

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS ARARAQUARA

***Syzygium cumini* (L.) Skeels: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, ESTUDO MORFO-
ANATÔMICO, ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, CONSERVANTE,
GENOTÓXICA, MUTAGÊNICA, CITOTÓXICA E INCORPORAÇÃO EM
FORMULAÇÕES COMÉTICAS PARA USO TÓPICO**

KETYLIN FERNANDA MIGLIATO TURATTI

ARARAQUARA – SP

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS ARARAQUARA

***Syzygium cumini* (L.) Skeels: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, ESTUDO MORFO-
ANATÔMICO, ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, CONSERVANTE,
GENOTÓXICA, MUTAGÊNICA, CITOTÓXICA E INCORPORAÇÃO EM
FORMULAÇÕES COMÉTICAS PARA USO TÓPICO**

KETYLIN FERNANDA MIGLIATO TURATTI

ORIENTADORA: Profª. Dr.^a HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORRÊA

ARARAQUARA – SP

2008

Ficha Catalográfica

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

T929s Turatti, Ketylin Fernanda Migliato
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. / Karina Andrade de Prince. – Araraquara, 2008.
184 f.

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

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

Co-orientador: Marcos Antonio Corrêa

1.*Syzygium cumini*. 2.Jambolão. 3.Teste de segurança. 4.Atividade antimicrobiana.. I.Salgado, Hérica Regina Nunes, orient.. II. Corrêa, Marcos Antonio, co-orient. III. Título.

CDD: 658.562

CAPES: 40300005

Dedico esta Tese:

A Deus

“Pela inteligência que a mim agraciou, permitindo eu discernir o bem e o mal, e equilatando os limites da Ciência, de modo a compreender as aspirações humanas”

Aos meus queridos mestres:

Profa. Dra. Hérica R. N. Salgado

Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

*Pilares do saber e da cultura, em que me inspirei a par dos
compêndios da Ciência, para preparo e apresentação desta Tese de
Doutorado.*

Meu muito obrigado!!!

Agradecimentos

Aos meus queridos pais Fernando e Nelcí, por haver me educado dentro dos padrões permitidos, dando constantes exemplos de bem proceder perante as pessoas e a sociedade.

Ao meu marido Ricardo, obrigada por todo amor, carinho e companheirismo dedicados a mim em todos estes anos que estamos juntos. Agradeço também pela compreensão, paciência e participação para realização deste trabalho. Eu te amo!!!

Aos meus irmãos Fernando, Karin e Caio obrigada pelo carinho e incentivo.

A toda minha família, especialmente aos meus avós Donato e Adelaide (*in memoriam*), Nelson e Darcy, que sempre busquei surpreendê-los durante minha caminhada.

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

À Profa. Dra. Christiane Pienna Soares, obrigada pela sua amizade, dedicação e ensinamentos.

À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini, obrigada pela sua amizade, dedicação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Luis Victor Silva do Sacramento, obrigada pela sua amizade e dedicação.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, obrigada pelos ensinamentos, atenção e amizade.

À Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda, obrigada pela amizade, ensinamentos e dedicação.

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

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

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

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

À Isabel técnica do laboratório de Citologia pela ajuda e amizade.

Ao Max técnico do laboratório de Hematologia pela ajuda e amizade.

À Ana Marisa pela amizade que permanece durante todos esses anos.

Aos colegas que ajudaram de alguma forma nesse trabalho a Liliane, Fabiana Biso, Isabel, Maria Angélica.

À Aline Miranda e Mariana Peron que me ajudaram a superar novos desafios, muito obrigada.

Ao André Baby pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, como também pela nossa amizade.

Aos meus colegas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara Andréa, Arnóbio, Daniele, Rubiana, Thalita, Greice, Cristina, Karen, Cristiane, Gustavo pela amizade.

À minha estagiária Sandra Cristina Monteiro obrigada pela sua ajuda no desenvolvimento deste trabalho, a sua amizade, paciência e mais que tudo isso, me ensinou a ser um ser humano diferente em vários momentos difíceis em minha vida, você é muito especial.

À minha estagiária Priscila Silva obrigada pela sua ajuda no desenvolvimento deste trabalho, amizade, você é uma grande amiga.

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

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

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

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

Por aqueles que em suas orações também puderam me fortalecer.

SUMÁRIO	Pg
Lista de figuras.....	13
Lista de tabelas.....	16
Lista de abreviaturas.....	18
Resumo.....	20
Abstract.....	21
1. Introdução.....	22
2. Objetivos.....	25
3. Revisão bibliográfica.....	26
3.1. <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	26
3.2. Controle microbiológico do extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	30
3.3. Teste de segurança.....	31
3.3.1. Teste de citotoxicidade.....	31
3.3.2. Teste do micronúcleo em <i>Tradescantia pallida</i>	34
3.3.3. Teste do micronúcleo (MN) em camundongos.....	36
3.3.4. Teste de AMES.....	39
3.3.5. Ensaio do cometa.....	40
3.4. Formulações cosméticas.....	43
3.4.1. Atividade antimicrobiana.....	46
3.4.2. Teste de desafio.....	49
4. Material e métodos.....	54
4.1. Material.....	54
4.1.1. Material vegetal.....	54
4.1.2. Microrganismos.....	54
4.1.3. Cultura celular.....	54
4.1.4. Animais.....	55
4.1.5. Solventes, reagentes e soluções.....	55

4.1.6. Equipamentos.....	56
4.1.7. Softwares.....	56
4.2. Métodos.....	56
4.2.1. Preparo do extrato dos frutos <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	56
4.2.2. Controle da qualidade dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	57
4.2.2.1. Estudo anatômico dos frutos maduros de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	57
4.2.3. Controle da qualidade do extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	58
4.2.3.1. Doseamento.....	58
4.2.3.1.1. Polifenóis totais.....	58
4.2.3.1.2. Polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele.....	58
4.2.3.1.3. Solução padrão.....	58
4.2.4. Validação.....	59
4.2.4.1. Linearidade.....	59
4.2.4.2. Especificidade e seletividade.....	59
4.2.4.3. Precisão.....	59
4.2.4.4. Exatidão.....	60
4.2.4.4.1. Recuperação.....	60
4.2.4.5. Limite de detecção.....	61
4.2.4.5.1. Limite de detecção estimado.....	61
4.2.4.6. Limite de quantificação.....	61
4.2.4.6.1. Limite de quantificação estimado.....	61
4.2.5. Análise microbiológica do extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	62
4.2.5.1. Contagem total de microrganismos.....	62
4.2.5.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp e <i>Escherichia coli</i>	62
4.2.5.3. Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63

4.2.6. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L) Skeels.....	63
4.2.6.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para bactéria..	63
4.2.6.1.1. Preparo do inóculo.....	63
4.2.6.1.1.1. Padronização da suspensão bacteriana.....	63
4.2.6.1.2. Análise de sensibilidade aos agentes antimicrobianos.....	64
4.2.6.1.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana do extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> pelo método da microdiluição.....	64
4.2.6.1.4. Leitura.....	65
4.2.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para fungos....	65
4.2.6.2.1. Preparo do inóculo.....	65
4.2.6.2.1.1. Padronização da suspensão fúngica.....	65
4.2.6.2.2. Análise de sensibilidade aos agentes antimicrobianos.....	65
4.2.6.2.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica do extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> pelo método da microdiluição.....	66
4.2.6.2.4. Leitura.....	67
4.2.6.3. Determinação da concentração bactericida e fungicida mínima (CBM/CFM).....	67
4.2.6.3.1. Padronização e adaptação dos testes de verificação da concentração bactericida mínima do extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	67
4.2.6.3.2. Padronização e adaptação dos testes de verificação da concentração fungicida mínima do extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	67
4.2.6.3.3. Leitura.....	68
4.2.7. Teste de citotoxicidade.....	68

4.2.7.1. Citotoxicidade pelo método do corante supravital do composto tetrazólio (MTS).....	68
4.2.8. Teste do micronúcleo em <i>Tradescantia pallida</i> (Trad-MCN).....	69
4.2.8.1. Controles.....	70
4.2.9. Teste de micronúcleo em eritrócitos de medula óssea de camundongos.....	70
4.2.9.1. Animais.....	70
4.2.9.2. Comitê de Ética.....	72
4.2.9.3. Coleta e processamento do material biológico.....	72
4.2.10. Teste de Ames.....	72
4.2.10.1. Linhagens utilizadas.....	72
4.2.10.2. Verificação das características genéticas das cepas de <i>S. typhimurium</i>	73
4.2.10.3. Preparo dos inóculos de <i>S. typhimurium</i>	73
4.2.10.4. Meios de cultura.....	73
4.2.10.5. Preparo da mistura de S9.....	74
4.2.10.6. Controles.....	75
4.2.10.7. Ensaios de mutagenicidade.....	75
4.2.11. Teste do cometa.....	75
4.2.12. Análise estatística.....	77
4.2.13. Preparo das formulações.....	78
4.2.13.1. Solução glicólica do extrato etanólico seco dos frutos de <i>S. cumini</i> incorporado nas formulações.....	80
4.2.14. Análise microbiológica das formulações.....	80
4.2.14.1. Contagem total de microrganismos.....	80
4.2.14.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp e <i>Escherichia coli</i>	80
4.2.14.3. Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80
4.2.15. Avaliação da atividade antibacteriana das formulações sem e com extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L) Skeels.....	80

4.2.15.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para bactérias.....	80
4.2.15.1.1. Preparo do inóculo.....	80
4.2.15.1.1.1. Padronização da suspensão bacteriana.....	80
4.2.15.1.2. Análise de sensibilidade aos agentes antimicrobianos....	80
4.2.15.1.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana das formulações pelo método da microdiluição.....	81
4.2.15.1.4. Leitura.....	81
4.2.16. Avaliação da atividade antifúngica do extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L) Skeels e das formulações.....	82
4.2.16.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para fungos	82
4.2.16.1.1. Preparo do inóculo.....	82
4.2.16.1.1.1. Padronização da suspensão fúngica.....	82
4.2.16.1.2. Análise de sensibilidade às substâncias.....	82
4.2.16.1.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica das formulações pelo método da microdiluição.....	82
4.2.16.1.4. Leitura.....	83
4.2.17. Determinação da concentração bactericida e fungicida mínima (CBM/CFM)..	83
4.2.17.1. Padronização e adaptação dos testes de verificação da concentração bactericida mínima das formulações.....	83
4.2.17.2. Padronização e adaptação dos testes de verificação da concentração fungicida mínima das formulações.....	83
4.2.17.3. Leitura.....	83
4.2.18. Teste de desafio.....	83
4.2.18.1. Conservação dos microrganismos teste – bactérias e leveduras.....	83
4.2.18.2. Conservação dos microrganismos teste–fungo.....	84
4.2.18.3. Reativação dos microrganismos.....	84

4.2.18.4. Repiques dos microrganismos para utilização nos testes.....	84
4.2.18.5. Obtenção de suspensões-mãe de microrganismos testes e contagem do número de microrganismos viáveis.....	85
4.2.18.5.1. Obtenção da suspensão de bactérias e levedura e contagem do número de microrganismos viáveis da suspensão.....	85
4.2.18.5.2. Obtenção da suspensão do fungo e contagem do número de esporos.....	85
4.2.18.6. Avaliação da neutralização na inibição da atividade antimicrobiana do sistema.....	86
4.2.18.7. Teste de eficácia do sistema conservante propriamente dito.....	87
5. Resultados e Discussão.....	90
5.1. Estudo anatômico dos frutos maduros de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	90
5.2. Validação da metodologia para o doseamento do extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	93
5.3. Controle microbiológico do extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels...	99
5.4. Atividade antimicrobiana do extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels..	100
5.5. Citotoxicidade do extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	105
5.6. Teste do micronúcleo em <i>Tradescantia pallida</i> (TRAD-MCN) do extrato seco dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	106
5.7. Teste do micronúcleo em camundongos.....	110
5.8. Teste do AMES.....	114
5.9. Teste do cometa.....	117
5.10. Preparo das formulações.....	121
5.11. Incorporação do extrato glicólico dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels às formulações.....	123
5.12. Controle microbiológico da formulação com extrato glicólico dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	124
5.13. Atividade antimicrobiana da formulação com e sem extrato glicólico dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	125

5.14. Teste de neutralização.....	131
5.15. Teste de eficácia conservante das formulações com extrato glicólico dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	135
6. Conclusões.....	150
7. Referências bibliográficas.....	152
8. Anexo.....	183

LISTA DE FIGURAS

n°.	Figura	pg
1	a) Exemplar urbano de <i>Syzygium cumini</i> ; b) frutos de <i>Syzygium cumini</i>	26
2	<i>Tradescantia pallida</i>	35
3	Procedimento do ensaio do cometa.....	42
4	Esquema para realização do teste do micronúcleo em camundongo e do cometa para o grupo teste 1, administração e sacrifício em 24 horas e para o grupo teste 2 sacrifício em 48 horas.....	71
5	Esquema do teste da avaliação da eficácia dos neutralizantes sobre o efeito antimicrobiano dos conservantes.....	87
6	Esquema de execução das análises microbiológicas do produto acabado durante o teste de eficácia.....	89
7	Aspectos anatômicos de frutos de <i>S. cumini</i>	91
8	Curva analítica do ácido pirogálico, através do método espectrofotométrico a 757 nm.....	94
9	Ilustração do ensaio da determinação da concentração inibitória mínima de extrato de frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	102
10	Ilustração do ensaio da determinação da concentração bactericida e fungicida mínima do extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	103
11	Índice de citotoxicidade do extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i> em culturas de CHO.....	105
12	Frequência de micronúcleos (\pm desvio padrão) em células de grão de pólen de <i>Tradescantia pallida</i>	108
13	A) Conjunto de <i>Tradescantia pallida</i> por tratamento; B) Inflorescência de <i>Tradescantia pallida</i> (conjunto de várias flores); C) Tétrades de inflorescência de <i>Tradescantia pallida</i> tratado com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> na concentração de 2500 μ g/mL contendo 3 micronúcleos (setas); D) Tétrade de inflorescência de <i>Tradescantia pallida</i> tratado com extrato do fruto de <i>Syzygium cumini</i> na concentração de 2500 μ g/mL.....	110
14	Ensaio de genotoxicidade através do teste do micronúcleo de medula óssea do extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i> no tratamento de 24 h nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 mg/kg; CP: controle positivo; CN: controle negativo. Mann-Whitney. *** $p < 0,01$ (CN X CP).....	111
15	Ensaio de genotoxicidade através do teste do micronúcleo de medula óssea do extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i> no tratamento de 48 h nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 mg/kg; CP: controle positivo; CN: controle negativo. Mann-Whitney. *** $p < 0,01$ (CN X CP).....	111
16	Ensaio de genotoxicidade através do teste do cometa do extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i> no tratamento de 24 h nas concentrações de 312,5; 625; 1250; 2500 μ g/mL (\blacktriangle).CP: controle positivo(\blacksquare); CN: controle negativo (\bullet). Mann-Whitney. *** $p < 0,0001$ (CN X CP; CN X 2500 μ g/mL) ; * $p < 0,05$ (CN X 1250 μ g/mL)....	118

17	Ensaio de genotoxicidade através do teste do cometa do extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i> no tratamento de 48 h nas concentrações de 312,5; 625; 1250; 2500 µg/mL (▲); CP: controle positivo(■); CN: controle negativo (●). Mann-Whitney. *** p<0,0001 (CN X CP).....	118
18	Núcleos de células sanguíneas de camundongo encontradas no ensaio do cometa a) controle negativo onde não se observa grande número de fragmentos de DNA; b) Avaliação quantitativa realizada pelo software Comet Score 1.5 e determinação do <i>tail moment</i> ; c) controle positivo; d) Leitura para determinação do <i>tail moment</i> ; e) Avaliação quantitativa realizada pelo software Comet Score 1.5 e determinação do <i>tail moment</i> do extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i> na concentração de 50,0 mg/kg; f) Leitura para determinação do <i>tail moment</i> ; g) Avaliação quantitativa realizada pelo software Comet Score 1.5 e determinação do <i>tail moment</i> do extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i> na concentração de 6,25 mg/kg; h) Leitura para determinação do <i>tail moment</i>	120
19	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Staphylococcus aureus</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido sem extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	140
20	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Staphylococcus aureus</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	140
21	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Staphylococcus aureus</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no gel sem extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	140
22	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Staphylococcus aureus</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	140
23	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Staphylococcus aureus</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, na emulsão não-iônica sem extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	140
24	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Staphylococcus aureus</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, na emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	140
25	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Escherichia coli</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido sem extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	143
26	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Escherichia coli</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	143
27	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Escherichia coli</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no gel sem extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	143
28	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Escherichia coli</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	143

29	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Escherichia coli</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, na emulsão não-iônica sem extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	143
30	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Escherichia coli</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, na emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	143
31	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido sem extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	146
32	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	146
33	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no gel sem extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	146
34	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	146
35	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, na emulsão não iônica sem extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	146
36	Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, na emulsão não iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	146

LISTA DE TABELAS

n°	Tabela	pg
1	Distribuição da concentração da amostra e seus respectivos microrganismos.....	67
2	Composição da formulação de gel de carbomer.....	78
3	Composição da formulação de emulsão não-iônica.....	79
4	Composição da formulação de sabonete líquido.....	79
5	Absorvâncias obtidas nas análises do padrão ácido pirogálico por espectrofotometria a 757 nm.....	94
6	Determinação de polifenóis totais no extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i> pelo método espectrofotométrico a 757 nm.....	96
7	Determinação de polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele do extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i> pelo método espectrofotométrico a 757 nm.....	96
8	Teste de recuperação para polifenóis totais do extrato seco do fruto de <i>S. cumini</i> pelo método espectrofotométrico a 757 nm.....	97
9	Teste de recuperação para polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele do extrato seco do fruto de <i>S. cumini</i> pelo método espectrofotométrico a 757 nm.....	97
10	Limites de detecção e quantificação estimados por meio do desvio da curva analítica.....	98
11	Controle microbiológico do extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i>	99
12	Determinação da concentração inibitória, bactericida e fungicida mínima para o controle dos fármacos ciprofloxacino e fluconazol.....	101
13	Determinação da concentração inibitória, bactericida e fungicida mínima para o extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	102
14	Frequência de micronúcleo, representado pela Média e desvio padrão (M _± EP) em células mãe de grão de pólen de <i>Tradescantia pallida</i>	107
15	Estudo da citotoxicidade de eritrócitos policromáticos (PCEs) e normocromáticos (NCEs) em células de medula óssea tratado com o extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i> durante 24 e 48 horas.....	113
16	Atividade mutagênica do extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i> nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i> , em ausência e presença de ativação metabólica (S9).....	115
17	Controle microbiológico das formulações solução glicólica do extrato seco dos frutos de <i>S. cumini</i>	125
18	Concentração inibitória mínima das formulações sem e com extrato glicólico dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> para os microrganismos <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	126
19	Concentração bactericida e fungicida mínima das formulações sem e com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> para os microrganismos <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	130

20	Determinação da concentração inibitória, bactericida e fungicida mínima para o controle dos fármacos ciprofloxacino e fluconazol.....	131
21	Contagem do número de microrganismos viáveis de <i>S. aureus</i> após neutralização do sistema conservante.....	132
22	Contagem do número de microrganismos viáveis de <i>E. coli</i> após neutralização do sistema conservante.....	133
23	Contagem do número de microrganismos viáveis de <i>P. aeruginosa</i> após neutralização do sistema conservante.....	133
24	Contagem do número de microrganismos viáveis de <i>C. albicans</i> após neutralização do sistema conservante.....	134
25	Contagem do número de microrganismos viáveis de <i>A. niger</i> após neutralização do sistema conservante.....	135
26	Log de UFC/g de <i>Staphylococcus aureus</i> , na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> , em função do tempo.....	138
27	Equações da reta, coeficiente de correlação (r) e valores D, obtidos para a formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> , utilizando como microrganismo desafiante <i>Staphylococcus aureus</i>	141
28	Log de UFC/g de <i>Escherichia coli</i> , na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> , em função do tempo.....	142
29	Equações da reta, coeficiente de correlação (r) e valores D, obtidos para a formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> , utilizando como microrganismo desafiante <i>Escherichia coli</i>	144
30	Log de UFC/g de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> , em função do tempo.....	145
31	Equações da reta, coeficiente de correlação (r) e valores D, obtidos para a formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> , utilizando como microrganismo desafiante <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	147
32	Log de UFC/g de <i>Candida albicans</i> , na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> , em função do tempo.....	148
33	Log de UFC/g de <i>Arpergillus niger</i> , na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i> , em função do tempo.....	149

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EMB	Eosina-azul de metileno
Ext.	Extrato
m/v	Massa/volume
MH	Muller Hinton
MN	Micronúcleo
MOPS	Ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico– Acros Organics
MTS	(5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil) tetrazólio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NCEs	Eritrócito normocromático
O/A	Óleo em água
P.A.	Pró-análise
PBS	Tampão salina fosfato
PCEs	Eritrócito policromático
PMS	Metassulfato de fenazida
PNA	Polifenóis não adsorventes
PT	Polifenóis totais
SFB	Soro fetal bovino
SM	Solução-mãe

Sol.	Solução
ST	Solução-teste
Trad MCN	Teste do micronúcleo em <i>Tradescantia pallida</i>
TSI	Tríplice Açúcar-Ferro
UFC	Unidade formadora de colônia
WHO	<i>World Health Organization</i>
XLD	Xilose-Lisina-Desoxicolato

RESUMO

A necessidade da introdução de novos princípios ativos naturais no arsenal farmacêutico e/ou cosmético tem sido pesquisado, devido ao aparecimento de formas bacterianas resistentes, decorrentes, principalmente, do uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, que possam ser utilizados como anti-sépticos ou como conservantes de preparações farmacêuticas ou cosméticas. Dentro disto foi realizado o estudo da atividade antimicrobiana com o extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* (Myrtaceae), fundamentado com os usos populares descritos para este vegetal, popularmente conhecido, no Brasil, como jambolão, jamelão ou azeitona-roxa. Para garantir-se a autenticidade da droga vegetal, realizou-se estudo morfo-anatômico do material colhido. O extrato vegetal foi preparado pelo método da percolação, utilizando como solvente etanol: água (50:50). Após validação de metodologia para o doseamento do extrato, foram realizados ensaios de citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, avaliação da atividade antimicrobiana e possível emprego como conservante após sua aplicação em preparações para uso externo: sabonete líquido, gel com polímero sintético e emulsão não-iônica. O estudo morfo-anatômico identificou glândulas secretoras de óleos essenciais, drusas e idioblastos tânicos, característicos da família Myrtaceae. O método espectrofotométrico foi validado para análise quantitativa do extrato produzido, garantindo confiabilidade aos resultados obtidos. O estudo de citotoxicidade apresentou índice de morte celular IC_{50} na concentração de 400,0 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *S. cumini*. A frequência de micronúcleos, em células da medula óssea de camundongos, não demonstrou efeito mutagênico em 24 e 48 horas após administração do extrato seco dos frutos de *S. cumini*. O ensaio do micronúcleo em *T. pallida*, realizado para a avaliação da mutagenicidade demonstrou efeito mutagênico nas concentrações de 1250,0 e 2500,0 $\mu\text{g/mL}$. O teste de Ames não detectou mutagenicidade. A genotoxicidade, avaliada pelo ensaio do cometa, foi positiva para as concentrações de 25,0; 50,0 mg/kg para o tempo de 24 horas. O controle microbiológico do extrato seco dos frutos de *S. cumini* e das formulações de sabonete líquido, de gel e da emulsão não-iônica, demonstrou ausência de crescimento microbiano de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Na contagem do número total de bactérias e de fungos ocorreu crescimento inferior a 10 UFC/g de amostra, valor aceito pelos compêndios oficiais. Para a determinação da concentração bactericida e fungicida mínima do extrato, a maior sensibilidade apresentada foi na concentração de 78,1 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. epidermidis*. Para os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. krusei*, as concentrações necessárias foram de 312,5; 625,0 e 625,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para os demais microrganismos como *E. coli*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, a atividade foi considerada baixa. Nas determinações da concentração bactericida e fungicida mínima das formulações propostas com o extrato, observou-se que o sabonete líquido adicionado de extrato apresentou maior atividade. Para o teste de desafio para bactérias, as formulações com o extrato apresentaram atividade conservante significativa quando comparadas com as formulações isentas do extrato. O extrato se apresentou ineficaz neste tipo de ensaio realizado para fungos. O mesmo extrato dos frutos de *S. cumini* mostrou-se seguro sob o ponto de vista toxicológico, quando aplicado nas concentrações propostas; seu emprego como conservante foi detectado, somente, frente a algumas espécies de bactérias Gram positivas, não apresentando adequada atividade frente aos fungos e a bactérias Gram negativas.

Palavras-chave: *Syzygium cumini*; jambolão; teste de segurança; validação; atividade antimicrobiana; teste de desafio.

ABSTRACT

The need for introducing new active principles to the pharmaceutical and/or cosmetic arsenal has been researched, due to the surge of resistant bacterial forms, stemming basically from the indiscriminate use of antimicrobial agents. The interest in obtaining new material with antimicrobial activity that can be used as antiseptics or as preservatives for pharmaceutical or cosmetic preparations led to a study on antimicrobial activity with the dry extracts of the fruit from *Syzygium cumini* (Myrtaceae). Such an interest is directly related to the popular uses of this plant, popularly known in Brazil as jabolão, jamelão or black plum. To assure the authenticity of the vegetable drug, a morpho-anatomical study has been performed on the material collected. The extract was prepared by percolation method, using ethanol:water (50:50) as a solvent. After validating the methodology for determining dosage extract, tests have been performed for citotoxicity, mutagenicity, genotoxicity, evaluation of antimicrobial activity and possible use as a preservative after its application in preparations for external use: liquid soap, gel with synthetic polymer and non-ionic emulsion. The morpho-anatomical study identified secretion glands of essential oils, druses and tannic idioblasts, characteristic of the Myrtaceae family. The spectrophotometric method was validated for quantitative analysis of the extract produced. The citotoxicity study showed a cell death index of IC_{50} in the concentration of 400.0 $\mu\text{g/mL}$ of the *S. cumini* extract. The frequency of micronuclei, in bone marrow cells in mice, did not show mutagenicity effect at 24 and 48 hours after administration of dry extract of fruit from *S. cumini*. The test for micronucleus in *T. pallida*, performed for evaluation of the mutagenicity showed a mutagenic effect in the concentrations of 1250.0 and 2500.0 $\mu\text{g/mL}$. The Ames test did not detect mutagenicity. Genotoxicity, evaluated by the comet test, was positive for concentrations of 25.0; 50.0 mg/kg for a period of 24 hours. The microbiological control of the dry extract of the *S. cumini* fruit and the formulations of liquid soap, gel and non-ionic emulsion showed an absence of microbial growth in the *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. When the total number of bacteria and fungi was counted there was a growth lower than 10 UFC/g of the sample, a number accepted by official compendia. For determining minimal bactericide and fungicide concentration of the extract, the greatest sensitivity presented was in the concentration of 78.1 $\mu\text{g/mL}$ of *S. epidermidis*. For microorganisms *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. krusei*, the necessary concentrations were 312.5; 625.0 and 625.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. For the remaining microorganisms such as *E. coli*, *C. albicans* and *C. parapsilosis*, the activity was considered low. In determining concentration of minimal bactericide and fungicide of the formulations proposed with the extract, it was observed that the liquid soap with the added extract presented greater activity. For the test of bacterial challenging, the formulations with the extract presented a significant preservative activity when compared with the formulations that did not have the extract. The extract has proved ineffective in this type of test done for fungi. The fruit extract of *S. cumini* showed to be secure and safe from the toxicological point of view when applied in the proposed concentrations; its use as a preservative was detected only with some species of Gram positive bacteria, not showing adequate activity in fungi and Gram negative bacteria.

Key words: *Syzygium cumini*; “jabolão”; security test; validation; antimicrobial activity; challenge test.

1. INTRODUÇÃO

Desde a Antigüidade, as plantas são recursos terapêuticos ao alcance do ser humano. Durante milênios, o homem, empiricamente, aprofundou seus conhecimentos visando a melhoria nas condições de alimentação e a cura de suas enfermidades, demonstrando uma estreita inter-relação entre o uso das plantas e sua evolução. É fato que, no passado, o homem, quando acometido de seus males, recorria a alguma fonte de poder curativo. Na perspectiva da pesquisa natural, o homem encontrou nas plantas, virtudes, cujo valor tornou-se reconhecido e por tantas vezes, foi considerado como mágico e até alquimista, sendo transmitido de geração a geração (SANTOS, 2006).

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

De acordo com a OMS, devido à pobreza e ao difícil acesso à medicina moderna, cerca de 65 a 80% da população mundial, que vivem em países em desenvolvimento dependem essencialmente das plantas medicinais como primeiro recurso ao cuidado com a saúde (CALIXTO, 2000).

Muitas empresas estão conscientes das tendências de consumo e buscam novos ingredientes para incorporar aos produtos já existentes e aos que poderão ser desenvolvidos no futuro. Existe uma tendência, em se buscar, por parte da população, produtos baseados em princípios ativos naturais ou fitoterápicos (NOVACOSKI, TORRES, 2005). No entanto, como toda substância incorporada em produto tópico é capaz de ser absorvida pela pele e mucosas e pode provocar efeitos tóxicos, existe a necessidade de garantir a inexistência de qualquer risco de efeito tóxico antes que o produto ou preparação seja comercializada (SIQUEIRA, 2004).

Aliteratura menciona que apenas 14 % dos recursos vegetais disponíveis são conhecidos adequadamente. Existem aproximadamente 250.000 espécies no planeta, sendo que no Brasil existe

cerca de 55.000 delas, uma das mais importantes biodiversidades do planeta, porém, apenas 2 % é conhecida (BABY et al., 2005).

A necessidade da introdução de novos princípios ativos no arsenal farmacêutico é absoluta. Em se tratando de antimicrobiano, tal necessidade torna-se mais evidente ao considerar-se o aparecimento de formas bacterianas resistentes, decorrentes, principalmente, do uso indiscriminado e mal orientado deste tipo de produto (CALIXTO, 2000; OLIVEIRA et al., 2006).

Dentro desse contexto, o interesse pelas plantas com propriedades antimicrobianas tem evoluído com amplas perspectivas, e a primeira grande preocupação refere-se à qualidade de tais plantas, pois são bastante conhecidas as características deste segmento no sentido de apresentarem adulterações, falsificações freqüentes e toxicidade (ZAUPA et al., 2000). Somente, por meio de adequado controle da qualidade da droga vegetal é possível garantir também a necessária eficácia e segurança dos produtos farmacêuticos, cosméticos e correlatos preparados a partir de drogas vegetais. Análises físico-químicas, microbiológicas e toxicológicas são importantes para o controle da qualidade de tais produtos. Entretanto, nem todas as drogas vegetais possuem parâmetros estabelecidos que possam contribuir para o controle da qualidade (GARCIA et al., 2008; BABY et al., 2005).

É importante destacar que na área da fitoterapia existe a necessidade de realizar estudos adequados para o desenvolvimento de fitoterápico e dos produtos que incorporem insumos naturais. No caso de antimicrobianos, espera-se um produto ativo contra microrganismos presentes na pele, couro cabeludo ou boca, bem como no próprio produto acabado (BABY et al., 2005).

Baseado no exposto, e considerando o fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, popularmente conhecido como jambolão, material abundante e já referenciado por suas diversas propriedades, inclusive antimicrobianas, demonstrou ser bastante interessante a possibilidade do estudo do morfo-anatômico do fruto, a validação da metodologia para realização do doseamento, o estudo da atividade antimicrobiana e efeito conservante, a citotoxicidade, a genotoxicidade e a mutagenicidade desta planta e também a incorporação do extrato em formulações cosméticas em geral, de uso

tópico. Tais procedimentos visam colaborar de modo a ampliar os conhecimentos sobre a atividade dos extratos vegetais, bem como estudos sobre a toxicidade, que permitirão atingir maior segurança em relação ao usuário.

2. OBJETIVOS

- Realizar estudo morfo-anatômico dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels.
- Validar metodologia de doseamento de substâncias marcadoras do extrato seco dos frutos de *S. cumini* (L.) Skeels.
- Avaliar a atividade citotóxica, mutagênica e genotóxica do extrato dos frutos de *S. cumini* (L.) Skeels.
- Desenvolver formulações de uso tópico como emulsão não iônica, gel de carbômero e sabonete líquido incorporado o extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* (L.) Skeels.
- Avaliar controle microbiológico e atividade antimicrobiana nos extratos e nas formulações cosméticas emulsão, gel e sabonete líquido contendo extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* (L.) Skeels.
- Realizar o teste de desafio das formulações contendo extrato dos frutos de *S. cumini* (L.) Skeels.

3. REVISÃO DA LITERATURA

O grande incremento do uso de plantas medicinais no final do século passado evidencia a necessidade de se desenvolverem métodos que facilitem a enorme tarefa de avaliar cientificamente o uso terapêutico de diversas espécies vegetais. Estudos relativos à morfologia vegetal, composição química, propriedades farmacológicas, toxicológicas e controle da qualidade estão sendo sistematicamente conduzidos e indiscutivelmente permitirão reduzir o tão comum empirismo envolvido na aplicação terapêutica de vegetais (SIMÕES et al., 2003; KONG et al., 2003).

3.1. *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Syzygium cumini (L.) Skeels (Figura 1) é uma árvore nativa dos trópicos, particularmente da Índia, bem como da Tailândia, Filipinas e Madagascar. A planta foi introduzida em muitos países tropicais pertencentes à África e à América Latina. No Brasil é encontrado em diversos estados das regiões Sudeste, Nordeste e Norte. Pode também ser encontrado em algumas regiões subtropicais como a Flórida e a Califórnia nos Estados Unidos, Argélia e Israel (ROSS, 1999; ALBERTON et al., 2001; MAHMOUD et al., 2001; GROVER et al., 2001; PEPATO et al., 2004; MORTON, 2008; VEIGAS et al., 2007).



Figura 1: a) Exemplar urbano de *Syzygium cumini*; b) frutos de *Syzygium cumini*

Uma das dificuldades encontradas no estudo dos vegetais diz respeito aos diversos nomes populares que um mesmo vegetal pode apresentar. Colabora, ainda, para dificultar, o fato de um mesmo vegetal com diversos nomes populares, apresentar também, mais de uma denominação científica. *Syzygium cumini* (L.) Skeels é conhecido no Norte e Nordeste do Brasil por azeitona roxa, e por jambolão em outras regiões do país. Por outro lado, este mesmo vegetal, apresenta outras sinonímias científicas, como *Eugenia jambolana* (L.), *Syzygium jambolanum* (L.), *Syzygium caryophyllifolium* (L.) entre outros (MIGLIATO, 2005).

Syzygium cumini destaca-se por ser rico em vários constituintes. A literatura relata suas ações hipoglicemiante, antimicrobiana, hipotensiva, diurética, cardiotônica, adstringente, antiinflamatória, antiemética, estimulante do sistema nervoso central, antipirética, anticonvulsivante, anti-hemorrágica, carminativa e antiescorbútica (ALBERTON et al., 2001; LORENZI e MATOS, 2002; ZANOELLO et al., 2002; DAMASCENO et al., 2002; TIMBOLA et al., 2002; SHARMA et al., 2003; BANERJEE et al., 2005; RAVI, RAJASEKARAN, SUBRAMANIAN, 2005; VILLASENOR e LAMADRID, 2006; MIGLIATO et al., 2006; SHARMA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; SULTANA et al., 2007; VEIGAS et al., 2007).

