



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA  
CENTRO DE CIÊNCIA BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**NATHÁLIA ALEXANDRA DE OLIVEIRA CARTAXO**

**ESTUDOS COM *Syzygium cumini* (L.) Skeel: CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-  
PRIMA, PERFIL FITOQUÍMICO, CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA SOBRE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO BIOFILME  
DENTAL**

**Campina Grande - PB**

**2014**

**NATHÁLIA ALEXANDRA DE OLIVEIRA CARTAXO**

**ESTUDOS COM *Syzygium cumini* (L.) Skeel: CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA, PERFIL FITOQUÍMICO, CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO BIOFILME DENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Obtenção e Avaliação da Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos de Interesse Farmacêutico da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora: Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira**

**Coorientador: Prof. Dr. Harley da Silva Alves**

**Campina Grande - PB**

**2014**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

C322e

Cartaxo, Nathália Alexandra de Oliveira.

Estudos com *Syzygium Cumini* (L.) Skeel [manuscrito] : caracterização da matéria-prima, perfil fitoquímico, citotoxicidade e atividade antimicrobiana sobre microorganismos associados ao biofilme dental / Nathália Alexandra de Oliveira Cartaxo. – 2014.

98 f. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2014.

“Orientação: Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira, Departamento de Odontologia.”

“Co-Orientação: Prof. Dr. Harley da Silva Alves, Departamento de Farmácia.”

1. Fitoterapia. 2. *Syzygium cumini*. 3. *Streptococcus*. 4. *Candida albicans*. 5. Hemólise. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

NATHÁLIA ALEXANDRA DE OLIVEIRA CARTAXO

**ESTUDOS COM *Syzygiumcumini* (L.) Skeel: CARACTERIZAÇÃO DA  
MATÉRIA-PRIMA, PERFIL FITOQUÍMICO, CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA SOBRE MICRORGANISMOS DO BIOFILME DENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Obtenção e Avaliação da Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos de Interesse Farmacêutico, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovarlo em: 22 de Abril de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

Jozinete Vieira Pereira

Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira/ UEPB

(Orientadora)

Hilzeth de Luna Freire Pessoa

Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa/UFPB

1ª Examinadora

Ana claudia Dantas de medeiros

Profa. Dra. Ana Claudia Dantas de Medeiros/ UEPB

2ª Examinadora

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**

**REITOR**

Prof. Dr. Antonio Guedes Rangel Júnior

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. José Ethan de Lucena Barbosa

**PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria José Lima da Silva

**DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dilma Maria de Brito Melo Trovão

**VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

**COORDENADORA ADJUNTA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karina Lidianne de Alcantra Saraiva

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho de todo o coração ao meu Pai celestial e às pessoas especiais que contribuíram com amor, carinho e apoio para a concretização desta etapa em minha vida: meus pais, irmãos e futuro esposo.**

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.**

**À minha família, especialmente aos meus pais, Marcos e Nancy, pelo amor, fidelidade e pelo incentivo que me fez chegar até aqui.**

**Aos meus amigos, especialmente aqueles que sempre estiveram por perto, dando-me o apoio necessário.**

**Ao meu esposo, Fabrício, presente de Deus em minha vida, por seu amor, carinho e atenção.**

**À minha orientadora, professora Jozinete Vieira Pereira, por sua amizade, dedicação e confiança. Especialmente pelo seu otimismo, me estimulando nos momentos difíceis.**

**Ao professor Harley Alves Silva por transmitir saber, especialmente, na área da Química.**

**À professora Ana Claudia Dantas de Medeiros, por toda disponibilidade em ajudar sempre quando necessário. Suas ideias e sugestões contribuíram muito para este trabalho.**

**À minha companheira de pesquisa Thaíse que esteve comigo em todos os momentos. Nossa parceria foi muito importante. Agradeço à Myllena, pela sua disponibilidade para colaborar.**

**Ao pessoal dos laboratórios (LABDEM, LQAQ, LDCPF, CERTBIO e CBIOTEC) onde foram realizados meus ensaios.**

**À turma do mestrado 2012 do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, particularmente Renata Alencar, Fernando Ramos, Deysiane Oliveira, João Paulo e Paulo César.**

**Às professoras Ana Claudia Dantas de Medeiros e Hilzeth Freire de Luna Pessoa, pela disposição em participar dessa banca, contribuindo de maneira positiva com suas experiências nas respectivas áreas de pesquisa.**

**Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) do Programa de Pós-Graduação de Odontologia pelo financiamento de parte desta pesquisa.**

**Ao Programa de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual da Paraíba (PRPPG/UEPB).**

**A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse estudo. Enfim, o meu muito obrigada!**

## EPÍGRAFE

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém  
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi caracterizar a matéria prima vegetal, bem como analisar o perfil fitoquímico, a citotoxicidade e a atividade antimicrobiana do extrato de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel sobre microrganismos associados ao biofilme dental. A caracterização foi realizada por meio da determinação de propriedades físico-químicas: granulometria, densidade aparente não compactada, pH, teor de cinzas e teor de água do pó da droga vegetal de *Syzygium cumini* L. Skeels e aplicação de técnicas analíticas (microscopia eletrônica de varredura, análise térmica–Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG), difração de raio-X e espectroscopia de infravermelho - IV) para caracterizar e verificar a autenticidade do extrato liofilizado de folhas de jambolão, que possui propriedade antimicrobiana. Além disso, determinou-se a atividade antimicrobiana do extrato de *Syzygium cumini*(L.) Skeel sobre microrganismos associados ao biofilme dental, assim como o perfil fitoquímico e a citotoxicidade. A atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo. Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato liofilizado frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus parasanguis* (ATCC 903), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073) e *Candida albicans* (ATCC 10231). A análise fitoquímica foi realizada por espectroscopia na região visível e quantificou-se polifenóis, flavonóides, taninos condensados e saponinas totais. A citotoxicidade foi realizada pelo método de hemólise. Os resultados de granulometria demonstram que o pó de folhas de *S. cumini* é grosso, apresenta boa densidade e o pH é ácido. O teor de cinzas e o teor de água estiveram dentro dos parâmetros preconizados pela Farmacopeia. A análise do extrato mostrou uma característica típica de extratos vegetais, ou seja, as partículas apresentaram propriedade amorfa. Além disso, essas partículas puderam ser observadas nas microscopias com formatos irregulares, formando aglomerados de diferentes tamanhos e morfologia. Na caracterização térmica do extrato, ocorreram cinco eventos térmicos, apresentados por curvas de DSC e TG, de caráter endotérmico. O espectro de IV sugeriu diversos grupos funcionais dos compostos presentes no extrato liofilizado, em distintas bandas de absorção. Para *Streptococcus*, *Syzygium cumini* só foi ativo frente a *Streptococcus mutans* e a *Streptococcus oralis*(CIM de 1mg/mL). O extrato apresentou grande potencial antifúngico sobre *C. albicans*, demonstrando forte atividade fungistática e fungicida. A quantificação de metabólitos secundários obteve resultados satisfatórios, especialmente com altas concentrações de saponinas e polifenóis totais. O extrato apresentou baixa citotoxicidade. Portanto, o perfil de folhas de *S. cumini* foi traçado, mostrando-se no geral com boas características físico-químicas, químicas e térmicas. *S. cumini* é uma planta com bom potencial antimicrobiano, com aceitáveis concentrações de compostos fitoquímicos e com baixa citotoxicidade, sendo por isso recomendada a sua utilização com segurança e eficácia na prevenção e tratamento de doenças decorrentes do biofilme dental.

**Palavras-chave:** Fitoterapia, *Syzygium cumini*, Caracterização, *Streptococcus*, *Candida albicans*, Hemólise.

## ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the vegetable raw material, as well as analyze the phytochemical profile, cytotoxicity and antimicrobial activity of the leaf extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeel on microorganisms associated with dental biofilm. The characterization was performed by the determination of physicochemical properties: particle size, apparent uncompressed density, pH, ash content and loss on drying powder of *Syzygium cumini* plant drug L. Skeels and application of analytical techniques (electron microscopy scanning, thermal analysis - Differential scanning calorimetry (DSC) and Termogravimetry (TG), X-ray diffraction and infrared spectroscopy) to characterize and implement a quality control of the lyophilized extract of leaves jambolan, which has antimicrobial property. In addition, was determined the antimicrobial activity of the extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeel on microorganisms associated with dental plaque, as well as the phytochemical profile and cytotoxicity. The antimicrobial activity was performed by microdilution broth. Was determined Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of the lyophilized extract against *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus parasanguis* (ATCC 903), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073) and *Candida albicans* (ATCC 10231). Phytochemical analysis was performed by spectroscopy in the visible region and was quantified polyphenols, flavonoids, condensed tannins and total saponins. Cytotoxicity was measured by the hemolysis method. The results demonstrate that particle size of the powder leaves of *S. cumini* is thick, the pH is acidic and has good density. The ash content and loss on drying were within the parameters recommended by the Pharmacopoeia. The analysis of the extract showed a typical feature of plant extracts, in other words, the particles showed amorphous property. Furthermore, such particles could be observed in the microscopy irregularly shaped, forming agglomerates of different sizes and morphology. In thermal characterization of the extract, five events of decomposition, presented by TG and DSC curves occurred; this had endothermic characteristic. The IR spectrum suggested various functional groups of compounds present in the lyophilized extract in different absorption bands. For *Streptococcus*, *S. cumini* was only active against *S. mutans* and *S. oralis* (MIC 1mg/mL). The extract showed potential antifungal activity against *C. albicans*, demonstrating strong fungistatic and fungicidal activity. The quantification of secondary metabolites obtained satisfactory results, especially with high concentrations of total polyphenols and saponins. The extract showed low cytotoxicity. Therefore, the profile of leaves of *S. cumini* was drawn, showing up in general good physico-chemical, chemical and thermal characteristics. *S. cumini* has a good antimicrobial potential, with acceptable levels of phytochemicals and compounds with low cytotoxicity and is therefore recommended for use with safety and efficacy in the prevention and treatment of diseases resulting biofilm.

**Keywords:** Herbal, *Syzygium cumini*, Characterization, *Streptococcus*, *Candida albicans*, Hemolysis.

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

**Quadro 1.** Uso popular de *Syzygium cumini* (L.) Skeels disponível na literatura.....33

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Análise granulométrica do pó das folhas de *S. cumini*.....58

**Tabela 2.** Caracterização físico química do pó da folha de *S. cumini*.....59

**Tabela 3.** Determinação do resíduo seco. ....60

**Tabela 4.** Resultados da curva termogravimétrica do extrato liofilizado de folhas de *S. cumini*.....64

**Tabela 5.** Eventos térmicos apresentados na curva de DSC do extrato liofilizado de folhas de *S. cumini*. ....64

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos liofilizados de folhas de *S. cumini* de três análises (I, II e III) em dias alternados.....82

**Tabela 2.** Composição química do extrato liofilizado de folhas de *S. cumini* L. Skeel obtidos por espectroscopia na região do visível.....86

**Tabela 3.** Ensaio de citotoxicidade: Leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com extrato liofilizado de *S. cumini*.....88

## LISTA DE FOTOGRAFIAS E FIGURAS

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

**Fotografia 1.** Árvore de *S. cumini* (L.) Skeels. Fonte: próprio autor. ....32

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Microscopia óptica nos aumentos de 140, 280, 420, 560 e 1400x. ....61

**Figura 2.** Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura nos aumentos de 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000 e 10000x. ....62

**Figura 3** Curvas de DSC (A) e TG (B) para o extrato liofilizado de *S. cumini*. ....65

**Figura 4.** Difratoograma do extrato liofilizado de *S. cumini* .....66

**Figura 5.** Espectro de infravermelho do extrato liofilizado de *S. cumini* .....68

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\text{AlCl}_3$  – Cloreto de Alumínio

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM/MIC – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratorial Standards Institute

DL50 – Dose Letal Mediana

DSC - Differential scanning calorimetry

EC50 – Concentração Citotóxica Efetiva

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FT-IR – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

HCl – Ácido Clorídrico

IV – Infravermelho

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

Mg - Miligramas

pH – Potencial de Hidrogênio

RDC - Resolução Diretiva Colegiada

RPM - Rotação por minuto

TG – Termogravimetria

$\mu\text{g}$  - Micogramas

$\mu\text{L}$  – Microlitros

$\mu\text{m}$  - Micrômetros

## SUMÁRIO

|                                                                                                       |               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                             | <b>16</b>     |
| <b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>                                                                  | <b>19</b>     |
| 2.1 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO BIOFILME DENTAL .....                                                | 19            |
| 2.2 PLANTAS MEDICINAIS.....                                                                           | 25            |
| 2.2.1 Considerações sobre atividade antimicrobiana na pesquisa clínica com extratos vegetais .....    | 26            |
| 2.2.2 Plantas medicinais utilizadas no controle de afecções orais causadas pelo biofilme dental ..... | 29            |
| 2.2.3 Descrição e propriedades medicinais de <i>Syzygium cumini</i> (L.)Skeels.....                   | 31            |
| 2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO <i>SYZYGIUM CUMINI</i> (L.)SKEELS .....                                     | 36            |
| 2.4 ATIVIDADE ANTIHEMOLÍTICA.....                                                                     | 37            |
| 2.5 CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO .....                                                        | 38            |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>                                                                               | <b>40</b>     |
| 3.1 GERAL.....                                                                                        | 40            |
| 3.2 ESPECÍFICOS.....                                                                                  | 40            |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                               | <b>41</b>     |
| <br><b>CAPÍTULO I.....</b>                                                                            | <br><b>50</b> |
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                    | <b>50</b>     |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                  | <b>51</b>     |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                             | <b>52</b>     |
| <b>2 METODOLOGIA .....</b>                                                                            | <b>53</b>     |
| 2.1 DROGA VEGETAL .....                                                                               | 53            |
| 2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO.....                                                                        | 54            |
| 2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL.....                                               | 54            |
| 2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE RESÍDUO SECO DO EXTRATO ETANÓLICO 70%.....                                | 56            |
| 2.5 CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DO EXTRATO LIOFILIZADO .....                                             | 56            |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                 | <b>58</b>     |
| 3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL.....                                               | 58            |
| 3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE RESÍDUO SECO DO EXTRATO ETANÓLICO 70%.....                                | 60            |
| 3.3 CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DO EXTRATO LIOFILIZADO .....                                             | 60            |

|                                                                                                                                                   |               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>4 CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                          | <b>69</b>     |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                           | <b>70</b>     |
| <br><b>CAPÍTULO II .....</b>                                                                                                                      | <br><b>73</b> |
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                                                                | <b>73</b>     |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                                              | <b>74</b>     |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                         | <b>74</b>     |
| <b>2 METODOLOGIA .....</b>                                                                                                                        | <b>76</b>     |
| 2.1 MATERIAL VEGETAL .....                                                                                                                        | 76            |
| 2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....                                                                                                                | 77            |
| 2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO<br>MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO .....                                                    | 78            |
| 2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA (CBM) OU<br>FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) .....                                                             | 79            |
| 2.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS, FLAVONÓIDES, SAPONINAS<br>TOTAIS E TANINOS CONDENSADOS .....                                              | 79            |
| 2.6 CITOTOXICIDADE POR HEMÓLISE .....                                                                                                             | 81            |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                             | <b>82</b>     |
| 3.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM),<br>CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E CONCENTRAÇÃO<br>FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) ..... | 82            |
| 3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS, FLAVONÓIDES, SAPONINAS<br>TOTAIS E TANINOS CONDENSADOS .....                                              | 86            |
| 3.3 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DE EXTRATO DE FOLHA LIOFILIZADO<br>DE <i>S. CUMINI</i> L. SKEEL POR HEMÓLISE .....                                | 87            |
| <b>4 CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                          | <b>90</b>     |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                           | <b>91</b>     |
| <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                            | <b>96</b>     |

## 1 INTRODUÇÃO

O biofilme dental é definido como um conjunto de microrganismos aderidos sobre uma superfície sólida e úmida incluídos em uma matriz de polissacarídeos extracelulares, derivados do metabolismo celular e de substâncias da saliva e da dieta do hospedeiro (MOREIRA et al., 2009). A saúde bucal pode ser afetada quando o controle do biofilme dental, seja constituído por bactérias e/ou fungos, não é feito de maneira eficiente, a exemplo de uma má higienização. Com isso, os microrganismos podem agredir a cavidade oral, desencadeando doenças como a cárie, a doença periodontal e a candidose oral (ARAÚJO et al., 2009).

A existência de métodos de higienização mecânicos e químicos, além de uma dieta adequada para controlar o biofilme e impedir que este se desenvolva e se multiplique são relatados por Moreira et al. (2009). O método mecânico é baseado no uso da escovação e do fio dental; já os métodos químicos são instrumentos auxiliares no controle mecânico, pois muitas vezes, estes sozinhos não demonstram bons resultados na prevenção e eliminação do biofilme dental. Partindo-se desse pressuposto, substâncias químicas sintéticas com ação antimicrobiana e antissépticas são utilizadas (MOREIRA et al., 2009).

Por isso, uma área que está em bastante evidência é o estudo da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. As plantas podem ser uma alternativa aos antibióticos sintéticos que apresentam muitas reações adversas, são mais onerosos e freqüentemente os microrganismos têm desenvolvido mecanismos de resistência frente a esses fármacos (PANCHAVARNAKILI et al., 2012).

Plantas apresentam propriedades medicinais devido à presença de metabólitos secundários que lhes conferem atividade farmacológica. Dessa forma, são bastante utilizadas na medicina popular para prevenção, alívio e/ou cura de diversas afecções humanas, inclusive contra agentes infecciosos, podendo ser aplicada também para auxílio na remoção do biofilme dental e prevenção de afecções orais (JESUS et al., 2010; NWODO et al., 2011).

Pesquisas têm sido desenvolvidas pela comunidade científica nos últimos anos para elucidar e confirmar atividade antimicrobiana de plantas medicinais demonstradas por estudos etnofarmacológicos. Apesar de muitos compostos ativos

serem descobertos, há necessidade de sempre investigar novas substâncias para o desenvolvimento de novos fitoterápicos, especialmente com atividade antimicrobiana, devido ao número crescente de cepas resistentes de microrganismos (ANTONISAMY; EAHAMBAN, 2012).

No entanto, vale ressaltar que é de extrema importância executar um controle de qualidade da matéria prima vegetal, determinado pela boa condição física da planta, do produto intermediário e pelas propriedades do produto final, tendo em consideração os requisitos de boas práticas na fabricação de produtos farmacêuticos de origem vegetal. O controle de material vegetal emprega métodos farmacognósticos, controle físico e físico-químico, e monitoramento microbiológico (FONSECA; SILVA; LEAL, 2010).

*Syzygium cumini* (L.) Skeels Myrtaceae é uma árvore com frutos roxos escuros, proveniente da Índia, Malásia, China e Antilhas. Foi introduzida em muitos países tropicais como África e América Latina. No Brasil é cultivada nas regiões Sudeste, Nordeste e Norte. É conhecida mais popularmente como jambolão, jamelão e/ou manjelão (ELAVARASI; SARAVANAN, 2012; MIGLIATO et al., 2006).

Diferentes partes da planta são utilizadas na medicina popular porque apresentam atividade medicinal anti-hipoglicemiante, antioxidante, anti-inflamatória, anti-HIV, antileishmanial, antidiarreica, anorexígena, gastroprotetora e antiulcerogênica, conforme é citado em um levantamento feito por Swami et al., (2012). Em relação à atividade antimicrobiana Chandrasekaran; Venkatesalu, (2004); Michelin et al., (2005); Vieira et al (2012) afirmam que possuem atividade frente a *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus parasanguis*, *S. mutans*, *S. oralis* e *Lactobacillus casei*. Além disso, pode estar direcionada para o uso Odontológico. Costa et al. (2009) revelam que *S. cumini* é utilizada na forma de bochechos para tratar ulcerações aftosas, estomatites, afecções da garganta e outras doenças da cavidade oral.

Diante do exposto, nota-se a importância de pesquisar novas substâncias, preferencialmente de origem natural e que tenha um uso popular descrito, o que favorece sua utilização também por grupos populacionais com acesso restrito à assistência em saúde. Nota-se na literatura que as pesquisas com *Syzygium cumini* têm sido feitas geralmente frente às bactérias intestinais e à *Candida spp.* Pouco é descrito sobre a sensibilidade de bactérias da cavidade oral envolvidas na formação

do biofilme dental. Por isso, baseado no uso popular descrito por Costa et al. (2009), acredita-se na possibilidade da utilização do extrato de jambolão como auxiliar no tratamento e controle da cárie dentária, doença periodontal e candidose.

Considerando o valor farmacológico e o uso popular de *S. cumini* para afecções orais, demonstrou ser bastante interessante executar um estudo de caracterização da matéria prima vegetal, bem como a análise farmacognóstica, perfil fitoquímico, citotoxicidade e avaliação do efeito antimicrobiano sobre microrganismos associados ao biofilme dental.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO BIOFILME DENTAL

A boca, por ser um órgão úmido, vascularizado, com presença de calor e restos alimentares é um ambiente propício para o desenvolvimento e permanência de grandes e diversas populações microbianas na língua, na mucosa jugal, nos dentes e na gengiva. Assim, quando em seu habitat normal, não causam doença e impedem o crescimento excessivo de microrganismos nocivos, são considerados patógenos oportunistas ou de microbiota normal. Os principais gêneros envolvidos são *Streptococcus*, *Candida*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Mycoplasma* e *Veillonella* (TORTORA et al., 2012; DESHPANDE et al., 2011; PORTO et al., 2007).

A homeostase é uma característica da microbiota bucal entre indivíduos saudáveis e, nesta condição, os microrganismos coabitam harmonicamente em saprofitismo nos diferentes habitats da boca, numa dependência direta do pH, dos nutrientes e da superfície mucosa. No entanto, quando há alguma desordem fisiológica ou agressão contra o hospedeiro por parte dessas bactérias e fungos, ocorre uma quebra no equilíbrio entre a resistência e os fatores que determinam a virulência dos microrganismos causando processos infecciosos na cavidade oral, como cárie dentária, doença periodontal e candidose oral (MARSH, 2010).

