresentam pouca difusão pelo ágar e podem não ser detectados, por isso também devem ser utilizados os métodos de macro e microdiluição. Nestes casos, é melhor utilizar métodos de micro ou macrodiluição (FENNELL et al., 2004). Os resultados obtidos indicam que os extratos clorofórmicos não devem apresentar atividade antimicrobiana por não ser constituído de substâncias capazes de inibir o crescimento bacteriano. Por outro lado, os extratos obtidos com EtOH 50, EtOH 70 e acetona:água permitem a visualização de um halo de inibição do crescimento bacteriano, indicando a existência de uma ou mais substâncias capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis*. Entretanto, não foram formados halos nítidos de inibição de crescimento de *B. subtilis* e *E. coli*, isto porque nem todas as espécies de microrganismos crescem homogeneamente,

dificultando o desenvolvimento deste tipo de metodologia (COS et al., 2006). Em paralelo, analisando os cromatogramas revelados com anisaldeído sulfúrico, verificou-se que são as mesmas substâncias derivadas de fenóis, apresentadas na análise do perfil cromatográfico das amostras, mais especificamente, composto(s) derivado(s) de taninos.

Uma vez que foi demonstrada atividade antimicrobiana para alguns dos extratos ensaiados, tornou-se importante conhecer a citotoxicidade que os mesmos poderiam apresentar. Para tanto, utilizou-se metodologia de determinação de morte celular em ensaio com monocamada de células.

Pela metodologia de avaliação da atividade citotóxica utilizada, o ensaio é feito em uma monocamada de cultura de células de mamíferos da linhagem de macrófagos J774. A cultura em monocamada, inclusive de outras linhagens celulares, é um dos métodos mais amplamente utilizados entre os testes de citotoxicidade, pois oferece flexibilidade quanto a tempo de exposição e quantificação do efeito da amostra. Geralmente, é utilizado tempo de exposição à amostra de 1 a 24 h e o ponto de leitura do resultado está baseado no número de células como indicação de viabilidade ou capacidade metabólica. O ensaio utilizando monocamada é um método que requer um reduzido número de células quando comparado a outros métodos e é facilmente manipulado utilizando microplacas de 96 poços, o que permite ensaiar uma ampla faixa de concentração de diferentes amostras (BUCKBERRY, 1999).

Para observar o resultado de citotoxicidade e analisar a existência de células vivas ou mortas, foi utilizado o corante denominado Alamar Blue. A forma oxidada do Alamar Blue apresenta-se não-fluorescente e na coloração azul, sendo que esta forma é reduzida por atividade celular (fato que é postulado dever-se às enzimas mitocondriais) à forma fluorescente e de coloração cor-de-rosa. Portanto, na presença de células mortas, a coloração azul visualizada indica que a amostra incubada com as células causou citotoxicidade, ou seja, morte celular, enquanto que a coloração cor-de-rosa indica ausência de citotoxicidade, uma vez que existem células vivas no meio. Sendo assim, o Alamar Blue é mais indicado como um marcador do

ponto de leitura para os ensaios de citotoxicidade, do que para ensaios de monitoramento da cinética de crescimento celular (O'BRIEN, 2000).

Desta forma, através da metodologia utilizada no ensaio de citotoxicidade, foi possível observar que o extrato obtido com etanol 50% de folhas de *M. cauliflora* apresentou a menor citotoxicidade (concentração de 0,625 mg/mL) entre todos os extratos. Entretanto, vem a ser mais adequado que o tipo de célula a ser ensaiado *in vitro* seja o mesmo ao qual a amostra entrará em contato ao ser administrada (BUCKBERRY, 1999; O'BRIEN, 2000). Assim, como os estudos com os extratos deste trabalho foram feitos a fim de que sejam administrados topicamente, seria mais adequado que a citotoxicidade dos mesmos fosse ensaiada frente a células epiteliais, como queratinócitos ou fibroblastos, como preconizado pelo Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (AGÊNCIA..., 2003), o qual indica as células do tecido conjuntivo de camundongo da linhagem NCTC – clone 929 (ATCC CCL1) ou células de fibroblastos de córnea de coelho da linhagem SIRC CCL 60 para o teste de citotoxicidade. Tem-se a intenção de adquirir uma das duas linhagens citadas para realizar o ensaio de citotoxicidade tanto com os extratos quanto com as preparações obtidas dos mesmos. Por outro lado, em termos de produtos comercializados, foi encontrado na literatura (DAMOUR et al., 1992) que, em concentrações terapêuticas, anti-sépticos como clorexidina e clorexidina+cloreto de benzalcônio+álcool benzílico, por exemplo, exibem citotoxicidade frente a culturas de células humanas de fibroblastos e queratinócitos e, mesmo assim, foram aprovados pelos órgãos responsáveis e são utilizados pela população, ao contrário, entretanto, do que ocorre com iodo-povidina que, quando sua citotoxicidade em fibroblastos de murinos é comparada à de digluconato de clorexidina, apresenta-se como um anti-séptico de melhor tolerabilidade, promovendo citotoxicidade após contato de 30 minutos, porém revitalização das células após 24 h (MULLER e KRAMMER, 2006).