Segundo Loguercio e colaboradores (2005), as folhas de *S. cumini* são ricas em taninos e saponinas. Tanto a casca como as folhas e as sementes são bastante adstringentes. O suco dos frutos é utilizado como adstringente, diurético, antidiabético e estomáquico. As propriedades adstringentes da casca são utilizadas contra diarreias crônicas, disenteria e menorragia. A decocção da casca é um eficaz enxagüante bucal no tratamento de aftas, estomatites, afecções da garganta e outras doenças das vias orais, leucorréia, úlcera venérea, purificação de sangue, interrupção de hemorragia nas fezes, disenteria, dispepsia, asma, bronquite, queimaduras, retenção urinária e descamações do couro cabeludo (MORTON, 2005; ANANDHARAJAN et al., 2006; MIGLIATO et al., 2006; SHARMA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; SULTANA et al., 2007).

O termo “tanino” é um nome genérico descritivo para um grupo de substâncias poliméricas fenólicas capazes de curtir couro ou precipitar gelatina em solução, propriedade conhecida como

adstringência. São encontradas na maioria dos órgãos vegetais, como casca, caule, folhas, frutos e raízes. Muitas atividades fisiológicas humanas, como a estimulação das células fagocíticas e a ação tumoral mediada por hospedeiro, além de uma larga faixa de atividades anti-infecciosas, têm sido atribuídas aos taninos (LOGUERCIO, 2005).

Taninos e outros compostos fenólicos vêm sendo reconhecidos por possuírem alto potencial antimicrobiano. Tal afirmação encontra respaldo ao confirmar o uso de plantas medicinais ricas em polifenóis para obtenção de efeito antimicrobiano (KOŁODZIEJ et al., 2003; BUGNO et al., 2007).

Tanino é um termo utilizado para designar substâncias de origem vegetal capazes de transformar “peles frescas em couro”. Estas substâncias encontram-se difundidas em plantas e alimentos de origem vegetal, como, por exemplo: legumes, sementes, grãos cereais e algumas bebidas como o vinho, o chá de ervas, a cidra e o cacau (BUELGA e SCALBERT, 2000). São metabólitos secundários de plantas superiores, possuem massa molecular entre 500 e 3000 Daltons (MELLO e SANTOS, 2003); são solúveis em água e apresentam propriedades especiais como a de precipitar proteínas e alcalóides. A capacidade de precipitar proteínas, particularmente salivares da cavidade oral, caracteriza o sabor adstringente dos taninos e possibilita seu fácil reconhecimento em frutos verdes. Tal propriedade é relevante para a proteção do vegetal frente ao ataque de alguns patógenos e herbívoros.

Estruturalmente, os taninos possuem 12 a 16 grupos fenólicos e 5 a 7 anéis aromáticos com 1000 unidades relativas de massa molecular. São divididos segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poli-ol central, geralmente β -D-glucose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com ácido gálico (MELLO e SANTOS, 2003).

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas unidades ou mais de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Esta classe também é denominada de proantocianidina ou leucocianidinas (MELLO e SANTOS, 2004), pelo fato de cederem

antocianidinas (cianidina, delphinidinas) após a degradação com ácido mineral diluído à quente (BUELGA e SCALBERT, 2000; MELLO e SANTOS, 2004).

Os taninos condensados são formados por unidades elementares de flavan-3-ol com ligações C-C e ocasionalmente ligações C-O-C. Os flavan-3-óis possuem um esqueleto típico flavonóidico com ligações C₆-C₃-C₆ (BUELGA e SCALBERT, 2000).

A toxicidade dos taninos para com os microrganismos tem sido bem documentada. Tais pesquisas envolvem vários campos, entre eles: alimentos, plantas, solos, patologia de plantas, farmacologia e nutrição humana e animal (SCALBERT, 1991; MONTALVO et al., 2005). As substâncias antibióticas ou antimicrobianas representam um avanço na farmacoterapia e suas pesquisas têm crescido significativamente nas últimas cinco décadas (SANCHES, 2004).

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

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

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

Akiyama e colaboradores (2001), investigando a atividade antimicrobiana de diversos taninos frente a *Staphylococcus aureus*, demonstraram que o ácido tânico é um ótimo adjuvante no tratamento de infecções da pele.

3.2. Controle microbiológico do extrato dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

As plantas medicinais constituem importantes fontes de compostos bioativos e atualmente têm sido incorporadas em diversas formulações farmacêuticas industrializadas ou manipuladas de forma magistral. O uso seguro e eficaz de fitoterápicos envolve as análises físico-químicas e microbiológicas das matérias-primas e do produto acabado como etapa preliminar para alcançar o padrão de qualidade necessário ao produto farmacêutico. Embora diversos estudos tenham demonstrado a necessidade de garantir segurança aos produtos de origem vegetal (BAUER e TITTEL, 1996; BRANDÃO et al., 2002; CHOI et al., 2002; BAST et al., 2002; MELO et al., 2004), a aplicação e a validação de métodos analíticos para matérias-primas à base de plantas ainda são escassas na literatura (RIBEIRO et al., 2005).

Um aspecto importante no extrato de plantas e no desenvolvimento de formulações cosméticas está relacionado ao controle da contaminação microbiológica. Relatos da literatura revelam que esta preocupação iniciou-se nos Estados Unidos quando se detectou uma preparação oftálmica contaminada por *P. aeruginosa*. Isto desencadeou uma enorme suspeita sobre vários produtos, principalmente sobre os cosméticos, dos quais não se exigia o controle rígido quando comparado às preparações farmacêuticas em geral. Essa suspeita levou a uma pesquisa envolvendo 250 produtos de grande consumo. Os resultados mostraram que 24 % dos produtos estavam contaminados por microrganismos potencialmente patogênicos e outros 13 % por microrganismos não patogênicos ao homem, mas que poderiam causar alterações variadas nos produtos cosméticos elaborados (SILVA e NETTO, 2002).

As contaminações microbianas de medicamentos e cosméticos podem causar alterações das suas características sensoriais, tornando-os impróprios para o uso e promovendo a degradação de componentes da formulação, podem comprometer a eficácia e segurança ou ainda causar danos à saúde dependendo do tipo do microrganismo presente, da via de administração utilizada e do estado de saúde do usuário (BAIRD e BLOOMFIELD, 1996; PINTO et al., 2003).

Segundo Orth (1993), os extratos vegetais estão num padrão de contaminação de risco três, ou seja, apresentam risco moderado de contaminação, pois podem promover o crescimento microbiano.

Atualmente, no entanto, o consumidor tem se tornado cada vez mais exigente e mais criterioso com a qualidade do produto que consome. É crescente a sua preocupação em fazer uso de produtos menos agressivos de origem natural ou o mais próximo possível desta origem. Esta é a realidade à qual está submetida também a indústria cosmética cuja inclusão de ativos utilizando produtos naturais tornou-se bastante freqüente. Dentro deste contexto, uma interessante característica para estas formulações com apelo natural ou botânico seria possível a inclusão de um conservante também natural, minimizando, desta forma o emprego dos já tradicionais conservantes sintéticos.

3.3. Teste de segurança

3.3.1. Teste de citotoxicidade

Ensaio de toxicidade celular sempre foram entre os métodos de bioensaios, os primeiros a serem realizados para predizer a toxicidade de substâncias a vários tecidos. Numerosas técnicas *in vitro* foram desenvolvidas para avaliações de citotoxicidade e genotoxicidade de compostos tóxicos (SILVA et al., 2004). A principal vantagem da avaliação de toxicidade em culturas de células em relação aos ensaios tradicionais de toxicidade *in vivo* realizados em camundongos, é que em relação aos primeiros se espera uma resposta mais simples, sensível, econômica e homogênea (FERNANDES et al., 2005).

Apesar dos avanços tecnológicos, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos no processamento das lesões induzidas no DNA e como estas lesões poderiam resultar em aberrações cromossômicas. No entanto, sabe-se que tais alterações estruturais podem também indicar mudanças na homeostase celular, as quais são importantes na instabilidade genômica e cruciais para a compreensão dos processos de mutagênese e carcinogênese (GALLOWAY, 1994).

Além da genética, técnicas de cultivo celular têm contribuído significativamente para o desenvolvimento da biomedicina, sendo fundamentais na compreensão da biologia celular-molecular e com grande aplicação em farmacologia, biologia reprodutiva e oncologia (BARILE, 1994).

Métodos *in vitro*, que medem o potencial citotóxico de substâncias, foram introduzidos na década de 80 e continuam sendo desenvolvidos para obtenção de *endpoints* citotóxicos mais sensíveis (RIDEL et al., 1986). Os testes de citotoxicidade usados medem a concentração da substância que danifica componentes, estruturas ou vias bioquímicas a situações análogas *in vivo* (BACON et al., 1990; BALLS e CLOTHIER, 1992; FRESHNEY, 1994).

Cerca de 20 diferentes critérios são utilizados na determinação da toxicidade geral. As células são expostas a diferentes concentrações da substância-teste por um período de tempo e, posteriormente, o grau de inibição de viabilidade e/ou condições funcionais das células são avaliados. Os métodos mais utilizados são: análise histológica através de microscopia comum, número, morfologia, crescimento, divisão e metabolismo celular, integridade de membrana, atividade mitocondrial, lisossomal e ribossomal. Critérios menos comuns, mas também de grande valor (estudos mecanísticos), são: análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão, frequência mitótica utilizando análise cariotípica, retenção do azul de tripan entre outras (BARILE, 1994).

Algumas técnicas para determinação de citotoxicidade utilizam substâncias que são incorporadas ou transformadas em produtos coloridos apenas por células vivas, mas não por células mortas ou são transformados pelo próprio meio de cultivo. A formação desses produtos reflete o *endpoint* tóxico e quantifica o número de células viáveis, mostrando uma relação linear entre esses dois parâmetros (WILSON, 1992).

Os métodos colorimétricos são realizados em placas de microtitulação, leitura em espectrofotômetro multicanal automático e oferecem vantagens como simplicidade, rapidez, custo e segurança. A técnica desenvolvida por MOSMANN (1983) baseia-se na quebra do sal de MTT-

tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio), o qual é reduzido em produto corado por enzimas microssomais e, em menor parcela, pela enzima mitocondrial succinato-deidrogenase. Esta reação ocorre exclusivamente em células vivas e a quantidade de formazana formada é proporcional ao número de células viáveis (BERRIDGE, 1986; VISTICA, 1991). Outro método colorimétrico utiliza o vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-*n*-dimetilamino-2-metilfenazina), corante supra vital, fracamente básico, catiônico e solúvel em água, que é absorvido pelas células por pinocitose ou transporte ativo através da membrana plasmática e acumulam-se apenas nos lisossomas de células vivas (BABICH e BORENFREUND, 1992). Pode também ser utilizado o procedimento originalmente desenvolvido por Borefreund e Puerner (1984) para a triagem de agentes citotóxicos, em geral, sobre uma monocamada de células. O método é baseado na avaliação quantitativa de células viáveis, após a exposição ao agente tóxico, pela incubação com o corante supravital do composto tetrazólio MTS e a um agente acoplador de elétrons metassulfato de fenazida (PMS). O MTS é biorreduzido pelas células a um produto que é solúvel no meio de cultura e, então, efetuada a análise colorimétrica de acordo com Barltrop e colaboradores (1991). A quantidade de MTS, o marcador da viabilidade celular, incorporado pela população de células, é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura. As amostras testadas, que induz a toxicidade celular, é medida em um intervalo de concentrações do extrato, e a concentração que produz uma redução de 50% na absorção de MTS é tomada como o parâmetro de citotoxicidade (TADDEI et al., 2007).

A descoberta de novos agentes químicos com atividade biológica é, sem dúvida, uma atividade multidisciplinar, onde os estudos sobre eficácia, mecanismos de ação, potencial tóxico e genotóxico dependem de bioensaios fármaco-toxicológico *in vitro* e *in vivo* para que estas substâncias possam ter confirmado suas atividades frente a estes aspectos. Apesar dos testes celulares *in vitro* não substituírem os testes em animais para avaliação da atividade biológica de diversas substâncias, inicialmente, estes testes são aplicados em estudos-piloto de novos fármacos servindo como modelo econômico para uma rápida triagem de xenobióticos.

3.3.2. Teste do micronúcleo em *Tradescantia pallida*

As plantas são reconhecidas como excelentes indicadoras de efeitos genotóxicos e citogenéticos de elementos químicos do meio e são aplicáveis na avaliação de mutagênese ocasionada por fatores químicos. Os testes são altamente confiáveis com alta sensibilidade para o monitoramento da mutagenicidade de compostos químicos (SUMITA et al., 2003). Estudos prévios, avaliando a atividade mutagênica de compostos químicos e agentes físicos, utilizaram várias espécies e clones do gênero *Tradescantia*. Essa planta é em geral eleita para estudos de mutagenicidade, por apresentar uma série de características genéticas favoráveis, como, por exemplo, apenas seis pares de cromossomos grandes e facilmente observáveis, bem como a presença de células passíveis de observação em quase todas as partes da planta, da raiz ao tubo polínico (MA e GRANT, 1982; KLUMPP et al., 2006).

A base para o desenvolvimento deste ensaio está no fato de que o maior problema na avaliação quantitativa das aberrações cromossômicas está na perda dos cromossomos em metáfase I e sua imagem difusa nas preparações das células em meiose. Entretanto, se o agente é aplicado no início da prófase I e o cromossomo prossegue por um período de recuperação, os fragmentos acêntricos dos cromossomos transformam-se em micronúcleos, na fase de tétrade da meiose, facilmente identificados à microscopia de luz (CARVALHO, 2005).

A *Tradescantia* é uma planta herbácea que apresenta fácil adaptação em qualquer ambiente e pode se desenvolver durante todo o ano, tanto ao ar livre, nas regiões subtropicais, quanto em estufas, em qualquer parte do mundo. O tamanho, relativamente pequeno, e o código genético composto por seis pares de cromossomos grandes tornaram esta planta um instrumento favorável para estudos citogenéticos.

A *Tradescantia* pertence à família Commelinaceae, geralmente chamada de erva-da-fortuna, é uma planta pequena (algumas espécies têm menos que 50 cm de altura), sendo um modelo favorável para estudos citogenéticos, pois tem a capacidade de sustentar seu estado reprodutivo e aumentar o brotamento e as flores para suplementar a falta de luz durante os dias curtos de inverno

(MA, 1981). No Estado de São Paulo, a *Tradescantia pallida* (Rosa) cv. *purpurea* (Figura 2) é largamente distribuída em jardins de ornamentação, margens de estrada e ruas, devido à sua natural resistência e fácil propagação (BATALHA et al., 1999). Também pode ser encontrada em jardins de parques públicos e ruas de Araraquara, bem como no Horto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Pelo menos quatro características são selecionadas como indicadores em bioensaios de avaliação de toxicidade genética. Dois destes ensaios, o da mitose em ponta de raiz e o do tubo polínico, permitem avaliar aberração cromossômica observada pela deformação morfológica visível nos cromossomos (MA, 1982). Um terceiro ensaio, o da mutação para célula cor-de-rosa do pêlo estaminal (Trad-SHM) é um teste de mutação mitótica pontual, que se baseia na expressão de um gene recessivo para cor da flor em plantas heterozigotas (UNDERBRINK et al., 1973). O quarto ensaio é um teste citogenético que se baseia na formação de micronúcleos (Trad-MCN), que resultam da quebra cromossômica nas células meióticas geradoras do pólen (MA, 1979).

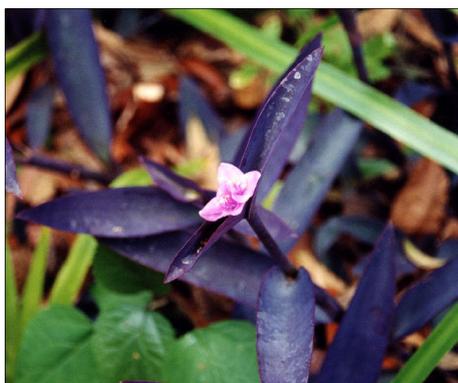


Figura 2: *Tradescantia pallida*

Alguns sistemas indicadores têm definido o teste de MN em plantas como teste de mutagênese de tipo II (ENNEVER et al., 1998), ou seja, que apresentam alta sensibilidade e baixa especificidade. A maioria dos bioensaios vegetais é considerada teste do tipo II, com especial frequência para os ensaios com micronúcleo e o do pêlo estaminal em *Tradescantia*, bem como o ensaio do grão de pólen ceroso em milho (ENNEVER et al., 1998).

3.3.3. Teste do micronúcleo (MN) em camundongos

O teste de micronúcleos *in vivo* foi criado para distinguir citologicamente, de forma fácil e rápida, quebras ou perdas cromossômicas. O teste de micronúcleos tem vantagens importantes sobre as análises de cromossomos metafásicos, porque é capaz de indicar perdas no conjunto cromossômico, assim como distúrbios no aparato do fuso (SCHMID, 1975).

O teste do micronúcleo (MN) foi utilizado pela primeira vez em plantas por EVANS e colaboradores (1959), e posteriormente em medula óssea de ratos, sendo idealizado como um método citogenético quantitativo para avaliar a frequência de danos cromossômicos “*in vivo*” em células nucleadas (HEDDLE, 1973; SCHMIDT et al., 1975; VANPARYS et al., 1992). Este teste permite a correlação entre a formação de MN, na medula óssea ou em eritrócitos periféricos, e os danos genéticos nas células expostas ao agente genotóxico (PARRA, LOPEZ, RUIZ, 1999; RODGERS e BAKER, 2000).

Os danos no DNA, formados espontaneamente ou induzidos por substâncias químicas, podem ser reparados e processados, mas, muitos deles, podem levar à formação de aberrações cromossômicas. Estas aberrações, dependendo do tempo de exposição ao agente, podem afetar a fidelidade da mensagem genética, levando a mudanças celulares irreversíveis e resultando em efeitos letais às células (NATARAJAM e OBE, 1984; JAYAPRAKASHA et al., 2007).

Os estudos de danos ao DNA induzido por substâncias de origem natural ou sintética são essenciais na toxicologia genética, uma vez que mutação em cromossomos é um evento importante na carcinogênese e, compostos antitumorais clássicos, como a ciclofosfamida, são agentes potencialmente genotóxicos (FENECH, 2005).

Durante a divisão celular, o material genético é duplicado e igualmente distribuído entre as duas células filhas. Radiações e substâncias químicas podem ocasionar quebra ou dano cromossômico, afetando a distribuição do material genético entre as células filhas. O micronúcleo é literalmente um núcleo pequeno, considerado um produto de quebra do DNA genômico de células eucarióticas. Partes ou pedaços dos cromossomos, resultantes desse dano, podem ser distribuídos a

qualquer uma das células filhas, e, ao não ser incorporado no novo núcleo, pode se apresentar sob a forma de micronúcleo claramente observável à microscopia óptica comum (AZEVEDO et al., 2003).

Os micronúcleos são originados de fragmentos acêntricos de cromossomos ou danos cromossômicos os quais são ocasionados por: a) perda mitótica de fragmento acêntrico; b) ação mecânica ocasionando quebra cromossômica; c) danos cromossômicos ocasionados por falha no filamento mitótico durante a anáfase ou d) apoptose (HEDDLE et al., 1991).

No momento da identificação da frequência de micronúcleos de células nucleadas, alguns critérios devem ser seguidos: a) apresentarem-se morfológicamente idênticos, porém menor do que o núcleo da célula e com refração similar; b) apresentarem diâmetro entre 1/3 a 1/6 do tamanho do núcleo; c) apresentarem a forma ovalada ou arredondada. A frequência de micronúcleos depende do tipo de célula avaliada, por exemplo, em células epiteliais da mucosa oral e vaginal de humanos, estima-se que possa ocorrer de 0 a 1 micronúcleos por 2000 células analisadas (GÁTTAS et al., 1992; DAVIES et al., 1998; RAMIRES et al., 1999).

Devido a sua simplicidade, confiabilidade e sensibilidade, o teste tem sido requisitado para a avaliação de mutagenicidade de compostos químicos, os quais podem exercer atividades clastogênicas (capacidade ou predisposição a quebra cromossômica), aneugênicas (capacidade ou predisposição de alterar o fuso mitótico resultando na perda de cromossomo), ou ambas (TOROUS, et al., 1998). Assim, o teste de MNs é recomendado pela OECD (*Organization for Economic Co-Operation e Economic Development*) como requerimento para testes em novos produtos químicos (VANPARYS et al., 1992; BATALHA et al., 1999; RODGES e BAKER, 2000; RIBEIRO et al., 2003).

De acordo com Mavournin e colaboradores (1990), o período mínimo de aparecimento de MN é de 6 horas, tempo em que deve transcorrer a absorção do agente mutagênico no camundongo, sua metabolização no estágio final do ciclo celular, a eliminação do núcleo do eritroblasto e o aparecimento dos micronúcleos nos eritrócitos da medula óssea, incluindo os atrasos que podem

ocorrer no ciclo de divisão. Cerca de 12-24 horas depois do tratamento com o agente mutagênico, os eritrócitos presentes na medula óssea correspondem aos descendentes das células que foram expostas antes da divisão celular (HAYASHI et al., 2000).

Inúmeros estudos toxigenéticos baseiam-se em avaliar danos cromossômicos em eritroblastos de camundongos e ratos, podendo ser facilmente visualizados em eritrócitos policromáticos (células jovens). Contudo, Schlegel e Macgregor (1982) demonstram que o pico de incidência de micronúcleos em eritrócitos normocromáticos em sangue periférico (eritrócitos maduros, anucleados) é similar aos da medula óssea. Estes resultados trouxeram avanços para os estudos relacionados à mutagenicidade, pois, não há necessidade do sacrifício dos animais de laboratório (HAYASHI et al., 2000).

3.3.4. Teste de AMES

Estudos de genotoxicidade e antigenotoxicidade com plantas têm crescido juntamente com o aumento do uso terapêutico e com o interesse em comprovar a eficácia das substâncias vegetais nas mais diversas finalidades farmacológicas (CARDOSO, 2006). No entanto, muitas pessoas utilizam plantas que possuem propriedades farmacológicas, porém também podem também estar provocando alterações no DNA (SCHMITTA et al., 2003).

Vários ensaios para identificação de agentes mutagênicos e/ou genotóxicos vêm sendo desenvolvidos (MAC GREGOR et al., 2000). As mutações são detectadas freqüentemente através da expressão fenotípica causada por uma mudança súbita e hereditária no genótipo de um organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA. Basicamente, as mutações são divididas em duas grandes categorias: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na seqüência de nucleotídeos do DNA e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou na estrutura dos cromossomos e são detectadas através de

análises citogenéticas (FRIEDBERG et al., 1995; VARELLA et al., 2004). Dependendo do tipo de lesão que se quer detectar são necessários, portanto, diferentes testes (MACIEL et al., 2002).

Bactérias como *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* são utilizadas nos métodos mais amplamente empregados para detecção de mutações gênicas. Porém, como estas bactérias são organismos simples, os resultados obtidos nem sempre são válidos para células animais ou outros eucariontes. Portanto, para se obter dados sobre mutação gênica em eucariotos há testes em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), em *Drosophila* ou mesmo mutações somáticas em mamíferos, pelo teste de HGPRT (gene de hipoxantina-guanina fosforribosil-transferase, ligado ao cromossomo X dos mamíferos). Para detectar mutações cromossômicas, os testes mais utilizados incluem as aberrações cromossômicas e micronúcleos, sendo que estes testes exigem que as células estejam em estado proliferativo (LE CURIEUX et al., 1993; TICE et al., 1998, MAC GREGOR et al., 2000). Estes testes têm um sistema de validação internacional e podem ser desenvolvidos tanto *in vitro* como *in vivo*, desde que se conheça adequadamente a biologia do organismo-teste.

O teste de Ames (*Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenesis Assay*) foi o primeiro ensaio descrito para avaliação de mutagenicidade de substâncias químicas. Este teste avalia a capacidade de determinados agentes induzirem mutação gênica em diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*, através da reversão do fenótipo histidina negativo (his-) para histidina positivo (his+), em sistemas com e sem metabolização (MARON e AMES, 1983). As linhagens TA 100, TA 98 e TA 102 são utilizadas com maior frequência e detectam produtos químicos que causam mutações por deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituição dos pares de bases do DNA (MARON e AMES, 1983; MORTELMANS e ZEIGER, 2000; RIBEIRO et al., 2004).

Alguns produtos químicos necessitam ser metabolizados *in vivo* para que seus derivados apresentem atividade mutagênica. Sistemas de ativação metabólica são comumente utilizados para realização de testes *in vitro*, revelando se o composto tem ação direta sobre o material genético na sua forma original (mutágenos diretos), além de, em alguns casos, serem os responsáveis pela

inativação total ou parcial de mutágenos diretos. O sistema composto por fração microsossomal S₉ e cofatores são amplamente empregados para metabolização de substâncias químicas (MARON e AMES, 1983; VARANDA, 2006).

3.3.5. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa, também conhecido por SCG (*Single-Cell Gel*) ou SCGE (*Single-Cell Gel Electrophoresis*), consiste em uma técnica capaz de detectar danos de DNA em células individuais. É um teste relativamente novo, mas amplamente aplicado em estudos por ser facilmente manipulável, por ter baixo custo e pelo tempo reduzido para obtenção de resultados. Com esse ensaio é possível detectar danos diretos no DNA (PAX-Y-MIÑO et al., 2002).

O ensaio do cometa foi desenvolvido empiricamente através de dois protocolos básicos descritos na literatura por Singh e colaboradores, em 1988. O primeiro protocolo foi desenvolvido a fim de mensurar pequenos níveis de quebras de DNA com uma alta sensibilidade, enquanto que o segundo foi otimizado a fim de detectar uma subpopulação celular com sensibilidade variável a determinados agentes ou radiação (FAIRBAIRN et al., 1995). As vantagens desse teste incluem sua aplicabilidade a vários tecidos e/ou tipos celulares específicos, grande sensibilidade em detectar pequenos níveis de danos no DNA, necessidade de utilizar um pequeno número de células por amostra (TICE et al., 2000). Mais especificamente, o teste do cometa pertence à classe de testes indicadores (em oposição aos testes de mutagenicidade), uma vez que é capaz de detectar danos de DNA que podem vir a originar mutações (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). Em sua forma mais simples, o ensaio do cometa requer alguns passos. Primeiramente, as células são adicionadas em lâmina recoberta por agarose. Uma vez na agarose, as células e membranas nucleares são lisadas e o DNA é submetido à eletroforese alcalina; por fim, o DNA é visualizado utilizando microscópio de fluorescência após a coloração das células com corante apropriado (Figura 3) (MOLLER et al., 2000).

Nesta técnica, as células nas quais se deseja verificar o dano causado por agente genotóxico são submetidas à eletroforese em lâminas. O DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto, formando um círculo (os aspectos descritos só são visíveis após a coloração própria da técnica). Caso ocorra dano ao DNA, os fragmentos tendem a migrar mais rapidamente. Sendo o dano muito intenso em uma célula, fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa (SASAKI et al., 1997).

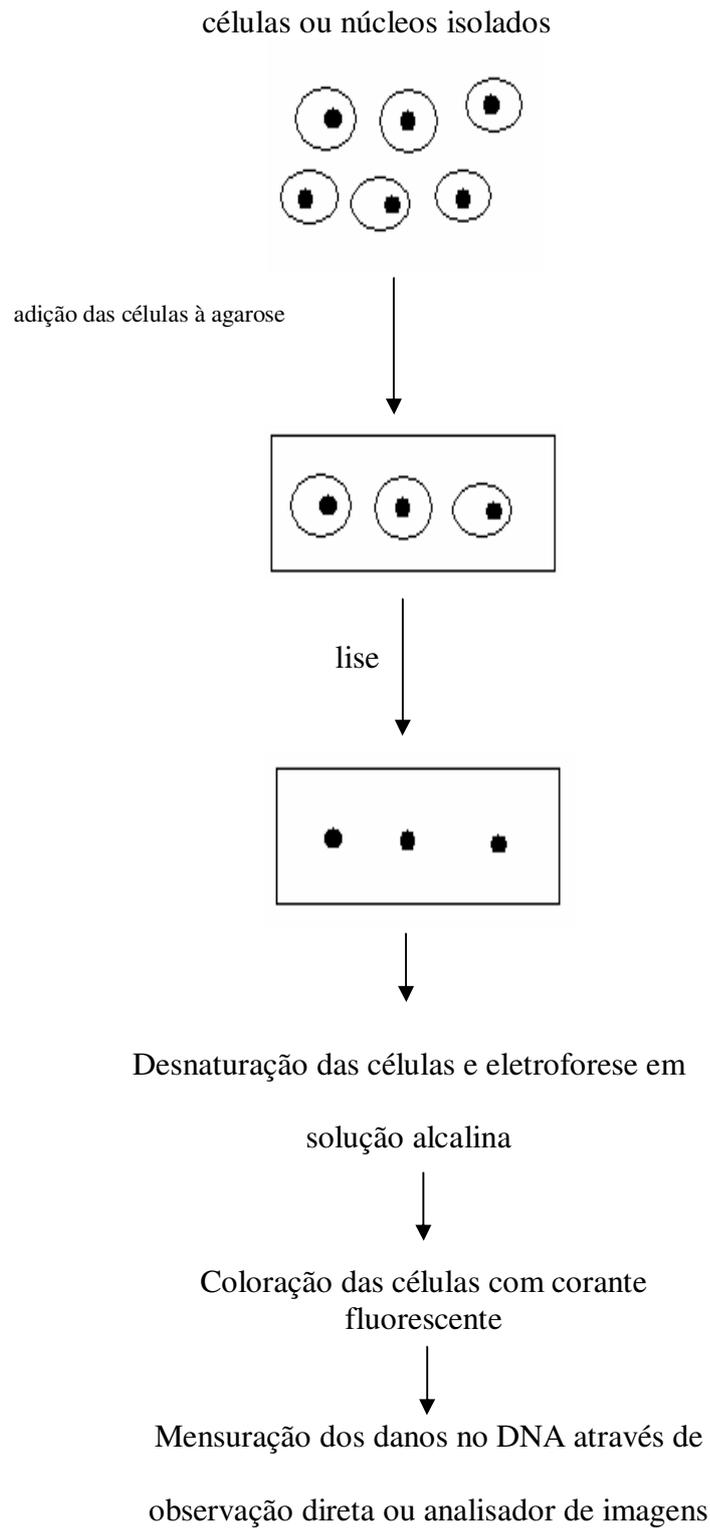


Figura 3: Procedimento do ensaio do cometa

Fonte: SINGH et al., 1988

Nos casos nos quais é relevante especular os danos ao DNA em órgãos específicos como estômago, rins, bexiga, etc, o ensaio do cometa é considerado o método mais confiável (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005), além de ser utilizado para avaliar danos genéticos tanto *in vitro*, como no caso de cultura de linfócitos, como *in vivo* no caso de sangue periférico de camundongos (DE LIMA et al., 2001). Os resultados do ensaio do cometa *in vivo* contribuem para identificar danos ao DNA definindo, o quanto um determinado agente pode ser genotóxico ou mutagênico para humanos, ou ainda, avaliar efeitos dose-resposta de determinados compostos e a probabilidade dessas substâncias gerarem efeitos adversos, podendo também ser útil no esclarecimento do mecanismo de ação de algumas substâncias. Atualmente, o teste do cometa vem sendo utilizado para avaliar tanto o potencial genotóxico como a atividade antimutagênica de produtos naturais (DE LIMA et al., 2001; RODEIRO et al., 2006) o que o torna uma ferramenta interessante para avaliar também a possível atividade genotóxica do extrato de *Syzygium cumini* complementando os resultados de micronúcleo que serão obtidos.

3.4. Formulações

Pode-se dizer que o uso de cosméticos remonta há pelo menos 30.000 anos, haja vista que os homens da pré-história, que faziam gravações em rochas e cavernas, pintavam o próprio corpo (LEONARDI, 2004).

No Antigüidade, os cosméticos e produtos de toucador tais como: leites, água de rosas, creme de pepino, entre outros eram feitos em suas próprias residências. Cada família tinha suas próprias e favoritas receitas. Foi um período para o surgimento de indústrias de matérias-primas para fabricação de cosméticos e produtos de higiene em vários países (LEONARDI, 2004).

No final do século XX, a ciência dos cosméticos, além de almejar o embelezamento, também contribuiu para a prevenção do envelhecimento da pele (BAHIA, 1998).

Os produtos cosméticos estão enquadrados em quatro categorias como: produtos de higiene, cosméticos, perfume e produto de uso infantil. Também são classificados por grau de risco, sendo

que grau 1 representa produtos com risco mínimo e grau 2 aqueles com risco potencial (ANVISA, 2000).

Como produtos classificados na categoria de produtos de higiene, têm-se os sabonetes faciais e corporais (grau 1) e os sabonetes anti-sépticos (grau 2). Para os produtos cosméticos têm-se xampus colorantes, talcos anti-sépticos, cremes para rugas, cremes clareadores de pele, cremes para mãos, todos de grau 2. A familiarização com as principais normas para os produtos cosméticos, de higiene e perfumes torna-se bastante importante no desenvolvimento de formulações (ANVISA, 2000).

Existem vários veículos que podem ser usados na preparação de formulações cosméticas, como emulsões (cremes ou loções) e géis. Esses veículos podem ser acrescidos ou não de substâncias ativas (OBUKOWHO, 2007).

A emulsão é uma dispersão cuja fase dispersa é composta por gotículas de um líquido, distribuídas num outro líquido, no qual são imiscíveis. A emulsão mais adequada para uso tópico, geralmente, é do tipo O/A, devido a seu aspecto menos oleoso e, portanto, mais agradável ao toque na pele, considerando o clima tropical (ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007; OBUKOWHO, 2007).

Reações de hidrólise de tensoativos em valores de pH extremos, processos fotoquímicos, destruição microbiana de componentes da emulsão, eletrólitos, calor ou frio, embalagens não adequadas, são alguns dos fatores que podem acelerar a separação das fases das emulsões, assim como a inversão de fases provocada pela perda de água do sistema, com a conseqüente variação da relação fase dispersa e fase contínua (ÖZER; AYDIN; YAZAN, 2007).

O gel é um sistema semi-sólido, formada por uma dispersão de partículas coloidais em um veículo líquido. Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que, quando dispersos em um meio aquoso doam viscosidade à preparação.

Os géis aquosos devem ser acrescidos de umectantes, pois tendem a apresentar um ressecamento com o tempo, devido à evaporação da água presente no gel. Além disso, é bastante

importante a adição de conservantes compatíveis e eficazes, uma vez que o gel aquoso é bastante susceptível à contaminação microbiana (ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007).

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

Os sabonetes líquidos lançados no mercado a partir de 1970 fizeram grande sucesso, pois permitiam a elaboração de preparações com pH próximo ao da pele, o que é impossível de se verificar com os sabonetes ou sabões tradicionais que possuem pH alcalinos por natureza. Além desta vantagem, estas preparações são envasadas em embalagens com sistema adequado de propulsão, que permitem a utilização da preparação de limpeza com o mínimo contato com o meio ambiente. Tal proposta vem ao encontro das necessidades de higienização e anti-sepsia rotineira e fundamentalmente naquelas referentes ao uso hospitalar e clínico laboratorial (LUNDMARK, 1992; MORGANTI, 1995).

Os produtos aquosos ou semi-aquosos como os sabonetes líquidos, as emulsões e os géis podem oferecer condições ideais para a proliferação microbiana precisando de conservação. O uso de substâncias que potencializam a atividade conservante, assim como a descoberta de possíveis componentes, que podem inativar as moléculas do sistema conservante, são exemplos desses princípios que regem a busca dos produtos naturalmente conservados (SIQUEIRA, 2004).