Esses microrganismos que causam tais patologias se incorporam em uma matriz extracelular, formando comunidades denominadas de biofilme, na superfície do dente, podendo também estar aderidos ao tecido vivo (FINKEL; MITCHELL, 2011). Aas et al. (2005) afirmam que os biofilmes contêm várias espécies de microrganismos, estimando cerca de 700 espécies diferentes na cavidade oral.

O mecanismo pelo qual o biofilme se instala consiste na interação das bactérias com os restos alimentares, especialmente com polissacarídeos. A interação com lecitinas, proteínas e adesinas são fatores essenciais que influenciam a adesão do biofilme na superfície dentária. A intensidade do biofilme dental varia em cada indivíduo, dependendo da morfologia do dente, da qualidade na higiene oral, da dieta, superfície bacteriana e superfície do substrato (JESUS et al., 2010).

Durante o desenvolvimento do biofilme dental são reconhecidas diferentes etapas. Iniciando com a adsorção de bactérias à superfície do dente formando uma fina película sobre estes. Após isso acontece uma interação físico-química das bactérias com o biofilme, as bactérias orais possuem mais de um tipo de proteína de adesão na sua superfície celular (adesinas) e participam de várias interações com moléculas presentes na boca e também com receptores de outras bactérias. Acontece também a adesão entre outros microrganismos colonizadores, interagindo com receptores de adesão específicos e aumentando a densidade do biofilme. E, por fim, uma multiplicação dos microrganismos, levando ao crescimento e formando uma superfície tridimensional e funcionalmente organizada (LEITES; PINTO; SOUSA, 2006).

No estágio inicial, o biofilme é pouco colonizado e possui uma pequena variedade de microrganismos, dentre os mais prevalentes incluem *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Nesta etapa, os colonizadores primários têm de resistir a certas condições do ambiente oral, como a altas concentrações de oxigênio e a fatores naturais de remoção, como a mastigação, a deglutição e o fluxo salivar para que o biofilme seja desenvolvido (MAGER et al. 2003; ALLAKER, 2010).

No segundo estágio, a microbiota do biofilme maduro se apresenta muito diversa onde geralmente *Eikenella corrodens*, *Veillonella atypica* e *Prevotella loeschii*, se coagregam formando uma camada mais espessa do biofilme. Em seguida, pode ocorrer uma fase de transição entre o biofilme imaturo e maduro que é devido à coagregação de *Fusobacterium nucleatum*. O estágio mais avançado é constituído por colonizadores como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis* (ALLAKER, 2010; AAS et al., 2005).

Os biofilmes de *Candida albicans* apresentam arquitetura complexa, onde há predomínio de células filamentosas, leveduriformes e intercaladas. Formam-se a partir da adesão a um substrato, seguido pela proliferação das células leveduriformes com o início do desenvolvimento de hifas e cessa na fase de maturação, quando o crescimento dessas é acelerado e a matriz extracelular envolve o biofilme (CHANDRA et al., 2001; ANDES et al., 2004).

Algumas espécies de *Candida* são responsáveis pelo desenvolvimento da candidose oral, sendo essa uma infecção causada por fungos presentes na

microbiota da cavidade oral. Tais espécies são frequentemente designadas como patógenos oportunistas, que comumente são isolados no intestino, na vagina, como também na cavidade oral; estando associados a infecções sistêmicas e superficiais. A espécie fúngica com maior capacidade para formar biofilme é a *Candida albicans*, inclusive sobre hidroxiapatita e resina acrílica, evidenciando sua patogenicidade. Os mecanismos moleculares envolvidos com a virulência da *Cândida* estão relacionados à respostas celulares de crescimento invasivo, com formação celular e instalação da infecção, induzindo uma resposta inflamatória (THEIN; SAMARANAYAKE, 2006).

*Candida spp.* é reconhecida como um dos principais agentes envolvidos em infecções, comportando-se como patógenos oportunistas. Apresenta alguns fatores de risco que torna o indivíduo susceptível à infecções por este tipo de microrganismo, conforme citam Peixoto et al. (2010). Os principais incluem: pacientes imunossuprimidos, mudanças fisiológicas no organismo, como gravidez, infância ou idade avançada, fatores nutricionais, tratamentos com antibióticos de amplo espectro, drogas imunossupressoras e corticosteroides, alterações anatomofisiológicas orais, como macroglossia, diminuição do fluxo salivar, doenças respiratórias, além de fatores locais, como xerostomia e aparelhos protéticos.

#### 2.1.1 Patologias infecciosas mais comuns na cavidade oral

Cárie dentária e doença periodontal são patologias comuns na população em geral e em várias regiões do mundo, representando assim o maior problema de saúde pública segundo Bonifait et al. (2012).

Candidose oral é uma infecção odontológica, que, assim como cárie dentária e doença periodontal, cujas importâncias clínicas devem ser levadas em consideração, atinge indivíduos saudáveis e imunocomprometidos (Aids, diabetes, Síndrome de Cushing, tumores malignos e condições imunossupressivas). O sistema imune é o principal fator que define a transição do fungo de comensal para patogênico, porém os fatores de virulência expressados por *C. albicans*, tais como adesinas, mudança fenotípica, comportamento dimórfico, e secreção de enzimas hidrolíticas, podem contribuir para a persistência da colonização, assim como o

desenvolvimento de sintomatologia decorrente da infecção fúngica (DE ROSSI et al., 2011).

#### *2.1.1.1 Cárie e doença periodontal*

As bactérias envolvidas no biofilme dental são capazes de metabolizar os carboidratos da dieta exógena e geram o ácido lático, mantendo o pH ácido na cavidade oral, resultando em desmineralização do esmalte dentário. À medida que o biofilme evolui, surgem cáries e mais tarde, os primeiros sintomas da doença periodontal, ou seja, bactérias anaeróbias facultativas que são desenvolvidas e se acumulam, causando no hospedeiro, placa supragengival e inflamação gengival, podendo provocar danos permanentes aos tecidos de suporte e perda dentária (BONIFAIT et al. 2012; ERDEM et al., 2012; LEITES; PINTO; SOUZA, 2006; ALLAKER, 2010).

A cárie, uma das doenças infecciosas mais prevalentes em todo o mundo, afeta pessoas de todas as idades, especialmente a população jovem (60-90%) e é causada pela interação entre microrganismos orais, dieta e dentição (JUNAID et al., 2013). Essa infecção é caracterizada pela destruição localizada dos tecidos dentários causada pela ação de bactérias, incluindo *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus* spp. (ALLAKER, 2010).

A natureza multifatorial da cárie é explicada através de fatores biológicos a exemplo da presença de biofilme, pH da saliva, tipo de dieta, classe social associado à renda e dificuldade de acesso à dentistas regularmente, educação, fatores comportamentais, dentre outros. Estes aspectos influenciam em maior ou menor grau o desenvolvimento dessa doença no indivíduo (VIEIRA et al., 2012).

Na doença periodontal as bactérias atingem a mucosa, gengiva e os tecidos periodontais, resultando em inflamação e degradação de tecidos moles. Tal processo resulta em halitose que consiste na exalação de compostos sulfurados voláteis produzidos a partir do metabolismo das bactérias na boca, sendo responsáveis pelo odor desagradável que algumas bactérias causam ao hospedeiro (MAEHLER et al., 2011; SILVA; TEREZAN; FISHER, 2012). Quando confinado na gengiva, pode causar gengivites e/ou periodontite quando um processo inflamatório é iniciado na gengiva para os tecidos de suporte do periodonto (ALLAKER, 2010).

### 2.1.1.2 Candidose oral

A candidose oral é uma infecção oportunista, tendo por agente etiológico leveduras do gênero *Candida*, sendo a *Candida albicans* a maior responsável por desencadear as afecções orais. Normalmente acomete pacientes idosos, indivíduos comprometidos imunologicamente e crianças. Clinicamente pode apresentar-se como placas pseudomembranosas, eritematosas, áreas hiperplásicas, queilite angular e muitas vezes associada a glossite rombóide mediana. A sensação de dor e/ou queimação está relacionada com os sintomas da candidose (SAMSON, 2013).

Esta infecção acomete principalmente indivíduos com imunidade baixa como é mostrado em um estudo epidemiológico realizado por Xu et al. (2013). Investigou-se a relação entre pacientes submetidos à quimioterapia e/ou radioterapia, seu estado nutricional e o uso ou não de prótese oral pelos portadores de neoplasias avançadas e a susceptibilidade para desenvolver infecções orais. Observou-se que a infecção oral foi prevalente em 46% (n=391) dos pacientes avaliados (n=850). Os resultados mostraram que os pacientes que fazem quimioterapia e/ou radioterapia têm mais chance de desenvolver infecções orais em comparação com os que só fazem cuidados paliativos e cirurgia. O estado nutricional e a prótese oral foram identificados como fatores de risco independentes associados à infecção oral. As doenças mais comuns encontradas foram candidose oral, herpes simples e mucosite.

Costa et al. (2013) afirmam que há uma maior predisposição dos pacientes submetidos à radioterapia e quimioterapia desenvolverem infecções orais. É reconhecido que esse tipo de tratamento induz danos às células epiteliais da mucosa oral e a morfofisiologia das glândulas salivares, comprometendo as suas funções. Com isso, alterações de natureza quantitativas e qualitativas podem ocorrer, o que pode resultar em uma mucosa frágil e um fluxo salivar reduzido, embasando assim o trabalho desenvolvido por Xu et al. (2013). O risco aumentado para a candidose oral decorre provavelmente da queda do fluxo salivar conseqüente da radioterapia. A atividade fagocítica reduzida dos granulócitos salivares frente a esses microrganismos é uma possível explicação para a maior predisposição dos pacientes irradiados à candidose (SERA et al., 2013).

A psoríase também pode ser um fator de risco para candidose oral. Picciani et al. (2013) analisam a presença de candidose oral em língua de pacientes com psoríase através de citopatologia. O exame oral e os resultados do esfregaço citopatológico revelaram que os 26% de casos de candidose ocorreram em pacientes com psoríase.

Okada, et al. (2013) verificam o processo patológico inicial da infecção causada por *Candida* a resposta imunológica após a inoculação de *C. albicans* em línguas de camundongos, induzindo assim a candidose oral. Os sintomas foram monitorizados através da observação de uma camada branca na língua e no número de células viáveis de *Candida* em cavidade oral. Verificou-se que o fungo invadiu a superfície da língua dos camundongos e manchas brancas foram desenvolvidas dentro de 24 horas após a inoculação. O exame histopatológico revelou a presença de inflamação aguda local, nos tecidos superficiais de línguas abrangidas pelo micélio de *C. albicans*. No entanto, foi verificada que a pior condição no processo patológico em candidose oral acontece 48 horas após a inoculação de *C. albicans*, quando a superfície da língua fica coberta com hifas de *Candida*. Assim, observou-se um acúmulo denso de neutrófilos sob as lesões. Isso sugere que os neutrófilos e os níveis de citocinas influenciam a condição patológica da infecção por *Candida*.

*C. albicans* apresenta alguns fatores de virulência, incluindo aspartil proteases secretadas, que são fatores determinantes na patogenicidade deste fungo em pacientes imunocomprometidos. Sendo assim, Sóllis; Gordillo; Herrera (2013) compararam a atividade das proteinases das cepas de *C. albicans* coletadas de pacientes imunodeprimidos portadores de HIV, câncer, diabetes, candidose oral e um grupo de pacientes saudáveis. Foi observado nesse estudo que os pacientes com candidose apresentaram uma alta atividade proteolítica em comparação com outros grupos. Do mesmo modo, ao comparar a atividade da proteinase a partir de diferentes grupos, verificou-se que os pacientes com candidose oral, diabetes, câncer e HIV mostraram elevada atividade, em comparação com indivíduos saudáveis.

Runyoro et al. (2006) realizaram um estudo etnobotânico com 36 espécies de plantas que são utilizadas tradicionalmente para o tratamento de infecções por *Candida*. Avaliou inicialmente informações de raizeiros locais comparando-se com a literatura e concluiu-se que das 36 plantas consultadas, 13 apresentaram com atividade antifúngica previamente avaliada e disponível na literatura, contribuindo para o conhecimento científico.

## 2.2 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas como medicamentos pela humanidade é tão antiga quanto à própria história do homem, inclusive com comprovação arqueológica. Plantas medicinais são utilizadas pela população desde o ano 3000 a.C., quando seus registros eram disponibilizados apenas em papiros. Em 1500 a.C., uma obra, o Papiro de Ebers, já mencionava o ópio e o *Aloe vera*. A partir do período das grandes navegações, seu uso foi disseminado pelas sociedades de vários continentes, deixando assim um valioso arsenal terapêutico para o mundo moderno e contemporâneo (PORTO; SILVA, 2012; HOERNER, 2009; FIRMO et al., 2011).

As plantas medicinais produzem metabólitos primários e secundários; os primários exercem diferentes finalidades, incluindo regulação do crescimento, defesa contra predadores e infecções (NWODO et al., 2011; FILHO, 2010; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Além disso, são importantes fontes de substâncias medicamentosas devido à produção de metabólitos secundários. Estes são os responsáveis pelas plantas exibirem atividades biológicas que beneficiam a humanidade na prevenção e tratamento de doenças, sendo utilizadas por indivíduos de todas as faixas etárias e sexos (NWODO et al., 2011; MURTI et al., 2012). Em pesquisa realizada por Razafindraibe et al. (2012) foram entrevistadas 498 pessoas, sendo 301 (60,44%) mulheres e 197 (39,56%) homens. Dessa amostra, 90,56% dos participantes afirmaram que utilizam plantas medicinais para algum fim medicinal, sendo a faixa etária mais comum a de 40-49 anos (98,29%) de idade e a menor, jovens entre 15-19 anos (45,73%).

As plantas são um dos recursos terapêuticos mais utilizados no mundo até hoje, provavelmente devido à disponibilidade no meio ambiente ou nas feiras, apresentando preço mais acessível à população e capaz de produzir menos efeitos colaterais e contraindicações, em relação aos medicamentos industrializados. Em nível mundial, cerca de 80% da população faz uso de plantas medicinais, seja na forma de chás, garrafadas ou outras formas de preparo caseiro. O uso, no entanto, não pode ser feito de maneira indiscriminada (THITHE et al., 2013; RIBEIRO; GONÇALVES; BESSA, 2012; JESUS et al., 2010).

Lima et al. (2012) e Razafindraibe et al. (2012), fazendo um levantamento dos principais usos populares de plantas medicinais de diferentes comunidades, sexo e faixa etária constataram que os principais usos de plantas medicinais estão

destinados para gripe, tosse, diarreia, parasitoses, altas taxas nos níveis séricos de colesterol, dores de estômago, diabetes, indigestão, infecção, diabetes, câncer, sarampo, cicatrização de feridas, asma, bronquite, problemas renais e do sistema circulatório, desordens digestivas e problemas do sistema reprodutivo.

Desempenham importante papel na medicina moderna primeiramente porque podem fornecer fármacos extremamente importantes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química, como, por exemplo, os alcalóides da *Papaver somniferum* L. e os glicosídeos cardiotônicos da *Digitalisspp*. Em segundo lugar, as fontes naturais fornecem compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos. Em terceiro lugar, os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; VINAGRE et al., 2011).

Estudo realizado sobre o uso de vegetais em tratamentos médico tradicionais no agreste paraibano verificou que a fitoterapia representa uma alternativa às praticas medicinais oficiais em regiões do Nordeste do Brasil, onde estudos acerca da flora medicinal serão úteis para garantir além da preservação desses saberes, a identificação e desenvolvimento de novos medicamentos oriundos desses produtos naturais (BARBOSA, 2011).

No Brasil, pesquisas com produtos naturais têm se mostrado interessantes, com perspectiva de desenvolvimento de novos medicamentos com menor toxicidade e maior atividade farmacológica, além de ter ótimo custo-benefício para a população. O país tem esta vantagem em relação a outros devido a dois aspectos: abriga a maior biodiversidade do planeta, sendo representado por 25% da flora mundial e o alto conhecimento tradicional etnobotânico da população local (SILVA MSP et al., 2012; CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010). No entanto, investimentos em pesquisas científicas no Brasil ainda são precários, limitando o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas.

#### 2.2.1 Considerações sobre atividade antimicrobiana na pesquisa clínica com extratos vegetais

As primeiras descobertas no campo da clínica microbiológica ocorreram entre o final de 1800 e início do ano 1900. Baseando-se na teoria de que agentes patogênicos específicos pudessem causar doença, o médico alemão Robert Koch postulou que a remoção do patógeno poderia deter ou reverter o processo da doença. Por isso é interessante que sejam realizados testes que auxiliem na seleção correta na terapia antimicrobiana para eliminar os patógenos envolvidos na infecção (KHULLER, 2009).

Silva MSP et al. (2012) afirmam que é reconhecida a susceptibilidade a antimicrobianos em culturas suspensas ser bem maior do que o crescimento bacteriano em biofilmes. No entanto, o ensaio laboratorial prediz a atividade antimicrobiana que determinado extrato vegetal possa ter frente a microrganismos envolvidos em patologias.

Partindo desse pressuposto diversas pesquisas com extratos vegetais têm sido realizadas para avaliar a atividade antimicrobiana. Por exemplo, *Schinopsis brasiliensis* mostrou forte atividade frente à *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (SILVA MSP et al., 2012). Extratos de caule de *Ximenia americana* L. mostraram atividade sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus oralis* (ATCC 10557) (SILVA MSP, et al., 2012). *Annona coriacea* (Mart.) mostrou boa atividade frente à *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) (TOLEDO et al., 2011). Extratos de *Syzygium cumini* L. (Skeels) foram testados frente a bactérias e fungos, alguns provenientes de isolados clínicos, e constatou-se atividade antimicrobiana especialmente frente à *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* (MTCC 736) e *Staphylococcus aureus* (MTCC 740), sendo, portanto, mais efetivo sobre os fungos (CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004). O potencial antifúngico *in vitro* dos extratos de *Syzygium cumini* L. (Skeels) foi testado também sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Apresentando atividade para todas as cepas de *Candida* estudadas, sendo que as cepas de *C. tropicalis* demonstraram-se mais sensíveis aos extratos em relação a *C. albicans* e *C. glabrata* (COSTA et al., 2009).

Para a determinação do perfil de sensibilidade, várias metodologias estão disponíveis, dentre as quais, as mais empregadas são: métodos de difusão em ágar, que pode ser executado por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e

perfuração em ágar, método de macrodiluição e microdiluição, conforme cita Ostrosky et al. (2008). Em laboratórios de rotina, aquelas consideradas padrão-ouro, como a diluição em ágar e a microdiluição em caldo, são laboriosas para serem executadas. Porém, essas duas técnicas fornecem resultados quantitativos (Concentração Inibitória Mínima- CIM), sendo bastante utilizadas em pesquisas científicas, já que técnicas qualitativas, como a disco difusão, apesar de fácil execução não são capazes de predizer a CIM (CAMPANA et al., 2011).

Dentre vários parâmetros considerados, o meio de cultura, o inóculo do microrganismo, a difusão do fármaco, as condições de incubação e os critérios de leitura são fundamentais para a confiabilidade do método (VITAL et al., 2004).

No entanto, por falta de padronização das técnicas *in vitro* na área de atividade antimicrobiana de extratos vegetais, os resultados muitas vezes diferem entre grupos de pesquisadores, quando se utiliza a mesma planta e varia apenas a metodologia. Este fato compromete o real resultado e leva a falsas conclusões sobre a eficácia do extrato como agente antimicrobiano (OTHMAN et al., 2011).

Por outro lado, para comprovar tal afirmação, Othman et al. (2011) relatam um estudo comparativo em que se avaliou a consistência e discrepâncias entre três metodologias (disco, diluição em caldo ou microdiluição e turbidimetria), testando-se duas plantas de diferentes espécies. Percebeu-se que houve pouca variação nos resultados, mas a microdiluição se destacou por mostrar cinética de crescimento das bactérias, incluindo extratos de plantas com baixa polaridade o que não pode ser visto com as outras técnicas.

De acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2002), os procedimentos para determinar a atividade inibitória podem ser realizados tanto pelas técnicas de diluição em caldo ou em ágar. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM). As CIM's são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos e, portanto, usadas para julgar o desempenho de todos os outros métodos de susceptibilidade. Nos laboratórios de diagnóstico, as CIM's são também usadas como uma ferramenta de pesquisa para determinar a atividade *in vitro* de novos antimicrobianos.

A classificação sobre os valores de CIM na literatura é variável segundo autores. Holetz et al. (2002) classificam a CIM da seguinte maneira: Abaixo de 100

µg/mL: Boa atividade antimicrobiana; Entre 100 e 500 µg/mL: Moderada atividade antimicrobiana; Entre 500 e 1000 µg/mL: Fraca atividade antimicrobiana; acima de 1000 µg/mL: Inativo. Aligiannis et al. (2001) apresentaram: CIM até 0,5mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6mg/mL são inibidores fracos. Webster et al. (2008) propõem que determinado extrato apresenta boa atividade quando o valor daCIM é decrescente a partir de 1000 µg/mL.

Segundo Alves et al. (2008) microdiluição envolve a medida de pequenos volumes de caldo inseridos em placas de até 96 cavidades, divididos em linhas e em colunas. Abrange pequenos volumes, por isso o nome da técnica, microdiluição. As placas de microdiluição inoculadas devem ser incubadas por determinado tempo e temperatura, dependendo da exigência do microrganismo. A CIM é influenciada por alguns fatores primários, a saber: a sensibilidade do organismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento bacteriano.

### 2.2.2 Plantas medicinais utilizadas no controle de afecções orais causadas pelo biofilme dental

Algumas plantas medicinais que possuem grande potencial antimicrobiano são utilizadas na Odontologia para controlar e ou combater afecções orais causadas por bactérias e fungos. As mais utilizadas são *Anacardium occidentale* L. (cajueiro), *Eugenia caryophyllata* T. (cravo-da-índia), *Zyziphus joazeiro* Mart. (juá), *Punica granatum* L. (romã), *Allium sativum* L.(alho), *Ximenia americana* L.(ameixa), *Stryphnodendron Adstringens* Mart.(Coville) (barbatimão), *Schinus terebinthifolius* Raddie *Myracruoduon urundeuva* All(aroeira) dentre outras com propriedades antimicrobianas, antissépticas, analgésicas e anti-inflamatórias (POCHAPSKI, 2010; OLIVEIRA, 2010).