Uma vez que o desenvolvimento de preparações cosméticas foi um dos objetivos do presente trabalho, tem-se que, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, são preparações constituídas por substâncias naturais ou

sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membrana mucosa da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (BRASIL, 2005).

São definidos como produtos grau 1 os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes cuja formulação cumpre com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado e que se caracterizam por possuírem propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não seja inicialmente necessária e não requeiram informações detalhadas quanto ao seu modo de usar e suas restrições de uso, devido às características intrínsecas do produto. Já os produtos grau 2, são produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes cuja formulação cumpre com o mesmo objetivo que os produtos grau 1 e que possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso (BRASIL, 2005).

Neste último grupo de produtos estão inseridos produtos como cremes anti-acne e sabonetes anti-sépticos, ou seja, pela legislação, as preparações desenvolvidas neste trabalho pertencem ao grupo grau 2 e, para receberem registro do órgão competente, entre outros fatores, deve ser comprovada a atividade atribuída e a segurança de seu uso.

Preparações anti-sépticas utilizadas na rotina de higiene têm o intento de proteger os indivíduos contra leves infecções de pele causadas tanto pela microbiota residente quanto pela transiente além de contribuir no controle para a prevenção de transmissão de infecções (WILKINSON e MOORE, 1982).

Entretanto, existe uma constante discussão em relação à efetiva atividade das preparações anti-sépticas e o desenvolvimento de resistência (GRUBE, 2001; LEVY, 2001).

Os antibióticos são compostos com um mecanismo específico de ação, já a efetividade, por exemplo, de um sabonete anti-séptico depende não só do agente antimicrobiano, como também da sua concentração, tempo de

contato com a pele e da formulação. De fato, o “FDA’s Non Prescription Drug Advisory Committee (NDAC)” concluiu em janeiro de 1997 que não existiam evidências que interligassem o uso de produtos anti-sépticos e a resistência a antibióticos (GRUBE, 2001). Gerba (2002) alega que infecções por microrganismos é terceira causa de morte nos Estados Unidos, sendo que muitas são transmitidas pelas mãos e, por isso, os produtos anti-sépticos podem ser a primeira linha de defesa contra infecção por manutenção da limpeza das mãos.

A eficácia de preparações anti-sépticas também depende da natureza da formulação, como exemplo, sabonete em barra, emulsão ou sabonete líquido (WILKINSON e MOORE, 1982). No presente trabalho, a eficácia anti-séptica das preparações de sabonete líquido e loção foi constatada pelos testes de avaliação da atividade anti-séptica contra os microrganismos testados. Um produto é classificado como anti-séptico quando apresenta halo de inibição de crescimento microbiano maior que 2 mm (ROESSLER, 1983), sendo a partir deste dado que as preparações foram avaliadas, medindo o diâmetro do halo de inibição que formaram.

A preparação de sabonete líquido controle apresentou redução do crescimento microbiano sem, contudo, apresentar inibição. O sabonete líquido incorporado com os diferentes extratos de folhas de *M. cauliflora* apresentou atividade anti-séptica contra as bactérias e melhor atividade contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*, sendo que mereceu destaque a formação de halo límpido pelo sabonete líquido com extrato EtOH 70 a 0,25% na formulação, em relação aos outros, cuja coloração do extrato era nítida no meio de cultura. Apenas o sabonete líquido com extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* a 0,25% na formulação apresentou atividade contra as bactérias e leveduras testadas. Portanto, foram selecionados o sabonete líquido com extrato EtOH 70 de folhas de *M. cauliflora* a 0,25% na formulação, correspondendo à concentração de 1,55 mg/mL de fenóis totais e 0,03 mg/mL de flavonóides totais e o sabonete líquido com extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* a 0,25% na formulação, correspondendo a 1,88 mg/mL de fenóis totais.

As preparações de sabonete em barra controle, com os diferentes extratos das folhas de *M. cauliflora* e com os diferentes extratos de casca de *S. adstringens*, embora tenham apresentado redução do crescimento microbiano, não foram capazes de inibir o mesmo, uma vez que não formaram halo de inibição ao redor do poço de aplicação das preparações.

A preparação de loção de controle não apresentou nenhum tipo de atividade sobre o crescimento microbiano. As preparações de loção com os extratos de folhas de *M. cauliflora* apresentaram atividade anti-séptica contra as bactérias testadas, com destaque para os halos de inibição maiores da preparação com o extrato EtOH 50 a 0,25% na formulação, correspondente a 1,15 mg/mL de fenóis totais e 0,03 mg/mL de flavonóides totais. Apenas a preparação de loção com o extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* a 0,50% na formulação apresentou atividade anti-séptica contra as bactérias, correspondendo a 3,76 mg/mL de fenóis totais. Nenhuma das preparações de loção apresentou atividade contra as leveduras testadas.

Observou-se que a concentração de compostos ativos e a composição de metabólitos secundários ativos dos extratos, fenóis e flavonóides, não foi o único fator influente na atividade apresentada pelas preparações, uma vez que as mesmas tinham a mesma composição qualitativa de extrato e semelhante composição quantitativa de fenóis totais e flavonóides (no caso dos extratos de *M. cauliflora*), mas apresentaram resultados diferentes.