Selecionar e usar corretamente o sistema conservante no produto significa definir a melhor combinação de princípios ativos conservantes e sua concentração ideal e, tornou-se um apelo do mercado no sentido da facilidade e segurança de uso. No entanto, não é papel do sistema

conservante compensar o não cumprimento das Boas Práticas de Fabricação, pelo aumento da concentração do conservante, considerando um possível risco de contaminação elevada (NOSTRO et al., 2004).

3.4.1. Atividade antimicrobiana

O uso de plantas como recurso terapêutico vem sendo descrito em toda história da humanidade. O homem sempre buscou nelas “soluções para todos os seus males”. Atualmente, esta é uma das exigências do mercado consumidor que induzem, por exemplo, a indústria cosmética a formular produtos seguros, cada vez menos agressivos e naturais. Dentro deste contexto histórico, o estudo de novos ativos naturais tem avançado e busca oferecer produtos com os mais variados efeitos farmacológicos, sendo um deles a atividade antimicrobiana e conservante de cosméticos (HOSTETTMANN et al., 2003; AGRA et al., 2007; PACKER e LUZ, 2007). Segundo Novacoski e colaboradores (2005), muitas indústrias pesquisam continuamente os óleos essenciais como fontes alternativas, naturais e menos nocivas ao meio ambiente. O mesmo se refere aos extratos de plantas, cujos estudos vêm sendo amplamente incentivados por Lopes e colaboradores (2005) em pesquisas realizadas com a planta *Physalis angulata* L., que comprovou a atividade bacteriostática de formulações obtidas a partir do extrato etanólico da planta frente ao microrganismo *S. aureus*.

O uso de plantas com atividade bactericida e fungicida pode representar uma alternativa aos anti-sépticos e desinfetantes sintéticos convencionais. Tal alternativa pode minimizar ou mesmo evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana a estes compostos, uma vez que metabólitos vegetais atuam por mecanismos variados (BARBOUR et al., 2004; MONTHANA e LINDEQUIST, 2005).

A pesquisa de novos compostos com ação antimicrobiana tem levado a comunidade científica a investigar a corrida dos medicamentos versus microrganismos, pois desde o início dos anos 80 o número de antimicrobianos em fase de desenvolvimento diminuiu, enquanto que a

resistência dos microrganismos a tais agentes tem crescido de forma acelerada (ANTUNES et al., 2006).

O uso de extratos vegetais de conhecida atividade antimicrobiana pode adquirir significado nos tratamentos terapêuticos. Muitas espécies vegetais têm sido usadas, pelas características antimicrobianas, apresentadas pelos compostos sintetizados do metabolismo secundário da planta. Estes produtos são reconhecidos por suas substâncias ativas, como é o caso dos compostos fenólicos, que fazem parte os óleos essenciais e os taninos (FUNARI e FERRO, 2005; LOGUERCIO et al., 2005).

Outras pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de vegetais estão sendo realizadas, como por exemplo, com extratos de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes elaborados por Santos e colaboradores (2007), que demonstraram atividade antimicrobiana destes extratos contra bactérias Gram positivas.

Outro estudo detalhado, feito por Araújo e colaboradores (2004), avaliou a ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas, e os resultados demonstraram uma proeminente atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Cinnamomun zeylanicum*, *Coniza bonariensis* e *Lipia alba*.

A ação antimicrobiana de *Mikania triangularis*, conhecida como guacho-da-folha-fina, foi testada frente a cinco diferentes gêneros bacterianos e três gêneros de fungos, sendo comprovada atividade contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (CRUZ et al., 1996).

Os efeitos de compostos fitoquímicos avaliados mostraram a atividade antimicrobiana do ácido anacárdico sobre *S. aureus*, *Brevibacterium ammoniagenis*, *Streptococcus mutans* e *Propionibacterium acnes* (LOGUERCIO et al., 2005).

Segundo OLIVEIRA (2005), o extrato hidralcoólico de folhas de *S. cumini* mostrou-se efetivo contra *Candida albicans* e *C. krusei*. Os pesquisadores Chandrasekaran e Venkatesalu (2004) também relatam a atividade de extratos da casca de *S. cumini* frente aos microrganismos *C.*

albicans, *Arpergilus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhumurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Criptomococcus neoformans*, *Rhyzopus* sp., *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophyte* e *Microsporium gypseum*.

Há vários estudos sobre a ação antimicrobiana de extratos vegetais em cosméticos, como é o caso da *Physalis angulata* (LOPES et al., 2005) e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, este último baseado em sua riqueza em taninos capaz de estimular células fagocitárias e apresentar ação antitumoral mediada por hospedeiros, possibilitando a formação de complexos com proteínas através de forças denominadas “não-específicas”, como pontes de hidrogênio de ligações hidrofóbicas, assim como pela formação de ligações covalentes (SOUZA et al., 2007).

Considerando que a atividade anti-séptica de determinada substância deve-se à sua capacidade de impedir o crescimento ou mesmo, destruir os microrganismos-teste, a avaliação da atividade antimicrobiana de potenciais agentes anti-sépticos torna-se possível. Nestes casos, o principal objetivo é avaliar as concentrações em que determinada substância apresenta ação sobre fungos e bactérias. A atividade antimicrobiana pode ser estudada através de vários métodos, no entanto os procedimentos utilizados para determinar a atividade antimicrobiana são: técnica da inoculação em placa e a técnica de microdiluição em poços (MIGLIATO, 2005).

A técnica de microdiluição constitui-se, na atualidade, uma importante técnica para a avaliação da atividade antimicrobiana, pois além de ser um método de fácil realização, permite a análise de grande número de amostras, com economia razoável de material. O método foi validado em 1992 quando um grupo de pesquisadores publicou os resultados de um estudo multicêntrico, comparando o micrométodo com o macrométodo de diluição em caldo segundo o documento do *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. Nesta técnica, em placas que contêm 96 poços, são realizadas transferências seriadas de 100 µL entre amostra e caldo, totalizando 200 µL de volume em cada poço entre o microrganismo e a concentração do extrato. A microplaca, incubada

por 24-48 horas a 37 °C, é examinada visualmente ou espectrofotometricamente, e determinada pela turvação do meio (KOŁODZIEJ et al., 1999; ALMEIDA, 2000).

3.4.2. Teste de desafio

Os testes de desafio constituem um instrumento projetado por pesquisadores, num esforço para criar uma simulação exagerada do principal abuso de um sistema conservante, numa tentativa de prever com maior precisão a resposta normal do produto a uma exposição microbiana acidental (YABLONSKI e MANCUSO, 2004).

Testes de desafio ou teste de eficácia de conservantes fazem parte dos testes de segurança de um produto. Embora os cosméticos e medicamentos aquosos em recipientes de uso múltiplo não precisem ser estéreis, devem ser adequadamente conservados por meio de um sistema conservante. Tais produtos eliminam as bactérias contaminantes em tempo suficientemente rápido para que não se torne um perigo para a saúde e para que as preparações não passem por alterações físicas inaceitáveis (cor, odor, viscosidade, pH e outros fatores (ORTH e STEINBERG, 2003).

Segundo Stevanato (2005), conservantes são adicionados às formulações com dupla finalidade: a primeira é proteger o usuário de qualquer dano à saúde, em virtude da contaminação das preparações, a outra, é proteger a preparação, visto que a contaminação conduz à alterações drásticas nas suas características físico-químicas.

Como estas preparações estão em contato com uma variedade muito grande de microrganismos, os conservantes devem apresentar um largo espectro de ação, inativando microrganismos e impedindo a adaptação dos mesmos (ORTH, 1993; SASSEVILLE, 2004).

O espectro de ação de potenciais sistemas conservantes pode ser avaliado primariamente pelo estudo da atividade *in vitro* destes frente a determinados microrganismos, podendo, por exemplo, aplicar como método de estudo a técnica de inoculação em placa e a técnica de microdiluição em poços (ORTH e STEINBERG, 2003).

Porém, para se definir qual conservante será utilizado ou, se determinado conservante é adequado à determinada formulação, é necessário que se faça um teste de eficácia, o denominado teste de desafio, que irá determinar qual a concentração mínima da substância será efetiva para garantir que o produto se mantenha conforme a legislação específica, durante sua fabricação, na embalagem, e durante a distribuição, além de resistir a possíveis contaminações introduzidas pelo usuário em função do mau uso (INTROINI, 1985; CURRY, 1987; CTFA, 1990; ORTH, 1993; PINTO, KANEKO, OHARA, 2003; RUSSEL, 2003).

A contaminação microbiana do produto pode ocorrer durante os processos de manipulação, quando as Boas Práticas de Manipulação, não são seguidas ou a matéria prima e embalagem estão contaminadas, durante a estocagem, principalmente em condições inadequadas e finalmente, pelo consumidor quando este, não utiliza a preparação de forma adequada e introduz contaminantes (YABLONSKI e MANCUSO, 2004). Exemplo desta última situação, pode-se mencionar o uso bastante comum de determinados cosméticos no banheiro, onde as condições para a invasão e desenvolvimento de microrganismos são facilitados. É sabido que xampus são susceptíveis à contaminação por espécies bacterianas Gram (-), como *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Klebsiella*, *Achromobacter* e *Alcaligenes*. Alguns sabonetes têm sido colonizados por *Pullularia pullulans*, *Stachybotry atra*, *Scopulariopsis brevicaulis* e *Trichoderma virida*.

Como visto, a necessidade da adição de agentes antimicrobianos em formulações é uma situação bastante plausível ou evidente. Entretanto, estes procedimentos podem resultar em diminuição ou mesmo perda de potência dos agentes antimicrobianos como resultados de interações com outros constituintes da formulação, ou ainda, pela distribuição entre as fases dos componentes.

Para saber o mecanismo de ação dos conservantes é necessário realizar testes para verificar o potencial conservante baseando-se em diluição da substância em meio de cultura, com a capacidade inibitória do crescimento de cepas-padrão. Observa-se o intervalo de concentração ativa ou único ponto de letalidade, verificando as condições de incubação, com vistas à definição da atividade biocida ou biostática (ORTH e STEINBERG, 2003).

Muitos são os conservantes utilizados atualmente, porém o exemplo clássico são os parabenos que foram introduzidos nos anos 30 para uso em cosméticos, alimentos e também em medicamentos de aplicação tópica e sistêmica, na concentração de 0,1 a 0,3%. Estes se mostraram pouco efetivos frente a *P. aeruginosa*, devendo para isto, ser usados sinergicamente com outros conservantes, como a imidazolidiniluréia (um liberador de formaldeído), as isotiazolinonas ou mesmo o fenoxietanol (FRANSWAY, 1991; SONI et al., 2002). Pode-se citar também as associações metilcloroisotiazolinona/metilisotiazilona, metildibromoglutaronitrila/fenoxietanol introduzidos a partir de 1970 (BAKETER et al., 1999; FLYVHOLM, 2005; PEDERSEN et al., 2004; SASSEVILLE, 2004). No entanto, uns dos problemas encontrados, em relação aos conservantes utilizados referem-se às possíveis adaptações e até mesmo a resistência que determinados microrganismos adquirem a estes conservantes. Um destes microrganismos é *P. aeruginosa* que se mostra resistente a alguns conservantes sintéticos como os parabenos e o fenoxietanol, sendo que este último utilizado em altas concentrações (ROMANOWSK e SCHUELLER, 1995; SANTOS, 1997).

Na atualidade a conservação dos produtos farmacêuticos e cosméticos tem sido tratada de maneira científica, devido às preocupações relativas não apenas aos aspectos microbiológicos, mas também, devido ao potencial de irritação e toxicidade ao consumidor que tais substâncias apresentam. Encontrar um conservante que atenda completamente às necessidades das preparações não é tarefa fácil (NOSTRO et al., 2004).

Demonstrar a eficácia conservante de um extrato de planta requer que este tenha sua atividade antimicrobiana mantida na presença de outros insumos da fórmula (PACKER e DA LUZ, 2007).

O extrato presente na formulação deve constituir um “ambiente hostil”, no qual os microrganismos não possam crescer ou sobreviver, conferindo à preparação características antimicrobianas. Além disto, a atividade conservante deve ser suficientemente rápida para garantir

que qualquer contaminação introduzida pelo consumidor seja eliminada no período entre as aplicações ou usos (SIQUEIRA, 2004; PACKER e DA LUZ, 2007).

Inicialmente, usava-se somente o método de concentração inibitória mínima (CIM) para avaliar a eficácia dos conservantes utilizados nas formulações. O emprego ou utilização do teste de eficácia ou desafio que, apresentou como vantagens a análise da eficácia do conservante, frente aos diversos componentes da formulação. Como é sabido, a presença de diversos componentes em uma formulação pode ajudar ou impedir a ação antimicrobiana dos agentes conservantes.

O teste de desafio consiste na contaminação proposital do produto com carga de microrganismos específicos e na monitoração dos sobreviventes em determinados intervalos de tempo, segundo métodos e padrão internacionalmente recomendado, para garantir um produto final seguro e estável (MANOU et al., 1998). Segundo Orth (1993), o uso de culturas puras, apesar do tempo despendido, em detrimento das mistas, é mais apropriado, pois permite conhecer as taxas de morte de cada microrganismo e determinar o perfil de resistência para determinada formulação.

Os microrganismos apropriados dependem do tipo de produto acabado, pois seus comportamentos podem não ser semelhantes. Em função destas diferenças, vários microrganismos testes devem ser incluídos na análise, tais como bactérias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias do grupo coliforme, como *E. coli*, entre outras, cocos Gram positivos, como *Staphylococcus aureus*, Gram positivos esporulados, como *B. cereus* ou *Bacillus subtilis*, leveduras como *Candida albicans* e fungos filamentosos como *Aspergillus niger* ou *A. flavus* (STEVANATO, 2005).

Os métodos convencionais, descritos nos compêndios (farmacopéias e manuais), baseiam-se na porcentagem de redução da carga microbiana inoculada em diferentes tempos. A carga microbiana é expressa em logaritmo decimal (log) da unidade formadora de colônias (UFC), sendo expressa em intervalos de tempos variáveis, dependendo do método oficial aplicado (CRÉMIEUX, CUPFERMAN, LENS, 2005).

Existem também métodos rápidos que se baseiam na inoculação proposital de microrganismos e avaliação da morte celular em intervalos de tempos subsequentes, diferenciando-se apenas na frequência da avaliação das cargas microbianas presentes. O teste convencional apresenta duração de 28 dias e os métodos rápidos de 48 horas (CRÉMIEUX, CUPFERMAN, LENS, 2005).

Para a determinação da efetividade do conservante, diversos compêndios oficiais estabelecem os critérios de eficiência de um conservante na formulação. A USP 26 (UNITED..., 2003) preconiza que a concentração de bactérias deve ser reduzida para não mais que 0,1% da concentração inicial no décimo quarto dia e a concentração de fungos filamentosos e leveduriformes deverá permanecer abaixo da concentração inicial durante os primeiros quatorze dias. Sendo que a concentração de cada microrganismo teste deverá permanecer abaixo destes níveis durante o período de 28 dias.

Segundo os critérios de *The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association* (CTFA) (CURRY, 1993), o conservante é apropriado quando a redução de número de bactérias for maior que 99,9% dentro de sete dias, com contínua redução na duração do teste e a redução do número de fungos filamentosos e leveduriformes for maior que 90% dentro de sete dias, com contínua redução na duração do teste. Portanto, a atividade bacteriostática deverá permanecer durante todo o tempo do teste.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Material vegetal

Os frutos de *Syzygium cumini* (L) Skeels (jambolão) foram coletados nos meses de dezembro de 2005 a janeiro de 2006, no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da FCF/UNESP, em Araraquara – SP. Na mesma ocasião, foram amostrados ramos da mesma árvore para o processo de conferência de exsicata que está depositada sob o número SJRP 19586 no Herbário do Departamento de Botânica do IBILCE-UNESP, Campus de São José do Rio Preto.

Para o bioensaio de mutagenicidade foram utilizadas mudas de *Tradescantia pallida* coletadas no mês de maio de 2007, no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da FCF/UNESP, em Araraquara – SP.

4.1.2. Microrganismos

Foram utilizados isolados de bactérias e leveduras da coleção padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 64548) e (ATCC 1023), *Candida krusei* (ATCC 63-00), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404) para todos os ensaios de verificação da atividade antimicrobiana. Para o ensaio do teste de Ames foram utilizadas o isolado de bactéria de *Salmonella typhimurium* das linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102.

4.1.3. Cultura celular

Foram utilizadas células de ovário de hamsters chineses (CHO) CHO - K1 (ATCC CCL-61) *Cricetulus griseus* obtidas da coleção padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC).

4.1.4. Animais

Foram utilizados camundongos *Balb-c* machos, com 4 semanas de idade adquiridos do biotério da UNICAMP (CEMIB).

4.1.5. Solventes, reagentes e soluções

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

- (5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil) tetrazólio (MTS)	- ágar Vogel-Johnson	- ciprofloxacino (Sigma)
- 2-aminofluoreno	- ágar XLD	- cloranfenicol (Sigma)
- 2-antramina	- agarose	- cloreto de magnésio
- 4-nitrofenilenodiamina (NPD)	- ampicilina	- cloreto de potássio
- ácido acético glacial	- azida sódica	- cloreto de sódio (cristalizado)
- ácido cítrico monoidratado	- azul de toluidina	- clorofórmio
- ácido fosfotúngstico	- brometo de etídio	- corante aceto-carmim
- ácido pirogálico	- caldo lactosado	- D-biotina (vitamina H)
- ágar batata-dextrose	- caldo Muller Hinton	- D-glucose 99,5%
- ágar bismuto sulfito	- caldo nutriente CM 67 n° 2	- dimetilsulfóxido (DMSO-d ₆) Aldrich [®]
- ágar cetrimida	- caldo peptonado	- etanol
- ágar glicose	- caldo RPMI - American Biorganics [®]	- fluconazol
- ágar granulado (BD / Bacto Agar)	- caldo Sabouraud-dextrose	- Reagente Folin ciocalteau - Dinâmica
- ágar mínimo glicosado	- caldo selenito cistina	- formaldeído
- ágar Muller Hinton (Difco)	- caldo tetrionato	- fosfato de potássio dibásico
- ágar Sabouraud (Difco)	- carbonato de sódio anidro (PA-ACS)	- glicerina
- ágar tripticaseína soja	- ciclofosfamida	- glutaraldeído
- ágar TSI	- Padrão ácido pirogálico	- hipoclorito de sódio
- L-glutamina	- Pó-de-pele	- sulfato de magnésio
- L-histidina	- propilenoglicol	
meio Vogel Bonner	- reativo May Grunwald-Giemsa	
- metassulfato de fenazida (PMS)	- sódio e amônio	- tampão fosfato pH 7,2

	hidrogenofosfato	
-mitomicina C	-solução de lise	-tampão salina fosfato (PBS)
-óleo mineral	-solução nutritiva de Hoagland	-xilol
-parafina	-soro fetal bovino	
-Permout®		

4.1.6. Equipamentos e dispositivos

-Autoclave (Phoenix/AV50)	-Estufa CO ₂ para cultura de células	-Micropipeta 100-1000 µL (Boeco)
-Agitador magnético		-Micropipeta 20-200 µL (Bolco)
-Balança analítica (Bel Mark)	-Estufa de ar (Fanem 002 CB)	-Microscópio (Olympus CH 20)
-Banho termostático (Fanem)	-Estufa de Cultura CO ₂ ORION (Fanem)	-Micrótomo rotativo (Leica RM 2125)
-Chapa de aquecimento (Marchesoni 1)	-Fluxo laminar (Veco) (Modelo: VLFS – 12)	Percolador
Contador de colônias	-Evaporador rotativo (Marconi-MA120)	-Ultrassom (Unique Ultrasonic Cleaner)
-Eletroforese	-Liofilizador (Solab - Novus nº321)	
-Espectrofotômetro UV/VIS(Hewlett Packard)	-Micropipeta 1000 µL (Kacil)	
-Estufa (Fabbe)		

4.1.7. Softwares

- Bioestat 5.0
- Excel - MICROSOFT®
- Inst Mac 2.01
- Origin 6.0
- Salanal

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo do extrato dos frutos *Syzygium cumini* (L.) Skeels

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

O extrato etanólico foi preparado pelo esgotamento da droga vegetal por meio do processo de percolação. Prepararam-se 1000,0 mL do extrato, utilizando-se 10 % (p/v) dos frutos secos de *S. cumini* (L.) Skeels em relação ao líquido extrator etanol:água destilada (50:50, v/v).

Após este período, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura máxima de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ até completa eliminação do solvente orgânico, para posterior liofilização (Migliato, 2005).

4.2.2. Controle da qualidade dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

4.2.2.1. Estudo anatômico dos frutos maduros de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), no Laboratório de Botânica sob a supervisão do Prof. Dr. Luis Vitor S. do Sacramento.

O material botânico utilizado constou de frutos maduros contendo sementes. O material fresco foi submetido à fixação com solução etanol 50 %: ácido acético glacial: formaldeído (5:5:9; v/v) e durante 24 horas sob condição de vácuo. O fixador, após este período, foi retirado e o material vegetal lavado com etanol 70% (v/v) por três vezes, e armazenado em frascos âmbar.

Foram preparadas lâminas permanentes, seguindo-se as técnicas de inclusão em parafina proposta por Montenegro (1985); os cortes anatômicos foram obtidos em micrótomo de rotação na espessura de 10 μm e transferidos para lâminas de vidro, distendidos em chapa aquecida a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Procedeu-se a desparafinização dos cortes utilizando-se a seqüência: xilol desparafinizador, xilol:álcool (3:1), xilol:álcool (1:1), xilol:álcool (1:3), por 5 minutos em cada etapa. A etapa de hidratação dos cortes consistiu na passagem dos mesmos na seqüência de etanol 100% e soluções etanólicas 90, 70, 50 e 30 %, água destilada por 5 minutos e solução aquosa de azul de toluidina por dez minutos (KRAUS e ARDUM, 1997). Em seguida, promoveu-se a retirada do excesso do corante, lavando-se as lâminas contendo os cortes em água destilada. Na seqüência, realizou-se a desidratação (etanol 30, 50, 70, 90 e 100%); as lâminas permanentes receberam banho em xilol diafanizador por 3 minutos; após secagem rápida, foram montadas com Permount[®].

4.2.3. Controle da qualidade do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

4.2.3.1. Doseamento

Para a realização do doseamento as amostras foram protegidas da luz durante a diluição. Foi utilizada água destilada isenta de dióxido de carbono recém destilada em todas as operações. Foram exatamente pesados 0,750 g de extrato dos frutos de *S. cumini*, transferidos para balão volumétrico e diluídos a 250,0 mL com água destilada (Farmacopéia Brasileira, 2000).

4.2.3.1.1. Polifenóis totais

Para determinação dos polifenóis totais, foram diluídos 5,0 mL do filtrado para 25,0 mL com água. Foram misturados 5,0 mL desta solução com 2,0 mL da solução de ácido fosfotúngstico SR e diluída a 50,0 mL com solução de carbonato de sódio SR. Mediu-se a absorvância da solução (A_1) a 757 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando água como branco (Farmacopéia Brasileira, 2000).

4.2.3.1.2. Polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele

Para determinação dos polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele, foram adicionados 20 mL do filtrado e 0,2 g de pó-de-pele e posterior homogeneização em agitador magnético, vigorosamente por 60 minutos, e depois foi filtrado em papel de filtro n^o 2. Uma alíquota de 5,0 mL do filtrado foi diluída a 25,0 mL com água. Foram misturados 5,0 mL desta solução com 2,0 mL da solução de ácido fosfotúngstico SR e diluído a 50,0 mL com solução de carbonato de sódio SR. Foi medida a absorvância da solução a 757 nm (A_2), exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando água como branco (Farmacopéia Brasileira, 2000).

4.2.3.1.3. Solução padrão

Para a construção da curva analítica foi preparada a solução padrão utilizando exatamente 50,0 mg de ácido pirogálico em água e diluindo em balão volumétrico a 100,0 mL. Foram diluídos 5,0 mL desta solução a 100,0 mL com água. Posteriormente, 5,0 mL desta solução foram adicionados de 2,0 mL da solução de ácido fosfotúngstico SR e diluídos a 50,0 mL com solução de carbonato de sódio SR. A absorvância desta solução foi medida em 757 nm (A_3), exatamente 3

minutos após a adição do último reagente e dentro de 15 minutos contados da dissolução do ácido pirogálico, utilizando água como branco.

O teor de taninos foi calculado pela expressão:

$$\frac{13,12(A_1 - A_2)}{A_3 \cdot m} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

m = massa da amostra (g)

A= leitura das absorvâncias (A₁, A₂ e A₃)

4.2.4. Validação

4.2.4.1. Linearidade

A linearidade demonstra a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância (analito), dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). Os resultados dos testes serão tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Sendo o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) igual 0,99. Foram realizados ensaios em triplicata em seis concentrações (1,0 a 5,0 µg/mL) (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

4.2.4.2. Especificidade e seletividade

Este parâmetro determina exatamente o fármaco em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003; USP 26, 2003).

4.2.4.3. Precisão

Uma mesma amostra em idênticas condições analíticas pode ser utilizada para avaliar a variação dos resultados obtidos em uma série de análises repetidas. Foi testado um número suficiente de alíquotas de uma mesma amostra homogênea e expressa pelo desvio padrão relativo

(coeficiente de variação), sendo 5 % o valor máximo aceitável para o coeficiente de variação (CV) é (ANVISA, 2003).

4.2.4.4. Exatidão

Para a determinação de exatidão do método, amostras de extrato de concentrações conhecidas de ácido pirogálico foram acrescidas com diferentes quantidades de solução padrão de ácido pirogálico para investigação da recuperação em diferentes níveis de concentração. Foram realizados ensaios em triplicata para três níveis de concentração (ANVISA, 2003). As concentrações utilizadas para o presente experimento foi de 1,0 a 3,0 µg/mL.

4.2.4.4.1. Recuperação

Para análise quantitativa o ensaio de recuperação pode ser realizado pelo método de adição de padrão ou pelo método do placebo contaminado. O método de adição de padrão consiste em adicionar quantidade conhecida de substância (padrão de referência) à amostra e o método de placebo contaminado consiste em adicionar quantidade conhecida de substância (padrão de referência) a um extrato conhecido (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

Desta forma, a exatidão é dada:

$$Exatidão = \frac{(CEC - CE)}{CPA} * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

CEC = concentração de extrato contaminado

CE = concentração de extrato

CPA = concentração de padrão adicionado

A metodologia de recuperação foi realizada aplicando a análise da adição de padrão no extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, acrescentando concentrações conhecidas de solução padrão e a solução do extrato em três diferentes níveis de concentrações. As concentrações de padrão utilizadas para o presente experimento foi de 1,0 a 3,0 µg/mL.

4.2.4.5. Limite de detecção

O limite de detecção é o menor valor de concentração da substância em análise capaz de ser detectado com grau de confiabilidade adequado, porém, não quantificado com precisão e exatidão aceitáveis. Diferencia-se do ruído do equipamento na relação mínima de ruído:resposta instrumental de 1:3 (ANVISA, 2003; USP 26, 2003).

4.2.4.5.1. Limite de detecção estimado

O limite de detecção estimado foi calculado segundo a **Equação 1** (ANVISA, 2003; ROLIM et al., 2005; BABY, 2007), descrita a seguir:

$$LD = 3,3 \times \sigma / CA \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

LD: limite de detecção

σ : desvio padrão médio obtido por meio da curva analítica

CA: coeficiente angular da equação da reta.

4.2.4.6. Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração da substância analisada que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003; USP 26, 2003).

4.2.4.6.1. Limite de quantificação estimado

O limite de quantificação estimado foi calculado segundo a **Equação 2** (ANVISA, 2003; ROLIM et al., 2005; BABY, 2007), descrita a seguir:

$$LQ = 10 \times \sigma / CA \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

LQ: limite de quantificação

σ : desvio padrão médio obtido por meio da curva analítica

CA: coeficiente angular da equação da reta.

4.2.5. Análise microbiológica do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini*

4.2.5.1. Contagem total de microrganismos

Para esta análise foram transferidos, assepticamente, exatamente 10,0 g do extrato seco dos frutos de *S. cumini* para 90,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2. A amostra 1:10 foi submetida à agitação durante 10 minutos. Após a homogeneização, foi pipetado 1,0 mL desta dispersão para placa de Petri, e adicionados 20,0 mL ágar tioglicolato a $47\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, para bactérias, e ágar Sabouraud a $47\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, para leveduras. Após a solidificação dos meios, as placas foram colocadas em estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias com o auxílio de contador de colônias, calculando o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

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

Foram transferidos, assepticamente, exatamente 10,0 g do extrato seco dos frutos de *S. cumini* em 90,0 mL de caldo lactosado, para pesquisa de *Salmonella* e *E. coli*, e incubados a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 a 48 horas. Após este período, 1,0 mL do caldo lactosado foi transferido para 1 tubo de ensaio contendo 15,0 mL caldo tetracionato, e o mesmo procedimento foi repetido para 1 tubo de ensaio contendo 15,0 mL de caldo selenito cistina. Os tubos de ensaios foram incubados a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após este período, a amostra foi semeada do caldo tetracionato para 1 tubo de ensaio contendo ágar verde brilhante e duas placas de Petri, uma contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e outra com ágar bismuto sulfito. O mesmo procedimento foi realizado com a amostra inoculada no caldo selenito cistina, transferindo para os três meios, incubados a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. O crescimento e as características das colônias foram observados. As colônias suspeitas foram semeadas com alça reta em tubo contendo ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) e incubado a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A confirmação da *Salmonella* foi feita pelo método de Gram.

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

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

Foram transferidos, assepticamente, exatamente 10,0 g do extrato seco dos frutos de *S. cumini* para 90,0 mL de caldo soja-caseína, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e incubados à $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas. Após este período, com alça de platina retirou-se uma alíquota e semeou-se em ágar Vogel Johnson, para a pesquisa de *S. aureus* e ágar cetrimida, para a pesquisa de *P. aeruginosa* a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. As características das colônias foram observadas pela técnica de Gram e a confirmação foi realizada através de método de coagulase e oxidase respectivamente.

4.2.6. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* (L) Skeels

4.2.6.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para bactéria

4.2.6.1.1. Preparo do inóculo

4.2.6.1.1.1. Padronização da suspensão bacteriana

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

4.2.6.1.2. Análise de sensibilidade aos agentes antimicrobianos

Para esta metodologia foi utilizado o fármaco antibacteriano ciprofloxacino, utilizada sob a forma de pó, e calculada quanto a sua potência seguindo recomendações de Murray et al. (2003) e

segundo documentos do NCCLS (2000) para bactérias. Foram pesados 32,0 mg de ciprofloxacino dissolvido em 10 mL de dimetilsulfóxido para obtenção da solução estoque a 3.200 µg/mL. A partir desta solução foram preparadas 10 concentrações, para emprego nos testes realizados em microplacas de 96 poços com fundo chato.

Para o teste de microdiluição, ciprofloxacino foi diluído para se obter concentrações de 16,0 a 0,031 µg/mL a serem adicionadas à placa de microdiluição.

4.2.6.1.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* pelo método da microdiluição

As soluções-teste (ST) foram preparadas a partir das soluções estoque a 200.000 µg/mL, em propilenoglicol:água (3:2), do extrato seco do fruto de *Syzygium cumini*.

Em placa de 96 poços com fundo chato, pipetou-se caldo Muller Hinton (MH) para cada poço utilizado, de acordo com o número de diluições realizadas. No experimento foram realizadas 6 diluições a partir da solução teste.

Na primeira coluna, foram pipetados 200 µL de meio de cultura como controle negativo (controle de esterilidade) e a partir da segunda coluna, apenas 100 µL. Na segunda coluna, pipetaram-se, então, 100 µL de extrato que são as ST.

Foi realizada a partir dessa coluna, diluições seriadas 1:2, homogeneizando e transferindo-se 100 µL do primeiro poço para os poços subseqüentes até obter-se as 6 diluições. Após a diluição, foram pipetados 100 µL de uma suspensão 10^4 UFC/mL de bactéria em cada poço com exceção da primeira coluna de forma que ao final o volume em cada poço foi de 200 µL.

As concentrações finais de ST em cada coluna foram de 78,12 a 2500,0 µg/mL (Tabela 1) para o extrato seco dos frutos de *S. cumini*. A última coluna foi utilizada como controle de microrganismo, sem a ST, e constituiu-se de meio de cultura e inóculo 10^4 UFC/mL, correspondente ao controle de 100 % de crescimento. A microplaca foi incubada em estufa a 37 °C

± 1 °C por 24 horas. Para esta metodologia foram utilizados os seguintes microrganismos: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *E. coli*.

4.2.6.1.4. Leitura

Foi realizada leitura visual após a incubação a 37 °C ± 1 °C durante 24 horas.

4.2.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para fungos

4.2.6.2.1. Preparo do inóculo

4.2.6.2.1.1. Padronização da suspensão fúngica

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), no Laboratório de Micologia, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini.

O inóculo de leveduras foi adaptado e padronizado segundo NCCLS (1997-M27A), pelo cultivo durante 24 horas em placas de ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (250 µg/mL) a 30°C ± 1 °C, onde uma alçada das leveduras, de colônias isoladas, foi suspensa em solução salina, sendo ajustada a contagem de leveduras em $1 \times 10^6 - 5 \times 10^5$ UFC/mL pela escala de McFarland. Posteriormente foi realizada, uma diluição 1/10 em tubo, para obter-se a suspensão de 10^4 UFC/mL, cujo inóculo foi empregado no ensaio.

4.2.6.2.2. Análise de sensibilidade aos agentes antimicrobianos

Para esta metodologia foi utilizado o fármaco antifúngico fluconazol, sob a forma de pó, e calculado quanto a suas potências, seguindo recomendações da NCCLS (1997- M27A) para leveduras. Foram pesados 64,0 mg de fluconazol dissolvido em 10 mL de dimetilsulfóxido para obtenção da solução estoque a 6400 µg/mL. A partir desta solução foram preparadas 10 concentrações, para emprego nos testes realizados em microplacas de 96 poços com fundo chato.

Para o teste de microdiluição, a solução de fluconazol foi diluída para a obtenção de gradiente com concentração de 64 a 0,125 µg/mL, adicionadas à placa de microdiluição.

4.2.6.2.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* pelo método da microdiluição

As soluções-teste (ST) foram preparadas a partir das soluções-estoque a 200.000 µg/mL, em propilenoglicol:água (3:2), do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini*.

Em placa de 96 poços com fundo chato, pipetou-se caldo RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio acrescido de 2,0 % de glicose tamponado em MOPS 0,165 M em cada poço utilizado, de acordo com o número de diluições realizadas. No experimento foram realizadas 6 diluições a partir da solução-teste.

Na primeira coluna, foram pipetados 200 µL de meio de cultura como controle negativo (controle de esterilidade) e a partir da segunda coluna apenas 100 µL. Na segunda coluna, pipetou-se, então, 100 µL de extrato que são as ST.

Foi realizada a partir desta coluna, diluição seriada 1:2, homogeneizando e transferindo 100 µL do primeiro poço para os poços subseqüentes até obterem-se as 6 diluições. Após a diluição foram pipetados 100 µL da suspensão 10⁴ UFC/mL de levedura em cada poço com exceção da primeira coluna, de forma que ao final o volume em cada poço foi de 200 µL.