Oliveira et al. (2010) desenvolveram um estudo etnobotânico com raizeiros, usuários de plantas medicinais e dentistas do serviço público de saúde, objetivando realizar um levantamento sobre a indicação de plantas medicinais utilizadas para problemas orais em diferentes regiões do Estado da Paraíba. Dentre as plantas para problemas orais, incluindo halitose, sangramento gengival, ulcerações aftosas e

odontalgias, as mais indicadas pelos grupos pesquisados estão jurema preta (*Mimosa tenuiflora* Benth), angico (*Anademathera colubrina* (Vell.) Brenan), pedra ume (*Myrcia salicifolia* DC.), quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium* Roem. & Schult. T.D. Penn.), aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), cravo (*Syzygium aromaticum* (L.)), hortelã (*Plectrantus amboinicus* (Lour.) Spreng), cajueiro roxo (*Anacardium occidentale* L.), limão Taiti (*Citrus aurantifolia* Swingle), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e a malva (*Malva sylvestris* L.), cauauçu (*Calathea lutea*(Aubl.) Schult.), mulungu (*Erythrina velutina* Willd.), juá (*Ziziphus joazeiro* Mart.) mostrando assim o grande arsenal terapêutico natural para este fim específico.

Microrganismos envolvidos na formação do biofilme dental, tais como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* tiveram seu crescimento inativo quando se testou pela técnica de difusão em ágar em placas de Petri para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) a atividade antimicrobiana de extrato de hidroalcoólico *Rosmarinus officinalis* Linn., arbusto aromático com propriedades anti-hipertensivas e digestivas. Os resultados sugerem a possibilidade de uso também do extrato de alecrim, como antimicrobiano oral (SILVA, et al., 2008).

Outra importante pesquisa foi realizada com extrato da casca do caule do *Anacardium occidentale* Linn. (cajueiro) sobre os microrganismos formadores do biofilme dental (*Streptococcus mitis* ATCC, 9811, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sanguis* ATCC 10557, *Streptococcus sobrinus* ATCC 7609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469). Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da diluição em meio líquido usando-se uma escala com concentrações crescentes do extrato, variando da diluição 1:1 até 1:1024. Todas as linhagens ensaiadas demonstraram sensibilidade ao extrato do cajueiro em uma concentração de 1:4 (*S. sanguis* e *L. casei*) a 1:8 (*S. mutans*, *S. mitis* e *S. sobrinus*) comparado ao gluconato de clorexidina a 0.12% que atuou em uma concentração de 1:2 (*S. mitis*), 1:4 (*S. sobrinus*) e 1:8 (*S. mutans*, *S. sanguis* e *L. casei*), contribuindo na prevenção e tratamento da cárie e doença periodontal (ARAÚJO et al., 2009).

Pereira et al. (2006) desenvolveram um estudo de avaliação da atividade antimicrobiana de casca do fruto da romã (*Punica granatum* Linn.) sobre linhagens bacterianas de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*. Os ensaios foram realizados pelas técnicas de difusão em ágar em placas para determinação da Concentração Inibitória

Mínima (CIM). As CIM's (mg/mL) do extrato da *P. granatum* frente ao *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* e *L. casei* foram 1:32, 1:8, 1:8, 1:512, e 1:128, respectivamente, mostrando o *P. granatum* como bom inibidor do crescimento bacteriano.

Bonifait et al. (2012) analisaram compostos ativos obtidos a partir de plantas que pertencem à família Rutaceae e descobriram moléculas naturais potenciais para a prevenção/tratamento de infecções orais comuns, incluindo a candidose oral pelo fato de inibir o crescimento da *Candida albicans*, a cárie dentária e doença periodontal por bactérias. Essa atividade pode ser explicada, pois os fitoconstituintes apresentam uma propriedade quelante de ferro, que por sua vez interfere no crescimento microbiano.

A prevenção de cárie, doença periodontal e candidose consistem na desorganização do biofilme através de sua remoção mecânica e ação de agentes químicos, como antimicrobianos e antissépticos (ALLAKER, 2010).

Por exemplo, um enxaguatório oral contendo extrato de malva foi testado frente a *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus mutans*, além de um pool de microrganismos da saliva. Os resultados indicaram que essa formulação se mostrou eficaz, visto que apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias testadas que estão envolvidas na cárie dentária (MOREIRA; FERREIRA; HASHIZUM, 2012).

### 2.2.3 Descrição e propriedades medicinais de *Syzygium cumini* (L.)Skeels

*Syzygium cumini* (L.)Skeels é uma árvore da família Myrtaceae, proveniente da Índia, Tailândia, Filipinas e Madagascar. É cultivada em alguns países, incluindo o Brasil, especialmente nas regiões Sudeste, Norte e Nordeste (MIGLIATO et al., 2006).

Os nomes populares mais comuns no Brasil são jambolão, azeitona, azeitona-roxa, oliva, dentre outros. A árvore (fotografia 1) mede de 15 a 30 metros de altura, com a copa de três a quatro metros e meio de diâmetro. As flores com inflorescências, branca, axilares e racemosas, brotam durante Setembro a Novembro, ou seja, cerca de 30 dias antes dos frutos. Estes, com aspecto carnoso, são do tipo baga, alongados, com cerca de quatro centímetros de comprimento, têm

a coloração roxa e apenas uma semente. As folhas são esverdeadas com fissuras escuras e cicatrizes foliares bastante aparentes. O caule é aéreo, ereto, tipo tronco, lenhoso, cilíndrico, apresentando ramificação caulinar do tipo simpodial (ELAVARASI; SARAVANAN, 2012; MIGLIATO et al., 2006).



**Fotografia 1** Árvore de *S. cumini* (L.) Skeels. Fonte: próprio autor.

Segundo a medicina popular (Quadro 1) e estudos científicos realizados, todas as partes da planta, tais como frutos, folhas, cascas do caule e sementes são utilizadas para tratar diversos distúrbios orgânicos (ELAVARASI; SARAVANAN, 2012). É conhecida por suas propriedades antidiarréica, anti-inflamatória, antidiabética, antimicrobiana e antioxidante e usada também contra constipação, leucorréia e febre (ELANSARY et al., 2012).

**Quadro 1** Uso popular de *Syzygium cumini* (L.) Skeels disponível na literatura

| PARTE DA PLANTA | USO POPULAR                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | REFERÊNCIAS                                                                                                          |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Folhas          | Febre, gastropatia, estrangúria, dermatopatia, obstipação, diabetes, pressão arterial elevada, acalma prurido, evita a presença de sanguenas fezes, além de ser utilizada como adstringente, cataplasma em doenças de pele, e antiinflamatória, antialérgica, antioxidante, antiviral e como reparadora de danos ao DNA. | Silva et al., (2007); Mohamed; Ali; El-baz, (2013); Chandrasekaran; Venkatesalu (2004); Silva SNet al. (2012).       |
| Caule           | Ulcerações aftosas e venéreas, estomatites, afecções de garganta, indigestão, diarreia, hemorragias, dispepsia, inflamações locais, queimaduras, e outros. Além disso, tem ação anti-hipoglicemiante, antimicrobiana, cardiotônica, antipirética e estimulante do SNC.                                                   | Chandrasekaran; Venkatesalu (2004); Migliato et al. (2006); Panchavarnakili et al. (2012); Schossler, et al., (2004) |
| Fruto           | Diabetes, irritações da garganta, indigestão, inflamação, febre, câncer, distúrbios gastrintestinais e possui propriedades carminativas, refrigerante e antioxidante.                                                                                                                                                    | Mohamed; Ali; El-baz, (2013); Chandrasekaran; Venkatesalu (2004); Migliato et al. (2006).                            |
| Sementes        | Tosse, febre, problemas dermatológicos, como rashes na boca, problemas de inflamação e infecção da garganta e intestino, além de tratar úlceras do trato geniturinário, causadas por <i>Candida albicans</i> . Além disso, diminui o nível de glicose no sangue.                                                         | Chandrasekaran; Venkatesalu, (2004); Elavarasi; Saravanan, (2012).                                                   |

Em relação à atividade antimicrobiana, *Syzygium cumini* se apresenta com bom potencial frente a uma variedade de microrganismos. Esse fato é mostrado em estudo desenvolvido por Nascimento, et al. (2000), em que dez plantas (*Achillea millifolium* L. (mil-folhas), *Caryophyllus aromaticus* L. (cravo), *Melissa officinalis* L. (erva-cidreira), *Ocimum basilicum* L. (manjerição), *Psidium guajava* L. (goiaba), *Punica granatum* L. (romã), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Salvia officinalis* L. (sálvia), *Syzygium cumini* L. Skeels (jambolão) e *Thymus*

*vulgaris* L. (tomilho) tiveram seus extratos de folhas e óleos essenciais testados frente a microrganismos sensíveis e resistentes em relação a antibióticos utilizados na clínica, tais como: ampicilina, norfloxacina, gentamicina, ceftriaxona, amoxicilina, entre outros. As cepas em estudo foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e oito cepas isoladas de ambiente hospitalar, como: *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Proteus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*. Comparando-se os resultados da atividade antimicrobiana das dez plantas envolvidas nesta pesquisa, constatou-se que os extratos hidroalcoólicos de cravo e de jambolão foram os mais eficazes. Cravo foi capaz de inibir 64,2% dos microrganismos testados e jambolão, atingindo 57,1%.

Michelin et al., (2005) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos secos do *Syzygium cumini* frente à cepas padrões de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27583), e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), à levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) e onze bactérias resistentes a antibióticos isoladas de ambiente hospitalar: *S. aureus* numeradas como 8, 36, 68, 115; *E. coli* 6.2 e 1.9c; *Proteus* sp 6.3; *P. aeruginosa* 6.4 e *Enterobacter* sp 1.17b. O extrato de *Syzygium cumini* apresentou uma atividade expressiva, inibindo 40% dos microrganismos estudados, sendo ressaltado o fato do *S. cumini* nas concentrações de 50 e 60mg/mL, respectivamente, inibiu tanto bactérias Gram positivas quanto Gram negativas.

Loguércio et al. (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de folhas de *S. cumini* frente a 17 isolados bacterianos, das seguintes espécies: *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium* spp., *Rhodococcus equi*, *Streptococcus canis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Staphylococcus choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus* spp., dentre eles, Gram positivos e Gram negativos. Constatou-se 100% de inibição do crescimento sobre as bactérias testadas e os isolados bacterianos. Para os Gram positivos foi observado um halo médio de 19,5 mm, enquanto que o dos Gram negativos foi de 18,8 mm. Assim, os autores chegaram à conclusão de que a atividade antimicrobiana do jambolão não apresentou diferença de sensibilidade entre microrganismos em relação aos Gram positivos e Gram negativos.

O óleo essencial de folhas desta planta também foi comprovado cientificamente por Shafi et al. (2002) como antibacteriano, especialmente contra

*Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, com halos de inibição de 20mm e 12mm, respectivamente por intermédio do método de disco-difusão.

Usando o método de discos e poços, Oliveira et al., (2007) analisou a atividade antifúngica de extratos hidroalcoólicos de folhas do jambolão sobre *Candida albicans*(ATCC 10231), nas concentrações de 100, 200 e 300mg/mL. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) variou de 70 a 200µg/mL, mostrando-se ativo. Assim como no estudo realizado por Michelin et al. (2005), utilizando a mesma técnica de determinação da CIM com extrato liofilizado. Os resultados foram satisfatórios para *Escherichia coli*(ATCC 25922), *Proteus spp.*(isolada clinicamente) e *Staphylococcus aureus*(ATCC 29213), com CIM variando de 120 a 180mg/mL.

As folhas de jambolão foram testadas por Oliveira et al. (2007) frente a duas leveduras (*Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida krusei* ATCC 6258) e sete bactérias (*Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 14948, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella flexneri* ATCC 12022 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e três cepasmultiresistentes isoladas de urocultura (*Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*) e hemocultura (*Staphylococcus aureus*). Constatou-se que o extrato foi ativo contra *Candida krusei* (halo de inibição de  $14,7 \pm 0,3$  mm e CIM = 70 µg/mL)e cepas multiresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

Estudos de atividade antimicrobiana com microrganismos que causam desordens na cavidade oral ainda são poucos na literatura. No entanto, alguns têm sido desenvolvidos frente a microrganismos que causam formação de biofilme dental tanto de *Candida* quanto de *Streptococcus spp.* (VIEIRA et al., 2012; MICHELIN et al., 2005; HÖFLING et al., 2010). Conforme pesquisa desenvolvida por Vieira et al. (2012), testaram extratos macerados hidroalcoólicos de folhas de *S. cumini* e diluições nas proporções de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8, por meio datécnica de difusão em ágar frente a *Streptococcus spp.* (ATCC 15300), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *S. oralis* (ATCC 10557), *S. parasanguis* (ATCC 903), *S. salivarius* (ATCC 7073), e *Lactobacillus casei* (ATCC 9595). Todas as linhagens se mostraram sensíveis aos extratos com halos de inibição que variavam de 7 a 19 mm. A cepa mais sensível foi o *S. parasanguis*, o qual mostrou um halo de 19 mm, seguido por *S. mutans*, *S. oralis* e *L. casei*. A Concentração Inibitória Mínima, foi de 242.5 mg.mL<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> para *Streptococcus spp.*, *S. parasanguis* e *S. salivarius*, já os microrganismos que apresentaram maior CIM foram *S. mutans*, *S. oralis* e *L. casei* (CIM = 485 mg.ml<sup>-1</sup>).

*Candida albicans* CBS-562, *C. dubliniensis* CBS-7987, *C. parapsilosis* CBS-604, *C. tropicalis* CBS-94, *C. guilliermondii* CBS-566, *C. utilis* CBS-5609, *C. krusei* CBS-573, *C. lusitaniae* B-06, *C. glabrata* B-07 e *C. rugosa* B-12 de interesse clínico foram testadas a fim de verificar a atividade antifúngica de extrato diclometânico de sementes de *S. cumini*. Os resultados foram satisfatórios com CIM variando entre 0.06 a 0.001 mg/mL indicando que novos agentes terapêuticos podem ser formulados para inibir o crescimento de *Candida* (HÖFLING et al., 2010).

## 2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO *SYZYGIUM CUMINI* (L.) SKEELS

O valor medicinal das plantas está fundamentado na presença de compostos químicos distribuídos em igual proporção ou não em todas as partes das plantas. Os mais importantes desses fitocompostos são alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas e compostos fenólicos (PANCHAVARNAKILI et al., 2012).

A composição química das folhas, frutos, sementes e cascas de caule têm sido referenciadas por diversos autores. Alguns utilizam técnicas qualitativas, que só indicam a presença de tais compostos, outros, técnicas quantitativas e outros trabalham com compostos isolados.

Por exemplo, em teste qualitativo para investigar composição química em extrato metanólico de caule de *S. cumini*, verificou-se a presença de flavonóides, fenóis, saponinas, taninos, esteróis, terpenóides em estudo realizado por Jayachandra; Devi (2012). Além disso, Migliato et al. (2006) citam a presença de ácido acetil oleanólico, triterpenóides, ácido elágico, isoquercetina, quercetina, canferol e miricetina.

As folhas são ricas especialmente em taninos e saponinas (LOGUÉRCIO et al., 2005). Migliato (2005); Swami et al., (2012) afirmam que as folhas contêm ácido gálico, metilgalato, canferol, miricetina, ácido elágico, ácido clorogênico, quercetina, nilocitina,  $\beta$ -sitosterol, ácido betulínico.

As sementes são compostas de taninos hidrolisáveis (ácido gálico, elágico, corilágico), quercetina, antimelina, óleo essencial ( $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, *cis*-ocimeno, *trans*-ocimeno,  $\gamma$ -terpineno, acetato de bornila,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$

-humuleno e candineno), materiais resinosos e glicose (MIGLIATO et al., 2007). Segundo Swami et al. (2012) os frutos são compostos de antocianinas, delfinidina, petunidina, diglucosídeos de malvidina.

## 2.4 ATIVIDADE ANTIHEMOLÍTICA

As plantas ou qualquer outra substância que apresente atividade hemolítica provoca ruptura das hemácias, liberando hemoglobina. Esta é capaz de causar danos ao fígado, rins e coração (BEDNARCZUK et al., 2010).

Bednarczuk et al. (2010) enfatizam a importância e citam três maneiras diferentes de se realizar esse teste, a saber: avaliação qualitativa por observação de coloração vermelha decorrente da liberação de hemoglobina, observação de formação de halos de hemólise em placas de ágar sangue e outra é a observação de absorvância em ultravioleta, recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Uma importante pesquisa foi realizada com extratos hidroalcoólicos a 70% liofilizados de folhas de *Syzygium gratum*, planta com mesmo gênero de jambolão teve sua toxicidade avaliada por meio de testes para avaliar a capacidade hemolítica. O extrato não se mostrou tóxico para células vermelhas do sangue humano (WORARATPHOKA; INTARAPICHET; INDRAPICHATE, 2012).

Desoti et al. (2011) testaram extratos metanólicos, hexânicos e de acetato de etila de seis espécies vegetais, para avaliar o poder citotóxico. O teste mostrou-se eficiente em relação à leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com os extratos brutos. O extrato mais hemolítico (75% de hemólise) foi o hexânico de *Psidium cattleianum* Sabine (vermelho) uma espécie da família Myrtaceae, conhecido popularmente como araçá, mostrando-se 75% de hemólise em todas as concentrações estudadas. Esta planta é da mesma família de *S. cumini* tem sua atividade antifúngica frente à *C. albicans* já elucidada há muito tempo conforme estudo de Limberger (1998).

O óleo essencial de folhas de *S. cumini* não se mostrou citotóxico, visto que o percentual de hemólise foi de apenas 11,3% na maior concentração testada (800 µg/mL) (RODRIGUES, 2013).

## 2.5 CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO

A qualidade de um fitoterápico é determinada pela qualidade da planta, do produto intermediário e pelas propriedades do produto final, tendo em consideração os requisitos de boas práticas na fabricação de produtos farmacêuticos de origem vegetal. O controle desses medicamentos emprega métodos farmacognósticos, controle físico-químico e monitoramento microbiológico (FONSECA; SILVA; LEAL, 2010).

Os produtos naturais destinados ao uso farmacêutico devem ser elaborados com segurança. Os extratos devem ser padronizados com constituintes químicos conhecidos tanto do ponto de vista qualitativo como quantitativo (ALEXANDRE; GARCIA; SIMÕES, 2005).

Migliato et al. (2007) fizeram um controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini*, envolvendo o controle microbiológico e o controle físico-químico, por meio de metodologias farmacopeicas e não farmacopeicas para se certificar que essa droga vegetal possa ser aplicada, com qualidade, para fins medicinais. Foi feita uma contagem de bactérias e fungos que poderiam estar presentes na droga vegetal. Os testes físico-químicos consistiram em: análise granulométrica; determinação da densidade bruta do pó do fruto; perda por secagem do fruto fresco; determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho do pó do fruto; determinação do pH; determinação do teor de cinzas e determinação do teor de extrativos.

O objetivo dos testes físico-químicos, segundo Migliato et al. (2007) é:

- a) Análise granulométrica: padronizar a granulometria da droga vegetal;
- b) Determinação da densidade bruta;
- c) pH: verificar a presença de substâncias ácidas que possam influenciar a estabilidade do farmacógeno;
- d) Perda por dessecação: fornecer informações em relação ao correto armazenamento e o controle de qualidade da droga vegetal, podendo acarretar na perda do material por contaminação microbiana ou degradação dos constituintes químicos;
- e) Teor de cinzas: verificar impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes;
- f) Teor de extrativos: avaliar o rendimento da extração com água;

- g) Análise térmica: TG é aplicada na caracterização, determinação de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de degradação. A DSC é utilizada na caracterização térmica e determinação da pureza de fármacos, estudos de compatibilidade entre os constituintes da formulação e identificação de polimorfismo com determinação das entalpias de cada forma cristalina (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011);
- h) Difração de raio X: técnica analítica empregada para caracterizar materiais, com foco da avaliação de polimorfismo (SILVA; IHA, 2010);
- i) Espectroscopia: avaliar a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus objetivos a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Além disso, pode-se obter informações sobre a estrutura molecular e as ligações químicas de determinado composto (GUIMARÃES, 2011).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Caracterizar a matéria prima vegetal obtida a partir do extrato de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel, bem como analisar o seu perfil fitoquímico, a sua citotoxicidade e a sua atividade antimicrobiana sobre microrganismos associados ao biofilme dental.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Realizar um estudo de caracterização físico-química na droga vegetal;
- Produzir extrato hidroalcoólico a 70%, de folhas de *Syzygium cumini* e submetê-lo a um processo de liofilização;
- Caracterizar o extrato liofilizado por análise térmica e por difração de raio x;
- Caracterizar o extrato liofilizado quimicamente por Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- Caracterizar as partículas do extrato por microscopia óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Determinar o perfil fitoquímico, por meio da quantificação de compostos ativos, tais como polifenóis, flavonoides, saponinas e taninos condensados no extrato liofilizado de *Syzygium cumini*;
- Realizar ensaio de citotoxicidade em suspensão de hemácias, sobre o extrato liofilizado;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato liofilizado em microrganismos associados ao biofilme dental.

## REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, nov. 2005.
- ALEXANDRE, R. F.; GARCIA, F. N.; SIMÕES, C. M. O. Fitoterapia baseada em evidências. Parte 1. Medicamentos fitoterápicos elaborados com Ginkgo, Hipérico, Kava e Valeriana. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, n.2, p. 9, 2005.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.
- ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 11, p. 1175-1186, 2010.
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1224-1229, 2008.
- ANDES, D.; NETT, J.; OSCHER, P.; ALBRECHT, R.; MARCHILLO, K.; PITULA, A. Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 6023-6031, 2004.
- ANTONISAMY, J. M.; EAHAMBAN, K. UV- VIS spectroscopic and HPLC studies on *Dictyota bartayresiana* Lamour. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, India, p. 514-518, aug. 2012.
- ARAÚJO, C. R. F. de; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. do S. V.; ALVES, P. M.; HIGINO, J. S.; MARTINS, A. B. Concentração mínima bactericida do extrato do cajueiro sobre bactérias do biofilme dental. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 9, n. 2, p.187-191, maio/ago. 2009.
- BARBOSA, J. A. A. Das sementes aos frutos: Indicações terapêuticas dos vegetais e suas partes em uma comunidade tradicional da Paraíba. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.5, n.1, 2011.
- BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, jul./dez. 2010.
- BONIFAIT, L.; MARQUIS, A.; GENOVESE, S., EPIFANO, F.; GRENIER, D. Synthesis and antimicrobial activity of geranyloxy- and farnesyloxy-acetophenone derivatives against oral pathogens. **Fitoterapia**, Canadá. v. 83, p. 996–999, 2012.