O perfil de estabilidade de um produto permite avaliar seu desempenho, segurança e eficácia, além de sua aceitação pelo consumidor.

Foi realizado o teste de estabilidade preliminar visando observar possíveis alterações a que as preparações desenvolvidas estivessem sujeitas quando submetidas a condições extremas de temperatura, a fim de que tais alterações fossem analisadas segundo características específicas de cada formulação e critérios de aceitação pela população.

A preparação de loção com extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* a 0,50% na formulação, embora tenha sido a única das preparações de loção com extrato de *S. adstringens* a apresentar atividade contra as bactérias, não apresentou-se estável ao teste de centrifugação, mesmo tendo mantido contante seu valor de pH e densidade durante o período a que foi submetida

às condições de estresse. As outras preparações de sabonete líquido e de loção apresentaram-se estáveis ao teste de centrifugação, indicando que as preparações foram desenvolvidas adequadamente e que a incorporação do extrato EtOH 70 de *M. cauliflora* a 0,25% e EtOH 50 de *S. adstringens* a 0,25% no sabonete líquido e do extrato EtOH 50 de *M. cauliflora* a 0,25% na loção não promoveram a separação dos componentes das preparações quando submetidas a centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos.

Avaliando os parâmetros organolépticos de todas as preparações submetidas às condições de estresse, não houve alteração de aspecto, cor e odor. De forma semelhante, os valores de pH e densidade das preparações, avaliados no mesmo período sob as mesmas condições, mostraram-se constantes, sendo notado que a incorporação dos extratos às formulações de base não alterou significativamente o pH nem a densidade quando comparados com os valores de pH e densidade obtidos com as preparações de controle.

A partir da avaliação da viscosidade das preparações de sabonete líquido, observou-se que a incorporação do extrato EtOH 70 de folhas de *M. cauliflora* a 0,25% proporcionou redução da viscosidade do sabonete, enquanto que a incorporação do extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* não alterou a mesma. Já a incorporação do extrato EtOH 50 de folhas de *M. cauliflora* a 0,25% e EtOH 50 de casca de *S. adstringens* a 0,50%, individualmente, proporcionou aumento da viscosidade da preparação de loção, quando comparadas à preparação de controle.

Tixotropia é um termo empregado para designar a propriedade que certos materiais apresentam de modificar a sua estrutura interna quando submetidos a uma pressão externa, retomando esta estrutura após um período definido de repouso. O grau de tixotropia é dado pela área existente entre a curva ascendente e descendente (área de histerese) obtidas por gradiente de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento e permite avaliar o comportamento do material frente a uma pressão aplicada, ou seja, um maior grau de tixotropia prediz se um material tem sua viscosidade reduzida quando uma pressão é aplicada (tensão de cisalhamento) e,

portanto, apresenta maior velocidade de escoamento (gradiente de cisalhamento) (PRISTA et al., 1996).

Desta forma, os reogramas de gradiente de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento das preparações de sabonete líquido indicaram pequeno grau de tixotropia das mesmas (pequena área de histerese), indicando que o material não tem comportamento de redução da viscosidade quando aplicada uma pressão com retorno à sua estrutura inicial após repouso, ou seja, possui comportamento pseudo-plástico. Isto indica que tal produto deveria ser acondicionado em recipiente que favorecesse sua extrusão quando do seu uso, mas que bloqueasse a saída quando fora de uso.

Por outro lado, os reogramas de gradiente de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento das preparações de loção indicaram maior grau de tixotropia das mesmas (maior área de histerese), indicando que o material tem comportamento de redução da viscosidade quando aplicada uma pressão com retorno à sua estrutura inicial após repouso, o que facilita sua administração e espalhabilidade, evitando escoamentos indesejados, seja no recipiente de envase ou no local de aplicação, já que apresentou comportamento plástico.

Desta forma, observou-se que os resultados obtidos com os testes de estabilidade preliminar e avaliação do comportamento reológico indicaram a adequabilidade organoléptica e físico-química das preparações para uso, quando acondicionadas de maneira propícia. Entretanto, a perda da atividade anti-séptica das preparações após o período sob as condições estresse indicou que os componentes das preparações são sensíveis às variações de temperatura e que, portanto, tais preparações, para manter sua atividade, necessitam ser armazenadas protegidas da variação de temperatura.