As concentrações finais de ST em cada coluna foram de 78,12 a 2500,0 µg/mL (Tabela 1) para o extrato seco dos frutos de *S. cumini*. A última coluna foi utilizada como controle de microrganismo, sem a ST, e constituiu-se de meio de cultura e inóculo 10⁴ UFC/mL, correspondente ao controle de 100 % de crescimento. A microplaca foi incubada em estufa a 37 °C ± 1°C, sob agitação por 24 horas. Para esta metodologia foram utilizadas as leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

Tabela 1. Distribuição da concentração da amostra e seus respectivos microrganismos

Amostra*	ORDEM DECRESCENTE DE CONCENTRAÇÃO (µg/mL)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	C-	Meio + Extrato 5000,0	Meio + Extrato 2500,0	Meio + Extrato 1250,0	Meio + Extrato 625	Meio + Extrato 312,5	Meio + Extrato 156,25	Meio + Extrato 78,12	C+
1** #									
2** #									
3** #									
4** #									

* 2 a 8: Extrato seco de frutos de *S. cumini* solubilizado com propilenoglicol:água (3:2)

** 1. *S. aureus*; 2. *P. aeruginosa*; 3. *S. epidermidis*; 4. *E. coli*

1. *C. albicans*; 2. *C. krusei*; 3. *C. parapsilosis*.

C- meio de cultura

C+ meio de cultura e inóculo

4.2.6.2.4. Leitura

Foi realizada leitura visual, após a incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

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

4.2.6.3.1. Padronização e adaptação dos testes de verificação da concentração bactericida mínima do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini*

A CBM foi realizada em todos os poços da microplaca. Para cada poço foi realizada uma subcultura transferindo-se, por meio de hastes estéreis, material de cada poço da microplaca, para placa com ágar Muller Hinton previamente demarcada. As placas foram incubadas em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A CBM foi definida como a menor concentração que apresentou inibição do crescimento.

4.2.6.3.2. Padronização e adaptação dos testes de verificação da concentração fungicida mínima do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini*

A CFM foi realizada em todos os poços da microplaca. Para cada poço foi realizada uma subcultura transferindo-se, por meio de hastes estéreis, material de cada poço da microplaca, para placa com ágar Sabouraud previamente demarcada. As placas foram incubadas em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm$

1°C por 24 horas. A CFM foi definida como a menor concentração que apresentou inibição do crescimento.

4.2.6.3.3. Leitura

Foi realizada leitura visual após a incubação a 37 °C ± 1°C durante 24 horas.

4.2.7. Teste de citotoxicidade

4.2.7.1. Citotoxicidade pelo método do corante supravital do composto tetrazólio (MTS)

O experimento foi realizado no Instituto de pesos e medidas do Estado de São Paulo (IPEM) no Laboratório Ciências Biotecnológicas, sob a supervisão da Profa. Dra. Olga Z. Higa.

Cultura de células de ovário de hamsters chinês (CHO) em monocamada foi separada por tripsinização. A suspensão celular foi centrifugada e o precipitado ressuspensão em meio RPMI 1640, contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB). Após a ressuspensão, foi realizada a lavagem da suspensão celular com solução tampão salina (PBS) estéril.

Uma microplaca de cultura celular de 96 poços foi preparada a partir da adição de diluições crescentes do extrato dos frutos de *Syzygium cumini* (50 µL/poços) nas seguintes concentrações 1250 a 4,9 µg/mL, em seguida, a placa foi estabilizada a 37 °C ± 1°C em atmosfera úmida de 5 % de CO₂, para efetuar a tripsinização das células para o ensaio.

Em seguida, foram pipetados 50 µL da suspensão celular (~3000 células) em cada poço. Foram realizadas colunas controle de 4 poços com o meio sem a colocação das células (branco) e o meio apenas com as células (controle negativo). A microplaca foi incubada sob atmosfera úmida de CO₂.

Após 72 horas, foram adicionados 20 µL da mistura de corante supravital do composto tetrazólio(5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil) tetrazólio (MTS) a 0,2 % e metassulfato de fenazida (PMS) a 0,09 % (20:1) aos poços teste e foi incubado por 2 horas. A incorporação do corante foi medida por meio de leitor de microplacas a 490 nm contra o branco.

A citotoxicidade (IC_{50%}) foi estimada pela curva de interpolação, como a concentração do extrato resultante da inibição de 50 % da incorporação do MTS, correlacionando o percentual médio de células viáveis em relação à concentração do extrato a partir do gráfico.

4.2.8. Teste do micronúcleo em *Tradescantia pallida* (Trad-MCN)

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), no Laboratório de Citologia, sob a supervisão da Profa. Dra. Christiane Pienna Soares.

Para este bioensaio foram utilizadas mudas de *T. pallida* cultivadas no Horto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).

As inflorescências (n = 30), com pedúnculos entre 10 a 15 cm de comprimento, foram coletadas e mantidas por 24 horas em período de adaptação com solução nutritiva de Hoagland (1:3), preparada de acordo com método descrito em Epstein (1975). Este material permaneceu sob aeração contínua, as inflorescências que murcharam ou floresceram durante este período foram descartadas. A seguir, as demais foram imersas separadamente nas diferentes concentrações do extrato seco dos frutos de *S. cumini* (L.) Skeels. O extrato seco dos frutos de *S. cumini* (L.) Skeels foi diluído em solução aquosa, nas concentrações de 31 a 250 µg/mL. Foram tratadas durante 8 horas, sob aeração constante através de bombas, para que houvesse oxigenação para as plantas, evitando que a água e a solução de Hoagland se contaminassem, podendo alterar o resultado do experimento (ALVES et al., 2003).

As inflorescências dos grupos-teste e controles foram submetidas a um período de recuperação (24 horas) em solução de Hoagland após 8 horas de tratamento, (1:3). Decorrido este período, foram retiradas e submetidas à fixação em solução de ácido acético glacial e etanol 95 % (1:3) por 24 horas e, posteriormente, armazenadas no etanol 70 %. Após 48 horas de fixação, foi iniciada a preparação das lâminas para a contagem de micronúcleos. Células-mãe dos grãos de pólen foram avaliadas com o objetivo de localizar a fase de tétrade, fase ideal para a quantificação de micronúcleos. Para tanto, aplicou-se o protocolo estabelecido por MA (1981), que consiste na

escolha de inflorescências com botões jovens, que foram dissecados com auxílio de estiletos, sendo suas anteras retiradas e maceradas sobre lâmina de vidro com uma gota de corante aceto-carmim (ROTH, 1964). Após a maceração foram retirados os fragmentos de anteras (“debris”). Uma lamínula foi depositada sobre o material, que foi aquecido rapidamente com o auxílio de lamparina para fixação do corante, pois o calor permite o entumescimento das tétrades e melhor penetração do corante para visualização dos micronúcleos. Posteriormente, a lamínula foi suavemente pressionada com o auxílio de papel absorvente, o que garantiu a remoção do excesso de corante e provocou o achatamento das tétrades permitindo, assim, a melhor observação dos micronúcleos (ALVES et al., 2003).

A contagem foi realizada ao microscópio óptico, em aumento de 400 vezes em grupo aleatório de 300 tétrades. Para cada grupo (testes e controles) foi quantificado o número mínimo de 10 inflorescências por grupo (ALVES et al., 2003).

4.2.8.1. Controles

Os experimentos foram acompanhados de controle negativo, a solução de Hoagland. Como controle positivo foi utilizada a solução de formaldeído (1000 ppm) (inflorescências, n = 30).

4.2.9. Teste de micronúcleo em eritrócitos de medula óssea de camundongos

4.2.9.1. Animais

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), no Laboratório de Citologia, sob a supervisão da Profa. Dra. Christiane Pienna Soares.

No presente estudo foram utilizados 80 camundongos *Balb-c* adultos machos pesando aproximadamente 20,0 g cada, fornecidos pelo biotério da UNICAMP (CEMIB), tratados com ração (NUVITAL) e água, mantidos em gaiolas com maravalha a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esses animais foram separados aleatoriamente em 10 grupos: um grupo controle negativo, um grupo controle positivo, 4 grupos-teste 24 horas e 4 grupos-teste 48 horas. No grupo controle negativo (n = 8)

foram injetados 0,3 mL de salina estéril por via intraperitoneal; no grupo controle positivo (n = 8) foi injetado 0,3 mL de ciclofosfamida em concentração de 50 mg/kg (CSGMT, 2003; MACGREGOR et al., 1990). Nos grupos-teste (n = 8) foram administrados, via gavagem, 0,4 mL de extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 mg/kg em dois tempos 24 horas (Grupo Teste 1) e 48 horas (Grupo Teste 2). As concentrações estabelecidas foram baseadas na atividade antimicrobiana encontradas.

Cada grupo de animais (n = 8) recebeu o extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* nas concentrações de 6,25 a 50 mg/kg por via gavagem, sendo um grupo (n = 8) sacrificado em CO₂ em 24 horas após a administração e o outro grupo (n = 8) após 48 horas de inoculação, segundo protocolo modificado de MAVOURNIN e colaboradores (1990) (Figura 4).

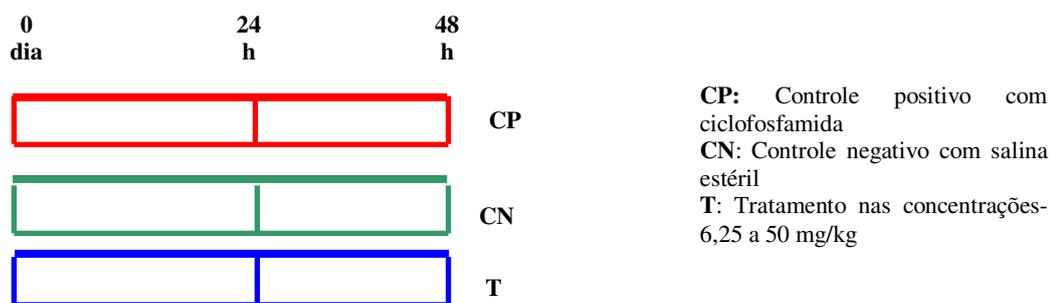


Figura 4: Esquema para realização do teste do micronúcleo em camundongo e do teste do cometa para o grupo teste 1, administração e sacrifício em 24 horas e para o grupo teste 2 sacrifício em 48 horas.

No presente estudo, o controle positivo (ciclofosfamida) avalia a resposta dos animais a uma substância sabidamente indutora de micronúcleos e tem por finalidade verificar a taxa de mutagenicidade e resposta dos grupos de animais. Por outro lado, o controle negativo (salina) representa os animais não tratados, cuja finalidade é avaliar a taxa basal de presença de micronúcleos que são observados em todos os animais do estudo.

4.2.9.2. Comitê de Ética

Para realização dos experimentos com utilização de animais o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araraquara, recebendo o parecer de nº 32/2007.

4.2.9.3. Coleta e processamento do material biológico

Os animais dos dez grupos foram sacrificados em câmara de CO₂ após 24 e 48 horas pós-tratamento e tiveram o fêmur retirado, a epífise proximal cortada e a medula óssea removida, segundo protocolo modificado por ZAMBRANO e colaboradores (1982). A medula óssea foi lavada com soro fetal bovino, centrifugada a 1000 rpm, por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido. Uma gota do sedimento foi transferida para uma lâmina, o esfregaço confeccionado por distensão e, corado pelo método de May Grunwald-Giemsa. Os esfregaços foram observados em microscópio óptico comum e o número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos foi estabelecido em 1.000 eritrócitos por lâmina, em cada animal, nos dez grupos avaliados. Também foi avaliada a relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos nos esfregaços de medula óssea dos camundongos dos dez grupos analisados, a fim de avaliar a citotoxicidade do composto.

4.2.10. Teste de Ames

4.2.10.1. Linhagens utilizadas

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), no Laboratório de Microbiologia, sob a supervisão da Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda.

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, USA. A cepa TA98 apresenta mutação no gene hisD (hisD3052) que codifica a histidinol desidrogenase, apresentando

como ponto preferencial para a reversão oito resíduos repetitivos de GC e detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA. A mutação *hisG46* presente na cepa TA100 ocorre no gene que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese da histidina, através da substituição do códon selvagem GGG (CCC) – prolina – por GAG (CAT) – leucina. Assim, esta cepa detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente neste par G-C. A cepa TA102 contém a mutação *ochre* TAA no gene *hisG* e detecta eficientemente mutágenos como formaldeído, glioxal, vários hidroperóxidos, bleomicina, fenilidrazina, raios-X, luz UV, estreptonigrina e agentes *cross-link*, como mitomicina- C. A cepa TA97a também detecta mutágenos do tipo *frameshift* e apresenta mutação no gene *his D 6610* e alvo para mutação os resíduos GC (MARON e AMES, 1983).

4.2.10.2. Verificação das características genéticas das cepas de *S. typhimurium*

As características genéticas das cepas de *S. typhimurium* foram verificadas rotineiramente, antes do preparo dos estoques para congelamento. Parâmetros como dependência da histidina, presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB*, presença de plasmídios de resistência e taxa de reversão espontânea foram determinados de acordo com Maron e Ames (1983).

4.2.10.3. Preparo dos inóculos de *S. typhimurium* utilizados no ensaio

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37 °C, por 12-16 horas, em banho termostático (37 °C) com agitação (160 rpm), de modo a obter densidade de 1–2 x 10⁹ bactérias/mL.

4.2.10.4. Meios de cultura

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983).

O crescimento das linhagens de *S. typhimurium* foi realizado em caldo nutriente Oxoid nº 2 e o ágar nutriente elaborado a partir do caldo nutriente, com ou sem ampicilina dependendo do ensaio, solidificado com 1,5 % de ágar.

Nos ensaios de mutagenicidade, foi usado ágar mínimo glicosado (AMG), constituído de ágar glicose (20 g de glicose, 15 g de bacto ágar e 930 mL de água destilada) e meio Vogel Bonner “E” 50 vezes concentrado (10 g de sulfato de magnésio heptaidratado, 100 g de ácido cítrico, 175 g de fosfato de sódio e amônio, 500 g de fosfato de potássio dibásico e 670 mL de água destilada) na proporção de 980 mL para 20 mL, respectivamente.

O ágar de superfície (“top-agar”) foi composto de 0,5 g de cloreto de sódio, 0,6 g de bacto ágar e 100 mL de água destilada, acrescido de 10 mL de uma solução de l-histidina 0,096 mg/mL e d-biotina 0,123 mg/mL.

Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos, quando não especificado.

4.2.10.5. Preparo da mistura de S9

Foi utilizada a fração microsomal S9 homogeneizada de fígado de rato (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, arocloror 1254). A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. Esta fração foi obtida da MOLTOX (Molecular Toxicology, Inc.USA). Para o preparo da mistura S9, todas as soluções (cloreto de magnésio 0,4 M e cloreto de potássio 0,4 M, glicose-6-fosfato 1 M, β-nicotinamida adenina dinucleotidifosfato 0,1 M, tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 e água destilada) inclusive a fração S9 hidratada, foram mantidas em banho de gelo durante todo o ensaio, preparadas recentemente e utilizadas por um período de no máximo 3 horas.

4.2.10.6. Controles

O controle negativo foi feito com DMSO, sendo este o solvente do extrato dos frutos de *S. cumini*. O ensaio foi realizado incluindo-se também controles positivos para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa. Foram utilizados como controle positivo em ensaios sem ativação metabólica o 4-nitrofenilenodiamina (NPD) para as linhagens TA98 e TA97a, azida sódica para a linhagem TA100 e mitomicina C para a linhagem TA102. Nos ensaios com ativação metabólica foram usados 2-antramina (2-ANTR) para as linhagens TA98, TA97a e TA100 e 2-aminofluoreno para a linhagem TA102.

4.2.10.7. Ensaio de mutagenicidade

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983), diferentes concentrações de 1,61 a 6,45 mg/placa do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* foram adicionados a 0,1 mL de cultura de bactérias e 0,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 (ou 0,5 mL da mistura S9 em ensaios com ativação metabólica) e incubadas por 20-30 minutos a 37 °C ± 1 °C. Após este tempo, adicionaram-se 2,0 mL de ágar superfície (“top agar”) suplementado com traços de histidina e biotina homogeneizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do ágar, incubou-se as placas por 48 horas, a 37 °C ± 1 °C. Após esse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.11. Teste do cometa

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), no Laboratório de Citologia, sob a supervisão da Profa. Dra. Christiane Pienna Soares.

Foi realizado segundo protocolo estabelecido por Singh e colaboradores (1988). Lâminas limpas foram mergulhadas horizontalmente em agarose (ponto de fusão normal) à temperatura de aproximadamente 60 °C ± 1 °C, secas e armazenadas sob refrigeração para posterior utilização.

Para a realização do teste do cometa, primeiramente foi preparada uma solução de lise que ficou sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 2 horas o momento do uso. A agarose de baixo ponto de fusão foi diluída 10 vezes, em solução de PBS sendo mantida em banho termostatizado a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ao abrigo de luz branca. Sangue periférico (20,0 μL) colhido por punção caudal foi armazenado nos capilares heparinizados transferido, posteriormente, para eppendorf e adicionado de agarose de baixo ponto de fusão. O sangue e agarose foram homogeneizados, distribuídos sobre a lâmina previamente preparada com agarose de ponto de fusão normal e cobertos lentamente com lamínula. As lâminas foram mantidas no refrigerador por 5 minutos; a lamínula foi retirada cuidadosamente e a lâmina mergulhada em solução de lise, *overnight*, sob refrigeração ao abrigo da luz. As lâminas foram submetidas à eletroforese em banho de gelo, mantendo-as a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na cuba, solução tampão de eletroforese a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi colocada até cobrir as lâminas, que foram deixadas durante 20 minutos em repouso, para que houvesse o relaxamento das moléculas de DNA nas células. Em seguida, a fonte de eletroforese foi regulada com 25 volts e a miliamperagem e a potência foram reguladas de acordo com a quantidade de solução colocada na cuba, deixando por 20 minutos. Após a corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e lavadas com solução de neutralização por 5 minutos por 3 vezes. As lâminas foram mergulhadas em etanol 100 % para fixação e deixadas secar a temperatura ambiente. Foram coradas com solução de brometo de etídio (diluída segundo recomendação do fabricante), cobertas com lamínula e a leitura das lâminas foi realizada imediatamente após a coloração em microscópio de fluorescência (filtro 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm) e aumento total de 400 vezes. A extensão do dano de DNA é diretamente proporcional à distância de migração da fita de DNA danificada, da imagem capturada, classificada segundo Singh e colaboradores (1988). Este aumento permite a observação de imagens microscópicas com contorno circular (sem danos no DNA) ou estruturas em forma de “cometa” (com danos no DNA). A extensão de imagem significa a distância de migração da fita de DNA danificada. As células foram classificadas em 5 categorias, segundo proposto por Singh e colaboradores (1988), correspondendo às seguintes quantidades de danos na cauda do DNA: As

células foram avaliadas por análise de imagem através do programa TriTek CometScore™, Freeware v 1.5, sendo analisado 50 células por animal.

4.2.12. Análise estatística

Para o teste do cometa, a avaliação estatística foi realizada através da análise do *Tail Moment* (TM). Uma vez que as frequências de TM assim como outras frequências baseadas na cauda do cometa não apresentam uma distribuição Gaussiana há a necessidade de se utilizar testes não paramétricos para avaliá-las (BAUER et al., 1998). Para os ensaios de micronúcleo, foi verificada se a distribuição dos dados era normal por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Como as amostras não apresentaram distribuição normal foi necessário empregar um teste não-paramétrico. Para os ensaios de genotoxicidade e mutagênese, os grupos foram comparados com o controle negativo. Para tanto, foi empregado o teste de Mann-Whitney e, o nível de significância adotado foi de 5 %. Para verificar se houve citotoxicidade nos eritrócitos de medula, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, os dados relativos ao tempo de 24 horas mostraram distribuição normal, e, portanto, foi realizado o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) um critério, já os dados relativos ao tempo de 48 h não apresentaram distribuição normal e, portanto foi realizado o teste de análise de variância não-paramétrico, Kruskal-Wallis. Desta forma, foi possível verificar se havia diferença entre as quantidades de eritrócitos policromáticos (EPCs) e normocromáticos (ENCs), o nível de significância adotado foi de 5 %. A avaliação estatística foi realizada, utilizando o programa estatístico programa BioEstat 5.0 (Belém, PA, Brasil).

Os dados da mutagenicidade pelo ensaio de AMES do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA, por intermédio da Dra. Maria Ines Sato (CETESB). Este programa permite avaliar o efeito dose-resposta através do cálculo da análise de variância (ANOVA – teste F) entre as médias do número de revertentes nas

diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de regressão linear. A partir dos resultados obtidos, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos mais induzidos) dividido pela média do número de revertentes por placa do controle negativo. A amostra foi considerada positiva quando a razão de mutagenicidade (RM) foi maior ou igual a dois, em, pelo menos, uma das doses testadas e quando houve relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Por sua vez, a amostra foi considerada negativa para o teste de Ames, quando não induziu aumento significativo no número de revertentes e seus RM foram todos menores do que dois.

4.2.13. Preparo das formulações

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), no Laboratório de Cosmetologia, sob a supervisão do Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa.

Para a incorporação do extrato dos frutos de *Syzygium cumini* foram preparadas as seguintes formulações: gel de carbomero, emulsão não-iônica e sabonete líquido, segundo a nomenclatura do INCI (Tabelas 2, 3 e 4).

Tabela 2. Composição da formulação de gel de carbomero(polímero carboxivinílico)

Componentes	Função	Concentração %
Carbomer	espessante hidrofílico	35,0
Propilene Glycol	umectante	4,0
Aminomethyl Propanol	agente neutralizante	q.s. pH 6,0
Deionized water	q.s.p.	100,0

Tabela 3. Composição da formulação de emulsão não-iônica

Componentes	Função	Concentração %
Cetearyl Alcohol	agente de consistência	7,0
Glyceryl Monostearate	agente de consistência	1,5
Decyl Oleate	emoliente	1,0
Dibutyl Adipate	emoliente	1,2
Petrolatum (and) Mineral Oil (and) Parafin (and) Lanolin Alcohol (and) Lanolin	emoliente	1,0
Sweet Almond Oil	emoliente	0,7
Cetareth-20	tensoativo emulsionante	1,0
Propylene Glycol	umectante	5,0
Deionized water	q.s.p.	100,0
Cyclomethicone	emoliente, toque seco	1,5

Tabela 4. Composição da formulação de sabonete líquido

Componentes	Função	Concentração %
Cocamidopropyl Betaine	detergente, formadore de espuma	6,0
Polyquaternium-7	suavisante	3,0
Sodium Laureth Sulfate	detergente, formador de espuma	32,0
Lauryl Polyglycose	espessante/ estabilizante espuma	4,0
Cocamide DEA	espessante/estabilizante/espuma/ solubilizante/sobreengordurante	3,0
PEG-7 Glyceryl Cocoate	sobreengordurante	0,8
PEG-60 Almond Glycerides	sobreengordurante	0,6
Citric Acid	corretivo de pH	q.s. pH 6,0
Deionized water	q.s.p.	100,0

4.2.13.1. Solução glicólica do extrato etanólico seco dos frutos de *S. cumini* incorporado nas formulações

Para a produção da solução glicólica a partir do extrato seco dos frutos de *S. cumini* (L.) Skeels preparou-se uma solução de propilenoglicol: água (3:2), utilizando a concentração de 10 % (p/v) do extrato seco dos frutos de *S. cumini* (L.) Skeels.

As soluções glicólicas obtidas foram incorporados em concentração de 10 % às formulações cosméticas, gel de carbômero, emulsão não-iônica e sabonete líquido.

4.2.14. Análise microbiológica das formulações

4.2.14.1. Contagem total de microrganismos

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.2.5.1.

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

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.2.5.2.

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

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.2.5.3.

4.2.15. Avaliação da atividade antibacteriana das formulações sem e com extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* (L) Skeels

4.2.15.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para bactérias

4.2.15.1.1. Preparo do inóculo

4.2.15.1.1.1. Padronização da suspensão bacteriana

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.2.6.1.1.1.

4.2.15.1.2. Análise de sensibilidade aos agentes antimicrobianos

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.2.6.1.2.

4.2.15.1.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antibacteriana das formulações pelo método da microdiluição

As soluções-teste (ST) das formulações (sabonete líquido, emulsão não-iônica e gel) incorporadas ao extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* foram preparadas a partir das soluções-estoque em concentração de 100.000 µg/mL.

Em uma placa de 96 poços com fundo chato, pipetou-se caldo Muller Hinton (MH) em cada poço utilizado, de acordo com o número de diluições realizadas. No experimento foram realizadas 6 diluições a partir da solução-teste.

Na primeira coluna, foram pipetados 200,0 µL de meio de cultura como controle negativo (controle de esterilidade) e a partir da segunda coluna apenas 100,0 µL. Na segunda coluna, pipetaram-se 100,0 µL das formulações que são as ST.

Foi realizada a partir dessa coluna diluição seriada 1:2, homogeneizando e transferindo 100 µL do primeiro poço para os poços subseqüentes até obter-se as 6 diluições. Após a diluição foram pipetados 100,0 µL de uma suspensão 10^4 UFC/mL de bactéria em cada poço, com exceção da primeira coluna de forma que ao final o volume em cada poço foi de 200,0 µL.

As concentrações finais de ST em cada coluna foram de 5000,0 a 156,25 µg/mL para as formulações. A última coluna foi utilizada como controle de microrganismo, sem a ST, e constituiu-se de meio de cultura e inóculo 10^4 UFC/mL, correspondente ao controle de 100 % de crescimento. A microplaca foi incubada em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Para esta metodologia foram utilizados os seguintes microrganismos, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *E. coli*.

4.2.15.1.4. Leitura

Foi realizada leitura visual após a incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

4.2.16. Avaliação da atividade antifúngica das formulações sem e com extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* (L) Skeels

4.2.16.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para fungos

4.2.16.1.1. Preparo do inóculo

4.2.16.1.1.1. Padronização da suspensão fúngica

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.2.6.2.1.1.

4.2.16.1.2. Análise de sensibilidade às substâncias

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.2.6.2.2.

4.2.16.1.3. Padronização e adaptação dos testes de verificação da atividade antifúngica das formulações pelo método da microdiluição

As soluções-teste (ST) das formulações (sabonete líquido, emulsão não-iônica e gel) incorporadas ao extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* foram preparadas a partir das soluções-estoque em concentração de 100.000,0 µg/mL.

Em placa de 96 poços com fundo chato, pipetou-se caldo RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio acrescido de 2 % de glicose tamponado em MOPS 0,165 M em cada poço utilizado, de acordo com o número de diluições realizadas. No experimento foram realizadas 6 diluições a partir da solução-teste.

Na primeira coluna, foram pipetados 200,0 µL de meio de cultura como controle negativo (controle de esterilidade) e a partir da segunda coluna apenas 100,0 µL. Na segunda coluna, pipetaram-se, então, 100,0 µL das formulações que são as ST.

Foi realizada a partir dessa coluna, diluição seriada 1:2, homogeneizando e transferindo 100,0 µL do primeiro poço para os poços subseqüentes até obter-se as 6 diluições. Após a diluição foram pipetados 100,0 µL da suspensão 10^4 UFC/mL de levedura em cada poço, com exceção da primeira coluna, de forma que ao final o volume em cada poço foi de 200,0 µL.

As concentrações finais de ST em cada coluna foram de 5000,0 a 156,25 µg/mL para as formulações. A última coluna foi utilizada como controle de microrganismo, sem a ST, e constituiu-se de meio de cultura e inóculo 10^4 UFC/mL, correspondente ao controle de 100 % de crescimento. A microplaca foi incubada em estufa a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, sob agitação por 24 horas. Para esta metodologia foram utilizadas as leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

4.2.16.1.4. Leitura

Foi realizada leitura visual após a incubação a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 24 horas.

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

4.2.17.1. Padronização e adaptação dos testes de verificação da concentração bactericida mínima das formulações

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.2.6.3.1.

4.2.17.2. Padronização e adaptação dos testes de verificação da concentração fungicida mínima das formulações

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.2.6.3.2.

4.2.17.3. Leitura

Foi realizada leitura visual após a incubação a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 24 horas.

4.2.18. Teste de desafio

4.2.18.1. Conservação dos microrganismos teste: bactérias e leveduras

Cada uma das bactérias foi repicada por semeadura em estrias, em 24 tubos de ensaio contendo meio ágar tripticaseína-soja esterilizado e inclinado. A levedura foi repicada em meio ágar batata-dextrose, seguindo a mesma técnica. Em seguida, os microrganismos foram levados à estufa, onde as bactérias permaneceram por 24 horas à temperatura de $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, enquanto a levedura

por 48-72 horas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após o crescimento, em cada tubo foi vertida uma quantidade suficiente de óleo mineral esterilizado para conservação em congelador à temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Desta maneira, para cada mês, foram preparados 2 tubos de cada microrganismo.

4.2.18.2. Conservação dos microrganismos teste: fungo

Aspergillus niger, inoculado em meio ágar batata dextrose inclinado, foi repicado com o auxílio de agulha de platina a outros 12 tubos, contendo o mesmo meio. Após a inoculação, os tubos foram levados à estufa e permaneceram por um período de 5 dias à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após o desenvolvimento das culturas sobre a superfície do ágar, os tubos foram mantidos em temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, obtendo-se o estoque anual.

4.2.18.3. Reativação dos microrganismos

Ao início de cada mês, um tubo de cada microrganismo (bactérias e leveduras) foi retirado do congelador e submetido ao descongelamento rápido à temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Em seguida, um tubo de cada bactéria foi transferido para erlenmayer contendo 50,0 mL de caldo tripticaseína-soja e no caso da levedura em caldo Sabouraud-dextrose e incubados em estufa à temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de 48 horas para as bactérias e 72 horas para a levedura. Após este período, cada microrganismo foi repicado, em meio adequado, por semeadura em estrias em 8 tubos e novamente incubados a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 48 e 72 horas para bactérias e leveduras respectivamente.

No caso de fungo, a partir do estoque anual, o repique de um tubo retirado da geladeira, foi efetuado em outros dois tubos, seguindo o mesmo protocolo estabelecido na conservação dos microrganismos-teste. Desta forma, foi obtido o estoque mensal deste microrganismo.

4.2.18.4. Repiques dos microrganismos para utilização nos testes

Um tubo de cada microrganismo foi retirado do estoque mensal e repicado por semeadura em estrias, em meio ágar inclinado adequado e incubados à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24

horas para bactérias. No caso dos fungos, a temperatura de incubação foi $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por um período de 3 dias para levedura e 5 dias para o fungo.

4.2.18.5. Obtenção de suspensões-mãe de microrganismos testes e contagem do número de microrganismos viáveis

4.2.18.5.1. Obtenção da suspensão de bactérias e levedura e contagem do número de microrganismos viáveis

Às culturas de microrganismos-teste, adicionaram-se 9,0 mL de solução salina esterilizada para a obtenção da suspensão de cada microrganismo (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*). A “suspensão-mãe” foi submetida à diluição decimal seriada em solução salina, até obter a diluição 10^{-15} .

Alíquotas de 0,3 mL, de algumas das diluições seriadas, foram semeadas à superfície do meio com auxílio de bastão em “L” esterilizado. As bactérias foram incubadas em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas em meio tripticaseína-soja, enquanto que a levedura foi incubada a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas em meio Sabouraud-dextrose. Após este período, as placas que apresentavam um número de colônias entre 30 a 300, foram selecionadas para contagem do número de microrganismos viáveis.

4.2.18.5.2. Obtenção da suspensão do fungo e contagem do número de esporos

A um tubo com meio ágar batata-dextrose inclinado, contendo o fungo *Aspergillus niger*, foram adicionados 9,0 mL de solução salina esterilizada e, por agitação, os esporos foram suspensos. Desta suspensão, uma alíquota de 1,0 mL foi transferida, por meio de pipeta graduada esterilizada, para um outro tubo e diluída 10 vezes, em solução salina. Desta diluição, retirou-se um pequeno volume que foi aplicado à câmara de Neubauer, para contagem do número de esporos/mL, sob microscópio óptico.

4.2.18.6. Avaliação da neutralização na inibição da atividade antimicrobiana do sistema

Como se trata de um sistema experimental, não havendo, portanto, um sistema de neutralização preconizado, o estudo foi feito verificando-se a inibição do crescimento dos microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. niger* e *C. albicans* em concentrações diferentes das formulações, obtidas a partir de diluições seriadas.

Primeiramente, a 1,0 g de cada formulação foram adicionados 9,0 mL de solução salina estéril, obtendo-se, então, a primeira diluição (10^{-1}), a partir desta foram feitas diluições decimais até 10^{-5} . A cada uma das diluições, foi adicionado 1,0 mL da suspensão de microrganismos contendo aproximadamente 10^3 bactérias, 10^3 células de bolores para a *C. albicans* ou 10^3 esporos para *A. niger*. A seguir, os tubos foram agitados mecanicamente e alíquotas de 1,0 mL foram semeadas, em duplicatas, nas placas de Petri contendo meios adequados.

Para comprovação da eficiência da neutralização dos conservantes, o teste foi acompanhado por um controle, onde 1,0 mL da suspensão de microrganismo foi adicionada em 9,0 mL de solução salina, seguindo o mesmo procedimento das formulações.

As placas foram incubadas em estufa por 24 horas à temperatura de $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, para contagem de bactérias. A temperatura de incubação para bolores foi $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por um período de 48 a 72 horas para a levedura e 4 a 5 dias para o fungo. Após o crescimento, o número de unidades formadoras de colônias foi determinado (Figura 5).

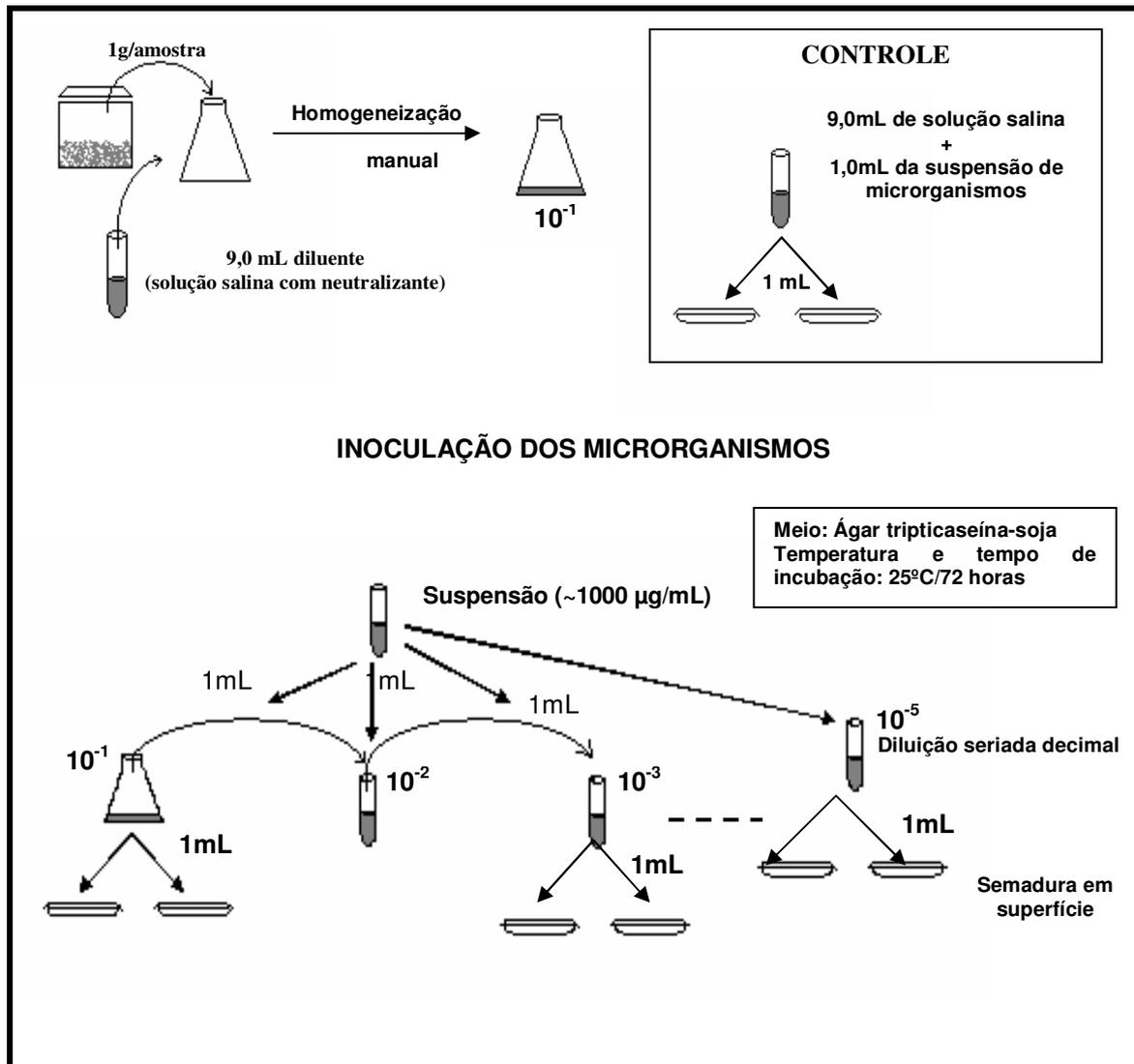


Figura 5: Esquema do teste de avaliação da eficácia dos neutralizantes sobre o efeito antimicrobiano dos conservantes.