CAMPANA, E. H.; CARVALHAES, C. G.; BARBOSA, P. P.; MACHADO, A. M. de O.; PAULA, A. M. de; GALES, A. C. Avaliação das metodologias M.I.C.E.<sup>®</sup>, Etest<sup>®</sup> e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Médica Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.47, n. 2, abr. 2011.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326–342, jul. 2010.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

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

CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A2. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica**. 2.ed. Pennsylvania: NCCLS; 2002. 51p.

COSTA, A. C. B. P. da; PEREIRA, C. A.; FREIRE, F.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 2, 111-116, mar./abr. 2009.

COSTA, R. de O.; CATÃO, M. H. C. de V.; COSTA, I. R. R. dos S.; SILVA, A. D. L da; PIRES, E. G. Os benefícios do laser de baixa potência na oncologia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 11, n. 37, jul/set. 2013.

DESHPANDE, R. R.; KULKARNI, A. A.; JADHAV, M. V.; MAHAJAN, P. P.; GAIKWAD, S.; DESHPANDE, N. R. Comparative evaluation of antimicrobial activity of various extracts of *Cassia auriculata* in different concentration on human salivary microflora. **Journal of Pharmacy Research**, Índia, v. 4, n. 10, p. 3427-3428, oct. 2011.

DESOTI, V. C.; MALDANER, C. L.; CARLETTO, M. S.; HEINZ, A. A.; COELHO, M. S.; PIATI, D.; TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região Oeste do Estado do Paraná. **Arquivo de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 3-13, jan./abr. 2011.

ELANSARY, H. O.; SALEM, M. Z. M.; ASHMAWY, N. A.; YACOUT, M. M. Chemical Composition, Antibacterial and antioxidant activities of leaves essential oils from *Syzygium cumini* L., *Cupressus sempervirens* L. and *Lantana camara* L. from Egypt. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 10, aug. 2012.

ELAVARASI. S.; SARAVANAN. K. Ethnobotanical study of plants used to treat diabetes by tribal people of Kolli Hills, Namakkal District, Tamilnadu, Southern India. **International Journal of PharmTech Research**, v.4, n.1, p. 404-411, 2012.

ERDEM, A.E.; SEPET, E.; KULEKCI, G.; TROSOLA, S. C.; GUVEN, Y. Effects of two fluoride varnishes and one fluoride/chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* Biofilm Formation *in vitro*. **International Journal of Medical Science**, v.9, p. 129-136, 2012.

FILHO, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 229-239, 2010.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 109-118, 2011.

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

FONSECA, F. N.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K. A. M. *Justicia pectoralis* Jacq., Acanthaceae: Preparation and characterisation of the plant drug including chromatographic analysis by HPLC-PDA. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 6, p. 871-877, dez. 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.2, mar./abr. 2007.

GUIMARÃES, C. **Espectroscopia Raman e Infravermelho na molécula (4E)-4((E)-3-fenilalilidenomanino)-1,2-dihidro-2,3-dimetil-1-fenilpirazol-5-ona**. 2011. 123 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, Cuiabá, 2011.

HOERNER, W. S. Recursos biológicos amazônicos: Pesquisas e patentes sobre plantas medicinais da Amazônia. **Cadernos PROLAM/USP**, v. 1. p. 41- 61, 2009.

HÖFLING, J. F.; ANIBAL, P.C.; OBANDO-PEREDA, G. A.; PEIXOTO, I.A.T.; FURLETTI, V.F.; FOGLIO, M.A.; GONÇALVES, R.B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.70, n.4, nov. 2010.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n.7, p. 1027-1031, oct. 2002.

JAYACHANDRA, K. ; DEVI, V. S. *In vitro* antioxidant activity of methanolic extract of *Syzygium cumini* Linn. bark. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 12, p. 45-49, 2012.

JESUS, R. P. F. S. de; COSTA, M. R. M.; BASTOS, I. V.; COUTO, G. B. L.; PEREIRA, M. do S. V.; SOUZA, I. A. de. Ação antibacteriana e antiaderente de *Pithecellobium cochliocarpum* (gomez) Macbr sobre microrganismos orais. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, Recife, v.9, n.4, dez. 2010.

JUNAID, S.; DILEEP, N.; RAKESH, K.N., PRASHITH, K. T. R. Anticaries activity of selected plants against clinical isolates of *Streptococcus mutans*. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 105-106, 2013.

KHULLER, N. The biofilm concept and its role in prevention of periodontal disease. **Revista Clínica e Pesquisa em Odontologia**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 53-57, jan./abr. 2009.

LEITES, A. C. B. R.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R. de. Aspectos microbiológicos da cárie dental, **Salusvita**, Bauru, v. 25, n. 2, p. 135-148, jan. 2006.

LIMA, S. C. da S.; ARRUDA, G. O. de; RENOVATO, R. D.; ALVARENGA, M. R. M. Representations and uses of medicinal plants in elderly men. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v.20, n.4, july./aug. 2012.

LIMBERGER, R. P. **Estudo de óleos voláteis de espécies do gênero Mikania (Asteraceae) e da subtribo Myrtinae (Myrtaceae) de ocorrência no Rio Grande do Sul**. 1998. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

LOGUÉRCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* L. Skells, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, mar/abr. 2005.

MAEHLER, M.; DELIBERADOR, T. M.; SOARES, G. M. S. S.; GREIN, R. L.; NICOLAV, G. V. Doença periodontal e sua influência no controle metabólico do diabete. **Revista Sul Brasileira de Odontologia**, Joinville, v. 8, n. 2, jun. 2011.

MAGER, D. L.; XIMENEZ-FYVIE, L. A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, p. 644-654, 2003.

MARSH, P. D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 1, p. 11-15, jun. 2010.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.4, p. 316-320, out./dez. 2005.

MIGLIATO, K. F. ***Syzygium cumini* (L.) Skeels – Jabolão: Estudo farmacognóstico, otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade antisséptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato**. 2005. 181 f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

MIGLIATO, K. F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M. V. R.; CORRÊA, M. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, p.310-314, 2006.

MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1, p.94-101, 2007.

MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. **Plos One**. v. 8, apr. 2013.

MOREIRA, A.C. A.; PEREIRA, M. H.Q.; PORTO, M. R.; ROCHA, L. A. P. da; NASCIMENTO, B. C.; ANDRADE, P. M. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.8, n.2, p.153-161, mai./ago. 2009.

MOREIRA, M. J. S; FERREIRA, M. B. C.; HASHIZUM, L. N. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos componentes de um enxaguatório bucal contendo malva. **Revista Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v.12, n. 4, p.505-09, out./dez. 2012.

MURTI; K.; PALIWAL, D.; MADAN, S.; KUNDU, R.; KAUSHIK, M. Exploration of preliminary phytochemical studies of seed of *Syzygium cumini*. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 12-14, 2012.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, oct./dez. 2000.

NWODO, U. U.; OBIYEKE, G. E.; CHIGOR, V. N.; OKOH, A. I. Assessment of *Tamarindus indica* extracts for antibacterial activity. **International Journal of Molecular Sciences**, South Africa, v. 12, p. 6385-6396, sept. 2011.

OKADA, M.; HISAJIMA, T.; ISHIBASHI, H.; MIYASAKA, T.; ABE, S.; SATOH, T. Pathological analysis of the *Candida albicans*-infected tongue tissues of a murine oral candidiasis model in the early infection stage. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 4, p. 444-450, apr. 2013.

OLIVEIRA, G. F. de; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA FILHO, A. A.; MARTINS, C. H. G.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, jun. 2007.

OLIVEIRA, M. A. C. **Plantas medicinais utilizadas para problemas bucais: estudo etnobotânico em diferentes biomas da Paraíba**. João Pessoa. 2010. 111 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) -Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, PB, 2010.

OLIVEIRA, M. A. de; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. de L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p.1224-1230, 2011.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.18, n.2. apr./june. 2008.

OTHMAN, M.; LOH, H. S.; WIART, C.; KHOO, T. J.; LIM, K. H.; TING, K. N. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, Malaysia, v. 84, p. 161–166, nov. 2011.

PANCHAVARNAKILI, N.; SELVI, S. T.; PAVAI, D.; PANNEERSELVAM, A.; PRABAKARAN, M. Antimicrobial studies and phytochemical screening of stem bark in *Syzygium cumini* (L.) and *Lannea coromentalis* Houtt (Merr.), **Asian Journal of Plant Science and Research**, Estados Unidos, v. 2, n. 2, p. 89-94, 2012.

PEIXOTO, I. T. A.; SARDI, J. de C. O.; ANÍBAL, P. C.; GONÇALVES, R. B.; HÖFLING, J. F. Evidências científicas da colonização de *Candida* spp. em bolsas periodontais. **Revista da Faculdade de Odontologia – UPF**, Passo Fundo, v.15, n.2, mai./ag. 2010.

PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, M. C. C.; ALVES, P. M.; ARAÚJO, C. R. F. de; HIGINO, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p. 88-93, jan./mar. 2006.

PICCIANI, B. L.; MICHALSKI-SANTOS, B.; CARNEIRO, S.; SAMPAIO, A. L.; AVELLEIRA, J. C.; AZULAY, D. R.; PINTO, J. M.; DIAS, E. P. Oral candidiasis in patients with psoriasis: Correlation of oral examination and cytopathological evaluation with psoriasis disease severity and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 12, 2013.

POCHAPSKI, M. T. P. **Estudo dos efeitos da *Ipomoea batatas* (L.) Lam. na Resposta Inflamatória e no Biofilme Dental**. 2010. 100 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, SP, 2010.

PORTO, F. R. C. ; SILVA, J. C. Etnobotânica e uso medicinal da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.) pelos horticultores e consumidores da horta comunitária da Vila Poty, Teresina, Piauí, Brasil. **Revista da Faculdade de Santo Agostinho**. Teresina, n. 9, 2012.

PORTO, S. M. M. da S.; VIANA, M. T.; SILVA, K. M. F. da; DINIZ, M. de F. A.; CASTRO, C. M. M. B. de. Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n.6, nov./dez. 2007.

RAZAFINDRAIBE, M.; KUHLMAN, A. R.; RABARISON, H.; RAKOTOARIMANANA, V.; RAJERARISON, C.; RAKOTOARIVELO, N.; RANDRIANARIVONY, T.; RAKOTOARIVONY, F.; LUDOVIC, R.; RANDRIANASOLO, A.; BUSSMAN, R. W. Medicinal plants used by women from Agnalazaha littoral forest (Southeastern Madagascar), **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9. nov. 2013. 8 p.

RIBEIRO, L. U.; GONÇALVES, G. R.; BESSA, N. G. F. Plantas medicinais e conduta terapêutica de idosos atendidos em unidade básica de saúde do município de Gurupi – Tocantins. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 11, n. 37, jul./set. 2013.

RODRIGUES, K. A. DA F. R. **Determinação das atividades anti-leishmania, citotóxica e de parâmetros de ativação de macrófagos dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia uniflora* L. e *Syzygium cumini* (L.) Skeels**. 2013. 150 f. Dissertação de Mestrado (Ciências da Saúde) - Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, 2013.

ROSSI, T. de; LOZOVY, M. A. B.; SILVA, R. V. da; FERNANDES, E. V.; GERALDINO, T. H.; COSTA, I. C.; SARIDAKIS, H. O.; WATANABE, M. A. E.; FELIPE, I. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

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

SAMSON N.G. Managing patients with oral candidiasis. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 79, n.122, 2013.

SCHOSSLER, D. R. C.; MAZZANTI, C. M.; LUZ, S. C. A. da; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; SILVEIRA, A. F. da; CECIM, M. Alterações histológicas e imunoistoquímicas em pâncreas de ratos diabéticos tratados com *Syzygium Cumini*. **Ciência rural**, v.34, n.6, p. 18-23, 2004.

SERA, E. A. R.; OLIVEIRA, R. V. de; MARIOTTO, A. H.; AQUINO, D. R.; SCHERMA, A. P. Avaliação dos cuidados odontológicos pré e trans tratamento radioterápico. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v.23, n. 3, sept. 2013.

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

SILVA, E. C. da; PAOLA, M. V. R. V. de; MATOS, J. do R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, jul./set. 2007.

SILVA, G. da; IHA, K. Polimorfismo: caracterização e estudo das propriedades de uma fase cristalina. **Journal of Aerospace Technology and Management**, São José dos Campos, v. 2, n.3, p. 331-338, sept./dec. 2010.

SILVA, M. K. D. da; TEREZAN, M. L. F.; FISHER, R. G. Associação da Halitose com a Presença de *Helicobacter pylori* no Biofilme Dental Supragengival em Pacientes

com Doença Periodontal – Um Estudo Piloto. **Brazilian Society of Periodontology**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 63-68, mar. 2012.

SILVA, M. S. A.; SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. de A. T. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.236-240, abr./jun. 2008.

SILVA, M. S. P.; BRANDÃO, D. O.; CHAVES, T. P.; FILHO, A. L. N. F.; COSTA, E. M. M. de B.; SANTOS, V. L.; MEDEIROS, A. C. D. Study Bioprospecting of Medicinal Plant Extracts of the Semiarid Northeast: Contribution to the Control of Oral Microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, apr. 2012. 6 pgs.

SILVA, S.N.; ABREU, I. C.; SILVA, G. F. C.; RIBEIRO, R. M.; LOPES, A. de S.; CARTÁGENES, M. do S. de S.; FREIRE, S. M. de F.; BORGES, A. C. R.; BORGES, M. O. da R. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1. p. 102-108, jan./feb. 2012.

SÓLLIS H. E.; GORDILLO R; HERRERA R. Proteinase activity in *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of immunocompromised patients with oral candidiasis and in healthy subjects. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.3, p.23, 2013.

SWAMI, S. B.; THAKOR, N. S. J.; PATIL, M. M.; HALDANKAR, P. M. Jamun(*Syzygium cumini* (L.)): A Review of its food and medicinal uses. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 1100-1117, aug. 2012.

THEIN ZM, SAMARANAYAKE YH, SAMARAYAKE LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 51, p. 672-680, 2006.

THITHE, S. V.; CHAVAN, Y. R.; APARADH, V. T.; KORE, B. A. Preliminary phytochemical screening of some medicinal plants. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3, n. 1, p. 87-90, 2013.

TOLEDO, C. E de; BRITTA, E. A.; CEOLE, L. F.; SILVA, E. R.; MELLO, J. C. de; DIAS, B. P. F.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaa as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p 420–425, oct. 2011.

TORTORA, Gerard J., FUNKE, Berdell R., CASE, Christine L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, abr./jun. 2006.

VIEIRA, T. I.; GONDIM, B. L. C.; SANTIAGO, B. M.; VALENÇA, A. M. G. *In vitro* antibacterial and non-stick activity of extracts from leaves of *Psidium guineense* Sw.

and *Syzygium cumini* (L.) Skeels on oral microorganisms. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v.60, n.3, p. 359-365, jul./set. 2012.

VINAGRE, N. P. de L.; JÚNIOR, J. O. C. S.; CORRÊA, A. M.; VITAL, T. M.; REIS, C.; ZAPATA, M. T. A. G. CUNHA, L. C. da. Efetividade clínica de um enxaguatório bucal fitoterápico com tintura padronizada de *Calendula officinalis* na manutenção da saúde periodontal. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 40, n. 1, p. 30-35 jan./fev. 2011.

VITAL, T. M.; REIS, C.; ZAPATA, M. T. A. G.; CUNHA, L. C. da. Estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: Nistatina, Eritromicina, Neomicina e Gentamicina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, abr./jun. 2004.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts: Preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140–146, 2008.

WORARATPHOKA, J.; INTARAPICHET, K.; INDRAPICHATE, K. Antioxidant activity and cytotoxicity of six selected, regional, Thai vegetables, **American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences**, n. 4, v. 2, p. 108-117, 2012.

XU, L.; ZHANG, H.; LIU, J.; CHEN, X. Investigation of the oral infections and manifestations seen in patients with advanced cancer. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v.29, n.5, p.1112-1115, 2013.

## CAPÍTULO I

---

### **Caracterização de novas matérias-primas obtidas de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel (Myrtaceae)**

**Nathália Alexandra de Oliveira Cartaxo, Cleildo Pereira Santana, Thaíse Oliveira Sampaio, Myllena Alves Xavier, Ana Claudia Dantas de Medeiros, Harley da Silva Alves, Pedro Luis Rosalen, Jozinete Vieira Pereira.**

#### **RESUMO**

Extratos secos têm sido utilizados como produtos finais e intermediários na obtenção de diferentes formas farmacêuticas fitoterápicas. *Syzygium cumini* L. Skeels (jambolão) apresenta propriedade antimicrobiana, antihipoglicemiante e antioxidante e pode ser uma planta promissora para ser incorporada em uma formulação. Granulometria, densidade aparente, determinação do pH, resíduo seco e as técnicas analíticas, como as espectroscópicas, a difração de raios-X e a análise térmica, são exemplos de técnicas analíticas empregadas para caracterizar as matérias-primas de origem vegetal. Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar a granulometria, a densidade aparente, o pH, o teor de cinzas e o teor de água da droga vegetal *S. cumini* L., bem como caracterizar o extrato liofilizado desta planta por técnicas analíticas. Os resultados mostram que a droga vegetal apresentou-se como um pó grosso e os outros parâmetros avaliados estiveram dentro das faixas preconizadas pela Farmacopéia Brasileira. A difração de raio-X, a microscopia óptica e a microscopia eletrônica de varredura sugeriram que as partículas do extrato são amorfas e possuem formatos irregulares, de modo que são visualizados aglomerados de diferentes tamanhos e morfologias. A decomposição térmica dos componentes orgânicos na amostra se iniciou em uma etapa ocorrida entre 151,64 – 209,27°C, com perda de massa de 9,08%, seguida de outra etapa, cuja perda de massa foi mais significativa (28,16%). O espectro de infravermelho sugeriu diversos grupos funcionais dos compostos presentes no extrato liofilizado, em distintas bandas de absorção. Portanto, as metodologias empregadas foram adequadas para avaliar a autenticidade dessa espécie vegetal e podendo-se com isso, caracterizar o extrato de folhas de *S. cumini*.

**Palavras-chave:** Autenticidade da matéria-prima, Técnicas analíticas, *Syzygium cumini*.

## ABSTRACT

Dried plant extracts have been used as end products and intermediates in obtaining the different dosage forms. *Syzygium cumini* L. Skeels (jambolão) has antimicrobial, antioxidant and antihypoglycemic property and may be a promising plant to be incorporated into a formulation. Particle size distribution, bulk density, determination of pH, dry residue and analytical techniques such as spectroscopy, X-ray diffraction and thermal analysis are examples of analytical methods used for characterizing the raw materials of vegetable origin. Thus, the aim of this study was to determine the particle size, bulk density, pH, solubility, ash and moisture content of the plant drug *S. cumini* L. and characterize the lyophilized extract of this plant by analytical techniques. The results show that the plant drug was presented as a coarse powder and the other parameters evaluated were within the ranges recommended by the Brazilian Pharmacopoeia. The X-ray diffraction, optical microscopy and scanning electron microscopy suggest that the extract particles are amorphous and have irregular shapes, so that clusters of different sizes and morphologies are displayed. Thermal decomposition of organic components in the sample started in a step occurring between 151.64 to 209.27 ° C with mass loss of 9.08%, followed by a step whose weight loss was more significant (28.16%). The IR spectrum suggested various functional groups of compounds present in the lyophilized extract in different absorption bands. Thus, the methodologies employed were adequate to evaluate the authenticity of this plant species and with that we could characterize the leaf extract of *S. cumini*.

Keywords: Raw material Authenticity, analytical techniques, *Syzygium cumini*

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado como um dos países de maior diversidade biológica por abrigar 25% da flora mundial. As plantas têm sido utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos, matérias-primas farmacêuticas e medicamentos fitoterápicos. Estes se mostram como uma alternativa terapêutica interessante, pois os medicamentos industrializados apresentam diversas reações adversas já conhecidas. Quando se trata dos antimicrobianos, as plantas podem ser uma alternativa aos antibióticos sintéticos, os quais são mais onerosos e frequentemente os microrganismos têm desenvolvido mecanismos de resistência frente a esses fármacos (ALBUQUERQUE, 2010; CARTAXO; SOUZA; PANCHAVARNAKILI et al., 2012; SILVA et al., 2012).

*Syzygium cumini* (L.) Skeels, espécie da família Myrtaceae, conhecida popularmente por jambolão, proveniente da Índia, Tailândia, Filipinas e Madagascar é cultivada em alguns países, incluindo o Brasil, especialmente nas regiões Sudeste, Norte e Nordeste (MIGLIATO et al., 2006). É conhecida por suas propriedades antidiarreica, anti-inflamatória, antidiabética, antimicrobiana e antioxidante. É popularmente utilizada como bochechos para afecções bucais e para tratar constipação, leucorreia e febre (COSTA et al., 2009; ELANSARY et al., 2012).

As folhas são ricas especialmente em taninos e saponinas (LOGUÉRCIO et al., 2005). Migliato (2005); Swami et al. (2012) afirmam que as folhas contêm ácido gálico, metilgalato, canferol, miricetina, ácido elágico, ácido clorogênico, quercetina, nilocitina,  $\beta$ -sitosterol e ácido betulínico.

Extratos vegetais secos, obtidos por nebulização ou liofilização, têm sido utilizados como produtos finais e intermediários na obtenção de diferentes formas farmacêuticas, apresentando-se cerca de duas a seis vezes mais potentes do que as drogas que lhes deram origem (COSTA et al., 2009). Esse tipo de extrato, por ser na forma de pó, tem a vantagem de ter maior estabilidade física, química, microbiológica, melhor padronização e maior concentração de compostos fitoquímicos em relação ao extrato fluido (FERNANDES et al., 2013).