O controle de qualidade microbiológico de produtos não-estéreis, isto é, produtos cosméticos e farmacêuticos tópicos e orais, assegura que a carga microbiana presente no produto, seja no aspecto qualitativo e quantitativo, não comprometa a sua qualidade final ou a segurança do paciente. Cargas microbianas elevadas podem comprometer a estabilidade do produto,

enquanto que, para a segurança do consumidor, microrganismos saprófitas presentes podem se portar como agentes infecciosos oportunistas e a presença de cepas reconhecidamente patogênicas representa potencial risco de aquisição de quadro clínico infeccioso (PINTO et al., 2003). A Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999, estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos, perfumes e produtos que entram em contato com mucosas (como sabonetes), que fazem parte do tipo I, segundo a classificação da Anvisa e demais produtos cosméticos susceptíveis à contaminação, que pertencem ao tipo II, a contagem de microrganismos mesófilos totais aeróbios tem o limite máximo de 5×10^2 e 5×10^3 UFC/g ou mL, respectivamente, sendo proibida a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e coliformes totais em 1 g ou 1 mL de produto (BRASIL, 1999). Visto a necessidade de seguir a legislação, através de ensaios de controle de qualidade microbiológico das preparações desenvolvidas, confirmou-se que as matérias-primas utilizadas não foram fonte de contaminação das preparações, bem como o operador, os equipamentos e o processo de manipulação das preparações.

7. CONCLUSÃO

Com este trabalho, obteve-se os valores de CIM contra bactérias e leveduras testadas para os diferentes extratos obtidos de *M. cauliflora* e *S. adstringens*, padronizados quanto à qualidade da droga, composição segundo classes de metabólitos secundários e teor de alguns destes metabólitos, obtendo também o índice de citotoxicidade. Tais resultados, nortearam o desenvolvimento de preparações com atividade contra bactérias e leveduras a apresentassem adequabilidade para aceitação e uso público em termos de atividade, estabilidade e qualidade microbiológica.

- ✓ Análises fitoquímicas indicaram a presença de flavonóides e taninos nas folhas e extratos polares de *M. cauliflora* e de de taninos na casca e extratos de *S. adstringens*.
- ✓ Análise quantitativa determinou elevado teor de fenóis totais nos extratos das folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens*.
- ✓ Pela determinação de CIM e CBM, extratos polares das folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens* demonstraram atividade leve e ausência de atividade dos extratos clorofórmicos de ambas as espécies.
- ✓ Os extratos polares das folhas de *M. cauliflora* e da casca de *S. adstringens* mostraram-se fungistáticos contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* e fungicidas para *Candida tropicalis*. Os extratos clorofórmicos de *M. cauliflora* e de *S. adstringens* não mostraram-se ativos contra as espécies de *Candida* testadas.
- ✓ O extrato EtOH 50 de folhas de *M. cauliflora* foi o que apresentou menor índice de citotoxicidade.
- ✓ A preparação de sabonete líquido com extrato EtOH 70 de folhas de *M. cauliflora* a 0,25% na formulação e com extrato EtOH 50 de casca de *S. adstringens* a 0,25% na formulação foram as preparações de sabonete líquido que apresentaram resultados mais significativos de atividade anti-séptica.
- ✓ A preparação de loção com os extrato EtOH 50 de folhas de *M. cauliflora* a 0,25% na formulação e com o extrato EtOH 50 de casca de

S. adstringens a 0,50% na formulação apresentaram resultados mais significativos de atividade contra as bactérias testadas, mas não apresentaram atividade contra as leveduras.

- ✓ Os parâmetros organolépticos e os parâmetros físico-químicos pH e densidade das preparações mostraram-se estáveis.
 - ✓ Todas as preparações desenvolvidas não apresentaram contaminação microbiana.
-

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, A.M.; HIGASHIGUCHI, S.; ABOUELEININ, A.M.; KIM, M. IBRAHIM, H.R. Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species. **Food Control**. 2007, v. 18, p. 173–178.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 13 de setembro de 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Séries Temáticas: Cosméticos_ Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. v.I, 2004. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 13 de setembro de 2006.

AGÊNCIA Nacional de Vigilância Sanitária. Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira. **Farmacopéia Brasileira**. 2004. Disponível em: <http://www.farmacopeia.org.br>. Acesso em: 01 ago. 2006.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J.E.J. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v.170, p.211-224, 1994.

AKERELE, O. Medicinal plants and primary health care: an agend for action. **Fitoterapia**, v.59, p. 533- 563, 1988.

ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal od Agricultural and Food Chemistry**, v.40, n. 9, p.4168-4170, 2001.

ALTERTHUM, F.; CARVALHAL, M.L. Controle dos Microrganismos. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.; SMÂNIA Jr., A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n.3, p. 367-373, 2000.

AMERICAN Society of Pharmacognosy. The Story of Taxol. 2005. Disponível em: http://www.phcog.org/Taxus/Taxus_Web.html. Acesso em: 26 jul. 2006.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of Analysis of the Association of Chemists. 13 ed. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists. 1984.

ARIAS, T.D. **Glosario de Medicamentos: desarrollo, evaluación y uso**. Washington: Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 1999.

ÁRVORES do Cerrado. Disponível em: <http://www.arvores.brasil.nom.br/cerrd/barbati.htm>. Acesso em: 01 ago. 2006.

AUGUSTIN, M.; HOCH, Y. Phytotherapie bei Hauterkrankungen. **Urban und Fischer**, p. 1-7, 2004.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p.727-733, 2005.

BARROS, R.S.; FINGER, F.L.; MAGALHÃES, M.M. Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, v. 66, p. 209-215, 1996.

BEOVIC, B. The issue of antimicrobial resistance in human medicine. **International Journal of Food Microbiology**. Article in Press, 2006. Disponível em: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro. Acesso em: 18/08/2006.

BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; KOHN, L.K.; REHDERA, V.L.G.; FOGGIO, M.A.; POSSENTI, A.; VILELA, L.; CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1-2, p. 72-77, 2005.

BLASCHEK, W.; EBEL, S.; HACKENTHAL, E.; HOLZGRABE, U.; KELLER, K.; REICHLING, J.; SCHULZ, V. **Hager ROM 2004** – Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. Berlin Heidelberg: Springer, 2004.

BORGES-FILHO, H.C.; FELFILI, J.M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil. **Revista Árvore**, v. 27, n. 5, p. 735-745, 2003.

BOUAMAMA, H.; NOEL, T.; VILLARD, J.; BENHARREF, A.; JANA, M. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 104-107, 2006.

BRASIL. Resolução nº 211, de 14 de julho de 2005. Estabelece a Definição e a Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, conforme Anexos I e II desta Resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005. disponível em: <http://e->

legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=17882&word=grau%202.

acesso em: 25 de setembro de 2006.

BRASIL. Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme o anexo desta resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1999. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=259>. Acesso em: 25 de setembro de 2006.

BRASIL. Decreto nº 5.813, 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2006. Disponível em: <http://www.mda.gov.br/saf/arquivos/0950311774.doc>. Acesso em: 26 de julho de 2006.

BRITISH Pharmacopea. London: Her Majesty's Stationery Office, 2001.

BROGGINI, L.S.C. Estudo fitoquímico e farmacológico de *Serjania erecta* Radlk: análises *in vivo* e *in vitro*. Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto, 2006. 61f. Qualificação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Ribeirão Preto.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology**. 22ed. USA: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2001.

BUHNER, S.H. **Herbal antibiotics**: Natural Alternatives for Treating Drug – Resistant Bacteria (A medicinal herb guide). Pownal, Vermont: Storey Books, 1999.

BYARUGABA, D.K. Antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *International Journal of Antimicrobial Agents*.

Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/09248579>.

Acesso em: 01 jun. 2006.

CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. Staphylococcus. In: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.149-155.

CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V. OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**. 2005. Article in Press.

CHRISTENSEN, D.J.; GOTTLIN, E.B.; BENSON, E.; HAMILTON, P.T. Phage display for target-based antibacterial drug discovery. **Drug Discovery Today**. v. 6, n. 14 p. 721-727, 2001.

CHOMNAWANG, M.T.; SURASSMO, S.; NUKOOLKARN, V.S.; GRITSANAPAN, W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, n. 1-3, p. 330-333, 2005.

CHOI, Y.M.; NOH, D.O.; CHO, S.Y.; SUH, H.J.; KIM, K.M.; KIM, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT**. 2006, v. 39, p. 756-761.

CITADIN, I.; VICARI, I.J.; SILVA, T.T.; DANNER, M.A. Qualidade de frutos de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) sob influência de duas condições de cultivo: sombreamento natural e pleno sol. **Revista Brasileira de Agrociências**, v.11, n. 3, p. 373-375, 2005.

CONFERENCE - Auckland 1999. '**Tree Cropping on the Edge...**'. Última atualização: 11 de junho de 2003. Disponível em: <http://www.nzero.co.nz/treecrop/feat99/jaboticaba.gif>. Acesso em: 01 de agosto de 2006.

CORDEIRO, C.H.G. Atividade biológica de gel dentrífico e enxaguatório bucal contendo extratos vegetais. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2005. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. v.1 e v. 2.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

COX, P.A. Will tribal knowledge survive the millenium. **Science**, v. 287, n. 5450, p. 44-45, 2000.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NOR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p.511-516, 2003.

DAMOUR, O.; HUA, S.Z.; LASNE, F.; VILLAIN, M.; ROUSSELLE, P.; COLLOMBEI, C. Citotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. **Burns**, v. 18, n. 6, p. 479-485, 1992.

DAVIS, B.D. Chemotherapy. In: DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N. GINSBERG, H.S. **Microbiology**. 4ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1990, p.201-228.

DEBBASCH, C.; EBENHAHN, C.; DAMI, N.; PERICOI, M.; VAN DEN BERGH, C.; COTTIN, M.; NOHYNEK, G.J. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of *in vitro* results with clinical data and product composition. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 155-165, 2005.

DE SMET, P.A.G.M. Traditional pharmacology and medicine in Africa
Ethnopharmacological themes in sub-Saharan art objects and utensils.
Journal of Ethnopharmacology, v. 63, p. 1-179, 1998.

DIEZ, M.A.; CARVALHO, G.S.C. Aditivos para sabonetes em barra. Oxiteno:
Artigo Técnico. Disponível em:
www.oxiteno.com.br/.../mercados/doc/documento.asp?artigotecnico=7&segmento=0600&idioma=PO&r=.pdf. Acesso em: 23 set. 2006.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 97, p. 654-660, 2006.

DONADIO, L.C. Jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba* (Vell.) Berg.). Jabuticabal: Funep, 2000. 55p. (Série Frutas Nativas, 3).