4.2.18.7. Teste de eficácia do sistema conservante propriamente dito

Em embalagens adequadas e esterilizadas, foram colocados 20,0 g de cada uma das formulações. A cada uma, foi inoculado um volume de suspensão de microrganismo, para a obtenção final de uma carga teórica de microrganismos equivalente a 10^6 bactérias ou 10^5 esporos ou células de fungos por grama de formulação. Em seguida, cerca de 1,0 g de formulação foi pesado, em recipientes estéreis, e adicionados de 9,0 mL de solução salina estéril, sob agitação manual constante. Após a dissolução de todo conteúdo, obteve-se a diluição 10^{-1} , que foi subsequentemente diluída até 10^{-5} .

Paralelamente, controles foram realizados, onde, em tubos de ensaio, com 20,0 mL de solução salina, inculou-se a mesma carga microbiana, seguindo-se de agitação para homogeneização das células ou esporos. A seguir, 1,0 mL desta suspensão foi pipetado e adicionado a 9 mL de solução salina, dando seqüência às diluições até 10^{-5} .

Geralmente, das diluições 10^{-3} e 10^{-5} , alíquotas de 0,5 mL, foram retiradas por pipeta automática e inoculadas em placas de Petri, em duplicatas, contendo os meios de cultura adequados para bactérias e bolores. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, para contagem de bactérias. A temperatura de incubação para bolores foi $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 48 a 72 horas pra a levedura e 4 a 5 dias para o fungo. Após o crescimento, o número de unidades formadoras de colônias foi determinado (Figura 6).

O período do teste ocorreu nos intervalos de tempo de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas; 7, 14, 28 e 35 dias. A análise dos microrganismos viáveis dos controles foi executada somente no tempo zero, ou seja, logo após a inoculação.

Durante a execução do teste, as formulações foram mantidas à temperatura ambiente em local livre de umidade e excesso de luz.

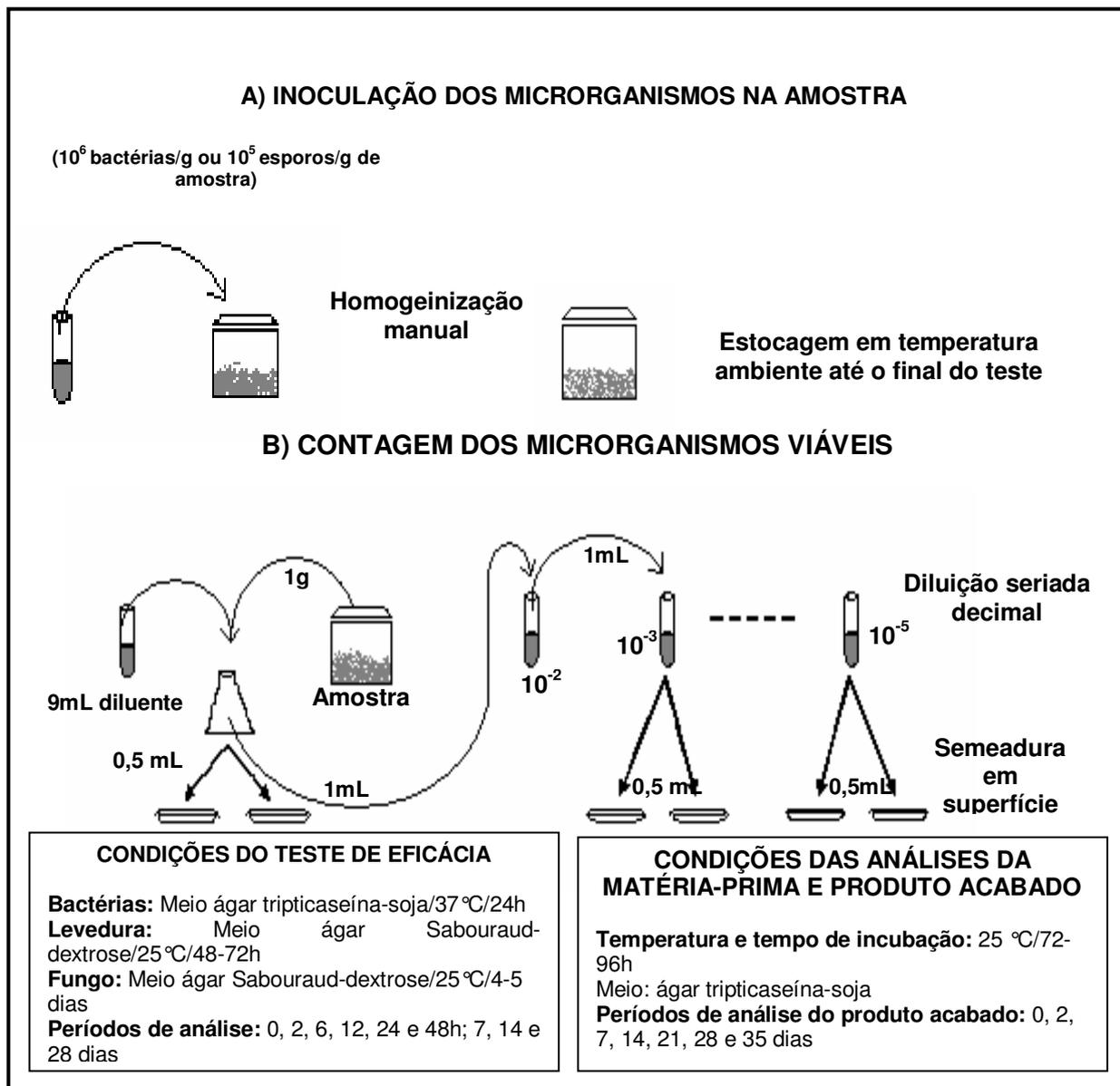


Figura 6: Esquema de execução das análises microbiológicas do produto acabado durante o teste de eficácia.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo anatômico dos frutos maduros de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

No Brasil, embora existam normas para garantir a qualidade dos fitoterápicos (RDC nº 48/2004), dentre outras, estas nem sempre são cumpridas, como o preparo, obtenção e produção pode gerar produtos sem qualidade, ineficazes e inseguro. Este fato justifica a necessidade de estudos que caracterizem as drogas vegetais, na obtenção destes parâmetros.

Do ponto de vista técnico, o desenvolvimento de um novo extrato pode necessitar de vários anos de pesquisa. O processo é normalmente longo e passa por diversas fases: pesquisa da planta, identificação botânica, avaliação da composição química, estudo das condições de cultura e colheita, inúmeros testes de condições de extração, definição do melhor método de extração, reprodutibilidade do método de extração, padronização do método de extração, estudos toxicológicos e eficácia do extrato integral ou de suas frações.

No desenvolvimento de uma forma farmacêutica ou cosmética, é necessário um planejamento adequado, como a escolha dos componentes, a concentração de uso e limites legais, a fim de determinar sua segurança, qualidade e eficácia terapêutica. Vários métodos podem ser empregados para atingir este objetivo. A correta identificação botânica é o primeiro passo neste sentido para a incorporação de produtos de origem vegetal.

Para o presente trabalho foram amostrados ramos da árvore de jambolão para o processo e preparação de exsicata que foi depositada sob o número SJRP 19586 no Herbário do Departamento de Botânica do IBILCE-UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto.

Seguindo as exigências da resolução ANVISA - RDC nº 48/2004, e na ausência de estudos sobre as especificações necessárias para auxiliar a qualidade, foram traçados os perfis da droga vegetal *S. cumini* (L.) Skeels, em consonância com as exigências legislativas, a fim de colaborar com, o estabelecimento dos requisitos de qualidade para a droga vegetal proposta.

Testes de controle da qualidade físico, físico-químico e microbiológico foram realizados por Migliato e colaboradores, (2007). No entanto, os autores destacaram a necessidade de realizar também o controle morfo-anatômico devido à possível presença de adulterantes.

Dessa forma, o presente trabalho incluiu um estudo de sistemática e morfologia envolvendo a coleta, herborização, estudo morfológico e identificação dos frutos de *S. cumini* (L.) Skeels.

A espécie vegetal ou partes desta podem ser reconhecidas por meio de várias características, específicas para cada uma delas: a forma e a organização são os aspectos fundamentais utilizados na identificação de uma espécie (Figura 7).

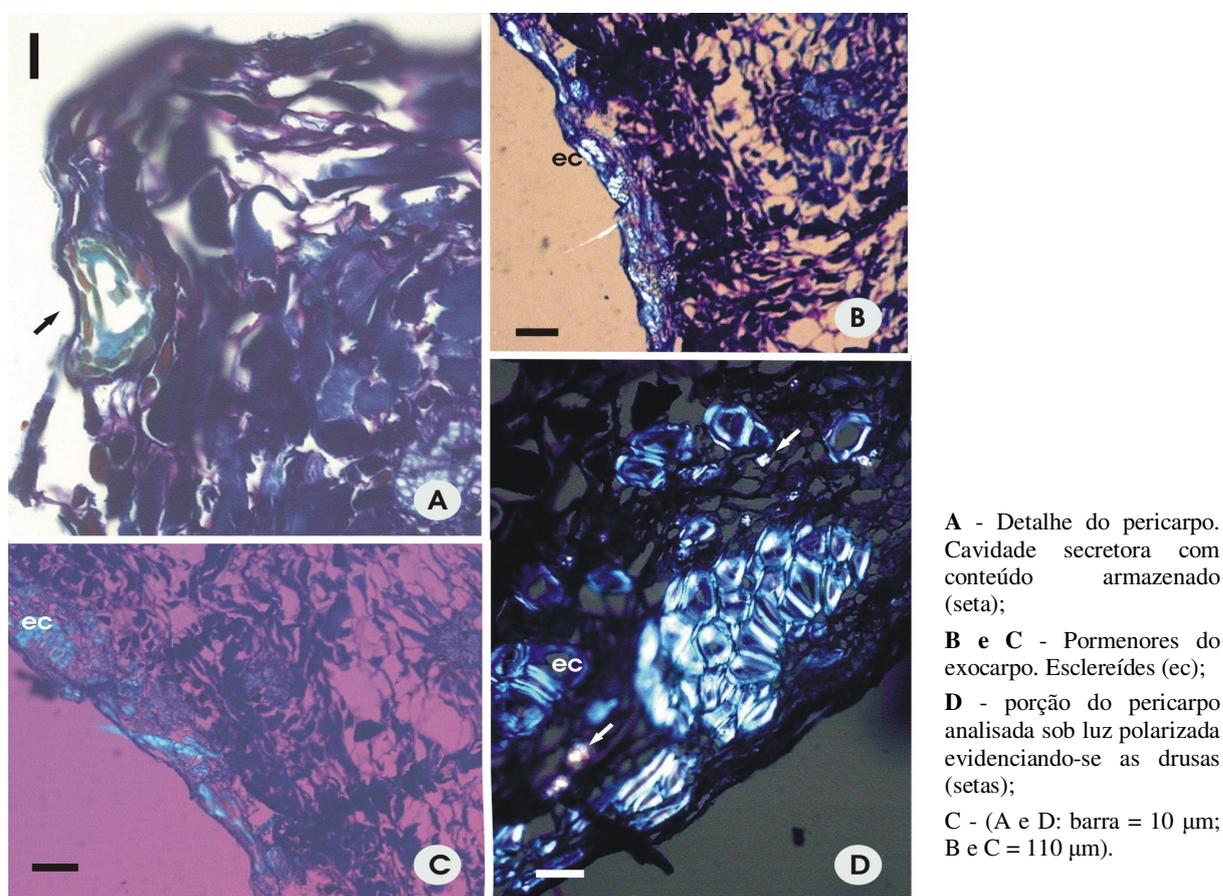


Figura 7. Aspectos anatômicos de frutos de *S. cumini*

Por meio dos cortes histológicos e, de acordo com o corante empregado, pode-se ter uma visão da organização tecidual de *S. cumini* (L.) Skeels.

A análise anatômica (Figura 7A e 7D) revelou caracteres típicos de mirtáceas: glândulas secretoras de óleo essencial, drusas e idioblastos tânicos. Tais características foram encontradas em toda a extensão do pericarpo e também na semente. A vascularização do pericarpo é semelhante à das folhas. Apresentam vários feixes colaterais e suas ramificações, todos envolvidos por bainha esclerenquimática.

As cavidades secretoras (Figura 7A) encontradas entre as células do parênquima cortical e a presença da periderme, com células retangulares são características que auxiliam na identificação dos frutos de jambolão. A presença destas cavidades é característica da família Myrtaceae.

O grande número de idioblastos tânicos com conteúdo fenólico confirma a presença destes compostos no vegetal estudado. Estes idioblastos contêm taninos como inclusões celulares algumas vezes podem apresentar-se um pouco mais aumentadas que os demais idioblastos devido à grande quantidade de taninos.

Os idioblastos, portadores de drusas, estão presentes no clorênquima do pecíolo da espécie Myrtaceae, onde também se observam cavidades secretoras e compostos de natureza fenólica no interior das células (CARDOSO e SAJO, 2004).

Desta forma, a identificação botânica realizada com os frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, considerando as estruturas morfológicas do vegetal, possui um papel relevante no estudo botânico. Trata-se de uma análise que permite fazer julgamento sobre a droga em questão, verificando sua identidade e sua autenticidade.

Jauregui e colaboradores (2001), estudando anatomicamente dez diferentes espécies do gênero *Cestrum*, demonstraram que cada uma delas apresenta, características foliares particulares, capazes de serem identificadas morfológicamente.

A análise morfo-anatômica torna-se importante para o controle da qualidade da matéria-prima, uma vez que esta análise fornece parâmetros que contribuem na identificação e padronização de insumos farmacêuticos, permitindo a diferenciação de adulterantes de drogas e entre espécies botanicamente próximas.

Após o estudo morfo-anatômico, etapa importante no controle da qualidade do fitoterápico, o material botânico foi submetido à secagem. Os frutos e sementes foram secos em estufa com ar circulante à temperatura de 45 °C, até estabilização do processo de secagem que ocorreu após sete dias. Esta secagem tem por finalidade a conservação da droga vegetal, uma vez que a retirada de água impede possíveis reações de hidrólise e o crescimento microbiano (SIMÕES et al., 2003).

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

Para este trabalho foi utilizada a percolação simples, que se iniciou com o intumescimento prévio da droga com o líquido extrator, durante 2 horas. O procedimento de percolação envolveu a utilização de álcool etanólico:água 50 % como líquido extrator.

5.2. Validação da metodologia para o doseamento do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Ao realizar o controle da qualidade de medicamentos, fitoterápicos e correlatos, destaca-se o número e diversidade de técnicas analíticas. Este número cresce com o desenvolvimento de novos produtos e de tecnologia. Ao referir-se aos fitoterápicos, existem limitações quanto à sua validação, pelo fato de não se conhecer ou, pelo menos, de forma completa, a composição das espécies vegetais; para isso pesquisas neste campo e a evolução e desenvolvimento de novas técnicas estão contribuindo para a validação de métodos analíticos para os fitoterápicos.

Adicionalmente às exigências regulatórias, o desempenho e a confiabilidade dos métodos analíticos são essenciais para o desenvolvimento e a execução do controle da qualidade de

substâncias ativas de origem vegetal. Em consideração às características da validação apresentadas na literatura científica e na legislação vigente, cada método analítico necessita ser validado em concordância com os parâmetros relevantes para garantir seu desempenho (BABY et al., 2006).

Os resultados para construção da curva analítica estão apresentados na Tabela 5 para o padrão ácido pirogálico.

Tabela 5. Absorvâncias obtidas nas análises do padrão ácido pirogálico por espectrofotometria a 757 nm

Concentração (µg/mL)	Absorvância média ± desvio padrão	Coefficiente de variação (cv%)
1,0	0,207 ± 0,004	1,78
2,0	0,392 ± 0,016	4,00
2,5	0,483 ± 0,022	4,62
3,0	0,572 ± 0,024	4,19
4,0	0,745 ± 0,027	3,59
5,0	0,917 ± 0,027	2,97

Foi realizada a validação da metodologia para o extrato dos frutos de *S. cumini*, utilizando-se como padrão o ácido pirogálico. A linearidade, verificada por meio da curva analítica (Figura 8), foi demonstrada pelo método espectrofotométrico a 757 nm na faixa de concentração de 1,0 a 5,0 µg/mL, e apresentou coeficiente de correlação $r^2 = 0,9997$, valor que se encontra em acordo com o limite estabelecido pela ANVISA (2003).

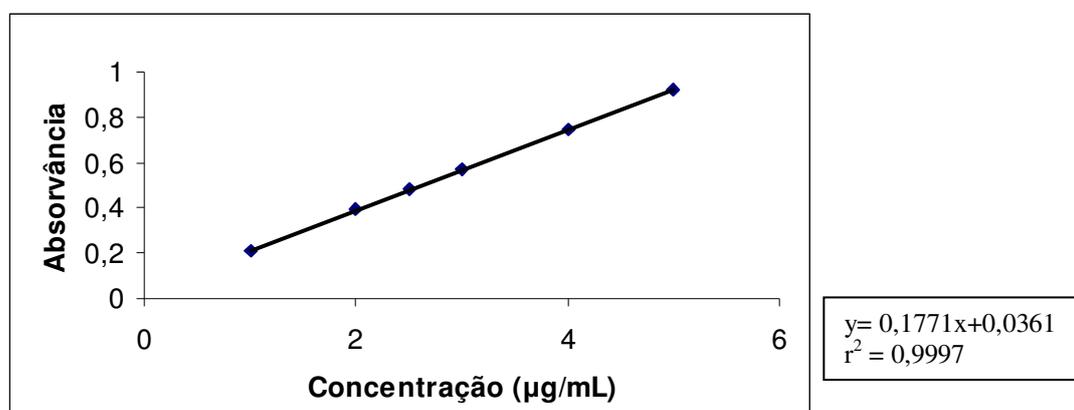


Figura 8. Curva analítica do ácido pirogálico, por método espectrofotométrico a 757 nm.

A curva analítica apresenta a relação entre a resposta instrumental em função das concentrações conhecidas das amostras em análise (FDA - USA, 2001). A linearidade é avaliada por meio da curva analítica e está relacionada com a habilidade do método em demonstrar que aqueles resultados experimentais obtidos são diretamente proporcionais à resposta instrumental ou, caso exista a necessidade, por transformações matemáticas bem definidas que comprovem a proporcionalidade da resposta perante as concentrações da substância em análise, em um intervalo especificado das concentrações (SHABIR, 2003; BABY, 2005).

A legislação brasileira vigente admite a linearidade de uma metodologia analítica quando o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados resulta em coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98 (ANVISA, 2003) e 0,90 para o Inmetro, (2003), segundo Ribani e colaboradores (2004).

Um valor de coeficiente de correlação linear superior a 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos resultados obtidos pela regressão linear (MULHOLLAND e HIBBERT, 1997; RIBANI et al., 2004).

Os resultados obtidos no teste de precisão (n = 6) demonstraram que o método foi preciso para análise do padrão, pois apresentou coeficiente de variação menor que 5 %, estando dentro do limite especificado (ANVISA, 2003).

Os resultados do ensaio de precisão estão apresentados na Tabela 6 para a amostra do extrato dos frutos de *S. cumini* no método de polifenóis totais. Utilizou-se a concentração de 5,0 µg/mL para o referido ensaio analítico por esta se apresentar adequada quanto ao intervalo de absorvância de, aproximadamente, 0,2 a 0,9 e por possuir conveniência experimental quanto ao processo de pesagem e diluição da amostra.

Tabela 6. Determinação de polifenóis totais no extrato seco dos frutos de *S. cumini* pelo método espectrofotométrico a 757 nm

Leituras	Absorvância média \pm desvio padrão	Coefficiente de variação (cv%)
1	1,011 \pm 0,018	1,78
2	1,022 \pm 0,018	1,72
3	0,985 \pm 0,022	2,27
Média	1,006 \pm 0,003	0,26

Os resultados obtidos no teste de precisão mostraram que a análise de polifenóis totais mostrou-se precisa observando coeficiente de variação menor que 3 %, estando dentro do limite especificado (ANVISA, 2003).

Os resultados do ensaio de precisão estão apresentados na Tabela 7 para a amostra do extrato dos frutos de *S. cumini* no método de polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele.

Tabela 7. Determinação de polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele do extrato seco dos frutos de *S. cumini* pelo método espectrofotométrico a 757 nm

Leituras	Absorvância média \pm desvio padrão	Coefficiente de variação (cv%)
1	0,230 \pm 0,007	2,90
2	0,246 \pm 0,007	2,85
3	0,246 \pm 0,007	2,92
Média	0,240 \pm 0,001	0,11

No teste de precisão, os resultados para a metodologia de polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele mostraram-se precisos para análise do extrato, em que foi observado cv menor que 3%, estando de acordo com a ANVISA (2003).

A precisão de uma metodologia analítica representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, sob condições definidas e padronizadas. Segundo ICH Q2B, 1996, e ANVISA, 2003, a precisão é calculada como desvio padrão relativo (DPR, %) e em três diferentes níveis: Repetibilidade ou Precisão Intra-Dia; Precisão intermediária ou Inter-Dias e; Reprodutibilidade ou Precisão Interlaboratorial (BABY, 2007).

A precisão pode ser avaliada pelo desvio padrão absoluto, que utiliza um número significativo de medições. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente reduzido e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto. Outro cálculo emprega o intervalo de confiança da média, isto é, um intervalo de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável (RIBANI et al., 2004).

Segundo FDA (1994), um método analítico pode ser considerado preciso se o valor do desvio padrão relativo for inferior ou igual a 1 %, porém, a Legislação Brasileira exige o limite máximo de DPR (%) de 5,0 %.

Os resultados obtidos no ensaio de recuperação estão apresentados na Tabela 8 para polifenóis totais e na Tabela 9 para polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele.

Tabela 8. Teste de recuperação para polifenóis totais do extrato seco do fruto de *S. cumini* pelo método espectrofotométrico a 757 nm

Concentração padrão (µg/mL)	Absorvância			Recuperação (%)
	Extrato	Ácido pirogálico	Extrato adicionado	
1,0	1,006 ± 0,003	0,207 ± 0,004	1,225 ± 0,078	105,82
2,0	1,012 ± 0,010	0,392 ± 0,016	1,422 ± 0,082	106,28
3,0	1,008 ± 0,025	0,572 ± 0,024	1,574 ± 0,090	99,24

Tabela 9. Teste de recuperação para polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele do extrato seco do fruto de *S. cumini* pelo método espectrofotométrico a 757 nm

Concentração padrão (µg/mL)	Absorvância			Recuperação (%)
	Extrato	Ácido pirogálico	Extrato adicionado	
1,0	0,230 ± 0,007	0,207 ± 0,004	0,451 ± 0,030	107,18
2,0	0,246 ± 0,009	0,392 ± 0,016	0,623 ± 0,037	96,23
3,0	0,246 ± 0,005	0,572 ± 0,023	0,825 ± 0,053	101,20

O método proposto pode ser considerado exato, pois a recuperação encontrada na totalidade das concentrações estudadas mostrou-se adequada para análise quantitativa do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* e o padrão utilizado (ácido pirogálico) (Farmacopéia Brasileira, 2000). Os valores calculados apresentaram-se próximos a 100%, em concordância com o limite especificado pela literatura (ANVISA, 2003; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004), portanto, os valores determinados demonstraram proximidade das concentrações calculadas dos polifenóis com os seus respectivos valores teóricos ou nominais.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados de acordo com o desvio padrão da curva analítica e pelo coeficiente angular da equação da reta descrito na Tabela 10. Os limites foram 0,21 e 0,64 µg/mL, respectivamente para LD e LQ.

Tabela 10. Limites de detecção e quantificação estimados por meio do desvio da curva analítica

Polifenóis totais (µg/mL) ^a	DP	σ	C.A.	LD	LQ
1,00	0,003731				
2,00	0,016529				
2,50	0,023877				
3,00	0,025572	0,011242	0,1771	0,21	0,64
4,00	0,028502				
5,00	0,029043				

^a Concentrações teóricas; DP: desvio padrão; σ: médias dos desvios padrão; C.A.: coeficiente angular da equação da reta; LD: limite de detecção estimado, µg/mL; LQ: limite de quantificação estimado µg/mL.

A análise dos resultados obtidos em todos os parâmetros de validação estudados para o método espectrofotométrico proposto indicou que o método estudado pode ser considerado adequado para análise quantitativa do extrato de *S. cumini*, garantindo confiabilidade dos resultados obtidos.

5.3. Controle microbiológico do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

A produção de extratos de plantas emprega tanto os vegetais silvestres como os cultivados. Embora exista a conscientização de que as técnicas de manejo sustentável sejam imperativas na preservação das espécies e da biodiversidade, a grande maioria dos extratos brasileiros é proveniente de processos extrativistas (BABY et al., 2005).

As matérias-primas de origem natural incluem grupos de produtos obtidos de plantas, partes de plantas ou mesmo extratos e óleos essenciais extraídos por processos químicos, bem como aqueles oriundos de minerais ou animais, portanto, matérias-primas e produtos com maiores quantidades de água comparadas com amostras com baixo teor de água, favorecem o crescimento de microrganismos.

Os testes de controle microbiológico do extrato dos frutos de *S. cumini* foram realizados conforme recomendações de compêndios oficiais e não-oficiais (USP 26, 2003; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; CARTURAN, 1999; PINTO et al., 2003; SIMÕES et al., 2003), estando descritos os resultados na Tabela 11.

Tabela 11. Controle microbiológico do extrato seco dos frutos de *S. cumini*

Amostra	Contagem n° total de microrganismos (UFC/g)		Pesquisa de patógenos			
	Bactérias	Fungos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>
Extrato seco dos frutos <i>S. cumini</i>	< 10	< 10	ausente	ausente	ausente	ausente
Recomendação *	< 10 ⁵	< 10 ⁴	ausente	ausente	ausente	ausente

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

Os resultados obtidos através do controle microbiológico do extrato dos frutos de *S. cumini* (Tabela 9) permitiu observar que não houve crescimento microbiano nas amostras analisadas de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, considerados microrganismos patogênicos. Na contagem do número total de bactérias e de fungos ocorreu crescimento inferior a 10 UFC/g. Os resultados obtidos foi devido as Boas Práticas de Manipulação

com relação ao preparo, uso de vidrarias e manipulação para que não houvesse contaminação microbiana.

A contaminação microbiana de produtos farmacêuticos, cosméticos e fitoterápicos pode ser proveniente de várias origens, devido à complexidade dos processos de coleta da planta aos vários procedimentos que resultam no produto acabado. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as exigências para o cumprimento às regulamentações técnicas estabelecidas objetivam garantir a qualidade do início ao fim do processo, ou seja, da matéria-prima ao produto acabado (YAMAMOTO et al., 2004).

5.4. Atividade antimicrobiana do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Existem inúmeros estudos realizados em diferentes países e registrado na literatura, para comprovar a eficácia de extratos vegetais e suas frações de conhecida atividade antimicrobiana (NUNAN et al., 1985; LOCHER et al., 1995; ANNAPURNA et al., 1999; DJIPA et al., 2000; FERESIN et al., 2001; KHAN et al., 2001; RAMESH et al., 2002). Muitas espécies vegetais têm sido pesquisadas, pelas suas características antimicrobianas, por meio de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta. Estes produtos são reconhecidos por suas substâncias ativas, como é o caso dos compostos fenólicos, que fazem parte dos óleos essenciais e dos taninos (NASCIMENTO et al., 2000).

Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infecções microbianas humanas vem apresentando um aumento expressivo, sendo as dermatomicoses uma das principais infecções (SIDRIM, DIÓGENES e PAIXÃO, 1999).

O uso de extratos vegetais e fitoquímicos de conhecida atividade antimicrobiana pode adquirir significado nos tratamentos terapêuticos, pois, apesar das indústrias farmacêuticas produzirem um expressivo número de novos antibióticos nas últimas três décadas, a resistência microbiana a estes fármacos também aumentou. Em geral, as bactérias têm a habilidade genética de adquirir e de apresentar resistência às substâncias utilizadas como agentes terapêuticos (COHEN, 1992). O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva futura do uso de agentes

antimicrobianos, incerta. É importante adotar, portanto, medidas para enfrentar o problema, entre elas, controlar uso de antibióticos, desenvolverem pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos da resistência microbiana e continuar estudos acerca de novos agentes terapêuticos, sintético e natural (NASCIMENTO et al., 2000).

Para assegurar a segurança e eficácia da metodologia, do meio de cultura e das leveduras utilizadas, foi realizado o controle de fármaco nas mesmas condições do experimento apenas para certificar-se da eficiência da metodologia da atividade antimicrobiana através da microdiluição. A Tabela 12 apresenta o comportamento dos microrganismos utilizados frente aos fármacos ciprofloxacino e fluconazol.

Tabela 12. Determinação da concentração inibitória, bactericida e fungicida mínima para o controle dos fármacos ciprofloxacino e fluconazol

Microrganismos	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>S. aureus</i> *	0,031	0,125	-
<i>E. coli</i> *	0,031	0,031	-
<i>P. aeruginosa</i> *	0,031	0,062	-
<i>S. epidermidis</i> *	0,031	0,062	-
<i>C. krusei</i> **	16,0	-	0,031
<i>C. albicans</i> **	0,0625	-	0,031
<i>C. parapsilosis</i> **	1,0	-	16,0

* ciprofloxacino; ** fluconazol

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos de concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) da solução glicólica do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini*, utilizando os seguintes microrganismos: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. krusei*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* (Figuras 9 e 10).

Tabela 13. Determinação da concentração inibitória, bactericida e fungicida mínima para o extrato dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Microrganismos	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	78,1	312,5	-
<i>S. epidermidis</i>	78,1	78,1	-
<i>E. coli</i>	625,0	1250,0	-
<i>P. aeruginosa</i>	312,5	625,0	-
<i>C. krusei</i>	156,3	-	625,0
<i>C. albicans</i>	156,3	-	2500,0
<i>C. parapsilosis</i>	78,1	-	1250,0

Considerando as concentrações determinada para avaliação da atividade antimicrobiana de 78,12 a 2.500,0 µg/mL, utilizando os microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. krusei*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, o resultado de maior atividade na determinação da concentração inibitória mínima obtida foi para os microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. parapsilosis*, que se mostraram mais sensíveis ao extrato. Os demais microrganismos apresentaram valores de CIM mais elevados.

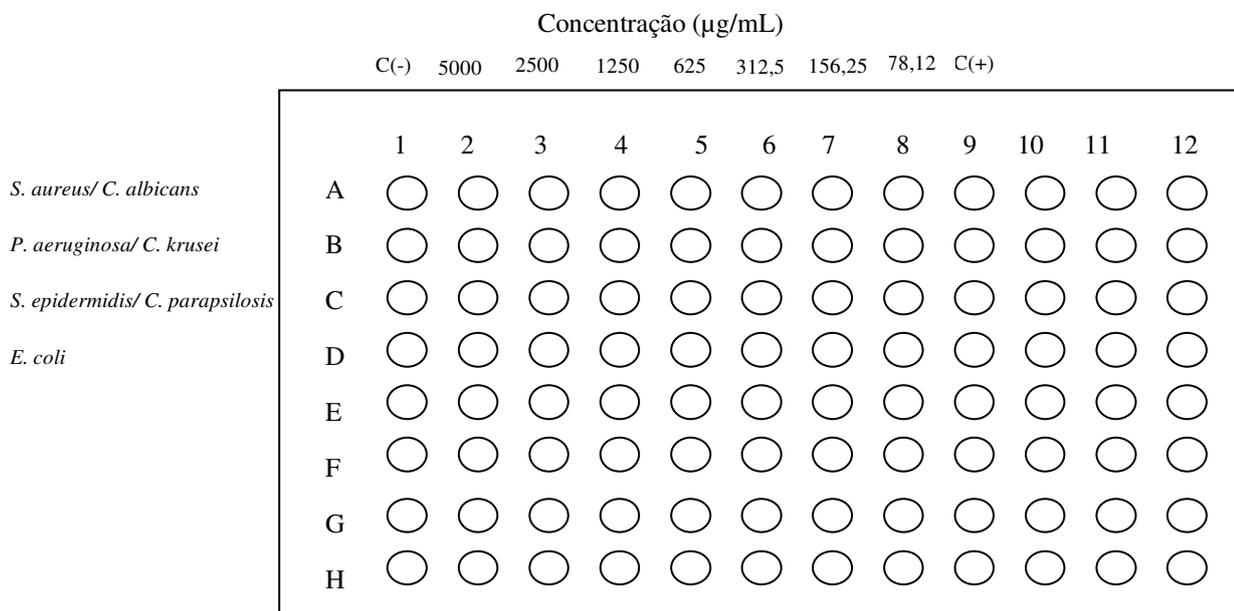


Figura 9. Ilustração do ensaio da determinação da concentração inibitória mínima de extrato de frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels.

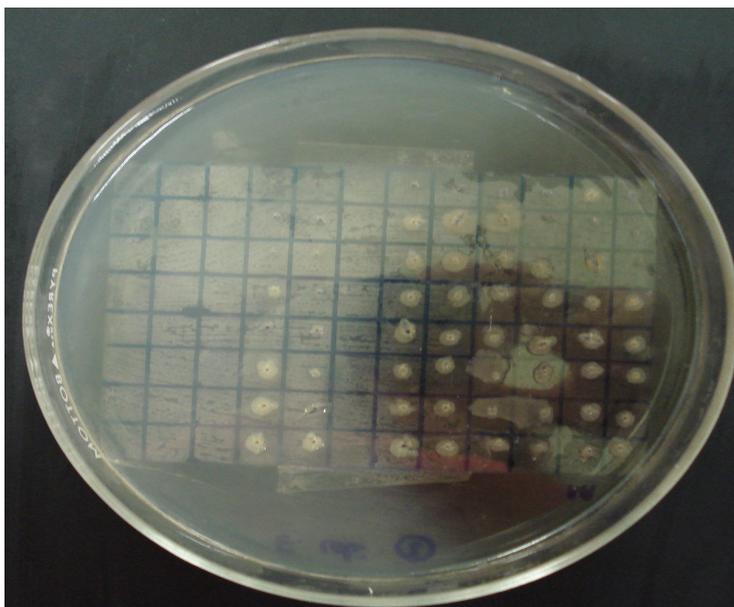


Figura 10. Ilustração do ensaio da determinação da concentração bactericida e fungicida mínima do extrato dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels.