Na produção de um fitoterápico com qualidade e segurança é essencial executar um controle de qualidade da matéria prima vegetal, seguindo critérios farmacopéicos. Inclusive, a Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-

ANVISA/RDC nº 14 de 31 de Março de 2010 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (Brasil, 2010), exige a documentação de todas as ações direta ou indiretamente relacionadas à sua produção (BARNI; FILHO; COUTO, 2009).

Espectroscopia de infravermelho, difração de raios-X, análise térmica e microscopia eletrônica de varredura são exemplos de técnicas analíticas empregadas para caracterizar compostos provenientes de plantas medicinais além de seus produtos intermediários e extratos vegetais (FERNANDES et al., 2013).

Estudos de caracterização de extrato seco obtido a partir de plantas medicinais da folha de *Syzygium cumini* são escassos na literatura. Por isso, essa pesquisa se propõe a contribuir com a autenticidade da droga vegetal e do extrato liofilizado de *Syzygium cumini* (L.) Skeel, a partir do conhecimento das suas características físicas, químicas e de interesse ao desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 DROGA VEGETAL**

O material botânico utilizado na pesquisa foi folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels – Myrtaceae, as quais foram coletadas em Dezembro de 2012, na Chácara Flor do Campo, localizada na zona rural do Município de Campina Grande/PB. Em seguida, foi preparada uma exsicata que foi depositada, no Herbário Arruda Câmara, da Universidade Estadual da Paraíba (CG) sob número 084. O material vegetal foi seco/desidratado em uma estufa de secagem com circulação de ar (FANEM – Modelo 330/ 5), a temperatura de 45°C até a estabilização final do peso. As folhas foram processadas em moinho de facas (Solab Científica) de 10 mesh, para se obter uma granulometria padronizada, conforme preconiza a Farmacopéia V (2010). Foram obtidas 920 gramas do pó da planta.

## 2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

O extrato hidroalcoólico de *S. cumini* (L.) Skeels foi preparado pelo esgotamento da droga vegetal por meio do processo de percolação, por cinco dias; utilizou-se a proporção de 100g da droga vegetal moída para 1000 mL de solução etanólica a 70% (POLITI, et al., 2010). Essa etapa foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos da Universidade Estadual da Paraíba.

Em seguida, o extrato foi submetido ao processo de liofilização (LS 3000 Terroni®) no Laboratório de Multiusuário de Caracterização e Análises da Universidade Federal da Paraíba/UFPB. Os extratos hidroalcoólicos foram liofilizados a temperatura de 20 a 40°C em um liofilizador LS3000 Terroni.

Para prever o rendimento do processo de liofilização, determinou-se o resíduo seco.

## 2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL

Os ensaios foram realizados de acordo com o preconizado pela Farmacopeia Brasileira (1988; 2010), no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos da Universidade Estadual da Paraíba.

### 2.3.1 Granulometria

Vinte e cinco gramas das folhas foram moídas e submetidas à passagem forçada por vibração, através de tamises, com abertura de malhas correspondentes a 710, 355, 180, 150, 75 e 38 µm, os quais foram previamente pesados. Utilizou-se um tamisador (Bertel®) com rotação de 2500 rpms, durante 15 minutos. Após este processo, as frações foram retiradas dos tamises e do coletor e quantificadas quanto às suas proporções.

### 2.3.2 Determinação da densidade aparente não compactada

Uma proveta de 250 mL foi previamente pesada e, posteriormente, preenchida com a droga vegetal. A densidade aparente foi determinada com os dados de volume e massa, de acordo com os seguintes cálculos:

$$Dap = Mpc - Mpv / Vp$$

Em que: Dap=densidade aparente; Mpv = massa da proveta vazia; Mpc = massa da proveta cheia; Vp = volume da proveta.

### 2.3.3 Determinação do pH

Foi preparada uma solução a 1% (p/V) por infusão com a droga vegetal por 15 minutos. Após este tempo, a mistura foi filtrada e arrefecida, procedendo-se à leitura em pHgâmetro (Hanna instruments®). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados equivalem à média dessas medições.

### 2.3.4 Determinação do teor de cinzas totais

Cadinhos de porcelana foram previamente calcinados em mufla a 550°C por 30 minutos, resfriados em dessecador (15 minutos) e suas massas (taras) foram determinados em balança analítica. Em cada cadinho foram adicionados cerca de 3,0 g da droga vegetal triturada, pesados em balança analítica, os quais foram incinerados (levados ao estado de carvão) e, posteriormente, submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 550°C por seis horas.

Foram deixados em dessecador para arrefecimento (15 minutos), com pesagem realizada posteriormente. A técnica foi repetida até massa constante. O resultado foi expresso em porcentagem em massa de cinza na droga (% m/m) e representa a média de três determinações.

### 2.3.5 Determinação do teor de água

Essa análise foi realizada através da técnica de perda por dessecação. Foram pesados 2g da droga e colocados em “pesa-filtros” previamente tarados. Em seguida, foram levados até estufa (Quimis® modelo 03/7M-32) a 105°C por duas horas. Após esse tempo, os “pesa-filtros” foram mantidos para arrefecimento em dessecador por mais 30 minutos, e, posteriormente, pesados. Depois dessa

pesagem, os “pesa-filtros” foram colocados normalmente em estufa, repetindo o procedimento, até obtenção de massa constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de três determinações.

## **2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE RESÍDUO SECO DO EXTRATO ETANÓLICO 70%**

Transferiu-se 2 mL de extrato líquido para placas de Petri, as quais foram evaporadas em banho-maria. Os resíduos foram colocados em estufa (03/7M-32 Quimis®) a 105°C, por quatro horas, resfriados em dessecador e pesados. Esta análise foi realizada em triplicata e o teor de resíduo seco calculado, em porcentagem, pela razão entre a massa de resíduo depositada no cadinho e a massa inicial de extrato, correspondente à alíquota de 2 mL (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

## **2.5 CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DO EXTRATO LIOFILIZADO**

### **2.5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS PARTÍCULAS**

As análises microscópicas foram realizadas no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais da Universidade Estadual da Paraíba CERTBIO/UEPB.

#### **2.5.1.1 Microscopia óptica**

Foi utilizado um videomicroscópio Hirox®, modelo KH-7700, nos aumentos de 140, 280, 420, 560 e 1400x.

#### **2.5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Foi utilizado um microscópio Hitachi® TM 1000 para a visualização das partículas do extrato, a fim de verificar a morfologia das partículas. As amostras foram visualizadas nos aumentos de 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000 e 10000x.

### 2.5.2 ANÁLISE TÉRMICA

As análises foram realizadas no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais da Universidade Estadual da Paraíba (CERTBIO/UEPB).

A DSC foi realizada em um equipamento DSC, modelo Q20, marca TA Instruments, utilizando-se amostra de 2,0 mg acondicionadas em panelas herméticas com furo na tampa. Foi analisado em atmosfera de nitrogênio ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ), na faixa de temperatura de 25 a  $400^{\circ}\text{C}$ , com razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . As curvas foram plotadas utilizando o software Universal Analysis 2000.

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um analisador simultâneo SDT Q600 (TA Instruments), também em atmosfera de nitrogênio ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ), na faixa de temperatura de 25 a  $900^{\circ}\text{C}$ , com razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . As curvas foram plotadas utilizando o software Universal Analysis 2000.

### 2.5.3 DIFRAÇÃO DE RAIO-X

A análise de difração de raios-X foi realizada no CERTBIO/UEPB. Utilizou-se um difratômetro modelo XRD-600 da Shimadzu®. O ângulo de varredura ( $2\theta$ ) foi de  $2^{\circ}$  a  $70^{\circ}$ , com uma razão de  $2^{\circ}/\text{min}$  e sistema de Cu ( $K\alpha 1$ ). O equipamento foi operado em voltagem de 40,00 kV e corrente de 30 mA. Os dados foram analisados utilizando o software Origin® versão 8.0.

### 2.5.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO, COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A Espectroscopia na região do infravermelho foi realizada no Centro de Biotecnologia (CBIOTEC/UFPB).

O extrato liofilizado das folhas foi submetido à análise por FTIR. As análises foram realizadas em um aparelho Perkin-Elmer® modelo 1600, utilizando discos KBr,

no intervalo de 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ . As curvas foram plotadas, utilizando o software Perkin Elmer UV WinLab.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL

A Farmacopeia Brasileira (2010) preconiza uma classificação para a dimensão das partículas do pó da droga vegetal, em grosso, moderadamente grosso, semifino, fino e finíssimo. É considerado pó grosso, quando no máximo 40% da amostra passa pelo tamis com abertura nominal de 355  $\mu\text{m}$  e moderadamente grosso quando as partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 710  $\mu\text{m}$ . Sendo assim, não houve passagem total das partículas na malha de 710  $\mu\text{m}$ , e sim uma retenção de 22,85%, não podendo ser classificado como moderadamente grosso (tabela 1). De acordo com os resultados apresentados, o pó das folhas de *S. cumini* comporta-se como grosso, pois houve retenção do pó de um pouco mais que 40% na malha de 355 mm.

**Tabela 1.** Análise granulométrica do pó das folhas de *S. cumini*.

| TAMANHO DA MALHA ( $\mu\text{m}$ ) | AMOSTRA  |                |
|------------------------------------|----------|----------------|
|                                    | Peso (g) | % do pó retido |
| 710                                | 5,569    | 22,85          |
| 355                                | 10,353   | 42,49          |
| 180                                | 3,507    | 14,40          |
| 150                                | 0,315    | 1,30           |
| 75                                 | 2,562    | 10,51          |
| 38                                 | 1,593    | 6,54           |
| Coletor                            | 0,468    | 1,92           |

Nesse estudo, o diâmetro médio foi de 0,3545 mm, estando dentro da faixa aceitável para uma boa extração. Quando o diâmetro médio de uma partícula é muito pequeno, ou seja, inferior a 0,2 mm, a filtração pode ficar prejudicada e, conseqüentemente, a concentração das substâncias ativas. Quando é grande, acima de 0,8 mm, pode impedir a penetração do líquido extrator a todas as partículas, produzindo resposta direta na eficiência da extração. O tamanho da partícula influencia diretamente na velocidade de dissolução, suspensibilidade e uniformidade na distribuição para que o extrato tenha a eficácia esperada (ALBERTON et al., 2001; AULTON, 2005).

**Tabela 2.** Caracterização físico-química do pó da folha de *S. cumini*.

| PARÂMETROS                               | VALORES OBTIDOS | ESPECIFICAÇÕES |
|------------------------------------------|-----------------|----------------|
| Densidade aparente não compactada (g/mL) | 0,500 ± 0,005   | -              |
| pH                                       | 5,30 ± 0,023    | -              |
| Teor de Cinzas Totais (%)                | 6,142 ± 0,233   | No máximo 14%  |
| Perda por dessecação                     | 8,406 ± 0,332   | 8-14%          |

A análise dos resultados com a droga vegetal estudada indicou a presença de substâncias ácidas, pois o valor encontrado de pH foi de 5,30 (tabela 2). Outro estudo (Migliato et al., 2007), sendo que realizado com o fruto de *S. cumini*, o pH encontrado nessa análise foi 4,09, revelando um pouco mais de acidez do que no atual trabalho, o qual foi realizado com folhas. Efeito semelhante ocorreu com a densidade aparente, em que, comparando-se a outra pesquisa (Migliato et al., 2007) realizada com frutos de *S. cumini*, os resultados foram bem próximos, ou seja, folhas apresentaram uma densidade aparente de 0,50g/mL (tabela 2) e frutos 0,86g/mL.

Os resultados para teor de cinzas (tabela 2) indicam que a presença de materiais inorgânicos em folhas de *S. cumini*, apresentou-se dentro da faixa preconizada pela Farmacopéia Brasileira (2010), ou seja, abaixo de 14%.

O teor de água presente na droga vegetal mostra que os valores obtidos na análise das folhas secas de *S. cumini* estão dentro dos limites estabelecidos (8-14%)

pela Farmacopeia Brasileira (2010) (tabela 2). Estudo semelhante, diferindo apenas na parte da planta estudada, ou seja, foi realizado com os frutos de *S. cumini*, os quais apresentaram o valor de perda por dessecação em torno de 20%, mostrando-se fora dos limites preconizados pela Farmacopeia (ALBERTON et al., 2001). Assim, pode-se considerar estabilidade microbiológica e química por conter baixo teor de água, dificultando o desenvolvimento de fungos e bactérias, hidrólise e atividade enzimática com consequente deterioração de constituintes químicos (MARQUES et al., 2012).

### 3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE RESÍDUO SECO DO EXTRATO ETANÓLICO 70%

Para 2 mL, o peso foi de 0,016 g e o rendimento cerca de 1,08% (tabela 3). Foi calculada a quantidade do resíduo para o processo de liofilização de 500mL do extrato etanólico 70%, o que rendeu uma massa de 4.066 gramas. Constatou-se que o rendimento desse extrato vegetal pode ser considerado baixo, pois é necessária grande quantidade de extrato hidroalcoólico para se obter o extrato liofilizado em massa.

**Tabela 3.** Determinação do resíduo seco.

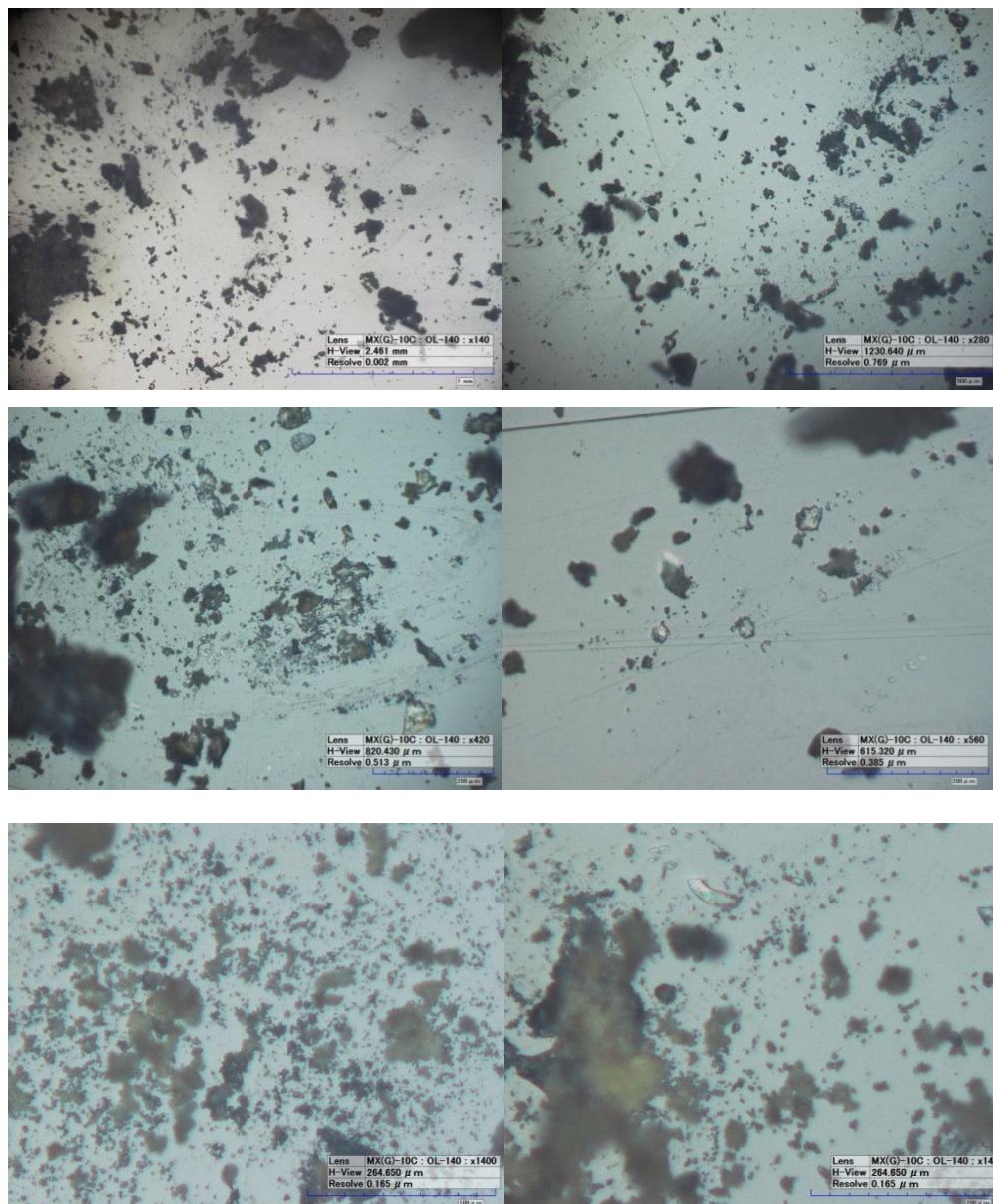
| PESO SECO           | RENDIMENTO          |
|---------------------|---------------------|
| 0,016 g $\pm$ 0,001 | 1,083 % $\pm$ 0,006 |

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DO EXTRATO LIOFILIZADO

#### 3.3.1 Microscopia óptica

Foram verificadas a forma de distribuição das partículas do extrato liofilizado de *S. cumini* e sua morfologia por meio de microscopia óptica, com vídeo microscópio, em várias dimensões.

Observou-se que as partículas são amorfas (figura 1), com ausência na padronização nas suas dimensões, apresentando vários tamanhos e formatos.

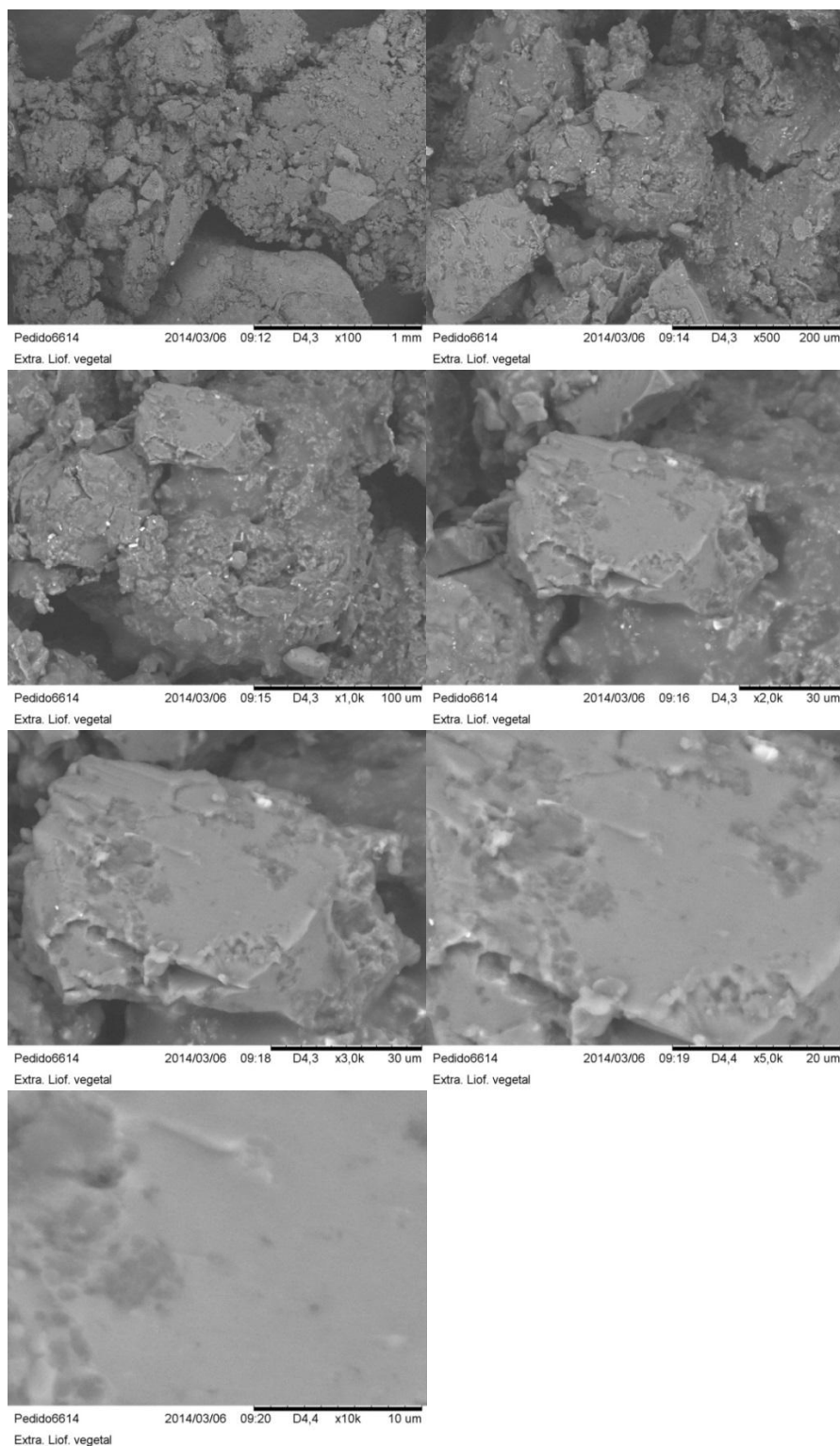


**Figura 1.** Microscopia óptica nos aumentos de 140, 280, 420, 560 e 1400x.

### 3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Observou-se na Microscopia Eletrônica de Varredura (figura 2) que as partículas apresentaram formatos irregulares, mostrando-se como aglomerados de partículas de diferentes tamanhos e morfologia, o que confirma os resultados da microscopia óptica (figura 1). Um extrato seco deve apresentar tamanho das

partículas uniformes, de forma que promova um bom fluxo de pós e boa densidade (CHAVES; DA COSTA; FREITAS, 2009).



**Figura 2.** Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura nos aumentos de 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000 e 10000x.

O extrato de *S. cumini*, entretanto, mostrou uma tendência a formar aglomerados (figura 2), sendo esse um fator que indica uma propriedade deficiente de fluxo de pó, além de provavelmente influenciar suas características de densidade e higroscopicidade. Para a incorporação do extrato de *S. cumini* em formas farmacêuticas, será imprescindível o uso de adjuvantes apropriados para a melhoria dessas características tecnológicas.