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A., REHDER, V.L.G.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M. Anti-*Candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. In: RAI, M.K.; CARPINELLA, C. (Eds.). Naturally Occurring Bioactive Compounds: A Newer and Safer Alternative for Control of Pest and Diseases. The Haworth Press Inc., in press. Acesso em: 18 de agosto de 2006.

ELOFF, J.N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 1998.

ESQUENAZI, D.; WIGG, M.D.; MIRANDA, M.M.F.S.; RODRIGUES, H.M. et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**, v.153, n. 10, p. 647-652, 2002.

FALCÃO, D.Q.; COSTA, E.R.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; KUSTER, R.M.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 1, p. 73-76, 2006.

FALKENBERG, M.B. Quinonas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004. p.657-684.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004. p. 263-288.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira S.A.. 1959.

FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu. 1988.

FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. Suplemento. São Paulo: Atheneu. 1997.

FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. Suplemento. São Paulo: Atheneu. 2000.

FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. Suplemento. São Paulo: Atheneu. 2002.

FENNELL, C.W.; LINDSEY, K.L.; MCGAWB, L.J.; SPARG, S.G. STAFFORD, G.I.; ELGORASHI, E.E.; GRACE, O.M.; VAN STADEN. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 205-217, 2004.

FERREIRA, E.C.; NOGUEIRA, A.R.A.; SOUZA, G.B.; BATISTA, L.A.R. Effect of drying method and length of storage on tannin and total phenol concentrations in *Pigeon pea* seeds. **Food Chemistry**, v.86, p.17-23, 2004.

FITOTERÁPICOS. Biodiversidade: Perspectivas e oportunidades tecnológicas. Disponível em:
<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/elocon.html>.
Acesso em: 31 de maio de 2004.

FREIREA, C.M.M.; ORTIZ, M.; MARQUES, M.; COSTA, M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 161-166, 2006.

FRUITS lovers nursery. Disponível em: <http://www.fruitlovers.com/Jaboticaba2.jpg>. Acesso em: 01 de agosto de 2006.

GERBA, C.P. Benefits of antibacterial products well documented. **American Journal of Infection Control**, v. 30, n. 4, p. 257-258, 2002.

GERTSCH, J.; NIOMAWËB; GERTSCH-ROOST, K.; STICHER, O. *Phyllanthus piscatorum*, ethnopharmacological studies on a women's medicinal plant of the Yanomamï Amerindians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 2-3, p. 181-188, 2004.

GRUBE, L. Antibacterial Debate. **Global Cosmetic Industry**, v. 168, n. 4, P. 26-29, 2001.

GUEDES, D. M. Resistência das Árvores do Cerrado ao Fogo: Papel da Casca como Isolante Térmico. Brasília: Universidade de Brasília, 1993. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – UnB.

HAMBURGER, M.O.; CORDELL, G.A. A direct bioautographic tlc assay for compounds possessing antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, v.50, n.1, p.19-22, 1987.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMAN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HAZEN, K.C. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An in vitro comparison. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, p. S37-S41, 1998.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M.M. **Manual de Cosmetologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

HERNÁNDEZ, N.E.; TERESCHUK, M.L.; ABDALA, L.R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucumán, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 317-322, 2000.

HISTÓRIA da Farmácia Brasileira. **História do Departamento de Ciências Farmacêuticas**. Disponível em: <http://www.ufpe.br/farmacia/historia1.htm>. Acesso em: 27 jul. 2006.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

JABOTICABA ou Jabuticaba. Disponível em: <http://herbario.com.br/dataherb16/jaboticaba.htm>. Acesso em: 15 de setembro de 2004.

KAVANAGH, F. **Analytical microbiology**. 2 ed. Nova Iorque: Academic Press, 1963. p.58.

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

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C.; **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia, USA: Lea & Febiger, 1992.

JABUTICABA. **Associação de Assistência Técnica e Extensão Rural do estado de Rondônia**. Disponível em: <http://www.emater-rondonia.com.br/Jabuticaba.htm>. Acesso em: 25/07/2006.

LABADIE, R.P. Problems and possibilities in the use of traditional drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, n. 3, p. 221-230, 1986.

LAPCÍK, O.; KLEJDUS, B.; KOKOSKA, L.; DAVIDOVÁ, M.; AFANDI, K. KUBÁN, V.; HAMPL, R. Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. 2005, v. 33, p. 983-992.

LARSON, E.L. APIC guideline for handwashing and hand antisepsis in health care settings. **American Journal of Infection Control**, v. 23, p. 251-269, 1995.

LEONTI, M.; STICHER, O. HEINRICH, M. Antiquity of medicinal plant usage in two Macro-Mayan ethnic groups (México). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2-3, p. 119-124, 2003.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical Technology**. Florida: CRC Press. 2000.

LOPES, D.C.D.X.P.; SANTOS, E.P.; TOMASSINI, T.C.B. Atividade anti-séptica de formulações contendo extrato etanólico de frutos de *Physalis angulata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 2, 2005.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C.; GARCÍA-GARCÍA, P. “The herbs that have the property of healing...”: The phytotherapy in *Don Quixote*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 429-441, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v.1, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LOW, S.P.; WILLIAMS, K.A.; CANHAM, L.T.; VOELCKER, N.H. Evaluation of mammalian cell adhesion on surface-modified porous silicon. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4538-4546, 2006.