Ao realizar-se a determinação das concentrações bactericida e fungicida mínimas, o microrganismo que apresentou a maior sensibilidade foi *S. epidermidis* na concentração de 78,1 $\mu\text{g/mL}$. Para os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. krusei* nas concentrações 312,5; 625,0 e 625,0 $\mu\text{g/mL}$ o extrato de *S. cumini* apresentou atividade moderada e para os demais a atividade foi considerada baixa (Figura 10).

Algumas plantas apresentaram atividade antimicrobiana favorável como é o caso de *Myroxylon peruiferum* sobre *Staphylococcus* spp coagulase-negativa e *Streptococcus* spp. *Bixa orellana* e *Psidium guajava* apresentaram atividade frente a *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. Recentes dados da literatura não evidenciaram atividade antimicrobiana do extrato de *Bixa orellana* contra tais microrganismos (ALVES et al., 2000). Os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* apresentam-se sensíveis ao extrato de *Psidium guajava* (HOLETZ et al., 2002).

Os resultados obtidos, em nosso trabalho, estão de acordo com dados da literatura, que indicam menor efetividade dos extratos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels frente às bactérias Gram negativas, como *P. aeruginosa* e *E. coli*, se comparadas às Gram positivas, como *S. aureus* e *S. epidermidis* (CHANDRASEKARAN e VENKATESALU, 2004; OLIVEIRA, 2005).

Ao avaliar a atividade antimicrobiana, pelo teste de difusão em ágar, de óleos essenciais extraídos de folhas de *Syzygium cumini* e outras espécies do gênero, Shafi e colaboradores (2002) encontraram valores da atividade antimicrobiana referente ao halo de inibição em torno de 20 mm. Para este estudo os autores utilizaram os microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella typhimurum*.

A atividade antimicrobiana frente aos grupos bacterianos parece derivar da constituição da parede celular bacteriana e dos constituintes do extrato vegetal, principalmente do grupo dos taninos. Conforme dados de vários autores (KHAN et al., 2001; SRINAVASAN et al., 2001; CIMANGA et al., 2002) o teor de taninos e atividade antimicrobiana estão relacionados, pois bactérias Gram positivas têm estrutura celular mais rígida, parede celular quimicamente menos complexa e menor teor de lipídico do que as Gram negativas.

O mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses. A primeira pressupõe-se que os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexam com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

Segundo alguns autores (HOLETZ et al., 2002; GNAN e DEMELLO, 1999), as famílias Anacardiaceae (*Anacardium occidentale*), Aquifoliaceae (*Ilex paraguariensis*), Bixaceae (*Bixa orellana*), Fabaceae (*Myroxylon peruiferum*), Leguminosae (*Mimosa tenuiflora*), Mimosoideae (*Stryphnodendron adstringens*) e Myrtaceae (*Eugenia uniflora*, *Psidium guajava*) foram as que mais se destacaram no aspecto da atividade antimicrobiana.

De um modo geral, as plantas têm atividade ilimitada para sintetizar compostos aromáticos sendo na sua maioria compostos fenólicos e derivados (GEISSMAN, 1963). Em muitos casos, estas substâncias servem como mecanismo de defesa da planta contra predadores, insetos e

microrganismos. Alguns compostos como terpenóides, conferem à planta seu odor, outros (quinonas e taninos) são responsáveis pelo pigmento (SIMÕES et al., 2003).

5.5. Citotoxicidade do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

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

Pela metodologia de avaliação da atividade citotóxica utilizada, o ensaio foi realizado em uma monocamada de cultura de células de ovário de hamster chinês CCL-61. A curva dose resposta da amostra, determinada após 48 horas de exposição, foi construída para permitir a obtenção dos valores de IC₅₀, índice de citotoxicidade que causa a morte celular de 50 % (Figura 11).

O ensaio utilizando monocamada é um método que requer um reduzido número de células quando comparado a outros métodos e é facilmente manipulado utilizando microplacas de 96 poços, o que permite ensaiar uma ampla faixa de concentração de diferentes amostras (BUCKBERRY et al., 1993).

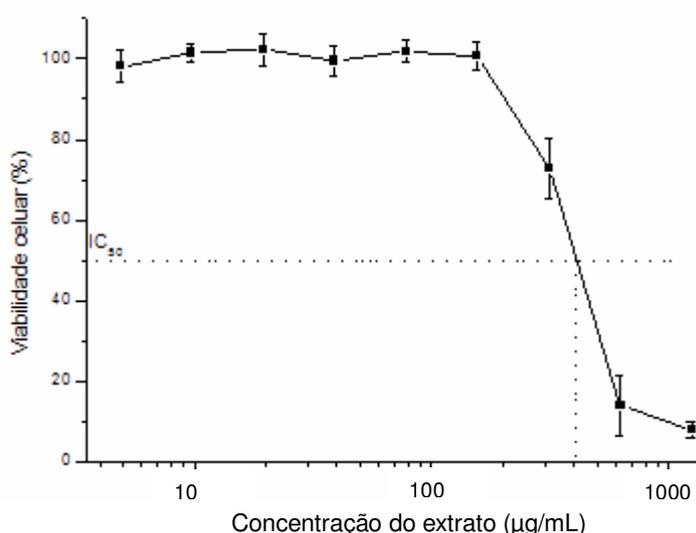


Figura 11. Índice de citotoxicidade do extrato seco dos frutos de *S. cumini* em culturas de CHO

Para observar o resultado de citotoxicidade e analisar a existência de células vivas ou mortas, foi utilizado o corante supravital do composto tetrazólio (5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-

dimetiltiazolil)-3-(4-sulfonil) tetrazólio (MTS) a 0,2 % e metassulfato de fenazida (PMS) a 0,09% (20:1). Portanto, na presença de células mortas, a coloração marrom indica que a amostra incubada com as células causou citotoxicidade, ou seja, morte celular, enquanto que a coloração amarela indica ausência de citotoxicidade, uma vez que existem células vivas no meio.

O extrato seco dos frutos de *S. cumini* apresentou índice de citotoxicidade (IC) na concentração de 400 µg/mL. A Figura 11 representa os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade do extrato.

Segundo Souza (2007) o extrato obtido com etanol 50 % de folhas de *M. cauliflora* (família Myrtaceae) apresentou citotoxicidade na concentração de 1250 µg/mL, utilizando cultura de células de mamíferos da linhagem de macrófagos J774.

O extrato estudado, posteriormente, será utilizado para incorporação em formulações cosméticas para serem administrados topicamente. Os anti-sépticos clorexidina e clorexidina+cloreto de benzalcônio+álcool benzílico, por exemplo, que exibem citotoxicidade frente a culturas de células humanas de fibroblastos e queratinócitos e, mesmo assim, foram aprovados pelos órgãos responsáveis e são utilizados pela população. Ao contrário, do que ocorre com iodo-povidina que, quando sua citotoxicidade em fibroblastos de murinos é comparada à de digluconato de clorexidina, apresenta-se como um anti-séptico de melhor tolerabilidade, promovendo citotoxicidade após contato de 30 minutos, porém com revitalização das células após 24 horas (MULLER e KRAEMER, 2006).

5.6. Teste do micronúcleo em *Tradescantia pallida* (TRAD-MCN) do extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Embora as plantas apresentem uma variedade de compostos com atividades farmacológicas ou nutracêuticas, elas também podem possuir substâncias tóxicas com potencial carcinogênico e mutagênico. Assim, a atividade quimioterapêutica potencial deve ser estabelecida em concordância com a investigação dos efeitos mutagênicos, a fim de avaliar quão seguros seriam esses extratos

para o uso medicinal (OLIVEIRA et al., 2008). Entretanto, poucos estudos têm sido dirigidos para a avaliação do potencial mutagênico de plantas pertencentes à flora brasileira.

Os resultados, apresentados na Tabela 14, demonstraram a frequência de micronúcleos (MN) observados em células-mãe de pólen de *Tradescantia pallida*.

Tabela 14. Frequência de micronúcleo, representado pela média e desvio padrão ($M \pm EP$) em células mãe de grão de pólen de *Tradescantia pallida*

Tratamentos	Média \pm EP
Controle positivo	2,54 \pm 0,28*
Controle negativo	0,40 \pm 0,10
Extrato 312,5 μ g/mL	0,66 \pm 0,13
Extrato 650,0 μ g/mL	0,53 \pm 0,15
Extrato 1250,0 μ g/mL	1,18 \pm 0,19*
Extrato 2500,0 μ g/mL	1,68 \pm 0,29*

(*) $p < 0,01$; $n = 10$

Foi observada diferença significativa de frequência de micronúcleos entre os grupos ($p < 0,01$). A análise pelo teste Mann-Whitney demonstrou efeito mutagênico nos tratamentos com 2500,0 μ g/mL ($p < 0,01$) e 1250,0 μ g/mL ($p < 0,01$) e as frequências de micronúcleos foram, respectivamente, 1,68 \pm 0,29 e 1,18 \pm 0,19. Nenhuma diferença foi observada entre o controle negativo e as menores concentrações 650,0 e 312,5 μ g/mL, apresentando frequência média de micronúcleos de, respectivamente, 0,53 \pm 0,15 e 0,66 \pm 0,13 (Figura 12).

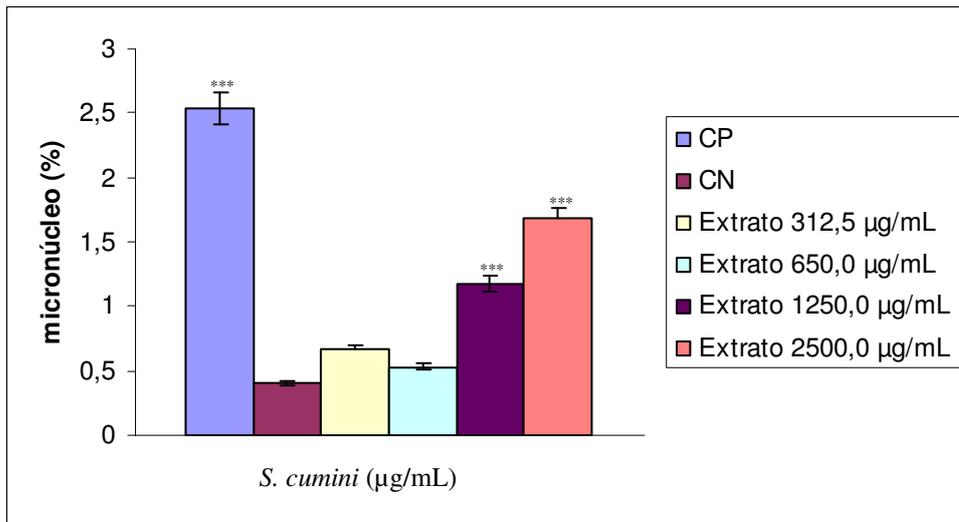


Figura 12. Frequência de micronúcleos (\pm desvio padrão) em células-mãe de grão de pólen de *Tradescantia pallida*.

Para ensaios de mutagenicidade utilizam-se marcadores de resposta como os ensaios de aberrações cromossômicas e micronúcleo. Os ensaios de micronúcleo em *Tradescantia pallida* nos últimos anos têm sido utilizados para controle de efeitos de poluentes ambientais em água, ar e solo e mais, recentemente, utilizados para avaliar mutagenicidade em extratos vegetais (BATALHA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2008). O ensaio de micronúcleo em *T. pallida* é um método sensível para avaliação de mutagênese que pode ser empregado em condições laboratoriais afim de monitorar o dano ao DNA (CARVALHO-OLIVEIRA et al., 2005).

As inúmeras semelhanças entre, a constituição genética das plantas superiores e dos mamíferos podem demonstrar efeitos semelhantes de um mutágeno sobre o DNA da planta e do mamífero. Interessantemente ao avaliar a frequência de micronúcleos do extrato seco dos frutos de *S. cumini* observou-se que nas maiores concentrações 2500,0 e 1250,0 µg/mL ocorreu um aumento significativo da frequência de micronúcleos. No ser humano, por exemplo, apenas uma fração mínima da lesão sobre o DNA pode ou não levar a mutações, ao passo que na *Tradescantia* a grande maioria das lesões resulta em mutação. Um determinado aumento na frequência do dano inicial elevará na mesma proporção a taxa de incidência de mutações, tanto no ser humano quanto na *Tradescantia* (ICHIKAWA, 1997). Dessa forma o teste de micronúcleo em *T. pallida* foi

utilizado neste estudo como método de triagem para posteriores avaliações de mutagenicidade em mamíferos.

Foram utilizadas em várias concentrações para verificar o comportamento das células-mãe de pólen de *T. pallida* e a frequência de micronúcleos. De forma semelhante ao nosso estudo, trabalho utilizando micronúcleo em *T. pallida* frente à exposição de extratos vegetais, apresentou mutagenicidade nas maiores concentrações testadas (OLIVEIRA et al., 2008, SANNOMIYA et al., 2007). Assim, um aumento relativo da frequência de mutações somáticas na *Tradescantia* pode indicar um aumento proporcional do risco de mutações do extrato seco dos frutos de *S. cumini* para o ser humano. Portanto, a avaliação da mutagenicidade de produtos naturais deve ser seriamente considerada, quando se busca uma aplicação farmacológica em seres humanos ou emprego cosmético como é caso do extrato seco dos frutos de *S. cumini*.

Na Figura 13a é possível observar o desenvolvimento do experimento. A Figura 13b permite observar a inflorescência no momento correto para realização do experimento. A Figura 13c estão apresentadas tétrades selecionadas e coradas com aceto-carmim. A Figura 13d é possível observar dois micronúcleos em maior aumento.



Figura 13: a) Conjunto de *Tradescantia pallida* por tratamento; b) Inflorescência de *Tradescantia pallida* (conjunto de várias flores); c) Tétrades de inflorescência de *Tradescantia pallida* tratado com extrato do fruto de *Syzygium cumini* na concentração de 2500 µg/mL em 400 x (Barra de escala 4 µm); d) Tétrade de inflorescência de *Tradescantia pallida* tratado com extrato do fruto de *Syzygium cumini* na concentração de 2500 µg/mL, micronúcleo (seta) e 1000 x (Barra de escala 0,1 µm).

5.7. Teste do micronúcleo em camundongos

Dentre os testes de avaliação de danos sobre o DNA em células *in vivo*, o teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos tem sido largamente utilizado para estabelecer carcinogênese (AZEVEDO et al., 2003). É um método útil para avaliar a capacidade de substâncias para induzir danos cromossômicos em células em estágio de divisão na medula óssea (FENECH, 2005).

Resultados experimentais do ensaio de indução de micronúcleos em medula óssea de camundongos frente ao extrato seco dos frutos de *S. cumini* estão apresentados nas Figuras 14 e 15 para tratamento de 24 e 48 horas.

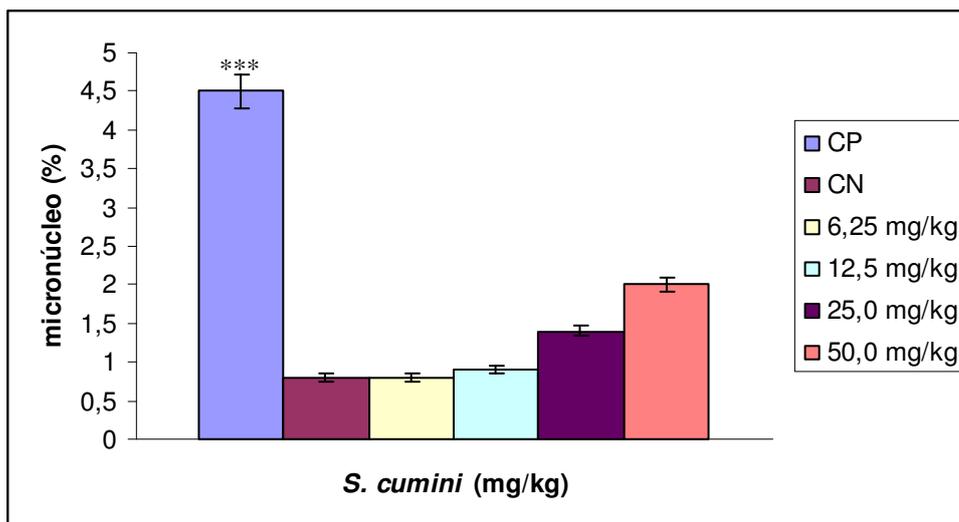


Figura 14. Ensaio de mutagenicidade através do teste do micronúcleo de medula óssea do extrato seco dos frutos de *S. cumini* no tratamento de 24 h nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 mg/kg; CP: controle positivo; CN: controle negativo. Mann-Whitney. *** $p < 0,01$ (CN X CP).

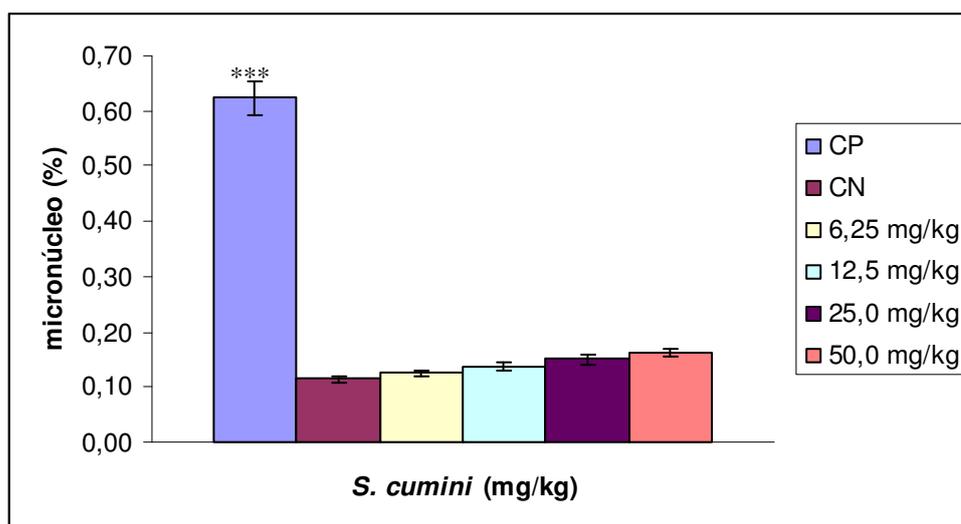


Figura 15. Ensaio de mutagenicidade através do teste do micronúcleo de medula óssea do extrato seco dos frutos de *S. cumini* no tratamento de 48 h nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 mg/kg; CP: controle positivo; CN: controle negativo. Mann-Whitney. *** $p < 0,01$ (CN X CP).

Conforme pode ser observado, as Figuras 14 e 15 os resultados demonstraram que a exposição de animais normais no período de 24 e 48 horas, às diferentes concentrações de 6,25 a 50 mg/kg do extrato seco dos frutos de *S. cumini*, por meio da análise pelo teste Mann-Whitney não demonstrou efeito mutagênico nos tratamentos, portanto, não induziu significativamente ($p < 0,05$) um aumento na incidência de micronúcleos, quando comparado ao grupo de animais controle negativo somente recebeu salina.

Ao comparar os resultados dos testes do micronúcleo em *T. pallida* e em mamíferos foi possível observar que em maiores concentrações o extrato avaliado em *T. pallida* apresentou mutagenicidade, enquanto o teste em camundongos não houve mutagenicidade em nenhuma das concentrações e nenhum dos tempos avaliados. Os diferentes resultados encontrados pode ser pelo fato de plantas e mamíferos apresentarem uma diferente metabolização dos mutágenos. Entretanto, o teste da *T. pallida* mostrou-se útil como estudo preliminar para posterior avaliação em mamíferos.

Os extratos vegetais possuem importantes propriedades no combate contra o desenvolvimento de diversas doenças, sendo amplamente difundida pela comunidade científica e muito bem aceita pela população em geral. No entanto, a possibilidade destes extratos possuírem efeitos adversos tem sido negligenciada e até mesmo ignorada. Diante disto, estudos na literatura indicam que diferentes produtos de origem natural como alguns flavonóides da soja, genisteína, daidzeína e metabólitos, amplamente utilizados, podem ser potencialmente genotóxicos (SCHMITTA et al., 2003). Os mecanismos envolvidos que explicam a clastogenicidade e/ou interação com o DNA não estão totalmente elucidados. Segundo Schmitta e colaboradores (2003), a segurança ou toxicidade da utilização destes produtos de origem natural dependem do tempo de exposição da dose utilizada.

Portanto, os resultados obtidos como o teste de micronúcleo permitem concluir que em termos de mutagenicidade, o extrato pode ser utilizado como forma cosmética, pois não apresentou danos ao DNA nas concentrações estudadas.

A Tabela 15 apresenta o estudo de citotoxicidade de eritrócitos policromáticos (PCEs) e normocromáticos (NCEs) em células de medula óssea de camundongos tratados com extrato seco dos frutos de *S. cumini* no período de 24 e 48 horas.

Tabela 15. Estudo da citotoxicidade de eritrócitos policromáticos (PCEs) e normocromáticos (NCEs) em células de medula óssea tratado com o extrato seco dos frutos de *S. cumini* durante 24 e 48 horas

Tratamentos	PCEs/NCEs (%)	
	Média ± EP 24 h	Média ± EP 48 h
Controle positivo	0,28± 0,08*	0,28 ± 0,08*
Controle negativo	0,48 ± 0,10	0,48 ± 0,10
Extrato 6,25 mg/kg	0,48 ± 0,07	0,58 ± 0,09
Extrato 12,5 mg/kg	0,47 ± 0,04	0,47 ± 0,06
Extrato 25,0 mg/kg	0,47 ± 0,08	0,46 ± 0,09*
Extrato 50,0 mg/kg	0,40 ± 0,07*	0,31 ± 0,09*

(*) $p < 0,05$; $n = 8$

Foi observada diferença significativa da citotoxicidade de eritrócitos policromáticos (PCEs) e normocromáticos (NCEs) em células de medula óssea entre os grupos ($p < 0,05$). A análise pelo teste Kruskal Wallis demonstrou efeito citotóxico nos tratamentos com 50,0 mg/kg ($p < 0,05$) para o tratamento de 24 e 48 horas e 25,0 mg/kg ($p < 0,05$) para o tratamento de 48 horas. Nenhuma diferença foi observada entre o controle negativo e as menores concentrações 12,5 e 6,25 mg/kg.

Sabe-se que a relação entre PCEs e NCEs pode indicar a toxicidade de uma substância em ensaio. Segundo Leite e colaboradores (2006), a razão entre a frequência de PCEs e NCEs decresce quando a substituição dos PCEs originados dos eritroblastos é deprimida. Pelos resultados obtidos, verificou-se que não houve decréscimo estatisticamente significativo da relação PCEs/NCEs nas doses 12,5 e 6,25 mg/kg ($p > 0,05$). Assim, foi observado que o extrato seco dos frutos de *S. cumini* não apresentou atividade citotóxica nas condições experimentais utilizadas para estas concentrações. Já as concentrações maiores ocorreu citotoxicidade.

5.8. Teste do Ames

Mutações são definidas como qualquer alteração permanente no DNA e podem acontecer em células germinativas ou somáticas, que envolvem mutações cromossômicas e mutações gênicas. A mutagenicidade é a capacidade de um agente químico ou físico causar alterações genéticas. Estes agentes podem ser mutágenos primários interagindo diretamente com a molécula de DNA, ou mutágenos secundários que, sofrendo reações metabólicas no organismo vivo, tornam-se mutagênicos (VARELLA et al., 2004).

Os resultados da atividade mutagênica do extrato seco dos frutos de *S. cumini* nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, em ausência e presença de ativação metabólica (S9), estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Atividade mutagênica do extrato seco dos frutos de *S. cumini* nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, em ausência e presença de ativação metabólica (S9)

Tratamento (mg/placa) <i>S. cumini</i>	Número de revertentes/placa (RM) em linhagens de <i>S. typhimurium</i> (M ± SD)									
	TA98		TA97a		TA100		TA102			
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
DMSO										
0,00 ^a	12 ± 3	29 ± 3	187 ± 7	205 ± 9	137 ± 19	123 ± 34	222 ± 25	290 ± 10		
1,61	13 ± 3 (1,0)	32 ± 6 (1,1)	194 ± 33 (1,0)	271 ± 5 (1,3)	191 ± 12 (1,4)	118 ± 12(1,0)	292 ± 6(1,3)	237 ± 3 (0,8)		
2,43	12 ± 2 (1,0)	21 ± 2 (0,7)	229 ± 13 (1,2)	222 ± 7 (1,1)	124 ± 15 (0,9)	86 ± 66 (0,7)	264 ± 11(1,2)	310 ± 20 (1,1)		
3,23	14 ± 2 (1,2)	30 ± 4 (1,0)	197 ± 19(1,0)	183 ± 9 (0,9)	153 ± 7 (1,1)	117 ± 6 (1,0)	228 ± 28 (1,0)	397 ± 21 (1,4)		
4,85	10 ± 2 (0,8)	25 ± 3 (0,9)	182 ± 11 (1,0)	163 ± 10 (0,8)	115 ± 19 (0,8)	114 ± 5 (0,9)	250 ± 23 (1,1)	323 ± 21 (1,1)		
6,45	16 ± 0,7 (1,3)	35 ± 3 (1,2)	207 ± 31 (1,0)	120 ± 6 (0,6)	223 ± 23 (1,6)*	116 ± 11 (0,9)	198 ± 36 (0,9)	283 ± 7 (1,0)		
C+ ^b	2630 ± 112	2227 ± 78	683 ± 20	1250 ± 269	1836 ± 28	1638 ± 547	667 ± 10	354 ± 41		

* p < 0,05 (ANOVA); ** p < 0,01 (ANOVA). M ± SD= média ± desvio padrão.

^a Controle negativo: dimetilsulfóxido, 75µL/placa. ^b Controles positivos: 4-nitrofenilenodiamina, 10 µg/placa (TA98 e TA97a); azida sódica, 2,5 µg/placa TA100); mitomicina 3,0 µg/placa (TA102), em ausência de S9, e 2-antramina 3,0 µg/placa (TA98, TA97a e TA100); 2-aminofluoran, 10 µg/placa (TA102), em presença de S9.

Ao realizar os ensaios de mutagenicidade *in vitro*, foi escolhido o teste de Ames, pois a metodologia é rápida e de alta reprodutibilidade para detectar substâncias genotóxicas (CARDOSO, 2006). Para o presente trabalho foram utilizadas as seguintes linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102, promovendo uma abrangente triagem dos diferentes compostos mutagênicos primários ou secundários.

O extrato seco dos frutos de *S. cumini* teve sua triagem de toxicidade realizada por meio de concentrações decrescentes para todas as linhagens, pois cada uma apresenta diferente sensibilidade. O parâmetro de escolha foi o de maior concentração não tóxica para todas as linhagens, uma vez que para a realização do ensaio de mutagenicidade, é importante avaliar a menor concentração possível da substância capaz de causar alterações genéticas (VIANA et al., 2005).

Para realizar a solubilização do extrato seco dos frutos de *S. cumini* foi utilizado DMSO, portanto, este solvente foi adicionado aos controles negativos, para que fosse avaliado o seu comportamento com relação à promoção da mutação reversa, favorecendo “falsos-positivos” com o extrato. As concentrações testadas foram entre 1,61 a 6,45 mg/placa.

Os resultados obtidos com o extrato seco dos frutos de *S. cumini* (Tabela 16) mostraram indícios de mutagenicidade na concentração de 6,45 mg/placa, apenas com a linhagem TA100 sem metabolização, sendo negativos para as demais concentrações. Após a metabolização, a dose-resposta ainda foi significativa em algumas concentrações, porém os valores de RM foram menores que 1,5, valor este considerado não-mutagênico.

Os resultados negativos encontrados nos ensaios de mutagenicidade referente ao extrato em estudo podem ser devido à alta concentração de taninos presente. Tal afirmação encontra respaldo na literatura. Segundo Gupta e colaboradores (2002), os taninos apresentaram efeito antimutagênico quando avaliado pelo método de Ames utilizando *Salmonella* das seguintes linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102.

Konan e colaboradores (2007) avaliaram a mutagenicidade do extrato etanólico de *Anacardium occidentale* L. e demonstraram que o extrato induziu sinais de *frameshift* e par de bases de substituição. Já Cavalcante e colaboradores (2003) relataram *frameshift* causada pelo suco de caju, que é rico em proantocianidina, quercetina e ácido anarcádico. O extrato demonstrou uma resposta clastogênica quando administrada na concentração de 2000 mg/kg, no entanto o efeito foi muito inferior ao efeito dos ciclofosfamida usado como controle positivo. Os polifenóis são componentes tanto do extrato de *Anacardium occidentale* L. como do extrato de *S. cumini*. Estrutura do tipo flavonóide apresenta efeito genotóxico citado na literatura, embora diversos resultados sejam opostos. Como, por exemplo, a quercetina foi considerada genotóxica usando TA100 e TA98 (SUGIMURA et al., 1977; NAGAO et al., 1981). No entanto, a quercetina e a isoquercetina reduziram o efeito clastogênico em ratos, quando administrou-se o benzo (α) pirona (BaP) (EDENHARDER et al., 2000). Ao utilizar a quercetina também houve uma redução do efeito da amino-3-4dimetilimidazolil [4,5] quinolona (MeIQ) (KANG et al., 2004).

Sendo os componentes principais do extrato de *Anacardium occidentale* L., os flavonóides e taninos, torna-se difícil concluir quais os compostos que possam estar envolvidos no efeito mutagênico do extrato. Em qualquer caso, é importante observar que testes mutagenicidade *in vitro* não são necessariamente positivos *in vivo*, porque muitas substâncias com atividade mutagênica não podem ser absorvidos *in vivo*, minimizando o potencial mutagênico das substâncias (Barros et al., 2005).

5.9. Teste do cometa

O estudo do teste do cometa vem sendo proposto para a detecção de substâncias genotóxicas. É um teste indicativo de lesões genômicas podendo ser passíveis de correção. Por outro lado, compostos antitumorais clássicos, como a ciclofosfamida, são reconhecidamente agentes potencialmente genotóxicos.

Nas Figuras 16 e 17 estão representados os resultados encontrados na análise do teste do cometa, após 24 e 48 horas de administração de diferentes concentrações do extrato seco dos frutos de *S. cumini*.

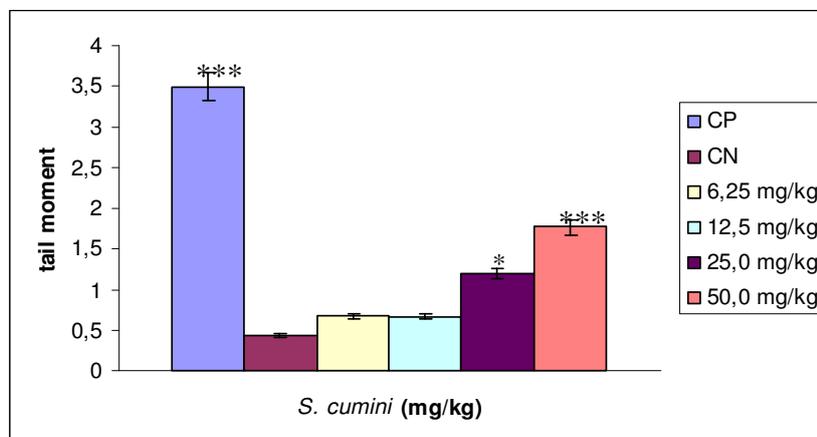


Figura 16. Ensaio de genotoxicidade através do teste do cometa do extrato seco dos frutos de *S. cumini* no tratamento de 24 h nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 mg/kg; CP: controle positivo; CN: controle negativo. Mann-Whitney. *** $p < 0,0001$ (CN X CP; CN X 50,0 $\mu\text{g/mL}$) ; * $p < 0,05$ (CN X 25,0 $\mu\text{g/mL}$).

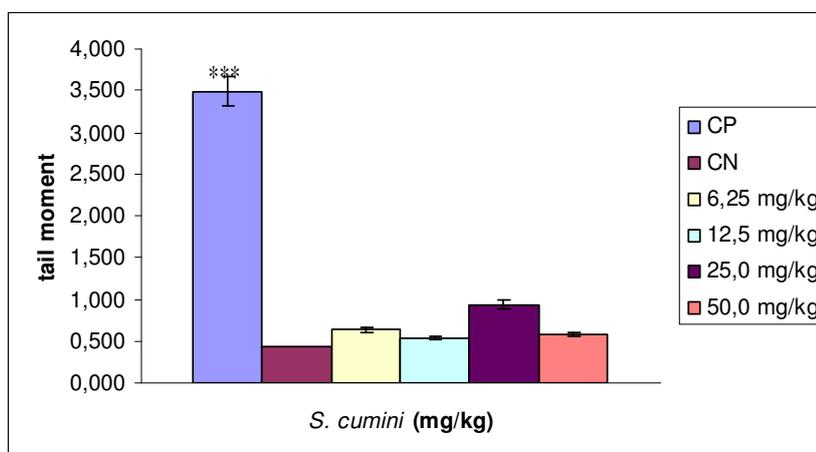


Figura 17. Ensaio de genotoxicidade através do teste do cometa do extrato seco dos frutos de *S. cumini* no tratamento de 48 h nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 mg/kg; CP: controle positivo; CN: controle negativo. Mann-Whitney. *** $p < 0,0001$ (CN X CP).

Conforme pode ser observado nas Figuras 16 e 17, através da análise estatística pelo teste Mann-Whitney, uma diferença significativa do *tail moment* foi observada para os grupos controle positivo e a amostra em concentração de 50,0 mg/kg ($p < 0,01$); demonstrou também efeito significativo na concentração de 25,0 mg/kg ($p < 0,05$) para o tratamento de 24 horas. Para o tratamento de 48 horas, nenhuma concentração apresentou diferenças significativas em relação ao

controle negativo. Os resultados podem ser indicativos que o sistema de reparo foi ativado no tratamento de 48 horas uma vez que o ensaio do cometa demonstra danos passíveis de reparo (VIJAYALAXMI e VENU, 1999) (Figura 17).

As plantas medicinais contêm inúmeros constituintes que podem atuar como cofatores de enzimas envolvidas em reações de oxi-redução (EDENHARDER et al., 2002). Desta forma, substâncias antioxidantes podem competir com o DNA como o alvo para reações de alquilação, reduzindo a genotoxicidade dos agentes alquilantes (VIJAYALAXMI e VENU, 1999). Os frutos de *S. cumini* apresentam compostos fenólicos, os quais podem proteger os sistemas biológicos por diferentes mecanismos. Sabe-se que o polifenol limonóide é indutor da enzima glutathione s-transferase e sua estimulação facilita a eliminação de componentes tóxicos (EDENHARDER et al., 2002; TASSANEEYAKUL et al., 2000; FRANKE et al., 2005). Outro mecanismo relacionado com compostos fenólicos, é o estímulo de rota de reparo do DNA, através da regulação da transcrição ou estabilização do mRNA, como é o caso da miracetina (ABALEA et al., 1999).

A Figura 18a apresenta a imagem da célula do controle negativo em que foi administrada solução salina aos animais. A Figura 18b demonstra a medida desta célula para posterior identificação de danos do DNA. Na Figura 18c apresenta a imagem da célula com danos no DNA, no qual observa-se presença de cometa, sendo uma célula de controle positivo o fármaco utilizado foi ciclofosfamida. A Figura 18d apresenta a medida do cometa para posterior análise de seu *tail moment* e avaliação do dano do DNA. A Figura 18e apresenta a imagem da célula com extrato dos frutos de *S. cumini* na concentração 50,0 mg/kg que apresentou genotoxicidade podendo ter ocorrido lesões ao DNA. A Figura 18f demonstra a medida desta célula para posterior identificação de danos do DNA. A Figura 18g apresenta a imagem da célula com extrato dos frutos de *S. cumini* na concentração 6,25 mg/kg que não apresentou genotoxicidade. A Figura 18h demonstra a medida do cometa para posterior identificação de danos do DNA.