Estudo com extrato seco de *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada), teve um baixo valor de higroscopicidade ( $4,69 \pm 2,04$  and  $11,53 \pm 1,45$  g) devido à alta concentração de excipiente farmacêutico utilizado no processo de secagem. Seu uso favoreceu o ângulo de repouso, índice de Carr, teor de água e higroscopicidade simultaneamente (GALLO et al. 2011).

### 3.3.3 Análise térmica

Na curva de DSC, entre as temperaturas de 59,46 e 80,78°C (tabela 5) pode-se considerar que houve um evento endotérmico (14,79 J/g). Esse evento foi atribuído à perda de alguns produtos voláteis da amostra, como solvente residual. No intervalo de temperatura entre 114,82-150,69°C houve o maior pico endotérmico da DSC, com energia de 61,76 J/g. Em uma pesquisa realizada por Fernandes et al. (2013) os extratos secos de *Schinopsis brasiliensis* e *Ximenia americana* foram avaliados quanto ao comportamento térmico por DSC. Percebeu-se que a faixa de temperatura em que ocorreram os primeiros e mais importantes eventos de DSC na atual pesquisa foi semelhante à faixa apresentada por Fernandes et al., (2013), entre 39,17°C e 126,14°C. Tal fenômeno, provavelmente está associado à natureza do tipo de extrato vegetal estudado, ou seja, extrato seco. Na faixa de temperatura entre 213,10°C e 285,03°C houve um evento endotérmico sutil.

Ocorreram cinco eventos de decomposição térmica (tabela 4) através da Termogravimetria (figura 3A). Evidenciou-se uma perda de massa que se iniciou a 59,07°C e terminou em 114,77°C, revelando uma alteração de 3,28% na massa do material. Na faixa de 114,77-151,64°C a perda de massa foi um pouco maior, 3,58%.

**Tabela 4.** Resultados da curva de TG do extrato liofilizado de folhas de *S. cumini*.

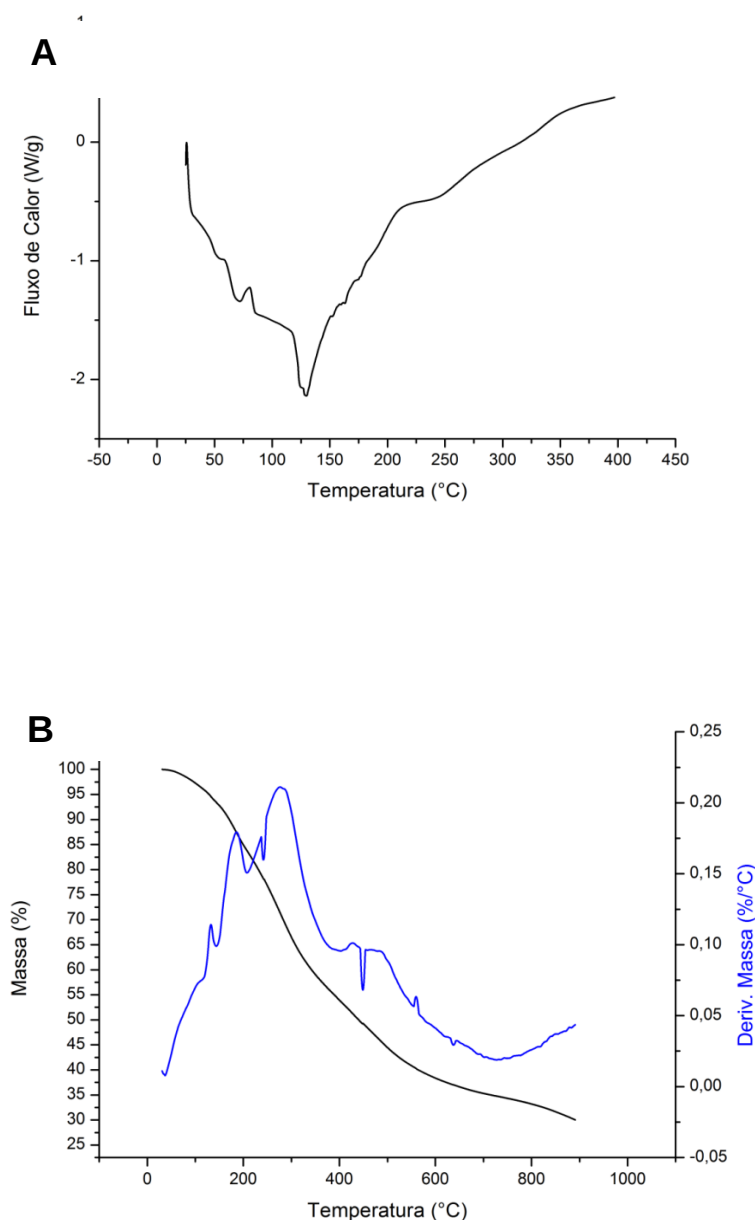
| ETAPAS DE DECOMPOSIÇÃO | INTERVALO °C    | PERDA DE MASSA (%) |
|------------------------|-----------------|--------------------|
| Primeira               | 59,07 – 114,77  | 3,28               |
| Segunda                | 114,77 – 151,64 | 3,58               |
| Terceira               | 151,64 – 209,27 | 9,08               |
| Quarta                 | 209,27 – 385,15 | 28,16              |
| Quinta                 | 385,15 - 692,37 | 19,89              |

Nota: TG = termogravimetria

**Tabela 5.** Eventos térmicos apresentados na curva de DSC do extrato liofilizado de folhas de *S. cumini*.

| EVENTO   | INTERVALO (°C)  | TEMPERAT. DO PICO (°C) | CALOR ENVOLVIDO (J/g) |
|----------|-----------------|------------------------|-----------------------|
| Primeiro | 59,46 – 80,78   | 67,47                  | 14,79                 |
| Segundo  | 114,82 – 150,69 | 129,90                 | 61,76                 |

Nota: DSC = Calorimetria Diferencial de Varredura



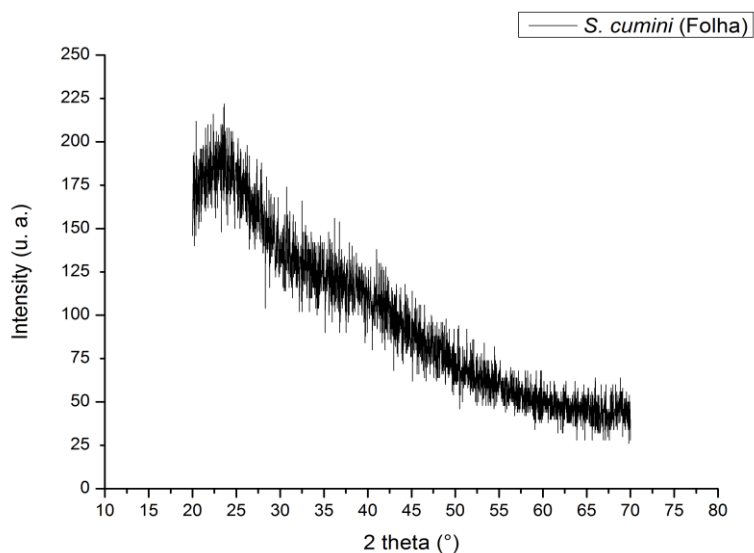
**Figura 3.** Curvas de DSC (A) e TG (B) do extrato liofilizado de *S. cumini*.

A decomposição dos componentes orgânicos na amostra se iniciou em uma etapa ocorrida entre 151,64 – 209,27°C, com perda de massa de 9,08%, seguida de outra etapa cuja perda de massa foi mais significativa (28,16%). Estudo com extrato liofilizado (Costa et al., 2013) de *Heliotropium indicum* L. mostrou que a decomposição se iniciou a temperatura de 155,00°C e a perda de massa foi de 24,00%, o que se assemelhou bastante ao atual estudo, devendo ser provavelmente característica desse tipo de secagem de extratos vegetais. Foi possível ainda

verificar uma etapa de decomposição entre as temperaturas de 385,15 - 692,37°C, com perda de massa de 19,89%. As etapas de degradação térmica que ocorrem em diferentes temperaturas são devido ao fato de amostras de drogas vegetais serem misturas multicomponentes de compostos orgânicos e inorgânicos, e suas curvas de decomposição térmica estarem envolvidas com fenômenos físico-químicos que ocorrem quando a mesma é aquecida. Além disso, há influência da forma e imperfeições das partículas e perda de produtos gasosos (WESOŁOWSKI; KONIECZYNSKI, 2003; FERNANDES et al., 2013; COSTA et al., 2013). Ao final da curva TG, obteve-se um resíduo de 30,02%. Não foi possível determinar o teor de cinzas da amostra, uma vez que ao final da faixa de análise, a amostra ainda não havia finalizado todos os seus processos de degradação.

#### 3.3.4 Difração de raios-X

De acordo com o difratograma (figura 4), o extrato mostrou alto grau de amorfização entre os ângulos 20 e 30°, não sendo observados picos de cristalinidade.



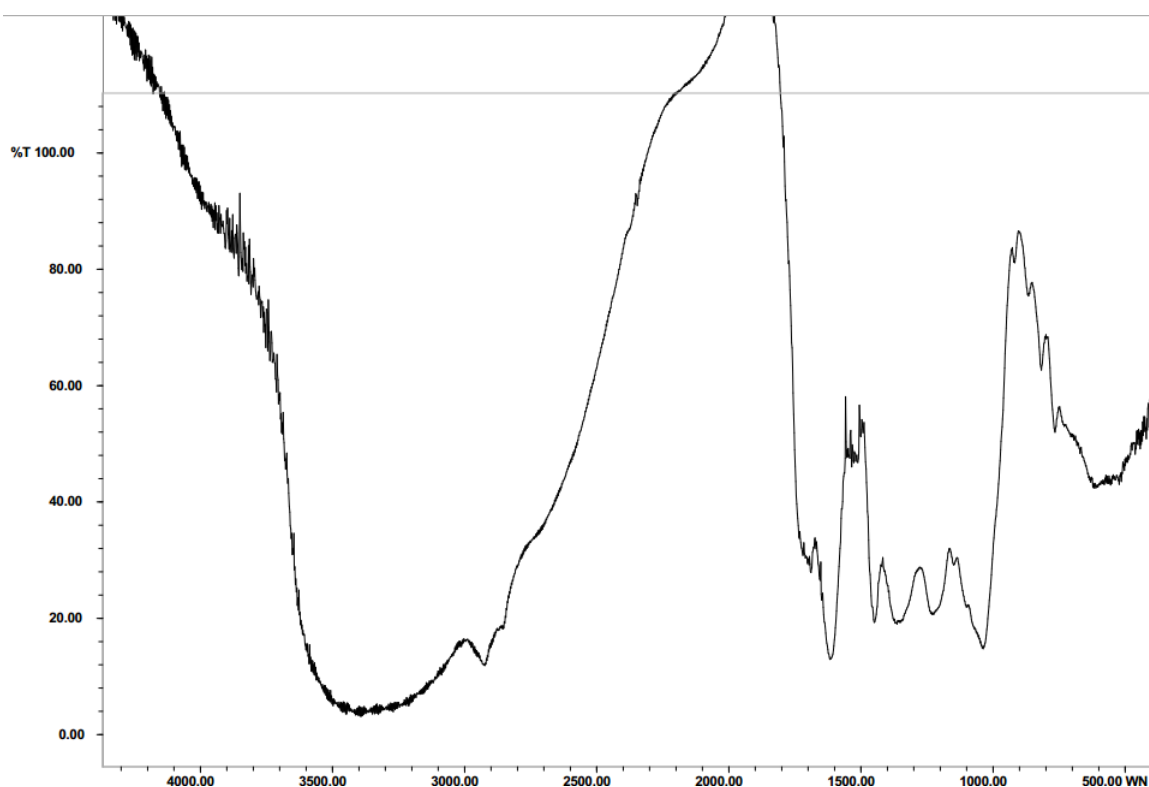
**Figura 4.** Difratograma do extrato liofilizado de *S. cumini*.

A presença de um ruído de diferentes intensidades pode ser explicada pelo fato de o extrato consistir em uma matriz complexa de substâncias não identificadas,

o que dificulta a formação de arranjos cristalinos durante o processo de secagem. Esse efeito pode ser observado também no estudo com extrato seco de *Schinopsis brasiliensis* Engl., com ângulos entre 10 e 30° ( FERNANDES et al., 2013).

### 3.3.5 Espectroscopia na região do infravermelho, com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro na região do IV para o extrato de folhas de *S. cumini* apresentou fortes absorções na região de  $3357\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramento axial de O-H, como é mostrado na figura 5. Bandas de absorção na região de  $2931\text{ cm}^{-1}$  foram visíveis, típicas de vibração de estiramento C-H (alcano), sendo atribuídas à natureza de compostos orgânicos no extrato. A presença de carbonos do tipo  $\text{sp}^3$  em grupamento metil, é demonstrada nas bandas de  $1363$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ . Os picos de média intensidade observados na região  $1041$  e  $1232\text{ cm}^{-1}$  estão relacionados com ligações carbono-oxigênio (CO) característicos de grupos funcionais como éter, ésteres e ácidos carboxílicos, os quais são indicativos de uma ampla variedade de metabólitos, tais como taninos, flavonóides e antraquinonas, entre outros (FERNANDES et al., 2013). Tal efeito também é mostrado em uma banda de absorção de média intensidade em  $1703\text{ cm}^{-1}$ , sugestiva de grupo carbonílico. A banda de absorção em  $1618\text{ cm}^{-1}$  é indicativa de ligação C=C. A absorção em  $604\text{ cm}^{-1}$  sugere a presença de CH aromático (FERNANDES et al., 2013).



**Figura 5.** Espectro de infravermelho do extrato liofilizado de *S. cumini*.

Um grupo de pesquisadores (KUMAR; YADAV; YADAV, 2010), realizou um estudo semelhante a este, de caracterização espectroscópica na região de infravermelho do extrato de folhas de *S. cumini*. Comparando-se os dois espectros, percebeu-se que as bandas de absorção entre eles foram muito parecidas, ratificando a presença dos grupos funcionais encontrados no atual estudo.

## 4 CONCLUSÃO

Amostras da planta medicinal *Syzygium cumini* L. Skeel, tanto a droga vegetal quanto o extrato liofilizado, foram caracterizadas, através de técnicas analíticas. As metodologias empregadas foram adequadas para avaliar a qualidade dessa espécie vegetal que, no geral, mostraram resultados satisfatórios.

Embora tenha demonstrado diferentes tamanhos de partículas, confirmado na Microscopia Eletrônica de Varredura que influencia as propriedades de fluxo, as partículas mostraram-se amorfas, típicas de extratos vegetais.

Neste caso, entretanto, será necessário o uso de adjuvantes apropriados para a melhoria dessas características tecnológicas.

O perfil térmico e o espectroscópico na região do IV traçados para a matéria-prima vegetal foram relevantes para a caracterização de *S. cumini*.

Diante do exposto, importantes informações podem ser sugeridas em caso de futuros estudos com essa planta medicinal, servindo também de base para o desenvolvimento de formas farmacêuticas com extrato seco de *S. cumini*.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTON, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L. V. S.; FRANCO, S. L.; LIMA, M. A. P. Caracterização farmacognóstica do Jambolão (*Syzygium cumini* L. Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 1. p.37-50. 2001.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677p.
- BARNI, S. T.; FILHO VC; COUTO AG. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 4, oct./dez. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 14 de 31 de março de 2010. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. *D.O.U.*, 5. abr. 2010.
- CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326–342, jul. 2010.
- CHAVES, J.S.; COSTA, F. B. da; FREITAS, L. A. P. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 573–584, 2009.
- COSTA, A. C. B. P. da; PEREIRA, C. A.; FREIRE, F.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 2, 111-116, mar./abr. 2009.
- COSTA, R.S. da; OZELA, E.F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L.; JÚNIOR, J.O.C. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.90, n. 3, p. 169-174, 2009.
- COSTA, R.S.; NEGRÃO, C.A.B.; CAMELO, S.R. P.; COSTA, R. M. R.; BARBOSA, W.L. R.B.; COSTA, C. E. F.; SILVA-JÚNIOR, J. O. C. Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**, v. 111, p.1959–1964, 2013.
- ELANSARY, H. O.; SALEM, M. Z. M.; ASHMAWY, N. A.; YACOUT, M. M. Chemical Composition, Antibacterial and antioxidant activities of leaves essential oils from *Syzygium cumini* L., *Cupressus sempervirens* L. and *Lantana camara* L. from Egypt. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 10, aug. 2012.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA**. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1988.

**FARMACOPEIA BRASILEIRA.** 5 ed. v. 1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FERNANDES FHA, SANTANA CP, SANTOS LS, CORREIA LP, CONCEIÇÃO MM, MACÊDO RU, MEDEIROS, ACD. Characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. **113**, p. 443–447, 2013.

GALLO, L.; LLBOT, J. M.; ALLEMANDI, D. ; BUCALÁ, V.; PINA, J. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. **Powder Technology**, v. 208, p. 205-214, 2011.

KUMAR, V.; YADAV, S. C.; YADAV, S. K. *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 1301-1309, 2010.

LOGUÉRCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* L. Skeels). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, mar./abr. 2005.

MARQUES, G. S. M.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L.; NETO, P. J. R. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 57-62, 2012.

MIGLIATO, K. F. ***Syzygium cumini* (L.) Skeels – Jambolão: Estudo farmacognóstico, otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade antisséptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato.** 2005. 181 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

MIGLIATO, K. F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M. V. R.; CORRÊA, M. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, p.310-314, 2006.

MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1, p.94-101, 2007.

PANCHAVARNAKILI, N.; SELVI, S. T.; PAVAI, D.; PANNEERSELVAM, A.; PRABAKARAN, M. Antimicrobial studies and phytochemical screening of stem bark in *Syzygium cumini* (L.) and *Lannea coromentalica* Houtt (Merr.). **Asian Journal of Plant Science and Research**, Estados Unidos, v. 2, n. 2, p. 89-94, 2012.

POLITI, F. A. S.; MOREIRA, R. R. D.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. Testes preliminares de motilidade intestinal e toxicidade oral aguda com extrato de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) em

camundongos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 187-189, 2010.

SILVA, M. S. P.; BRANDÃO, D. O.; CHAVES, T. P.; FILHO, A. L. N. F.; COSTA, E. M. M. de B.; SANTOS, V. L.; MEDEIROS, A. C. D. Study Bioprospecting of Medicinal Plant Extracts of the Semiarid Northeast: Contribution to the Control of Oral Microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, apr. 2012. 6 pgs.

SWAMI, S. B.; THAKOR, N. S. J.; PATIL, M. M.; HALDANKAR, P. M. Jamun(*Syzygium cumini* (L.): A Review of its food and medicinal uses.**Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 1100-1117, aug. 2012.

WESOŁOWSKI, M.; KONIECZYNSKI, P. Thermoanalytical, chemical and principal component analysis of plant drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 262, p. 29-27, 2003.

## CAPÍTULO II

---

### **Determinação da atividade biológica e do perfil fitoquímico de extrato de *Syzygium cumini*(L.) Skeel sobre microrganismos associados ao biofilme dental**

**Nathália Alexandra de Oliveira Cartaxo, Thaíse Oliveira Sampaio, Myllena Alves Xavier, Ana Claudia Dantas de Medeiros, Harley da Silva Alves, Jozinete Vieira Pereira.**

#### **RESUMO**

*Syzygium cumini* (L.)Skeel é utilizada na medicina popular para tratar afecções na cavidade oral. Estudos demonstram atividade antimicrobiana sobre *Candida albicans* e *Streptococcus parasanguis*, *S. mutans* e *S. oralis*, cepas envolvidas na formação do biofilme dental. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi determinar atividade antimicrobiana de extrato de *Syzygium cumini*(L.) Skeel sobre microrganismos associados ao biofilme dental, assim como o seu perfil fitoquímico e a citotoxicidade. A atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo. Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato liofilizado de folhas frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus parasanguis* (ATCC 903), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073) e *Candida albicans* (ATCC 10231). A análise fitoquímica foi realizada por espectroscopia na região visível e quantificou-se polifenóis, flavonoides, taninos condensados e saponinas totais. A citotoxicidade foi realizada pelo método de hemólise. *Syzygium cumini* obteve moderada atividade antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*, com CIM de 1mg/mL. Para *Streptococcus parasanguis* e *Streptococcus salivarius* o extrato mostrou-se inativo. O extrato apresentou grande potencial antifúngico sobre *C. albicans*, com CIM e CFM de 62,5 µg/mL, demonstrando forte atividade fungistática e fungicida. A quantificação de metabólitos secundários obteve resultados satisfatórios, especialmente com altas concentrações de saponinas e polifenóis totais. O extrato apresentou baixa citotoxicidade, nas concentrações que exerceu atividade antimicrobiana não chegando a ser a concentração citotóxica efetiva 50% (EC50). Pode-se concluir que o extrato de *S. cumini*, apresentou atividade antimicrobiana frente a *S. mutans* e *S. oralis*, demonstrando bom potencial antimicrobiano para *C. albicans*, sugerindo-se sua utilização com segurança e eficácia na prevenção e tratamento de doenças decorrentes do biofilme dental.

**Palavras-chave:** Fitoterapia, *Syzygium cumini*, *Streptococcus*, *Candida albicans*, Hemólise

## ABSTRACT

*Syzygium cumini* (L.) Skeels is used in popular medicine to treat diseases in oral cavity. Studies show antimicrobial activity against *Candida albicans* and *Streptococcus parasanguis*, *S. mutans*, *S. oralis*, strains involved in the formation of dental biofilm. Thus, the aim of this study was to determine the antimicrobial activity of *Syzygium cumini* extract against microorganisms associated with dental biofilm, as well as the phytochemical profile and cytotoxicity. The antimicrobial activity was performed by microdilution broth. Was determined Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of the lyophilized extract of the leaves from *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus parasanguis* (ATCC 903), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Phytochemical analysis was performed by spectroscopy in the visible region and was quantified polyphenols, flavonoids, condensed tannins and total saponins. Cytotoxicity was measured by the hemolysis method. *Syzygium cumini* got moderate antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus oralis* with CIM 1mg/mL. For *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus parasanguis*, the extract was inactive. The extract showed potential antifungal activity against *C. albicans* with MIC and MFC of 62.5 mg / mL, demonstrating strong fungistatic and fungicidal activity. The quantification of secondary metabolites obtained satisfactory results, especially with high concentrations of total polyphenols and saponins. The extract showed low cytotoxicity at concentrations that exerted antimicrobial activity coming up not being effective cytotoxic concentration 50% (EC50). It can be concluded that the extract of *S. cumini*, showed antibacterial activity against *S. mutans* and *S. oralis*, showing good antimicrobial potential for *C. albicans*, suggesting its use for safety and efficacy in the prevention and treatment of diseases arising biofilm.