LOZOYA, X.; REYES-MORALES, H.; CHÁVEZ-SOTO, M.A.; MARTINEZ-GARCIA, M.C.; SOTO-GONZALEZ, Y. DOUBOVA, S.V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 1-2, p. 19-24, 2002.

MACHADO, F.A.V. Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de extratos das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart.,

Leguminosae, barbatimão. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

MAGALHÃES, M.M.; BARROS, R.S.; FINGER, F.F. Changes in nonstructural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, v. 16, p. 209-215, 1996.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. **Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis**. 2005 Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/artigos/apa0014.htm>. Acesso em: 25 jul. 2006.

MARTINS, L.T. *Staphylococcus*. In: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.149-155.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and Prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 807-813, 1996a.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 857-862, 1996b.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric prodelphinidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1105-1107, 1999.

MÓS, E.N. Outras bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas. In: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.273-283.

MOULARI, B.; PELLEQUER, Y.; LBOUTOUNNE, H.; GIRARD, C.; CHAUMONT, J.P.; MILLET, J.; MUYARD, F. Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from the leaves of *Harungana madagascariensis* Lam. Ex Poir. (Hypericaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 2, p. 272-278, 2006.

MULLER, G.; KRAMMER, A. Comparative study of *in vitro* cytotoxicity of povidine-iodine in solution, in ointment or in a liposomal formulation (Repithel) and selected antiseptics. **Dermatology**, v. 212, S. 1, p. 91-93, 2006.

NAMIESIK, J.; GORECKI, T. Sample preparation for Chromatographic Analysis of Plant Material. **Journal of Planar Chromatography**, v. 13, p. 404-413, 2000.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2002.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003a.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for

Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003b.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Method for Antifungal disk Diffusion Susceptibility Testing for Yeasts. Proposed Guideline. NCCLS document M44-P. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003c.

NEVES, M.C.L.; JORGE NETO, J.; IFA, D.R.; FRACASSO, J.F.; LEPERA, E.Z.P.; SILVA, R.F.P. Estudo dos efeitos farmacológicos produzidos pelos extratos aquosos de hamamélis e barbatimão. In: **Reunião Anual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Caxambu, Resumos, p. 7, 1992.

NISHINO, C.; ENOKI, N.; TAWATA, S.; MORI, A.; KOBAYASHI, K.; FUKUSHIMA, M. Antibacterial activity of flavonoids against *S. epidermidis*, a skin bacterium. **Agricultural Biological Chemistry**, v.51, p.139-143, 1987.

NORTON, S.A. Botanical heritage of dermatology. In: AVALOS, J.; MAIBACH, H.I. **Dermatologic Botany**. CRC Press LCC: Boca Raton, 2000.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**. v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD/ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Estratégias. Salud para todos en el año 2.000. Oficina Sanitaria Panamericana. Documento Oficial n. 173, 1980.

PALACIOS, P.; GUTKIND, G.; RONDINA, R.; DE TORRES, R.; COUSSIO, J. **Acta Farmacêutico Bonaerense**, v.2, p.5-10, 1983.

PANIZZA, S. **Plantas que curam**: cheiro de mato. 17ed. São Paulo: IBRASA, 1997.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 50-52, 2005.

PEREIRA, M. Propagação via estacas apicais, caracterização morfológica e molecular de jabuticabeiras (*Myrciaria* spp). Piracicaba, 2003. 86f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; COMODO, N.; LO NOSTRO, A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Food Control**. Article in Press. 2005. Disponível em: www.elsevier.com/locate/foodcont. Acesso em: 18/08/2006.

PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil.1.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926.

PHILLIPSON, J.D. A matter of some sensitivity. **Phytochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1319-1343, 1995.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.

PIERONI, A.; NEBEL, S.; QUAVE, C.; HEINRICH, M. Ethnopharmacology of Liakra: traditional, weedy vegetables of the Arbereshe of the Vulture area in southern Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 165-185, 2002.

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.

PRIETO, J.M. El Bálsamo de Fierabrás. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 4, p. 48-51, 2005.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian. 1996. v. II, p.1319-1333.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.; LOBO, J.S. **Tecnologia Farmacêutica**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian. 2002. v. I, p.597-669.

PUERTO, E.J. La terapéutica y la farmacia durante el barroco. In: PUERTO, E.J. (Ed). El mito de panacea. **Compendio de Historia de la Terapéutica y de la Farmacia**. Ediciones Doce Calles: Madrid, 1997, p. 299-382.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. 2001, v. 39, p. 603-613.

REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; GRESPAN, R.; CUMAN, R.K.N.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; MELLO, J.C.P.; BERSANI-AMADO, C.A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 1-2, p. 101-104, 2002.

REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; KELMER-BRACHT, A.M.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R.K.N.; PAGADIGORRIA, C.L.S.; MELLO, J.C.P.; BRACHT, A.; BERSANI-AMADO, C.A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. **Toxicology Letters**, v. 143, n. 3, p. 55-63, 2003.