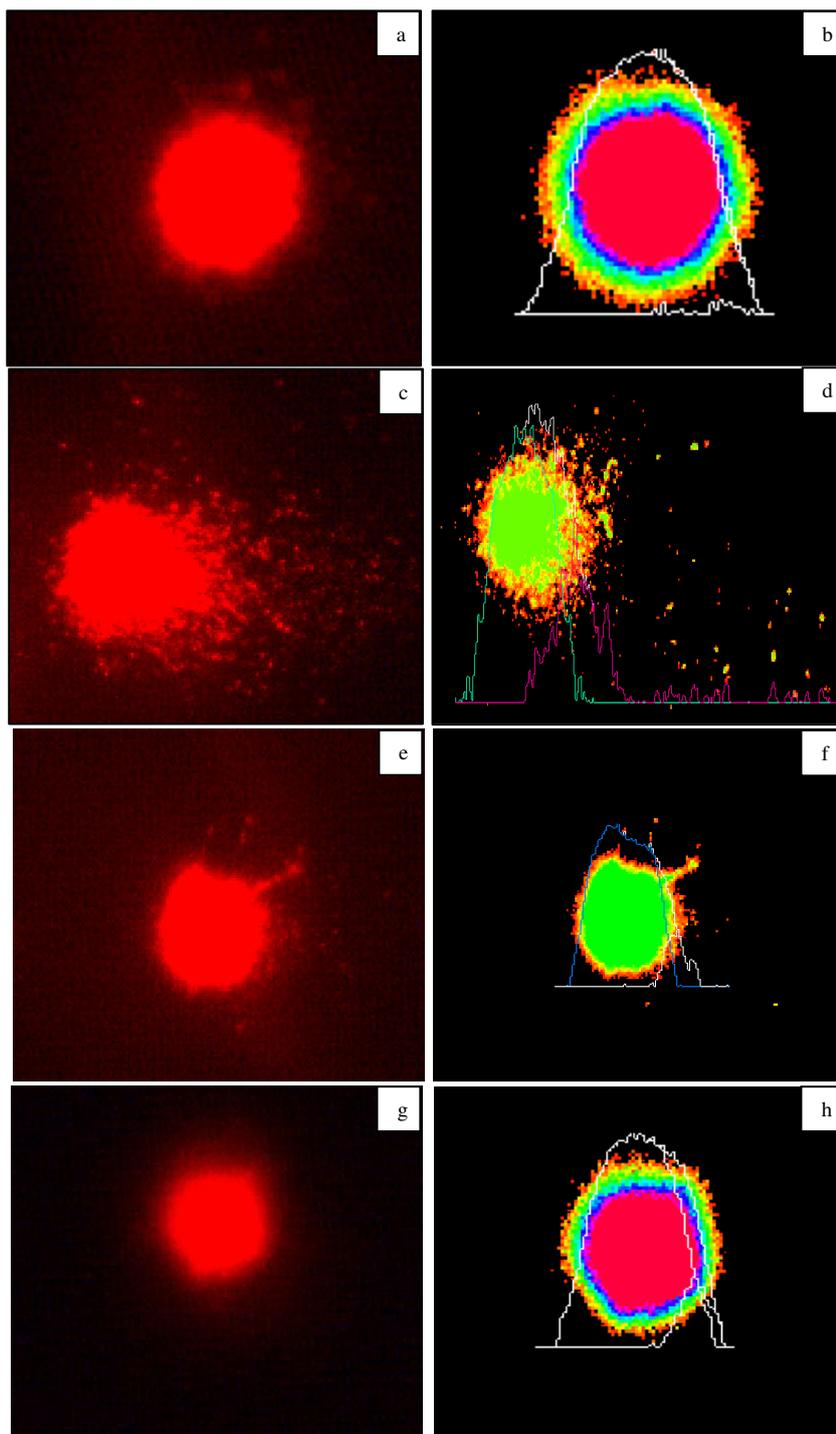


Figura 18. Núcleos de células sanguíneas de camundongo encontradas no ensaio do cometa a) controle negativo onde não se observa grande número de fragmentos de DNA; b) Avaliação quantitativa realizada pelo software Comet Score 1.5 e determinação do *tail moment*; c) controle positivo; d) Leitura para determinação do *tail moment*; e) Avaliação quantitativa realizada pelo software Comet Score 1.5 e determinação do *tail moment* do extrato seco dos frutos de *S. cumini* na concentração de 50,0 mg/kg; f) Leitura para determinação do *tail moment*; g) Avaliação quantitativa realizada pelo software Comet Score 1.5 e determinação do *tail moment* do extrato seco dos frutos de *S. cumini* na concentração de 6,25 mg/kg; h) Leitura para determinação do *tail moment*.

5.10. Preparo das formulações

Após a etapa de obtenção do extrato, estudo morfo-anatômico, controle da qualidade do extrato, avaliação da concentração inibitória mínima, concentração bactericida e fungicida mínima, ensaios de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade do extrato seco dos frutos de *S. cumini*, foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* incorporado a um sabonete líquido, a um gel e a uma emulsão não-iônica. Estas formas de aplicação foram selecionadas devido às diferentes características de composição que apresentam, permitindo dessa forma, uma maior abrangência para a análise da atividade buscada.

As formulações de sabonetes líquidos apresentam composição similar aos xampus, com elevadas concentrações de tensoativos detergentes, mas o que os diferenciam é sua escolha na concentração. Estes produtos podem ser transparentes ou perolados.

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

Na formulação do sabonete foi utilizado lauril éter sulfato de sódio que é um dos principais detergentes sintéticos empregado no preparo de tais produtos. Ao lauril éter sulfato de sódio foi associado outro tensoativo detergente, a cocoamido propilbetaína, normalmente associada às formulações deste tipo, pois melhora a qualidade de espuma e eleva na viscosidade da composição. Para proporcionar adequado sobreengorduramento e maior suavidade à pele, quando da utilização do produto, empregou-se a dietanolamida de ácido graxo de coco, o glicerilcocoato PEG7 e o óleo de amêndoas etoxilado (OBUKOWHO, 2007).

A presença de adequada concentração de ácido cítrico permitiu a correção do pH para 6,0. Tal escolha obedeceu a parâmetro comumente adotado pelo mercado. Valores de pH próximo a 6,0 atende à necessidade de não se modificar o pH natural da pele, que normalmente varia dentro da faixa de pH 4,0 a 6,0 (ÖZER; AYDIN; YAZAN, 2007).

Diferentemente do sabonete líquido, a forma cosmética emulsão é constituída por duas fases distintas, uma de natureza aquosa e outra oleosa, estabilizada pela presença de um terceiro componente, o tensoativo emulsificante. A grande vantagem deste tipo de preparação é a possibilidade de incorporar ativos hidrossolúveis e lipossolúveis sem perda de estabilidade e/ou modificação em suas características físicas final. Tal possibilidade não mostra a mesma viabilidade em se tratando dos sabonetes líquidos (SIQUEIRA, 2004).

Na formulação da emulsão não-iônica foram utilizados, como agente de consistência, o álcool cetílico e o monoestearato de glicerila. Para proporcionar uma melhor emoliência foram utilizados oleato de decila, adipato de dibutila, base de absorção da lanolina, óleo de amêndoas e ciclometicona. Como tensoativo para a estabilização da emulsão empregou-se o álcool cetosteárfico etoxilado 20 OE. Este tensoativo, por apresentar caráter não-iônico, mostra larga apresenta ampla faixa de compatibilidade com diversos materiais possíveis de serem incorporados a uma emulsão. Além disso, permite estabilidade em uma larga faixa de pH. Como solubilizante e umectante foi utilizado propilenoglicol (ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007).

A forma cosmética gel é um sistema semi-sólido constituído por dispersões de pequenas partículas (ordem nanométrica) ou de grandes moléculas orgânicas interpenetradas por um líquido. São sistemas monofásicos, onde a água, seu principal constituinte, é espessada pela presença de um homopolímero ou copolímero natural ou sintético (ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Para a obtenção do gel, empregou-se um polímero sintético carboxivinílico também conhecido como carbômero. Sua escolha baseou-se no fato de ser o principal polímero sintético empregado para obtenção de gel, disponível no mercado, e apresentar características de elevada transparência com adequado caráter sensorial após a aplicação tópica. O umectante utilizado foi o propilenoglicol.

Todas as preparações testadas se apresentaram isentas de conservantes antimicrobianos. Tal critério foi adotado com o objetivo de evitar as possíveis interferências que estes materiais pudessem proporcionar às análises propostas.

A avaliação da atividade antimicrobiana do sabonete líquido, do gel e da emulsão não-iônica contendo extrato seco dos frutos de *S. cumini* foi realizada utilizando-se o extrato seco dos frutos de *S. cumini* solubilizado em propilenoglicol:água (3:2). Tal procedimento objetivou minimizar a interferência que a inclusão de um extrato pode exercer sobre a qualidade de espuma do sabonete líquido e não influenciar negativamente nas demais preparações. Os ensaios ocorreram frente às bactérias Gram positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), Gram negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) e leveduras (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*).

5.11. Incorporação do extrato glicólico dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels às formulações

Após o preparo do extrato etanólico dos frutos de *S. cumini*, com secagem em evaporador rotatório para eliminação do álcool etílico e posterior procedimento de liofilização para a eliminação total da água, o extrato seco dos frutos de *S. cumini* foi solubilizado em propilenoglicol:água (3:2), o que facilitou sua incorporação nas formulações propostas. A concentração de extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* incorporado às formulações foi de 10% (p/p) para cada uma delas.

Outra consideração importante diz respeito à utilização do propilenoglicol como material para a solubilização do extrato seco dos frutos de *S. cumini*. Na escolha deste material para os ensaios referentes à avaliação antimicrobiana do extrato, procurou-se prever a possível incorporação do extrato solubilizado no sabonete líquido, no gel e na emulsão não-iônica. Em tal situação, deve-se estabelecer um material que permita a adequada suspensão e até solubilização do extrato, e que apresente a menor influência possível sobre as propriedades do sabonete líquido, do gel e da formulação, ou seja, o extrato não deve interferir sobre a viscosidade, estabilidade e poder

espumógeno e fundamentalmente sobre a capacidade de limpeza ou detergência. Como solubilizante para o extrato, foi utilizado propilenoglicol:água (3:2), escolhido qualitativamente e quantitativamente para diluir o extrato seco dos frutos de *S. cumini*, previamente preparado pelo método da percolação (etanol:água-1:1). Como controle negativo empregou-se o sabonete líquido, o gel e a emulsão não iônica isentos de extrato vegetal.

5.12. Controle microbiológico da formulação com extrato glicólico dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Para assegurar a qualidade das preparações para uso tópico é necessário realizar ensaios de controle durante a fabricação e no produto acabado. Características organolépticas, determinação de pH e controle microbiológico, entre outros, fazem parte destes testes (STULZE et al., 2005).

Segundo Stulze e colaboradores (2005), ao analisar as amostras de xampus contendo extratos vegetais, observaram-se que uma de suas formulações apresentou contagem microbiana $> 6,5 \times 10^4$, acima do limite de aceitabilidade estabelecido na legislação. Conseqüentemente, foi possível associar os resultados obtidos nas análises físico-químicas nas quais ocorreram modificações, provavelmente decorrente desta contaminação.

As preparações com composição complexa como medicamentos e cosméticos constituem fonte rica em nutrientes para o crescimento de microrganismos. Grande parte dos ensaios para avaliação de qualidade é comum a todas as preparações, e dentre eles, merece destacar a importância do controle microbiológico. Foi realizada a contagem total do número de microrganismos viáveis e a pesquisa de patógenos para as formulações desenvolvidas e posteriormente incorporadas com extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* (Tabela 17).

Tabela 17. Controle microbiológico das formulações solução glicólica do extrato seco dos frutos de *S. cumini*

Amostras com extrato glicólico dos frutos de <i>S. cumini</i>	Contagem n° total de microrganismos (UFC/g)		Pesquisa de patógenos			
	Bactérias	Fungos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>
Sabonete líquido	<10	<10	ausente	ausente	ausente	ausente
Gel	<10	<10	ausente	ausente	ausente	ausente
Emulsão não-iônica	<10	<10	ausente	ausente	ausente	ausente
Recomendação	<10	<10	ausente	ausente	ausente	ausente

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

Os resultados obtidos por meio do controle microbiológico das formulações com extrato glicólico dos frutos de *Syzygium cumini* na concentração estudada (Tabela 17) permitiram observar que a contagem do número total de bactérias foi inferior a 10 UFC/g, nas amostras analisadas como *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Esta etapa deste estudo torna-se importante para as análises posteriores, envolvendo a avaliação da atividade antimicrobiana e o teste de desafio. Resultados positivos de contaminação nesta fase podem inviabilizar a execução das demais etapas.

5.13. Atividade antimicrobiana da formulação com e sem extrato glicólico dos frutos de *Syzygium cumini*

O consumidor tem-se tornado cada vez mais exigente e mais criterioso com a qualidade dos produtos consumidos. É crescente a sua preocupação em fazer uso de produtos menos agressivos de origem natural ou o mais próximo possível desta origem. Esta é a realidade à qual está submetida, também, a indústria cosmética, e desenvolver preparações contendo produtos naturais com atividade conservante também faz parte deste novo conceito. Por tal motivo remete-se à pesquisa de produtos extraídos de matérias-primas vegetais e produtos naturais com valor conhecido, comprovado ou não, que serão ofertados à indústria cosmética (PACKER e LUZ, 2007).

Uma das preocupações que levaram a este estudo é o crescente aumento da resistência microbiana aos antibióticos atuais. A resistência microbiana tem aumentado principalmente para aquelas amostras patogênicas isoladas de fontes humanas, na mesma proporção do uso indiscriminado de antimicrobianos (COHEN e TARTASKY, 1997; SMITH, 2005).

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de uma formulação que inibe o crescimento microbiano visível *in vitro*. Para um aprimoramento técnico deste procedimento, foi realizado o ensaio em microplaca, que permite visualizar a contaminação através da turvação dos meios de culturas nos poços contidas nas placas. Também foram determinadas as concentrações bactericida e fungicida mínima (CBM e CFM) das formulações por meio de subcultivos das microplacas em placas de ágar Muller Hinton para bactérias e ágar Sabouraud para fungos, avaliando a presença ou ausência de crescimento microbiano. A concentração bactericida e fungicida mínima é definida como a menor concentração que produz a morte de 99,9 % das células bacterianas e fúngicas (KONEMAN et al., 2001).

Os resultados obtidos da concentração inibitória mínima, pelo método da microdiluição de 96 poços frente aos microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. krusei*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Concentração inibitória mínima das formulações sem e com extrato glicólico dos frutos de *Syzygium cumini* para os microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. krusei*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*

Amostras	CIM ($\mu\text{g/mL}$)						
	Atividade antibacteriana				Atividade antifúngica		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Sabonete	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0	156,3	156,3	312,5
Sabonete com extrato	156,3	156,3	312,5	1250,0	156,3	156,3	156,3
Gel	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0	1250,0	1250,0	2500,0
Gel com extrato	312,5	312,5	2500,0	1250,0	156,3	156,3	156,3
Emulsão não-iônica	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0	1250,0	156,3	1250,0
Emulsão não-iônica com extrato	2500,0	156,3	2500,0	2500,0	156,3	156,3	312,5

Para o presente trabalho, o método empregado foi a microdiluição em placas de 96 poços seguindo as normas do NCCLS. As concentrações utilizadas para a realização do estudo da atividade antimicrobiana das formulações empregadas foi de 156,3 a 5.000 $\mu\text{g/mL}$. Considerando para esta escolha, os valores de CIM obtidos durante a avaliação do extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, que determinou serem necessárias as concentrações mínimas frente às bactérias e fungos é de 156,3 a 625,0 $\mu\text{g/mL}$. Apesar das concentrações escolhidas (10% de extrato na formulação) estarem bem acima do indicado, seu valor foi estabelecido de acordo com a estabilidade das formulações, e procurando resultados positivos para o sabonete líquido, o gel e a emulsão não-iônica. Outro fator a ser considerado diz respeito aos problemas técnicos em relação às formulações. Concentrações superiores à escolhida podem afetar a estrutura da fórmula e, por exemplo, comprometer a capacidade espumógena do sabonete líquido, a viscosidade e também a estabilidade das demais preparações. A manutenção destes parâmetros é fator determinante para a boa aceitação do produto, de tal forma que não devem ser desprezados.

Os resultados, apresentados na Tabela 18, demonstram que ao avaliar-se a concentração inibitória mínima (CIM) das formulações com extrato glicólico dos frutos de *S. cumini*, o microrganismo que apresentou maior resistência, independentemente da formulação, foi a *P. aeruginosa*, apresentando sensibilidade na concentração de 1250,0 µg/mL. Para o gel, os microrganismos *E. coli* e a *P. aeruginosa* apresentaram inibição nas concentrações de 2500,0 e 1250,0 µg/mL. Para a emulsão não-iônica os microrganismos mais resistentes foram *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* apresentando sensibilidade na concentração de 2500,0 µg/mL para todos os microrganismos.

O sabonete líquido sem a solução glicólica do extrato seco dos frutos de *S. cumini* apresenta concentração inibitória mínima (CIM) de 156,3 µg/mL para *C. krusei* e *C. albicans*. Para a *C. parapsilosis* a CIM é de 312,5 µg/mL. A mesma preparação demonstrou muito pouca atividade frente às bactérias testadas apresentando elevada concentração (2500,0 µg/mL).

A presença da solução glicólica do extrato seco dos frutos de *S. cumini* na concentração de 10% no sabonete líquido intensificou o efeito antibacteriano, reduzindo as concentrações antes de 2500,0 µg/mL para 156,3 µg/mL para *S. aureus* e *S. epidermidis* e 312,5 µg/mL para *E. coli*. A CIM para a *P. aeruginosa* foi 1250,0 µg/mL, demonstrando ser esta a bactéria mais resistente à atividade do extrato proposto e presente no sabonete líquido.

Os resultados demonstram ser o gel e o creme não-iônico sem solução glicólica do extrato seco dos frutos de *S. cumini* extremamente susceptíveis ao desenvolvimento de bactérias e fungos.

A presença do extrato na composição do gel reduz significativamente a CIM frente a *S. aureus* (312,5 µg/mL) e principalmente frente aos fungos testados como a *C. krusei*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* (156,3 µg/mL para todos).

A presença da solução glicólica do extrato seco dos frutos de *S. cumini* na composição da emulsão não-iônica estudada apresenta efeito similar, observando-se, porém, a intensificação do efeito frente a *S. epidermidis* (156,3 µg/mL) e reduzido efeito frente a *S. aureus* (2500,0 µg/mL).

Holetz e colaboradores (2002) estabeleceram alguns valores como referência de atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Para que um extrato apresente forte atividade, a CIM não deve ultrapassar 100,0 µg/mL; de 100,0 a 500,0 µg/mL a atividade é considerada como moderada; de 500,0 a 1000,0 µg/mL a atividade é fraca, e maior que 1000,0 µg/mL, o extrato é considerado inativo. Porém, outros trabalhos apresentaram valores de CIM maiores como boas atividades dos extratos. Aligianni e colaboradores (2001) apresentam a classificação para material vegetal baseada em resultados de CIM, no qual os valores menores que 500,0 µg/mL foram considerados fortes inibidores, CIM entre 600,0 a 1500,0 µg/mL foram considerados moderados e acima de 1600 µg/mL foram fracos inibidores do crescimento microbiano. Bouamama e colaboradores (2006) comprovam a utilização de folhas do gênero *Cistus* na medicina popular do Marrocos obtendo valores de CIM de 780,0 a 50.000,0 µg/mL para bactérias e de 190,0 a 200.000,0 µg/mL para cepas de *Candida*, utilizando as técnicas preconizadas pelo NCCLS (2003).

Segundo Kolodziej e colaboradores (1999), os valores de CIM de polifenóis isolados pertencentes à classe dos taninos contra bactérias como *S. aureus* e *E. coli* e contra fungos como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, e descrevem que tais moléculas apresentam fraca atividade antimicrobiana, com CIM entre 1000,0 a 2000,0 µg/mL para algumas moléculas como ácido gálico, chegando a 8000,0 µg/mL para catequina. No entanto, no mesmo trabalho, indicaram que as plantas utilizadas como antimicrobianos, provavelmente, apresentam seu potencial devido à sua diversificada composição de polifenóis e a concentração destes constituintes nesta planta.

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

Após a determinação da concentração inibitória mínima, foi realizada a concentração bactericida e fungicida mínima das formulações sem e com o extrato glicólico dos frutos de *S.*

cumini para os microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. krusei*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, conforme apresentado na Tabela 19.

Tabela 19. Concentração bactericida e fungicida mínima das formulações sem e com extrato dos frutos de *Syzygium cumini* para os microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. krusei*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*

CBM/CFM ($\mu\text{g/mL}$)							
Amostras	Atividade bactericida				Atividade fungicida		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Sabonete	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0	1250,0	156,3	1250,0
Sabonete com extrato	625,0	1250,0	2500,0	2500,0	156,3	156,3	1250,0
Gel	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0
Gel com extrato	1250,0	1250,0	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0
Emulsão não-iônica	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0	2500,0
Emulsão não-iônica com extrato	2500,0	625,0	2500,0	2500,0	156,3	2500,0	1250,0

Ao avaliar os resultados das formulações, considerou-se que os valores de CIM entre 1250,0 e 2500,0 $\mu\text{g/mL}$ não devem ser desprezados, seja pela diluição dos compostos ativos com outros compostos também extraídos, seja porque a própria literatura não descarta resultados de CIM maiores que 1000,0 $\mu\text{g/mL}$, pois poderiam ser utilizados para outros propósitos.

Em comparação com os resultados obtidos pelo método de microdiluição, os valores de CBM e CFM obtidos pelo método de microdiluição foram maiores de forma geral, as bactérias e fungos testados apresentam maior sensibilidade ao sabonete líquido com extrato glicólico dos frutos de *S. cumini*. As formulações gel e emulsão não-iônica apresentaram menor atividade, tendo requerido, portanto, maior concentração de extrato na formulação para inibir o crescimento dos microrganismos.

Para garantir a segurança e eficácia da metodologia, do meio de cultura e das cepas de bactérias utilizadas, foi realizado o controle de fármaco nas mesmas condições do experimento apenas para certificar-se da eficiência da metodologia. A Tabela 20 apresenta o comportamento dos microrganismos utilizados frente aos fármacos ciprofloxacino e fluconazol.

Tabela 20. Determinação da concentração inibitória, bactericida e fungicida mínima para o controle dos fármacos ciprofloxacino e fluconazol

Microrganismos	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>S. aureus</i> *	0,031	0,125	-
<i>E. coli</i> *	0,031	0,031	-
<i>P. aeruginosa</i> *	0,031	0,062	-
<i>S. epidermidis</i> *	0,031	0,062	-
<i>C. krusei</i> **	16,0	-	0,031
<i>C. albicans</i> **	0,0625	-	0,031
<i>C. parapsilosis</i> **	1,0	-	16,0

* ciprofloxacino; ** fluconazol

Os resultados dos ensaios realizados para verificação do perfil de sensibilidade das bactérias e leveduras utilizando como controle o ciprofloxacino para as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* e *E. coli* e o fluconazol para os fungos, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, indicaram as concentrações inibitórias mínimas, respectivamente de 0,031 µg/mL para as bactérias e para os fungos 16 µg/mL para *C. krusei*, 0,0625 µg/mL e para *C. parapsilosis* 1,0 µg/mL. As concentrações bactericida mínima entre 0,062 a 0,125 µg/mL e as concentrações fungicida mínima ficaram entre 0,031 a 16,0 µg/mL.

5.14. Teste de neutralização

A contagem de microrganismos viáveis em produtos farmacêuticos e cosméticos necessita de completa neutralização da substância ou substâncias presentes que impedem ou prejudiquem o crescimento dos microrganismos (CURRY, 1993; GUIA..., 1998; ORTH, 1993). Os conservantes, na sua maioria, podem ser quimicamente neutralizados, no momento da análise, mediante adição ao diluente ou nos meios de cultura, dos neutralizantes, ou fisicamente, por meio de diluições

sucessivas ou filtração em membrana filtrante (BRANNAN, 1997). A inativação da atividade antimicrobiana dos extratos glicólicos dos frutos de *S. cumini* foi feita por meio de diluição, pois não são descritos métodos de inativação química de extratos vegetais na literatura.

A inativação do sistema conservante se faz importante, pois recupera microrganismos estressados durante o período da análise. Os resultados estão indicados nas Tabelas 21 a 25 frente aos microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *A. niger*.

Tabela 21. Contagem do número de microrganismos viáveis de *S. aureus* após neutralização do sistema conservante

Amostras	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	Controle
Sabonete líquido	20	26	71	84	108	158
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	0	68	126	131	166	158
Gel	147	154	157	162	200	158
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	0	74	158	185	191	158
Emulsão não-iônica	162	164	165	172	200	158
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	3	115	167	174	180	158

Os resultados (Tabela 21) expressam a contagem do número de microrganismos viáveis de *S. aureus* nas formas de aplicações selecionadas – sabonete líquido, gel e emulsão não-iônica contendo ou não o extrato glicólico dos frutos de *S. cumini*. Uma análise geral de tais resultados evidencia primeiramente o diferente comportamento antimicrobiano das formas cosméticas escolhidas. Dentre elas, não nos surpreende que o sabonete líquido apresente uma maior atividade antimicrobiana, uma vez que tal forma de preparação apresenta alto conteúdo de tensoativo e a presença desta substância exerce um importante efeito antimicrobiano (ORTH, 1993). A inclusão do extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* na concentração de 10% nas formas estudadas demonstrou um importante efeito antimicrobiano frente à bactéria testada.

Tabela 22. Contagem do número de microrganismos viáveis de *E. coli* após neutralização do sistema conservante

Amostras	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	Controle
Sabonete líquido	33	46	49	53	58	72
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	44	45	50	59	62	72
Gel	44	47	49	53	62	72
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	38	41	64	84	98	72
Emulsão não-iônica	20	42	89	93	104	72
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	3	32	43	57	63	72

A contagem do número de microrganismos viáveis para *E. coli* (Tabela 22) demonstrou um comportamento de crescimento muito similar entre as diferentes formas de aplicação escolhida. A presença de 10% de extrato nas formas testadas não apresentou capacidade significativa de reduzir o crescimento da bactéria testada.

Tabela 23. Contagem do número de microrganismos viáveis de *P. aeruginosa* após neutralização do sistema conservante

Amostras	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	Controle
Sabonete líquido	33	70	100	125	135	118
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	12	117	123	154	174	118
Gel	11	89	110	132	200	118
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	0	31	87	98	124	118
Emulsão não-iônica	7	78	172	181	197	118
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	0	66	103	110	120	118

Considerando a contagem do número de microrganismos viáveis frente a *P. aeruginosa* observa-se, para as formas cosméticas testadas isentas do extrato, um comportamento de crescimento diferenciado. Porém o gel e a emulsão não-iônica na diluição 10^{-1} dificultam o desenvolvimento da *P. aeruginosa*. Diluições subseqüentes a esta demonstram a perda desta atividade. A presença da solução glicólica extrato seco dos frutos de *S. cumini* reduz o crescimento microbiano do gel e da emulsão não-iônica, não exercendo, porém o mesmo efeito ao considerar-se o sabonete líquido (Tabela 23).

Uma análise geral dos resultados obtidos frente às bactérias testadas demonstra a atividade da solução glicólica extrato seco dos frutos de *S. cumini* frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*, e que tal comportamento é influenciado pela forma de aplicação escolhida.

Com o aumento da diluição das amostras espera-se de forma geral um aumento no número de microrganismos viáveis. Surpreende-nos, porém que as contagens no número de microrganismos viáveis presentes no sabonete líquido contendo a solução glicólica extrato seco dos frutos de *S. cumini*, apresentarem crescimento superior ao controle.

Tabela 24. Contagem do número de microrganismos viáveis de *C. albicans* após neutralização do sistema conservante

Amostras	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	Controle
Sabonete líquido	120	123	136	145	152	119
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	60	105	117	120	141	119
Gel	125	130	133	137	148	119
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	101	109	136	184	201	119
Emulsão não-iônica	141	166	182	203	192	119
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	139	139	151	161	152	119

Tabela 25. Contagem do número de microrganismos viáveis de *A. niger* após neutralização do sistema conservante

Amostras	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	Controle
Sabonete líquido	168	174	179	189	197	245
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	81	142	175	182	191	245
Gel	205	211	215	222	236	245
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	136	144	172	179	187	245
Emulsão não-iônica	152	162	179	182	212	245
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	108	111	114	118	122	245

De forma geral os resultados expressos nas Tabelas 24 e 25 não demonstraram atividade frente aos fungos testados, com exceção do sabonete líquido com extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* na diluição 10⁻¹ que apresentou atividade antimicrobiana considerável tanto para a cepa *C. albicans* como para a cepa *A. niger*.

Como não existe referência na literatura de um método de inativação química para a solução glicólica extrato seco dos frutos de *S. cumini*, optou-se por realizar diluições sucessivas até o máximo de 10⁻³. A proposta desta diluição máxima obedeceu aos resultados obtidos durante os testes de neutralização.

5.15. Teste de eficácia conservante das formulações com extrato glicólico dos frutos de *Syzygium cumini*

Segundo Orth e Steinberg (2003), os testes de desafio são realizados para determinar o tipo de conservante e a concentração mínima que deve ser usada nas formulações de modo, a ter uma conservação satisfatória destes produtos. Diferentes métodos estão descritos na literatura para a avaliação deste tipo de atividade. O chamado método convencional encontra-se descrito em diversos compêndios oficiais, entre eles a USP 26, (2003). No presente trabalho, optou-se pelo

método convencional modificado preconizado pela USP 26 (2003), com análise nos tempos 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas, 7, 14, 28 e 35 dias, permitindo, desta forma, obter-se as unidades formadoras de colônias (UFC/g) em função do tempo (CURRY, 1993; GUIA..., 1998; ORTH, 1993).

Outra técnica descrita pela literatura (CURRY, 1993; GUIA..., 1998; ORTH, 1993) consiste num método de regressão linear. A taxa de inativação dos microrganismos do teste pelo método de regressão linear é dada pelo tempo de redução decimal (valor D), que é o tempo necessário para matar 90% (1 log) da população dos microrganismos do teste.

O valor D é calculado tomando-se a recíproca negativa da inclinação da curva de sobrevivência traçada, usando-se o número log de microrganismos sobreviventes como função do tempo na qual as amostras foram coletadas para cada microrganismo teste. Valores D menores indicam uma taxa de morte mais rápida; valores D maiores indicam que essa taxa é mais lenta (ORTH, STEINBERG, 2003).

Segundo Orth (1993) produtos bem conservados eliminam os microrganismos rapidamente e atendem aos critérios farmacopéicos. Produtos precariamente conservados podem também atender aos critérios farmacopéicos, porém podem matar bactérias Gram negativas tão lentamente que tais bactérias podem conseguir se adaptar, sobreviver e ou se desenvolver. Isto resulta em contaminação do produto.

O uso de substâncias com atividade antimicrobiana em qualquer produto objetiva minimizar degradação causada por microrganismos e proteger o usuário contra os possíveis riscos à saúde que estes microrganismos possam trazer. Porém, os conservantes são substâncias químicas, que podem sofrer interações com os demais ingredientes da formulação, tais como nutrientes, tensoativos, agentes seqüestrantes, álcoois, entre outros. Podem ser observadas também, interações com as propriedades físico-químicas das formulações como pH e atividade da água (a_w). Alguns tipos de interações podem fazer com que haja a perda da atividade do conservante dentro da mistura de substâncias (COWEN e STEIGER, 1977; OLIVEIRA, 1999; ORTH et al., 1987). Levando-se em consideração tais aspectos, um produto mesmo estando com níveis adequados de conservantes pode

apresentar problemas de contaminação microbiana, por isso há a necessidade em testar a eficácia ao longo de um período (STEVANATO, 2005).

Com o objetivo de observar o comportamento do extrato glicólico dos frutos de *Syzygium cumini* como agente antimicrobiano, avaliou-se a atividade conservante do extrato frente a três formas de aplicação de uso tópico: sabonete líquido, gel e emulsão não-iônica.

A composição da formulação pode exercer grande influência na sua estabilidade microbiológica. Diferentes componentes podem potencializar ou diminuir a ação do conservante. No trabalho proposto, para a elaboração das formulações empregaram-se matérias-primas que constituem rotina no desenvolvimento de preparações de uso tópico. Procurou-se evitar a inclusão nestes sistemas de qualquer material que conhecidamente possuísse atividade antimicrobiana.

Nas Tabelas 26 a 35 e Figuras 19 a 48 a seguir estão apresentados os resultados das análises do teste de desafio realizado pelo método convencional (USP 26, 2003) e pelo método do valor D, proposto por ORTH (1979). Algumas modificações metodológicas foram aplicadas objetivando avaliar a eficácia do extrato glicólico dos frutos de *Syzygium cumini* nas formulações de sabonete líquido, gel e emulsão não-iônica frente às cepas dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* em períodos regulares de tempo.

Tabela 26. Log de UFC/g de *Staphylococcus aureus*, na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, em função do tempo

Sistema Conservante	Tempo									
	0h	2h	6h	12h	24h	48h	7d	14d	28d	35d
Sabonete líquido	5,8	5,7	4,7	4,6	3,3	0	0	0	0	0
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	5,4	4,8	3	0	0	0	0	0	0	0
Gel	5,1	4,2	0	0	0	0	0	0	0	0
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	4,7	3,6	0	0	0	0	0	0	0	0
Emulsão não-iônica	4,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	4,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle	6,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

h = horas; d = dias; ND = não determinado

O patógeno que lidera a lista de microrganismos multirresistentes é, sem dúvida, *S. aureus* resistente à metilina. O uso extensivo de um número restrito de antibióticos contra ele tem criado expectativas pessimistas de que estamos criando um verdadeiro arsenal de monstros microscópicos resistentes a todos nossos antimicrobianos (MULLIGAN et al., 1993; FOSTER, 2004; WILCOX, 2005).

Muitos estudos têm sido feitos na busca de novos conservantes, e têm sido direcionados para a obtenção de compostos de origem natural como a lactoferrina bovina, por exemplo, pesquisada por Stevanato (2005). O objetivo do estudo não é só a substituição dos conservantes já existentes por produtos de origem natural, seguindo o apelo pelo natural intensamente disseminado, mas também pela busca de novos compostos que sejam ativos contra microrganismos já resistentes aos conservantes utilizados no mercado (ROMANOWSK e SCHUELLER 1995; SANTOS, 1997).

Os resultados do teste para a bactéria *S. aureus* (Tabela 26) mostram que a presença do extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* na concentração de 10 % incorporada às formulações propostas apresenta atividade conservante somente para o sabonete líquido.

Os resultados das equações da reta, coeficiente de correlação (R) e valores D obtidos para a formulação controle e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, utilizando como microrganismo desafiante *Staphylococcus aureus* estão apresentados nas Figuras 19 a 24 e Tabela 27.