Key words: Phytotherapy, *Syzygium cumini*, *Streptococcus*, *Candida albicans*, Hemolysis

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, o homem aprendeu a conhecer as plantas e tirar proveito de suas propriedades sobre o organismo. O reino vegetal é considerado a maior e mais importante fonte de substâncias medicamentosas (LIMA et al., 2006). Produzem metabólitos secundários que conferem às mesmas, atividades biológicas e farmacológicas (NWODO et al., 2010). É, portanto, um importante arsenal

terapêutico, sendo utilizado para profilaxia, prevenção, alívio e cura de doenças (FIGUEIREDO et al., 2010).

Plantas medicinais representam uma rica fonte de substâncias ativas que chama a atenção de cientistas na descoberta de novos agentes terapêuticos. Devido ao rápido aumento deresistência microbiana, a indústria farmacêutica tem demonstrado pouco interesse em investir no desenvolvimento de novasmoléculas deantimicrobianossintéticospara ampliaraarsenal terapêutico. Com isso, a tendência atual é a pesquisa de plantas com propriedades antibióticas (PANCHAVARNAKILI et al., 2012; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, 2012).

Cárie e candidose oral são doenças infecciosas que atingem a população em geral (BONIFAIT et al., 2012; AKPAN; MORGAN, 2002). Microrganismos que causam tais patologias se incorporam em uma matriz extracelular, formando comunidades denominadas de biofilme, na superfície do dente, podendo também estar aderidos ao tecido vivo (FINKEL; MITCHELL, 2011). Aas et al. (2005) afirmam queos biofilmes são compostos por várias espécies de microrganismos, estimando cerca de 700 espécies diferentes na cavidade oral.

*Syzygium cumini* (L.) Skeels, planta da família Myrtaceae, conhecida popularmente por jambolão é utilizada na medicina popular para tratar ulcerações, estomatites, afecções da garganta e outras doenças da cavidade oral, sendo utilizada na forma de bochechos (Costa et al., 2009). Além de tratamento específico para afecções odontológicas, a literatura relata suas ações hipoglicemiante, antimicrobiana, hipotensiva, diurética, cardiotônica, adstringente, anti-inflamatória, antiemética, estimulante do sistema nervoso central, antipirética, anticonvulsivante, anti-hemorragica, carminativa e antiescorbútica (MIGLIATO et al., 2006; BALIGA et al., 2011; SWAMI et al., 2012).

Pesquisas apontam a eficácia dessa planta na inibição do crescimento de microrganismos responsáveis por causar patologias de interesse médico. Dentre os mais sensíveis, apresentados porChandrasekaran; Venkatesalu, (2004); Michelin et al., (2005); Vieira et al., (2012) estão *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, *Proteus* sp, e *Pseudomonasaeruginosa* e *Streptococcus parasanguis*, *S. mutans*, *S. oralis* e *Lactobacillus casei*, estando grande parte desses envolvidos na formação do biofilme dental.

Nota-se na literatura que as principais pesquisas com extratos de *S. cumini* têm sido feitas frente a bactérias intestinais e *Candida spp.* (NASCIMENTO et al., 2000; LOGUÉRCIO et al., 2005; MICHELIN et al., 2005; CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004; OLIVEIRA, 2007). Pouco é descrito sobre a sensibilidade de microrganismos da cavidade oral envolvidos na formação do biofilme dental frente a extratos de *S. cumini*. Por isso, baseado no uso popular de que esta planta é utilizada na forma de bochechos para tratar ulcerações aftosas, estomatites, afecções da garganta e outras doenças da cavidade oral (Costa et al., 2009), acredita-se na possibilidade da utilização do extrato de jambolão como auxiliar na prevenção e ou controle da cárie dentária, bem como no tratamento da candidose oral.

Neste contexto, é de grande importância avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos liofilizados de folha de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, assim como quantificar os principais fitocompostos e avaliar seu potencial citotóxico.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 MATERIAL VEGETAL**

As folhas foram obtidas a partir de árvores de jambolão (*Syzygium cumini*- L. Skeels – Myrtaceae), cultivadas na Chácara Flor do Campo, localizada na zona rural do Município de Campina Grande, Paraíba, coletadas em dezembro de 2012. Uma amostra da planta foi enviada ao Herbário "Arruda Câmara", da Universidade Estadual da Paraíba, em Campina Grande, para identificação botânica e registro do exemplar. A secagem do material vegetal foi em estufa (FANEM – Modelo 330/5), a 45°C até obter um teor de umidade de 20%. As folhas foram processadas em moinho de facas (SOLAB – Modelo SL 30). Em seguida, misturou-se o pó resultante com a solução hidroalcoólica (etanol 70%) pela técnica de percolação. Ao final, o extrato hidroalcoólico a 70% foi submetido à secagem por liofilização (liofilizador LS 3000\_Terroni®) no Laboratório de Multiusuário de Caracterização e Análises da Universidade Federal da Paraíba/UFPB.

## 2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A partir do extrato liofilizado procedeu-se um *screening* microbiológico determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) através da técnica de microdiluição em caldo descrita no documento Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005). O extrato foi diluído em álcool 40% e testado na concentração de 4 mg/mL. Foram feitas triplicatas em três dias alternados para avaliar a reprodutibilidade do método.

### 2.2.1 Linhagens bacterianas ensaiadas

Foram selecionadas cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ): *Streptococcus mutans* (25175), *Streptococcus parasanguinis* (903), *Streptococcus oralis* (10557), *Streptococcus salivarius* (7073) e *Candida albicans* (10231).

### 2.2.2 Meio de cultura

Para realização dos testes de sensibilidade dos microrganismos aos extratos vegetais preparados foram utilizados o caldo BHI (HIMEDIA®) e o caldo Sabouraud (HIMEDIA®) para bactérias e fungos, respectivamente. Para a CBM e CFM, o meio de cultura Agar Mueller Hinton (HIMEDIA®) acrescido de sangue e Agar Sabouraud (HIMEDIA®), respectivamente.

### 2.2.3 Preparo do inóculo

O preparo dos inóculos para os testes de suscetibilidade foram realizados através do método de microdiluição seguindo as recomendações do protocolo M7-A6 para bactérias (CLSI, 2005) e M27-A2 para leveduras (CLSI, 2002).

#### 2.2.3.1 Bactérias

Culturas de bactérias incubadas por 24 horas em gerador de anaerobiose (Probac) foram preparadas e adicionadas em solução salina (0,85%) esterilizada (5mL). Sua absorbância foi ajustada entre 0,08 a 0,10 a um comprimento de onda de 625nm em fotocolorímetro Bioespectro, modelo SP-22, originando uma concentração equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC. A partir disso, foi realizada diluição seriada obtendo-se ao final da mesma uma concentração de  $1 \times 10^6$  UFC. No poço, essa concentração é estabelecida como  $5 \times 10^5$  UFC.

#### 2.2.3.2 Leveduras

Os testes de suscetibilidade para *Candida albicans*, foram realizados através do método de microdiluição seguindo as recomendações do protocolo M27-A2 para leveduras (CLSI, 2002). A concentração do inóculo, após ajuste em fotocolorímetro (530nm), corresponde a  $5 \times 10^6$  céls/mL e, após diluições sucessivas,  $2,5 \times 10^3$  céls/mL.

### 2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO

Foram distribuídos nos orifícios de cada coluna, 100 µL do caldo BHI e Sabouraud para bactéria e fungo, respectivamente. Na coluna 1 - linha A foram acrescentados 50 µL (micropipeta Eppendorf, Research plus, 20-200 µL) de solução da amostra testada, de concentração conhecida, sendo estes referentes ao controle de esterilidade das amostras. Em seguida, na linha B foram adicionadas 100 µL dos extratos para em seguida efetuar uma diluição seriada nos poços consecutivos, retirando-se 100 µL do poço de maior concentração para o poço seguinte. Os 100 µL finais foram desprezados.

A partir das suspensões padrões de cada espécie de microrganismo foram pipetados 100 µL dessa suspensão em cada poço. As primeiras colunas correspondem ao controle positivo (gluconato de clorexidina 0,12% para bactéria e nistatina 100.000 UI/mL para fungo) e controle negativo (o diluente do extrato, no caso, álcool 40%).

As placas foram incubadas por 24-48 horas a cerca de 36°C em atmosfera aeróbia, microaerofilia ou anaeróbia dependendo da exigência do microrganismo (CLSI 2002; CLSI 2005).

### 2.3.1 Leitura dos Resultados da CIM

Foram adicionados 20 µL da solução de cloreto de resazurina 0,01% (Sigma Aldrich Chemistry®) após o período de incubação e as placas re-incubadas por 40 minutos para fungo e duas horas para bactérias. A CIM foi definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória (CLSI, 2005).

## 2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA (CBM) OU FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Determinada a CIM dos extratos pôde-se confirmar a atividade bactericida ou fungicida dos mesmos através da determinação da CBM/CFM, por meio de plaqueamento por superfície do material do poço correspondente à CIM e concentrações anteriores a este, em meio de cultura específico. As placas foram submetidas à incubação a 35°C ± 1°C, durante 24 horas para os estreptococos e por 48 horas, para crescimento de *C. albicans* (CLSI 2002; CLSI, 2005).

## 2.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS, FLAVONÓIDES, SAPONINAS TOTAIS E TANINOS CONDENSADOS

### 2.5.1 Determinação de polifenóis totais

A determinação do teor de polifenóis totais seguiu a metodologia proposta por Chandra e Mejía (2004) com adaptações, através de espectroscopia na região do visível por meio do método de Folin-Ciocalteu. Submeteu ao estado de repouso por dois minutos, uma mistura de 1 mL da solução aquosa do extrato com 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N. Em seguida, 2mL de uma solução aquosa de

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 20% (p/v) foi adicionada, e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 minutos. Por último, foi feita a leitura da absorbância a 757 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240), contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de ácido gálico nas concentrações de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, e 40 µg/mL. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata.

### 2.5.2 Determinação de flavonóides totais

Meda et al. (2005) sugere um método para a quantificação de flavonóides totais, o qual foi aplicado nesta pesquisa. Obteve-se uma mistura de 5 mL de extrato dissolvido em metanol no mesmo volume de uma solução (em metanol) de Cloreto de Alumínio (AlCl<sub>3</sub>) a 2% (p/v). Após 10 minutos de repouso, foi realizada a leitura da absorbância a 415 nm, contra um branco composto pela solução de AlCl<sub>3</sub>.

A determinação da curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 100 µg/mL, preparada pela dissolução de 10 mg de quercetina em 100 mL de metanol. A amostra branca consistiu em metanol. O total de flavonóides foi determinado utilizando a curva de calibração utilizando quercetina (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) nas concentrações 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30 µg mL<sup>-1</sup> e expresso em mg equivalente de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

### 2.5.3 Determinação de saponinas totais

Segundo o método descrito por Makkar; Siddhuraju e Becker (2007), o teor de saponinas no extrato de *S. cumini* foi determinado. A 250 µL da solução do extrato (em metanol 80%), adicionou-se 250 µL de uma solução de vanilina (8% em etanol) e 2,5 mL de ácido sulfúrico (72%). Os tubos foram incubados a 60°C em banho-maria por 10 minutos, sendo transferidos para um banho de gelo, onde permaneceram por quatro minutos. A leitura da absorbância foi feita em 544 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, metanol 80% e ácido sulfúrico.

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 500 µg/mL, preparada pela dissolução de 10 mg de disogenina em 20 mL de metanol a 80%. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de quercetina nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL. A concentração de saponinas foi expressa em miligramas equivalentes de disogenina. As análises foram realizadas em triplicata.

#### 2.5.4 Determinação de taninos condensados

A determinação do conteúdo de taninos condensados seguiu o método descrito por Makkar e Becker (1993). A 0,5 mL da amostra do extrato vegetal foi adicionado 3 mL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 22 °C. A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% (v/v) em água.

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão de catequina obtida pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de catequina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. As análises foram realizadas em triplicata.

## 2.6 CITOTOXICIDADE POR HEMÓLISE

Uma alíquota de 1 mL de uma suspensão de hemácias 4% de sangue humano O<sup>+</sup> em solução salina 0,9% foi distribuída em tubos de ensaio e homogeneizadas com 1 mL do extrato liofilizado de folha de *S. cumuni* nas concentrações de 500µg/mL, 1mg/mL e 2 mg/mL e deixadas em repouso por uma hora. Passado esse período, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpms, durante 10 minutos, em seguida realizada a leitura visual, levando em consideração a quantidade de hemácias que sofreram lise. A visualização da hemólise foi classificada como: – (0% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e

++++ (100% de hemólise). Essa leitura foi realizada, seguindo método descrito por Desoti et al. (2011), com adaptações, um espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm, (Shimadzu® UV mini – 1240) utilizando como branco a solução salina 5% para confirmar os resultados da leitura visual. Neste ensaio, utilizou-se como controles negativo a suspensão de hemácias 4% e o extrato liofilizado diluído e como controle positivo uma solução do líquido de Turk.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM), CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)**

A maioria das linhagens mostraram-se sensíveis ao extrato com CIM de 1000 µg/mL para *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*. Para *Candida albicans* o extrato apresentou um grande potencial de inibição de crescimento, com CIM de 62,5 µg/mL, mostrando-se fungistático e fungicida conforme apresentado na tabela 1.

Os controles positivos (clorexidina e nistatina) e negativos (álcool 40%) mostraram-se satisfatórios, não houve contaminação dos extratos nem dos meios de cultura, o álcool a 40% não apresentou inibição bacteriana/fúngica e a CIM dos controles positivos foi de 15,6 µg/mL, tanto para clorexidina quanto para nistatina.

**Tabela 1.** Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos liofilizados de folhas de *S. cumini* de três análises (I, II e III) em dias alternados.

| Réplicas | CIM (µg/ml), CBM (µg/ml) e CFM (µg/ml) |                  |                      |                       |                    |
|----------|----------------------------------------|------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|
|          | Microrganismos                         |                  |                      |                       |                    |
|          | <i>S. mutans</i>                       | <i>S. oralis</i> | <i>S. salivarius</i> | <i>S. parasanguis</i> | <i>C. albicans</i> |
| I        | 1000,0                                 | 1000,0           | >1000                | >1000                 | 62,5               |
| II       | 1000,0                                 | 1000,0           | >1000                | >1000                 | 62,5               |
| III      | 1000,0                                 | 1000,0           | >1000                | >1000                 | 62,5               |
| CIM      | 1000                                   | 1000             | >1000                | >1000                 | 62,5               |

Pouco é descrito na literatura sobre a atividade antimicrobiana de extrato liofilizado do *Syzygium cumini*, pela técnica de microdiluição; até mesmo pela técnica de disco-difusão em ágar encontram-se limitações nos estudos com microrganismos da cavidade oral. Por exemplo, em pesquisa desenvolvida por Loguércio et al. (2005) foi avaliada a atividade antibacteriana do extrato hidralcoólico de folhas de jambolão sobre dezessete isolados bacterianos, Gram-positivos e Gram-negativos. No entanto, não foi testada a atividade sobre estreptococos orais. Neste estudo os resultados demonstram eficácia do extrato de folha do *Syzygium cumini* sobre microrganismos associados ao biofilme dental

Optou-se neste estudo pela classificação de Aligiannis et al. (2001), que propõe a classificação de produtos naturais baseada nos resultados da CIM. Inibidores potentes: CIM até 500 µg/mL; inibidores moderados: CIM entre 600 e 1500 µg/mL; inibidores fracos: CIM acima de 1600 µg/mL.

Tendo em vista esta classificação e diante dos resultados apresentados, *S. cumini* apresentou-se como um inibidor moderado para o crescimento de *S. mutans* e *S. oralis*, ao passo que frente a *S. salivarius* e *S. parasanguis*, o extrato mostrou-se inativo. Em relação à atividade antifúngica frente à *Candida albicans*, o extrato em estudo mostrou-se como um inibidor potente. A candidose oral é uma infecção oportunista, tendo por agente etiológico leveduras do gênero *Candida*, sendo a *Candida albicans* a maior responsável por desencadear as afecções orais. Assim, uma vez que *Syzygium cumini* já é utilizada na medicina popular para tratar ulcerações, afecções da garganta e outras doenças da cavidade oral, sendo utilizada pela população na forma de bochecho, esse resultado mostrou-se importante para dar embasamento científico ao uso popular (Costa et al., 2009).

As Concentrações Bactericidas e Fungicidas Mínimas foram determinadas apenas para os microrganismos que foram sensíveis aos extratos testados. O extrato não apresentou atividade bactericida para *S. mutans* e *S. oralis*, sendo evidenciado crescimento bacteriano através da CBM na concentração testada de 1000 µg/mL. Por outro lado, a CFM sugere que *S. cumini* é fungicida nas concentrações de 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL.

Portanto, baseado nos resultados da CIM e CBM/CFM, folhas de *S. cumini* têm atividade bacteriostática para *S. mutans* e *S. oralis*; fungistática e fungicida para *C. albicans*, visto que, na concentração em que inibiu o crescimento também conseguiu causar a lise de células fúngicas e, conseqüentemente, morte celular.

Desse modo, os resultados apresentados neste estudo indicam que *S. cumini* é mais efetiva sobre fungos do que contra bactérias, corroborando com o estudo desenvolvido por Chandrasekaran; Venkatesalu, (2004). Os autores testaram *S. cumini* frente a bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), Gram negativas (*Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*) e cepas fúngicas (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum gypseum*). A atividade antimicrobiana mostrou que dentre os microrganismos testados, apenas duas cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) foram sensíveis ao extrato, enquanto que para fungos, quatro espécies fúngicas (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*) apresentaram inibição do crescimento.

Em relação à atividade antimicrobiana do extrato de *S. cumini* sobre microrganismos associados ao biofilme dental, Vieira et al. (2012) desenvolveram um estudo semelhante à este, sendo que pelo método de disco-difusão. Os microrganismos testados foram *Streptococcus spp.* (ATCC 15300), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *S. oralis* (ATCC 10557), *S. parasanguis* (ATCC 903), *S. salivarius* (ATCC 7073), e *Lactobacillus casei* (ATCC 9595). A cepa mais sensível foi a de *S. parasanguis*, a qual mostrou um halo de 19 mm, seguido por *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. oralis* e *L. casei*. A Concentração Inibitória Mínima, foi de 242.5 mg.mL<sup>-1</sup> para *Streptococcus spp.*, *S. parasanguis* e *S. salivarius*, enquanto os microrganismos que apresentaram maior CIM foram *S. mutans*, *S. oralis* e *L. casei* (CIM = 485 mg.mL<sup>-1</sup>). Entretanto, no presente estudo houve uma discordância em

relação aos resultados apresentados por esses autores. Nesta pesquisa, diferentemente os microrganismos mais sensíveis foram *S. mutans* e *S. oralis*, enquanto que *S. parasanguis* e *S. salivarius* não demonstraram atividade frente aos extratos liofilizados. O método de microdiluição, no entanto, mostrou-se mais sensível comparando-se ao de disco-difusão, visto que as CIM's para os microrganismos no trabalho de Vieira et al. (2012) apresentaram-se bem maiores, na faixa de 242.5 mg.mL<sup>-1</sup> a 485 mg.mL<sup>-1</sup>.

Apesar dessa controvérsia, os resultados do presente estudo para atividade antibacteriana do extrato frente a *S. mutans* e a *S. oralis* foram satisfatórios visto que, Alves et al. (2010); Garnett et al. (2012) relatam que as bactérias mais importantes associadas ao biofilme dental no estágio inicial são *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *L. casei* que tornam o meio mais propício para a colonização de *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *S. parasanguis*. Embora, *S. salivarius* e *S. parasanguis* não tenham mostrado atividade frente ao extrato, os resultados para *Streptococcus*, de modo geral, são considerados satisfatórios, visto que, 50% das cepas testadas apresentaram atividade moderada (CIM = 1000 µg/mL) para dois microrganismos de grande importância clínica, na etiologia da cárie dentária, *S. mutans* e *S. oralis*, em um método sensível e reprodutível como o empregado neste estudo.

A atividade antifúngica enfatiza que os resultados desta pesquisa mostraram-se semelhantes aos apresentados por Oliveira (2007), o qual foi realizado por meio das técnicas de discos e poços com extratos hidroalcoólicos de folhas do jambolão frente *Candida albicans*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) realizada por microdiluição variou de 70 a 200 µg/mL, mostrando um pouco superior ao apresentado nesta pesquisa, indicando atividade antifúngica em ambos os estudos, especialmente mais potente neste estudo, com CIM de 62,5 µg/mL.

Em outro estudo, realizado por Höfling et al. (2010), para avaliar a atividade antifúngica de extratos diclorometânico e metanólico de sementes de *S. cumini* frente a *C. albicans* revelou CIM's de 30 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente, mostrando-se maior atividade antifúngica de sementes com esses solventes extratores do que em folhas com solução hidroalcoólica a 70% para dar origem ao extrato liofilizado, como foi realizado nesta pesquisa. No entanto, apesar de sementes terem apresentado melhor atividade antifúngica conforme Hofling et al.

(2010), esses solventes são mais tóxicos para o organismo humano. Assim, pode-se enfatizar que os atuais resultados para folhas revelam melhor segurança e eficácia.