RIPPON, J.W. **Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes**. 3 ed. Philadelphia, USA: WB Saunders, 1988.

RODRIGUES Jr, C.J. **Mecanismos de resistência das plantas aos agentes patogênicos**. Lisboa: Junta de Investigações Científicas do Ultramar, 1980. p.23.

ROESSLER, W.G. Methods of Testing Antiseptics. In: BLOCK, S.S.; Desinfection, Sterilization and Preservation. 3 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 100-106, 1983.

RUNYORO, D.K.B.; NGASSAPA, O.D.; MATEE, M.I.N.; JOSEPH, C.C.; MOSHI, M.J. Medicinal plants used by Tanzanian traditional healers in the management of *Candida* infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 2, p. 158-165, 2006.

SANCHES, A.C.C. Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2004. 210f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

SANTOS, S.C.; COSTA, W.F.; RIBEIRO, J.P. et al.. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, n. 4, p. 292-299, 2002.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004. p.615-656.

SARTORATTO, A. et al.. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004.

SATTAR, S.A.; SPRINGTHORPE, V.S.; TETRO, J.; VASHON, R.; KESWICK, B. Hygienic hand antiseptics: Should they not have activity and label claims against viruses? **AJIC**, v. 30, n. 6, p. 355-372, 2002.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, n. 12, p.3875-3883, 1991.

SIGRIST, S.R. **Plantas Medicinais:** Barbatimão. 2003-2005. Disponível em: ci-66.ciagri.usp.br/pm/ver_1pl.asp?f_cod=19. Acesso em: 01 ago. 2006.

SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004.

SONAGLIO,D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R. BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004. p.290-326.

SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.S.; von POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies

in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

SOUZA, O.V.S.; OLIVEIRA, M.S.; RABELLO, S.V.; CUNHA, R.O.; COSTA, B.L.S.; LEITE, M.N. Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip.- Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, s. 1, p. 50-53, 2003.

STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Myrtales medicinais. In: STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002. p. 321-330.

STASI, L.C.; GUIMARÃES, E.M.; SANTOS, C.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SOUZA-BRITO, A.R.M. Fabales medicinais. In: STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002. p. 276-320.

TEIXEIRA, M.L.; SOARES, A.R.; SCOLFORO, J.R.S. Variação do teor de tanino da casca de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) em 10 locais de Minas Gerais. **Ciência Prática**, Lavras, v. 14, n. 2, p. 229-232, 1990.

TOLEDO, C.E.M. Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae). Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2002. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F. Epidemiologia das Infecções Bacterianas. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPertz, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

UNITED States Pharmacopeia. 26.ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 2003.

VANDEBROEK, I.; DAMME, P.; PUYVELDE, L.V.; ARRAZOLA,S.; DE KIMPED, N. A comparison of traditional healers' medicinal plant knowledge in the Bolivian Andes and Amazon. **Social Science & Medicine**, v. 59, n. 4, p. 837-849, 2004.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 137-144, 2004.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó, Santa Catarina: Argos, 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analysis**. Berlin: Springer-Verlag, 1984.

WENDT, C. Hand hygiene – comparison of international recommendations. **Journal of Hospital Infection**, v. 48, suplemento A, p. S23-S28, 2001.

WHA 42.43. **Traditional medicine and modern health care**. World Health Assembly, 1989. Disponível em: www.who.int/medicines/organization/trm/wha4243.pdf. Acesso em: 15 set. 2004.

WHO good manufacturing practices: specific pharmaceutical products. Herbal medicinal products. Quality assurance of pharmaceuticals. Disponível em:

http://www.who.int/medicines/organization/qsm/activities/qualityassurance/gmp/gmpthree_herb.html. Acesso em: 01 jun. 2004.

WHO. Traditional Medicine – Growing Needs and Potential. **WHO Policy Perspectives on Medicines**. Geneva, 2002, n. 2. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_2002.4.pdf. Acesso em 27 jul. 2006.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health for all in the 21th century: overview**. Disponível em: <http://www.who.int/hfa/>. Acesso em: 01 de ago. de 2006).

WIKIPEDIA. **La enciclopedia libre**. Disponível em; <http://es.wikipedia.org/wiki/Etnobot%C3%A1nica>. Acesso em: 28 jul. 2006a.

WIKIPEDIA. **Die freie enzyklopadie**. Disponível em: http://de.wikipedia.org/wiki/Pazifische_Eibe. Acesso em: 28 jul. 2006b.

WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. Harry's Cosmeticology. 7 ed. New York: Chemical Publishing. p.652-674, 1982.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, v. 322, p. 681-692, 1997.

ZAMPINI, I.C.; VATTUONE, M.A.; ISLA, M.I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. Ethanolic extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 450-456, 2005.

ZIEBUHR, W.; HENNIG, S.; ECKART, M.; KRÄNZLER, H.; BATZILLA, C.; KOZITSKAYA, S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28S, p. S14–S20, 2006.

**ANEXO A – Laudo do
Fornecedor de casca de S.
*adstringens***

ANEXO B – Laudo do
Fornecedor de extrato de *G.*
biloba