### **3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS, FLAVONÓIDES, SAPONINAS TOTAIS E TANINOS CONDENSADOS**

A caracterização química das espécies vegetais, com determinação dos grupos de metabólitos secundários, é considerada uma abordagem desafiadora. Porém, em função da complexidade química é de extrema importância, visto que plantas medicinais dispõem de uma rica fonte de substâncias, o que prediz valores terapêuticos, envolvidos principalmente com atividade antimicrobiana e antioxidante (JEON et al., 2011; NEWMAN; CRAGG, 2007). Os mais importantes fitocompostos encontrados e que estão relacionados com essas atividades terapêuticas são compostos fenólicos, flavonoides, saponinas e taninos (PANCHAVARNAKILI et al., 2012). Neste estudo, o composto fitoquímico que apresentou maior concentração no extrato liofilizado de folhas de *S. cumini* foram saponinas, seguido pelos polifenóis, taninos e flavonoides (tabela 2).

Na literatura, pesquisas fitoquímicas, de caráter quantitativo com folhas de *S. cumini* é escasso Kaneria et al. (2009) estudaram os componentes fitoquímicos de folhas, qualitativamente. Foi observado que a presença de taninos prevaleceu em relação à de saponina, com uma diferença discreta, contradizendo o presente estudo, visto que, neste, o teor de saponinas foi 94% maior que o de taninos. No entanto, os resultados do presente estudo mostram-se mais seguros, uma vez que, além de identificar a presença marcante de saponinas no extrato, a concentração desse composto ativo é expressa em miligramas equivalentes de disogenina, seu padrão de referência. Vale ressaltar, nesse estudo, a importância de se ter quantificado no extrato de folhas de jambolão, a presença marcante de saponinas, metabólito secundário, que constitui uma das classes de maior destaque devido a sua ampla distribuição no reino vegetal e suas importantes atividades biológicas, dentre elas antibacteriana, antifúngica (DINIZ, 2006; KAISER; PAVEI; ORTEGA, 2010).

**Tabela 2.** Composição química do extrato liofilizado de folhas de *S. cumini* L. Skeel obtidos por espectroscopia na região do visível.

| COMPOSTO    | Polifenóis     | Flavonóides  | Saponinas       | Taninos condensados |
|-------------|----------------|--------------|-----------------|---------------------|
| TEOR (mg/g) | 100,10 ± 39,97 | 23,04 ± 3,02 | 820,35 ± 225,38 | 54,26 ± 0,39        |

\* mg de equivalentes do padrão de referência por g de extrato.

Estudo quantitativo, semelhante a este, foi realizado por Luzia; Jorge (2009) e fornece dados de que a concentração de polifenóis totais encontrada em extrato etanólico de sementes de *S. cumini* (130,56 mg) foi concordante ao encontrado no presente estudo (100,10 ± 0,33 mg/g) com folhas. Neste, a concentração mostrou-se um pouco menor, o que indica que há pouca diferença entre a composição desse composto ativo entre sementes e folhas. É conhecido que polifenóis podem apresentar atividade antimicrobiana, pois agem sobre a parede celular dos microrganismos combinando-se assim com as suas adesinas, de forma a comprometer a adesão do microrganismo sobre a superfície celular (CASTRO et al., 2012). A atual pesquisa revela um valor de taninos bem maior em folhas, representando 54,263 ± 0,05mg/g de extrato, comparando-se ao trabalho feito por Saha; Zaman; Roy (2013) em suco, polpa do fruto e sementes (6.9mg/g, 20.7mg/g e 21.0mg/g, respectivamente). O mesmo estudo ainda determina o teor de flavonóides em extrato metanólico de sementes e suco do fruto de jambolão, revelando que o valor desse composto na atual pesquisa mostrou-se bem menor, comparando-se ao encontrado por esses autores em extrato metanólico de sementes, com teor de 7715 mg/g. Em contrapartida, mostrou-se maior (23,043 ± 0,15mg/g) que o suco do fruto de jambolão (10mg/mL) determinado por Saha; Zaman; Roy (2013).

### 3.3 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DE EXTRATO DE FOLHA LIOFILIZADO DE *S. CUMINI* L. SKEEL POR HEMÓLISE

De acordo com a classificação sugerida por Schulz et al., (2005) da percentagem de hemólise (0% de hemólise, até 25% de hemólise, 50% de hemólise, 75% de hemólise e 100% de hemólise).

O extrato liofilizado de *S. cumini* L. apresentou uma citotoxicidade equivalente a 50% em relação ao controle positivo, na concentração de 2mg/mL (tabela 3), mostrando-se como a única que apresentou como a citotóxica efetiva 50% (EC50), ou seja, capaz de hemolisar 50% de uma suspensão a 4% de eritrócitos. No entanto, nas concentrações de 1mg/mL e 500µg/mL o extrato conseguiu hemolisar cerca de 25% das hemácias em estudo, sendo considerado um produto de baixa toxicidade.

Esse teste foi realizado com o objetivo de verificar a atividade citotóxica do extrato de *S. cumini* em três concentrações, alta, média e baixa, baseando-se no valor da CIM da atividade antimicrobiana. Aligiannis et al. (2001) consideram que determinado extrato de interesse microbiológico tenha atividade nas concentrações de até 1600 µg/mL; CIM's superiores a esta última, o extrato é considerado inativo. Desse modo, nesta pesquisa, a escolha dessas concentrações esteve dentro da faixa proposta por esses autores. Assim, se a 500 µg/mL o extrato foi pouco citotóxico (até 25% de hemólise), conseqüentemente nas inferiores a estas, o extrato foi capaz de causar menos lise das hemácias. Vale salientar que as CIM's foram de 1 mg/mL para *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis* e de 62,5 µg/mL para *Candida albicans* mostrando que, na concentração que o extrato apresentou atividade antibacteriana e, principalmente atividade antifúngica, a citotoxicidade tem pouco significado clínico, sendo aceitável para o uso.

Neste estudo optou-se por citotoxicidade em hemácias humanas porque é um ensaio *in vitro* que prediz os efeitos danosos à membrana celular. Este ensaio visa avaliar o efeito protetor ou tóxico de substâncias, incluindo extratos vegetais sobre organismos vivos. Assim, a ocorrência de hemólise pode estar diretamente correlacionada com o efeito tóxico que certas substâncias produzem (SCHIAR et al., 2007; REDDY et al., 2007). Se citotóxica pode causar a morte de células ou tecidos presentes na mucosa, podendo gerar absorção local e/ou sistêmica e causar efeitos danosos à saúde do indivíduo (PITHON et al., 2011). A hemoglobina liberada na lise das hemácias é capaz de causar danos ao fígado, rins e coração (BEDNARCZUK et al., 2010) e até o desenvolvimento de tumores (DESOTI et al., 2011).

As plantas que apresentam alta concentração de saponinas e terpenos podem desencadear no indivíduo efeito tóxico renal. *S. cumini* apresentou um teor de saponinas de 820,349 mg/g de extrato. Por este motivo, fez-se necessário avaliar a citotoxicidade de *S. cumini* para que esta planta possa ser utilizada de maneira segura, isto é, sem produzir efeitos locais e sistêmicos (DESOTI et al., 2011). No

entanto, pelos resultados obtidos da citotoxicidade nesta pesquisa, o teor de saponinas (tabela 2) encontrado na folha de jambolão não influenciou no poder citolítico por hemólise em eritrócitos humanos.

**Tabela 3.** Ensaio de citotoxicidade: Leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com extrato liofilizado de *S. cumini*.

| Concentrações                          | Absorbância | Intensidade de hemólise |
|----------------------------------------|-------------|-------------------------|
| 500µg/mL                               | 0,483       | +                       |
| 1mg/mL                                 | 0,519       | +                       |
| 2mg/mL                                 | 0,649       | ++                      |
| Liquido de Turk<br>(controle positivo) | 1,300       | ++++                    |

Nota: Utilizou-se como referência: – (0% de hemólise), +(até 25% de hemólise) ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise), Schulz et al., (2005).

Estudo semelhante foi realizado por Rodrigues (2013) para avaliar a atividade hemolisante de óleo essencial de folhas de *S. cumini* sobre eritrócitos humanos. O resultado de citotoxicidade revelou 11,3% de hemólise na maior concentração testada (800 µg/mL). Comparando-se ao atual estudo, provavelmente nas concentrações da CIM (1mg/mL e 65,5 µg/mL) o extrato seria praticamente atóxico no trabalho de Rodrigues (2013), da mesma forma que aconteceu neste, representando menos de 25% de hemólise nas concentrações inferiores a 1mg/mL.

Turatti (2008) verificou a citotoxicidade de *S. cumini* e observou que o índice de morte celular (IC50) ocorreu na concentração de 400,0 µg/mL do extrato de frutos secos de *S. cumini*. Dessa forma, comparando-se a atual pesquisa, frutos de *S. cumini* é mais citotóxico conforme metodologia empregada por Turatti (2008) do que as folhas como foi descrito no atual ensaio (2mg/mL), no entanto em uma concentração menor, foi capaz de provocar morte celular de 50% na população dos

organismos testados, favorecendo assim o uso de folhas de *S. cumini*, com maior segurança.

Em outro estudo com extratos hidroalcoólicos a 70% liofilizados de folhas de *Syzygium gratum*, planta com mesmo gênero de jambolão, não se mostrou tóxica para células vermelhas do sangue humano,  $15.64 \pm 4.62\%$ , na maior concentração testada ( $1200 \mu\text{g/mL}$ ). Este resultado indica que plantas do gênero *Syzygium* não se mostraram potencialmente citotóxicas, semelhante ao que aconteceu neste estudo, com extrato liofilizado de folha (WORARATPHOKA; INTARAPICHET; INDRAPICHATE, 2012).

Por conseguinte, *S. cumini* pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico quando utilizada com fim antimicrobiano para microrganismos da cavidade oral, ou seja, pouco citotóxica nestas concentrações. Entretanto, estudos mais detalhados para a avaliação da toxicidade dos extratos bioativos empregando-se outros modelos (*in vitro* e *in vivo*) se fazem necessários. No entanto, Silva et al. (2012) já adiantam que extrato hidroalcoólico de folhas de *S. cumini* não exercem efeitos tóxicos agudos ou crônicos, por administração oral, com uma DL50 de  $0,489 \text{ g/kg}$  em ratos, enquanto que a dose intraperitoneal desencadeou a morte de 67% dos animais na dose de  $2 \text{ g/kg}$ .

#### 4 CONCLUSÃO

O extrato liofilizado de folhas de *Syzygium cumini* L. Skeel mostrou-se fungicida, fungistático frente à *C. albicans* e bacteriostático frente a *S. oralis* e a *S. mutans*. A quantificação de metabólitos secundários obteve resultados satisfatórios, especialmente com altas concentrações de saponinas e polifenóis totais. O extrato apresentou baixa citotoxicidade nas concentrações que exerceu atividade antimicrobiana não chegando a ser a concentração citotóxica efetiva 50% (EC50).

Sendo assim, tratando-se de eficácia e segurança, *S. cumini* é uma planta de escolha para prevenção e tratamento de doenças decorrentes do biofilme dental.

## REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, nov. 2005.
- AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, p. 455-459, 2002.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.
- ALVES, T. M. S.; SILVA, C. A.; SILVA, N. B. da; MEDEIROS, E. B. de; VALENÇA, A. M. G. Atividade antimicrobiana de produtos fluoretados sobre bactérias formadoras do biofilme dentário: Estudo *in vitro*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v.10, n. 2, p. 209-216, mai./ago. 2010.
- BALIGA, M. S.; BHAT, H. P.; BALIGA, B. R. V.; WILSON, R.; PALATTY, P. L. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, p. 1776–1789, 2011.
- BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, jul./dez. 2010.
- BONIFAIT, L.; MARQUIS, A.; GENOVESE, S.; EPIFANO, F.; GRENIER, D. Synthesis and antimicrobial activity of geranyloxy- and farnesyloxy-acetophenone derivatives against oral pathogens. **Fitoterapia**, Canadá, v. 83, p. 996–999. 2012.
- CASTRO, L. C. de. Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato aquoso e etanólico de *Acanthospermum australe*. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 9, n. 2, p. 153-161, 2012.
- CHANDRA, S.; MEJÍA, E. G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity and Quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.
- CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, India, v.91, p. 105–108, mar. 2004.
- CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A2. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica**. 2.ed. Pennsylvania: NCCLS; 2002. 51p.
- CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M7-A6. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por**

**diluição para bactéria de crescimento aeróbico.** 6.ed. Pennsylvania: NCCLS; 2005. 81 p.

COSTA, A. C. B. P. da; PEREIRA, C. A.; FREIRE, F.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 2, 111-116, mar./abr. 2009.

DESOTI, V. C.; MALDANER, C. L.; CARLETTO, M. S.; HEINZ, A. A.; COELHO, M. S.; PIATI, D.; TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades Antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do paraná. **Arquivo de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 3-13, jan./abr. 2011.

DINIZ, L. R. L. **Efeito das saponinas triterpênicas isoladas de raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke sobre a função renal.** 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) - Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

FIGUEIREDO, N. L.; AGUIAR, S. R. M. M. de; FALÉ, P. L.; ASCENSÃO, L. et al. The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. **Food Chemistry**, v. 119, p. 664–668, mar. 2010.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 109-118, 2011.

GARNETT, J. A.; SIMPSON, P. J.; TAYLOR, J.; BENJAMIN, S. V.; TAGLIAFERRI, C.; COTA, E.; CHEN, Y. M.; WU, H.; MATTHEWS, S. Structural insight into the role of *Streptococcus parasanguinis* Fap1 within oral biofilm formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, n.1, p. 421-426, 2012.

HÖFLING, J. F.; ANIBAL, P.C.; OBANDO-PEREDA, G. A.<sup>1</sup>; PEIXOTO, I.A.T.; FURLETTI, V.F. FOGLIO, M.A.; GONÇALVES, R.B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.70, n.4, nov. 2010.

KANERIA, M.; BARAVALIA, Y.; VAGHASIYA, Y.; CHANDA, S. Determination of antibacterial and antioxidant potential of some medicinal plants from Saurashtra Region. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, India, v.71, n. 4, p. 406–412, jul./aug.2009.

JEON, J.-G. ; ROSALEN, P. L.; FALSETTA, M. L. ;KOO, H. . Natural products in caries research: Current (limited) knowledge, challenges and future perspective. **Caries Research (Online)**, v. 45, p. 243-263, 2011.

KAISER, S.; PAVEI, C.; ORTEGA, G. G. Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.20, n.3, jul. 2010.

KANERIA, M.; BARAVALIA, Y.; VAGHASIYA, Y.; CHANDA, S. Determination of antibacterial and antioxidant potential of some medicinal plants from Saurashtra Region.

KUMAR, V.; YADAV, S. C.; YADAV, S. K. *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 1301-1309, 2010.

LIMA, J. L. S. de; FURTADO, D. A.; PEREIRA, J. P. G.; BARACUHY, J. G. V.; XAVIER, H. S. I. **Plantas Medicinais de Uso Comum no Nordeste do Brasil**. 1 ed. Campina Grande. 2006. 81 p.

LOGUÉRCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* L. Skells. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, mar./abr. 2005.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Composição centesimal, potencial antioxidante e perfil dos ácidos graxos de sementes de jambolão (*Syzygium cumini* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 2, p. 219-223, abr./jun. 2009

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, n. 4, v. 19, 1993.

MAKKAR, Harinder P. S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, Klaus. **Plant Secondary Metabolites**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007.

MEDA, Aline; LAMIEN, Charles Eulogie; ROMITO, Marco; MILLOGO, Jeanne; NACOULMA, Odile Germaine. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.4. p. 316-320, out./dez. 2005.

MIGLIATO, K. F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M. V. R.; CORRÊA, M. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, p.310-304, 2006.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, oct./dez. 2000.

NEWMAN D.J., CRAGG G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461–477, 2007.

NWODO, U. U.; OBIYEKE, G. E.; CHIGOR, V. N.; OKOH, A. I. Assessment of *Tamarindus indica* extracts for antibacterial activity. **International Journal of Molecular Sciences**, South Africa, v. 12, p. 6385-6396, sept. 2011.

OLIVEIRA, G. F. de; FURTADO, C. N. A. J.; FILHO, A. A. da S.; MARTINS C. H. G.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. de A. e. Antimicrobial activity of *syzygium cumini* (myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 381-384, 2007.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; GASPAR, C.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R.; SILVA-DIAS, A.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; PINA-VAZ, C.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; QUEIROZ, J. A. The anti-Candida activity of *Thymbra capitata* essential oil: Effect upon pre-formed biofilm. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 379–383, mar. 2012.

PANCHAVARNAKILI, N.; SELVI, S. T.; PAVAI, D.; PANNEERSELVAM, A.; PRABAKARAN, M. Antimicrobial studies and phytochemical screening of stem bark in *Syzygium cumini* (L.) and *Lannea coromentalis* Houtt (Merr.). **Asian Journal of Plant Science and Research**, Estados Unidos, v. 2, n. 2, p. 89-94, 2012.

PITHON, M. M.; SANTOS, R. L.; RIBEIRO, D. L. R.; FREITAS, L. M. A.; SOUZA, R. A.; MARTINS, F. O. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de enxaguatórios bucal Listerine®. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, Camaragibe v.11, n.4, p. 83-88, out./dez. 2011.

REDDY, C. S. S. S.; SUBRAMANYAM, M. V. V.; VANI, R.; DEVI, S. A. *In vitro* models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidante supplements. **Toxicology in vitro**, v. 21, p. 1355-1364, 2007.

RODRIGUES, K. A. DA F. R. **Determinação das atividades Anti-Leishmania, Citotóxica e de Parâmetros de Ativação de Macrófagos dos Óleos Essenciais das Folhas de *Eugenia uniflora* L. e *Syzygium cumini* (L.) Skeels**. 2013. 150 f. Dissertação de Mestrado (Ciências da Saúde) - Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, 2013.

SAHA, R. K.; ZAMAN, N. M.; ROY, P. Comparative evaluation of the medicinal activities of methanolic extract of seeds, fruit pulps and fresh juice of *Syzygium cumini* *in vitro*. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 1, n. 4, p.: 300-308, 2013.

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

SCHULZ, D; SIMÕES, C.M.O.; FRÖHNER, C.R.A.; GABILAN, N.H.; BATISTA, C.R.V. Citotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* frente a hemácias de carneiro e células vero. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 2, 2005.

SILVA, S. do N.; ABREU, I. C.; SILVA, G. F. C.; RIBEIRO, R. M.; LOPES, A. de S.; CARTÁGENES, M. do S. de S.; FREIRE, S. M. de F.; BORGES, A. C. R.; BORGES,

M. O. da R. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 102-108, jan./feb. 2012.

SWAMI, S. B.; THAKOR, N. S. J.; PATIL, M. M.; HALDANKAR, P. M. Jamun(*Syzygium cumini* (L.): A Review of its food and medicinal uses.**Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 1100-1117, aug. 2012.

TURATTI, K. F. M. ***Syzygium cumini* (L.) skeels**: avaliação da qualidade, estudo morfo-anatômico, estudo da atividade antimicrobiana, conservante, genotóxica, mutagênica, citotóxica e incorporação em formulações cosméticas para uso tópico. Araraquara. 2008. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Farmacêutica, Araraquara, SP, 2008.

VIEIRA, T. I.; GONDIM, B. L. C.; SANTIAGO, B. M.; VALENÇA, A. M. G. *In vitro* antibacterial and non-stick activity of extracts from leaves of *Psidium guineense* Sw. and *Syzygium cumini* (L.) Skeels on oral microorganisms. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v.60, n.3, p. 359-365, jul./set., 2012.

WORARATPHOKA, J.; INTARAPICHET, K.; INDRAPICHATE, K. Antioxidant activity and cytotoxicity of six selected, regional, Thai vegetables. **American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences**, n. 4, v. 2, p. 108-117, 2012.

## CONCLUSÃO

Com a realização desse trabalho permitiu-se traçar o perfil de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels por meio de uma caracterização físico-química do pó da droga vegetal, assim como, padronizou-se o extrato liofilizado por meio de técnicas analíticas e térmicas. Por outro lado, determinou-se a Concentração Inibitória Mínima, a Concentração Bactericida Mínima e Fungicida Mínima, o perfil fitoquímico de compostos e a atividade citotóxica por hemólise no extrato liofilizado de folhas da planta medicinal em estudo. Diante disso, constatou-se que:

- O pó das folhas de *S. cumini* comporta-se como grosso. O pH ácido, densidade aparente, teor de cinzas e teor de água com valores aceitáveis, de acordo com especificações farmacopeicas;
- O rendimento do processo de liofilização foi de quase 5%;
- O tamanho das partículas do extrato teve ausência de padronização no tamanho destas, apresentando-se de vários tamanhos, formatos e mostraram-se amorfas, característica típica de extratos vegetais;
- Ocorreram cinco eventos térmicos com picos tipicamente endotérmicos. A decomposição dos componentes orgânicos na amostra se iniciou em uma etapa ocorrida entre 151,64-209,0°C;
- Identificou-se por meio da espectroscopia de infravermelho, bandas características de determinados grupamentos como metil, hidroxila, além de hidrocarbonetos e ligações carbono-oxigênio. Estes sugerem a presença na amostra de grupos funcionais como éter, ésteres e ácidos carboxílicos, indicativo de metabólitos responsáveis pela atividade antimicrobiana como: taninos e flavonoides;
- O extrato inibiu o crescimento de linhagens bacterianas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* e *Candida albicans* com boa atividade antimicrobiana. *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus parasanguis* se mostraram resistentes;
- O efeito do extrato foi bacteriostático frente a *S. mutans* e a *S. oralis* e fungistático e fungicida frente à *C. albicans*;
- O composto fitoquímico que apresentou maior concentração no extrato liofilizado de folhas de *S. cumini* foram saponinas, com maior quantidade, seguido de polifenóis, taninos e flavonoides;

- O extrato apresentou baixa citotoxicidade, nas concentrações que exerceu atividade antimicrobiana, não chegando a ser a concentração citotóxica efetiva 50% (EC50).

Diante do exposto, pode-se afirmar que esse estudo serviu de ponto de partida para a produção de um fitoterápico a partir do extrato de *Syzygium cumini* uma vez que caracterizou a matéria-prima e obteve-se excelente atividade antimicrobiana e baixa toxicidade. A partir de então, pode ser utilizado para prevenir e/ou tratar infecções causadas por microrganismos associados ao biofilme dental, ratificando o uso popular descrito por Costa et al (2009), de que essa planta já era utilizada para tratar afecções bucais.