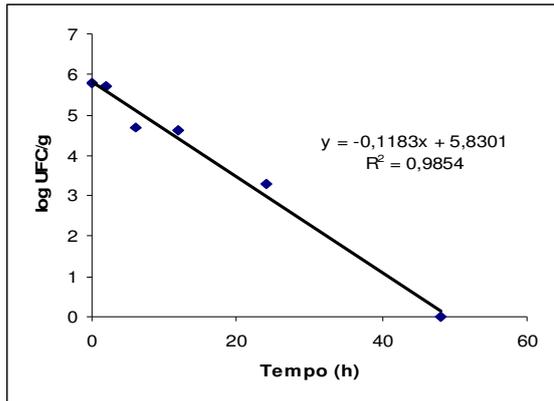


Figura 19. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Staphylococcus aureus* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido sem extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

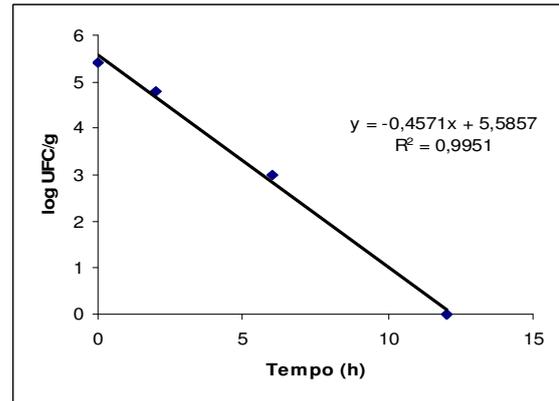


Figura 20. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Staphylococcus aureus* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

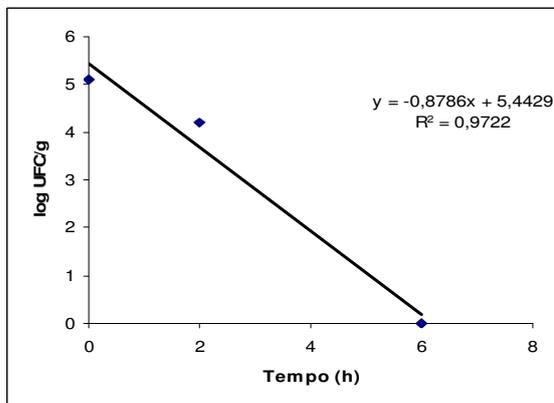


Figura 21. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Staphylococcus aureus* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no gel sem extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

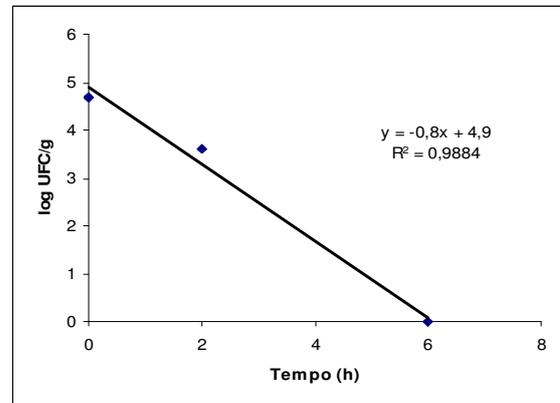


Figura 22. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Staphylococcus aureus* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no gel com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

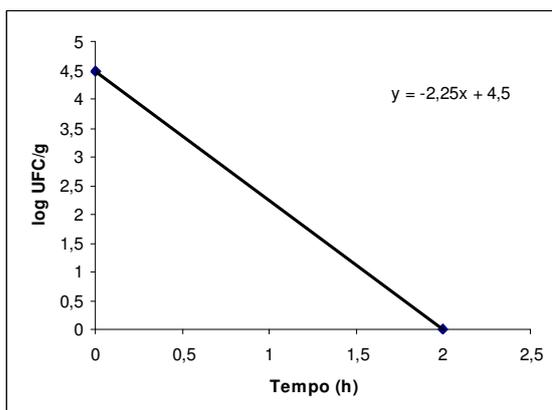


Figura 23. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Staphylococcus aureus* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, na emulsão não-iônica sem extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

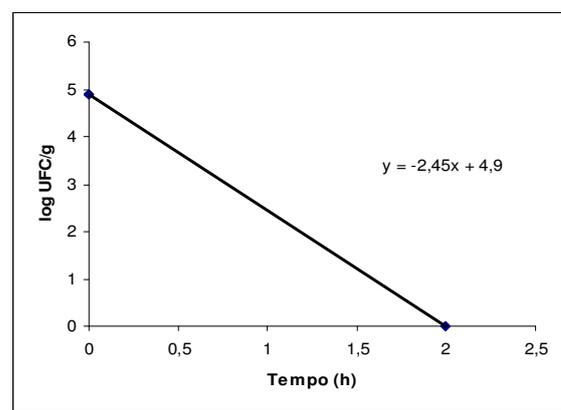


Figura 24. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Staphylococcus aureus* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, na emulsão não-iônica com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

Tabela 27. Equações da reta, coeficiente de correlação (R) e valores D, obtidos para a formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, utilizando como microrganismo desafiante *Staphylococcus aureus*

Sistema Conservante	Equação da Reta	Valor D (h)	Coefficiente de Correlação (R)
Sabonete líquido	$y = -0,1183x + 5,8301$	8,45	0,9854
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	$y = -0,4571x + 5,5857$	2,2	0,9951
Gel	$y = -0,8786x + 5,4429$	1,1	0,9722
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	$y = -0,8x + 4,9$	1,25	0,9884
Emulsão não-iônica	$y = -2,25x + 4,5$	0,4	-
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	$y = -2,45x + 4,9$	0,4	-

A aplicação do método de regressão linear expresso pelas Figuras 19 a 24 e Tabela 27 confirma o desempenho conseguido pelo método do teste de desafio convencional empregando o microrganismo *Staphylococcus aureus*.

O teste de desafio foi realizado também nas formulações controle, sem a presença do extrato glicólico dos frutos de *Syzygium cumini*, uma vez que outros componentes ou as próprias formulações poderiam interferir na sobrevivência dos microrganismos, levando a erros na interpretação dos resultados, atribuindo erroneamente à substância em estudo.

Os resultados confirmam que a preparação menos resistente ao efeito conservante é o sabonete líquido. Apesar de a literatura considerar que bactérias Gram positivas como *S. aureus*, são inativadas pelos tensoativos aniônicos como o lauril sulfato de sódio (ORTH, 1993), os resultados, aparentemente, não confirmaram tal afirmativa.

O valor D confirma a redução de crescimento de microrganismo frente *S. aureus* para o sabonete líquido com extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* quando comparado ao sabonete líquido sem extrato.

Tabela 28. Log de UFC/g de *Escherichia coli*, na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, em função do tempo

Sistema Conservante	Tempo									
	0h	2h	6h	12h	24h	48h	7d	14d	28d	35d
Sabonete líquido	6,3	6,3	4,8	0	0	0	0	0	0	0
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	6,3	5,4	0	0	0	0	0	0	0	0
Gel	6,3	5,6	3,4	0	0	0	0	0	0	0
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	6,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Emulsão não-iônica	6,3	5,6	0	0	0	0	0	0	0	0
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	6,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle	6,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

h = horas; d = dias; ND = não determinado

Os bastonetes Gram negativos, produtores de β -lactamases, representam um desafio emergente ao tratamento de infecções. Destacam-se a *P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae* (SHAH et al., 2004; HAUSER; SRIRAM, 2005).

Os resultados das análises pelo método convencional frente ao microrganismo *E. coli* (Tabela 28) demonstram a eficácia antimicrobiana do extrato presente nas formulações propostas. De forma geral, tais resultados encontram-se em concordância ao que prevê a Farmacopéia Americana (2003), quando considerada este tipo de análise. Este compêndio estabelece aceitabilidade de eficácia conservante para bactéria, quando houver uma redução maior ou igual a 99,9% em 14 dias. As formulações isentas de extrato apresentaram inibição após 6 horas de incubação, porém tais resultados são questionáveis, uma vez que tal inibição pode ser devida ao procedimento de diluição adotado. O que realmente deve ser salientado é que, comparativamente, a presença do extrato apresentou efeito conservante frente à bactéria testada.

Os resultados das equações da reta, coeficiente de correlação (R) e valores D obtidos para a formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, utilizando

como microrganismo desafiante *Escherichia coli* estão apresentados nas Figuras 25 a 30 e Tabela 29.

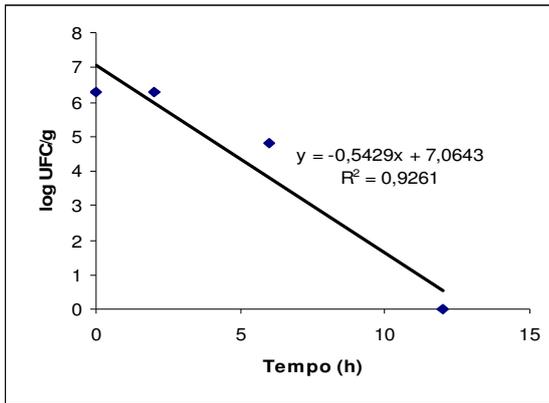


Figura 25. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Escherichia coli* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido sem extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

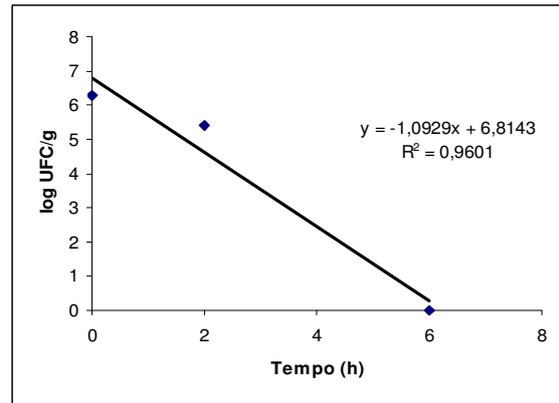


Figura 26. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Escherichia coli* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

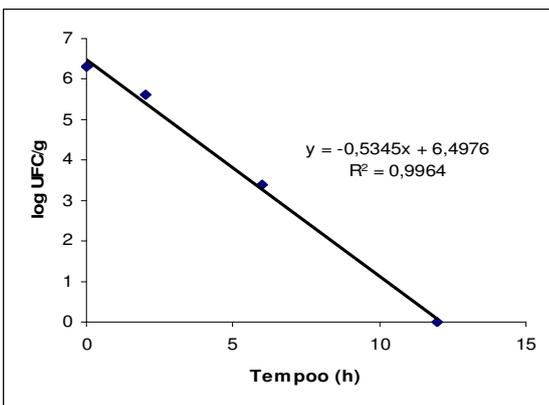


Figura 27. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Escherichia coli* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no gel sem extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

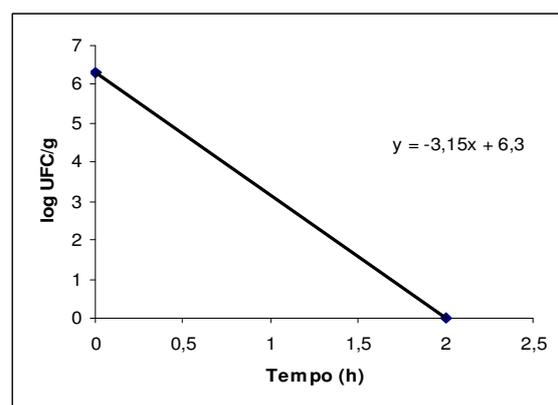


Figura 28. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Escherichia coli* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no gel com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

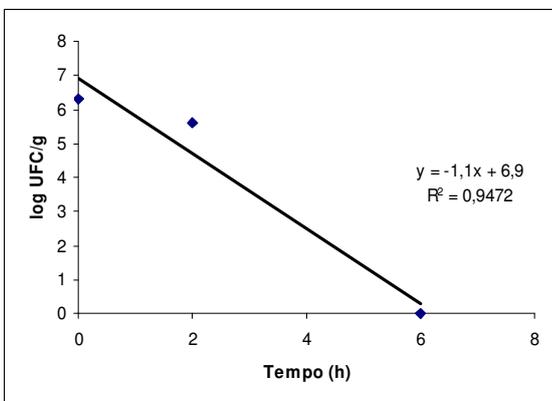


Figura 29. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Escherichia coli* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, na emulsão não-iônica sem extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

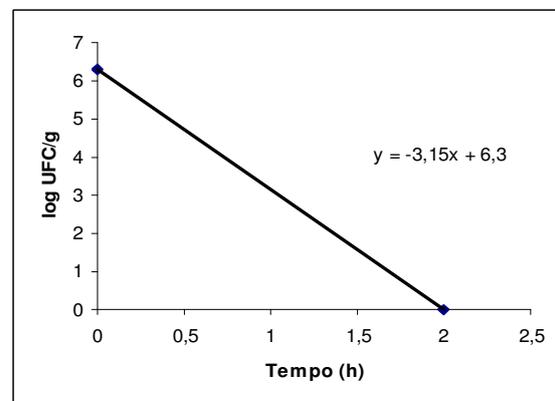


Figura 30. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Escherichia coli* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, na emulsão não-iônica com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

Tabela 29. Equações da reta, coeficiente de correlação (R) e valores D, obtidos para a formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, utilizando como microrganismo desafiante *Escherichia coli*

Sistema Conservante	Equação da Reta	Valor D (h)	Coefficiente de Correlação (R)
Sabonete líquido	$y = -0,5429x + 7,0643$	1,8	0,926
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	$y = -1,0929x + 6,8143$	0,9	0,9601
Gel	$y = -0,5345x + 6,4976$	1,9	0,9964
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	$y = -3,15x + 6,3$	0,3	-
Emulsão não-iônica	$y = -1,1x + 6,9$	0,9	0,9472
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	$y = -3,15x + 6,3$	0,3	-

Os resultados confirmam que as formulações propostas com o extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* apresentaram um bom efeito conservante. Considerando, ainda, o critério de Orth (2003), de que um bom conservante mata os microrganismos rapidamente, pode-se considerar que o extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* apresenta um bom efeito conservante.

O valor D para todas as formulações propostas com extrato glicólico dos frutos de *S. cumini* apresentaram redução de valor.

Os resultados do teste de desafio em relação ao log de UFC/g de *Pseudomonas aeruginosa*, na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, em função do tempo estão expressos na Tabela 30.

Tabela 30. Log de UFC/g de *Pseudomonas aeruginosa*, na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, em função do tempo

Sistema Conservante	Tempo									
	0h	2h	6h	12h	24h	48h	7d	14d	28d	35d
Sabonete líquido	6,3	6,3	5,2	0	0	0	0	0	0	0
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	6,3	6,3	4,9	0	0	0	0	0	0	0
Gel	6,3	6,3	5,8	5,0	0	0	0	0	0	0
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	6,3	6,3	5,1	0	0	0	0	0	0	0
Emulsão não-iônica	6,3	6,0	5,8	5,8	5,3	0	0	0	0	0
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	6,3	6,0	5,6	0	0	0	0	0	0	0
Controle	6,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

h = horas; d = dias; ND = não determinado

A *P. aeruginosa* é um patógeno, sendo considerado um grande problema da indústria farmacêutica e cosmética por se tratar de um microrganismo de veiculação hídrica com facilidade de adaptação a ambientes estressantes (TRAFNY, 2005).

Burlin (2000), estudando *P. aeruginosa* em sistemas conservantes com parabens e fenoxietanol, observou o fenômeno de adaptação e resistência, portanto os resultados obtidos pelo sistema conservante não foi eficaz para destruir totalmente a carga microbiana conforme estabelecido pelos compêndios oficiais que não apresentou inibição antes dos 14 dias para bactérias.

Nos resultados obtidos para *P. aeruginosa* das formulações do sabonete líquido, da emulsão não-iônica e do gel incorporados do extrato dos frutos de *S. cumini*, quando comparadas entre si por metodologia, não apresentaram a eficácia desejada.

Porém, ao empregar-se a metodologia de regressão linear, Figuras 31 a 36 e Tabela 31, consegue-se observar um diferencial no tempo de morte bacteriana nas formulações gel e emulsão não -iônica.

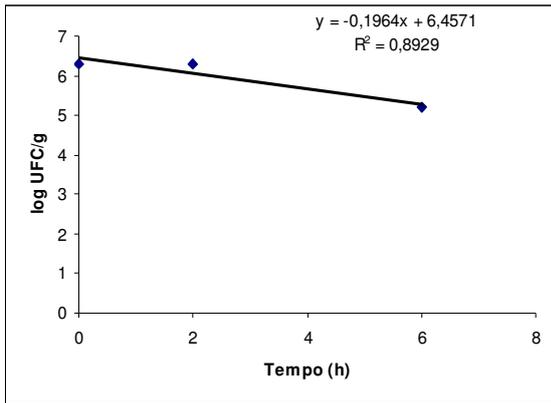


Figura 31. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Pseudomonas aeruginosa* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido sem extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

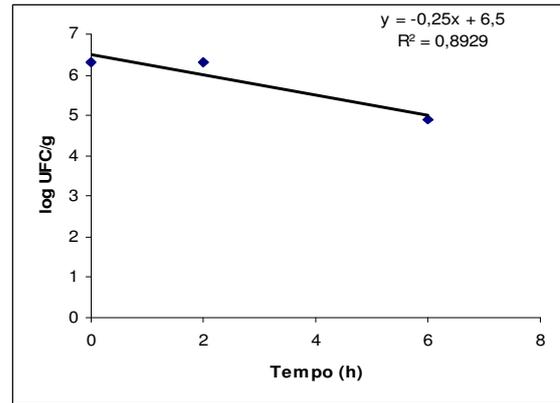


Figura 32. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Pseudomonas aeruginosa* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no sabonete líquido com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

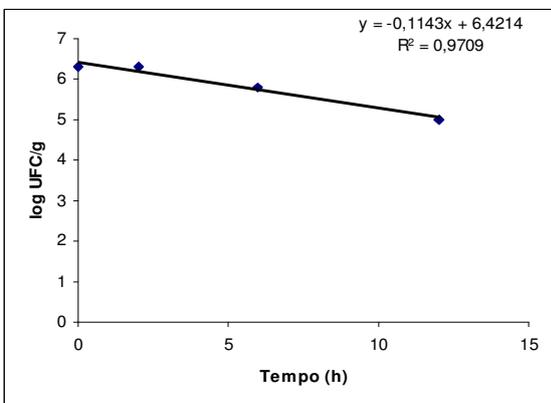


Figura 33. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Pseudomonas aeruginosa* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no gel sem extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

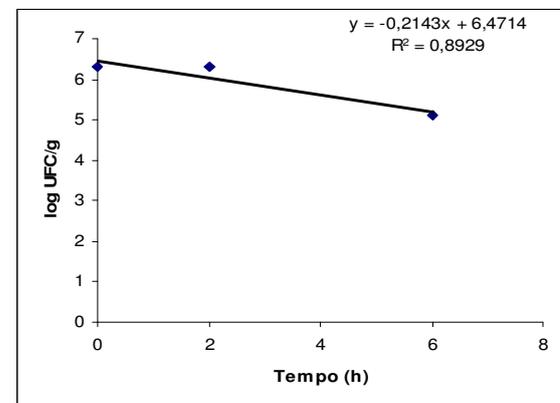


Figura 34. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Pseudomonas aeruginosa* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, no gel com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

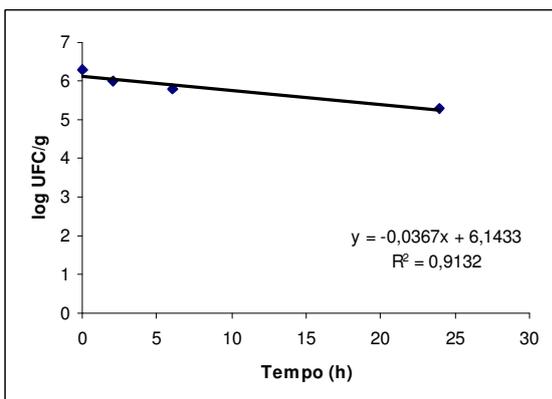


Figura 35. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Pseudomonas aeruginosa* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, na emulsão não iônica sem extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

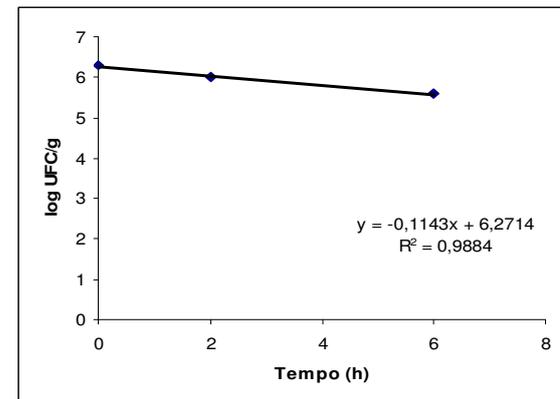


Figura 36. Representação gráfica da regressão linear da relação entre o log de *Pseudomonas aeruginosa* sobreviventes em função do tempo de inoculação da carga microbiana, na emulsão não iônica com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*

Tabela 31. Equações da reta, coeficiente de correlação (R) e valores D, obtidos para a formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, utilizando como microrganismo desafiante *Pseudomonas aeruginosa*

Sistema Conservante	Equação da Reta	Valor D (h)	Coefficiente de Correlação (R)
Sabonete líquido	$y = -0,1964x + 6,4571$	5,1	0,8929
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	$y = -0,25x + 6,5$	4,0	0,8929
Gel	$y = -0,1143x + 6,4214$	9,0	0,9709
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	$y = -0,2143x + 6,4714$	4,6	0,8929
Emulsão não-iônica	$y = -0,0367x + 6,1433$	27	0,9132
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	$y = -0,1143x + 6,2714$	9	0,9884

Segundo Burlin (2000), o valor D como critério de aceitabilidade num teste de desafio deve ser menor ou igual a 4 horas para bactérias patogênicas e menor ou igual a 28 horas para bactérias não patogênicas. Considerando tais primícias, a única preparação que apresentou resultados de eficácia satisfatórios pela presença do extrato em estudo foi o sabonete líquido.

Os resultados do teste de desafio em relação ao log de UFC/g de *Candida albicans*, na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, em função do tempo estão expressos na Tabela 32.

Tabela 32: Log de UFC/g de *Candida albicans*, na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, em função do tempo

Sistema Conservante	Tempo									
	0h	2h	6h	12h	24h	48h	7d	14d	28d	35d
Sabonete líquido	4,7	4,9	4,8	5,0	5,1	3,3	4,8	5,1	5,6	5,6
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	4,9	4,8	4,6	5,0	5,0	5,6	4,5	4,8	5,0	5,3
Gel	5,1	5,0	4,6	5,4	5,0	5,6	5,6	5,8	6,1	5,8
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	5,0	4,9	4,7	5,2	6,1	5,9	5,7	5,3	6,3	4,9
Emulsão não-iônica	5,2	5,2	4,7	4,7	4,6	4,7	4,5	5,0	4,6	4,4
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	4,9	5,0	4,9	5,2	5,0	4,9	5,1	5,6	5,4	5,1
Controle	5,3	ND								

h = horas; d = dias; ND = não determinado

Para o microrganismo *C. albicans*, com exceção de sabonete isento de extrato, nenhuma das formulações estudadas mostrou-se efetiva antes de 7 dias, portanto, o número de microrganismos sobreviventes permaneceu em níveis consideráveis para todas as formulações, sendo ineficaz o extrato glicólico dos frutos de *S. cumini*.

Os resultados do teste de desafio em relação ao log de UFC/g de *Arpergillus niger*, na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, em função do tempo estão expressos na Tabela 33.

Tabela 33: Log de UFC/g de *Arpergillus niger*, na formulação sem extrato e na formulação com extrato dos frutos de *Syzygium cumini*, em função do tempo

Sistema Conservante	Tempo									
	0h	2h	6h	12h	24h	48h	7d	14d	28d	35d
Sabonete líquido	3,9	3,7	3,8	4,2	3,3	0	0	0	0	0
Sabonete líquido com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	4,1	3,9	3,8	3,8	3,7	3,0	0	0	0	0
Gel	4,1	4,2	3,9	3,9	3,7	4,0	3,9	3,8	4,0	4,0
Gel com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	3,7	3,9	3,6	4,0	3,8	3,3	3,4	0	0	0
Emulsão não-iônica	3,7	3,9	4,0	3,9	3,8	3,5	4,1	4,5	4,5	4,20
Emulsão não-iônica com extrato dos frutos de <i>Syzygium cumini</i>	4,1	3,8	3,6	3,9	3,4	3,0	0	0	0	0
Controle	3,8	ND								

h = horas; d = dias; ND = não determinado

Arpergillus pertencem ao grupo dos fungos filamentosos e são ubíquos e podem facilmente crescer em culturas do ar, do solo ou de vegetação com bolor. A principal espécie patogênica é *Arpergillus fumigatus*, porém outras também podem causar doenças. Das espécies existentes, apenas oito são agentes de infecção, entre eles *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* (ZAITZ et al., 1998).

Ao realizar o teste de desafio, o fungo *Arpergillus niger* mostrou-se, para todas as formulações testadas, resistência não ocorrendo inibição antes de 7 dias do experimento o que impede sua ação conservante segundo os compêndios oficiais como a Farmacopéia Americana (USP 26, 2003) em que 7 dias deve ocorrer a morte de 90% das leveduras.

Portanto, não foi possível realizar a determinação do valor D para os microrganismos *C. albicans* e *A. niger*, pela baixa atividade antimicrobiana encontrada para as formulações com extrato seco dos frutos de *S. cumini* e das formulações sem extrato.

6. CONCLUSÕES

- Os frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels revelaram caracteres típicos de Myrtaceae, tais como glândulas secretoras de óleo essencial, drusas e idioblastos tânicos.
- O método espectrofotométrico no visível foi validado e indicou ser considerado adequado para análise quantitativa do extrato de *S. cumini*.
- O controle microbiológico do extrato dos frutos de *S. cumini* permitiu observar que não houve crescimento microbiano nas amostras analisadas de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Na contagem do número total de bactérias e de fungos ocorreu crescimento inferior a 10 UFC/g.
- Nas concentrações bactericida e fungicida mínimas, o microrganismo que apresentou a maior sensibilidade foi *S. epidermidis* na concentração de 78,1 µg/mL. Para os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. krusei* nas concentrações 312,5; 625,0 e 625,0 µg/mL, o extrato de *S. cumini* apresentou atividade moderada e para os demais a atividade foi considerada baixa.
- O índice de citotoxicidade observado para o extrato seco dos frutos de *S. cumini* foi a concentração de 400,0 µg/mL.
- O teste de micronúcleo em *T. pallida* demonstrou efeito mutagênico nos tratamentos com 1250,0 e 2500 µg/mL.
- O teste de micronúcleo não demonstrou mutagenicidade nas concentrações avaliadas de 6,25 a 50,0 mg/kg para os tempos de 24 e 48 horas.
- O teste do cometa apresentou genotoxicidade nas concentrações de 25,0 e 50,0 mg/kg no tempo de 24 horas.
- O extrato seco dos frutos de *S. cumini* não apresentou mutagenicidade pelo teste de Ames nas concentrações de 1,61 a 6,45 mg/placa.
- O controle microbiológico das formulações com solução glicólica do extrato etanólico seco dos frutos de *S. cumini* permitiu observar que não houve crescimento microbiano nas amostras

analisadas de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Na contagem do número total de bactérias e de fungos ocorreu crescimento inferior a 10 UFC/g.

- A concentração inibitória mínima (CIM) das formulações com solução glicólica do extrato etanólico seco dos frutos de *S. cumini*, o microrganismo *P. aeruginosa* apresentou maior resistência independentemente da formulação, na concentração de 1250,0 µg/mL. Para o gel, os microrganismos mais sensíveis foram *E. coli* e *P. aeruginosa*, apresentando atividade nas concentrações de 2500,0 e 1250,0 µg/mL. Já para a emulsão não-iônica os microrganismos mais resistentes foram *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, apresentando sensibilidade na concentração de 2500,0 µg/mL para todos os microrganismos. Para os demais microrganismos, a concentração final foi de 156,3 a 312,5 µg/mL. A presença do extrato nas formulações analisadas frente aos fungos testados como *C. krusei*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* apresentaram sensibilidade na concentração de 156,3 µg/mL para todas, com exceção da emulsão não-iônica frente ao microrganismo *C. parapsilosis*.
- A concentração bactericida e fungicida mínima do sabonete líquido com solução glicólica do extrato etanólico seco dos frutos de *S. cumini* frente às bactérias e fungos testados apresentou maior sensibilidade. Para as formulações de gel e de emulsão não iônica os microrganismos testados apresentaram maior resistência tendo requerido, portanto, maior concentração de extrato na formulação para inibir seu crescimento.
- O teste de desafio para as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* mostrou que a presença da solução glicólica do extrato etanólico seco dos frutos de *S. cumini* na concentração de 10% incorporada às formulações propostas apresentam atividade conservante significativa quando comparadas com as formulação isentas do extrato. Já os fungos *C. albicans* e *A. niger* mostraram-se, para todas as formulações testadas, resistência, não ocorrendo inibição antes de 7 dias do experimento o que impede sua ação conservante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 17, p. 114-140, 2007.

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

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

ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.**, v.40, n. 9, p.4168-4170, 2001.

ALLEN JUNIOR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 301-308.

ALMEIDA, A.M.F. Análise do cariótipo eletroforético de diferentes amostras de *Cryptococcus neoformans* e correlação com suscetibilidade a drogas antifúngicas. 2000, 90f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2000.

ALVES, E.S.; PEDROSO, A.N.V.; DOMINGOS, M.; GUIMARÃES, E.T.; SALDIVA, P.H.N. Biomonitoramento indoor do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio de Trad-MCN. **Hoehnea**, v. 30, p. 89-94, 2003.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

ANANDHARAJAN, R.; JAIGANESH, S.; SHANKERNAYANAN, N.P.; VISWAKARMA, R. A.; BALAKRISHNAN, A. In vitro glucose uptake activity of *Aegles marmelos* and *Syzygium cumini*

by activation of Glut-4, PI3 kinase and PPAR γ in L6 myotubes. **Phytomed.**, v. 13, p. 434-441, 2006.

ANDRADE, L.S.; CASTRO, D.B.; CHEN, L.C. Efeito modulador do extrato de *Stryphnodendron adstringens* Mart. (barbatimão) contra danos induzidos pela mitomicina C em camundongos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 2, 127-130, 2006.

ANNAPURNA, J; BHALERAU, U.T.; IYENGAR, D.S. Antimicrobial activity of *Saraca asoca* leaves. **Fitoterapia**, v.70, n.1, p.80-82, 1999.

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

ARAÚJO, J.C.L.V.L.; EDELTRUDES, O.; CEBALLOS, B.S.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUZA, E.L.; SANTOS FILHO, L. Anti-microbial action of essential oils against microorganisms potentially causing opportunistic infections. **Rev. Patol. Trop.**, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2004.

AZEVEDO, L.; GOMES, J.C.; STRINGHETA, P.C.; GONTIJO, A.M.M.C.; PADOVANI, C.R.; RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 1671-1676, 2003.

BABICH, B.; BORENFREUND, E. Neutral red assay for toxicology in vitro. In: WATSON, R. R. (Ed). **In vitro methods of toxicology**. Boca Raton: CRC, 1992. cap. 17, p. 237-251.

BABY, A.R. **Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas**. São Paulo, 2007. 144p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BABY, A.R. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham, padronizado em flavonóides totais**. São Paulo, 2005. 159p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BABY, A.R.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. UV spectrophotometric determination of bioflavonoids from a semisolid pharmaceutical dosage form containing *Trichilia*

catigua Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham standardized extract: analytical method validation and statistical procedures. **J. AOAC Int.**, v.89, n. 6, p.1532-1537, 2006.

BABY, A.R.; MACIEL, C.P.M.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; DIAS, T.C.S.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. Uso de extratos de plantas em produtos cosméticos. **Cosmet. Toilet.**, v. 17, p. 78–82, 2005.

BABY, A.R.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; DIAS, T.C.S.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. Eficácia e segurança de princípios ativos vegetais. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, p. 80–82, 2003.

BACON, J.A.; LINSEMAN, D.A.; RACZNIAK, T.J. In vitro cytotoxicity of tetracyclines and aminoglycosides in LLC-PK, MDCK and Chang continuous cell lines. **Toxicol. in Vitro**, v. 4, n. 4/5, p. 384-388, 1990.

BAHIA, M.F.G. Multifuncionalidade de produtos cosméticos. **Cosmet. Toilet.**, v. 10, n. 2, p. 44-47, 1998.

BAIRD, R.M.; BLOOMFIELD, S.F. **Microbial Quality Assurance in Cosmetic, Toiletries & Non-Sterile Pharmaceuticals**. New York: Taylor & Francis, 1996. 258 p.

BALLS, M.; CLOTHIER, R. Cytotoxicity assays for intrinsic toxicity irritancy. In: WATSON, R. R. (Ed). **In vitro Methods of Toxicology**. Boca Raton: CRC, 1992.

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

BARBOUR, E.K.; AL SHARIF, M.; SAGHERIAN, V.K.; HABRE, A.N.; TALHOUK, R.S.; TALHOUK, S.N. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p.1-7, 2004.

BARILE, F.A. **Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods**. Boca Raton: CRC, 1994. 222p.

BARLTROP, J.A.; OWEN, T.C.; CORY, A.H; CORY, J.G. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-

dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indicators. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 1, n. 11, p. 611-614, 1991.

BASKETTER, D.A.; RUDFORD, R.; SMITH, I.; WAHLBERG, J.E. Skin sensitization risk assessment: a comparative evaluation of 3 isothiazolinone biocides. **Contact Derm.**, v. 40, p. 150-154, 1999.

BAST, A.; CHANDLER, R.F.; CHOY, P.C.; DELMULLE, L.M.; GRUENWALD, J.; HALKES, S.B.A.; KELLER, K.; KOEMAN, J.H.; PETER, P.; PRZYREMBEL, H.; REE, E.M.; RENWICK, A.G.; VERMEER, I.T.M. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 12, p. 195-211, 2002.

BATALHA, J.R.F.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; DEUR, T.; CARVALHO, H.A.; ALVES, E.S.; DOMINGOS, M.; RODRIGUES, G.S.; SALDIVA, P.H.N. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. **Mutat. Res.**, v.426, p 229-232, 1999.

BAUER, E; RECKNAGEL, R.; FIEDLER, U.; WOLLWEBER, L.; BOCK, C.; GREULICH, K. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (Comet assay) obeys a Chi-square (χ^2) not a Gaussian distribution. **Mutat. Res.**, v. 398, p. 101–110, 1998.

BAUER, R.; TITTEL, G. Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. **Phytomed.**, v. 2, n. 3, p. 193-198, 1996.

BENERJEE, A.; DASGPITA, N.; DE, B. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chem.**, v. 4. p 727-733, 2005.

BERRIDGE, M. V. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v.4, p. 15-19, 1996.

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

BOLOGNESI, C.; ABBONDANDOLO, A.; BARALE, R.; CASALONE, R.; DALPRA, L.; DEFERRARI, M.; DEGRASSI, F.; FORNI, A.; LAMBERTI, L.; LANDO, C.; MIGLIORE, L.;

- PADOVANI, P.; PUNTONI, R.; SBRANA, L.; STELLA, M.; BONASSI, S. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchange, chromosome aberrations and micronuclei in human lymphocytes. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 6, p. 249-256, 1997.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, v. 24, p. 119-124, 1985.
- BOUAMAMA, H.; NOEL, T.; VILLARD, J.; BENHARREF, A.; JANA, M. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two *Moroccan cistus* L. species. **J. Ethnopharmacol.**, v. 104, n. 1-2, p. 104-107, 2006.
- BRANDÃO, M.G.L.; ALVES, R.M.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, P.; VIEIRA, M.T; MOREIRA-CAMPOS, L.M. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.5, n.1, p.56-59, 2002.
- BRANNAN, D.K. (Ed). **Cosmetic microbiology: a practical handbook**. Washington: CRC Press, 1997. 323p.
- BRASIL, Leis, decretos, etc... Resolução nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2004.
- BRASIL, Leis, decretos, etc... Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000. Dispõe sobre o. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2000.
- BRASIL, Leis, decretos, etc... Resolução nº 899, de maio de 2003. Dispõe sobre validação. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02/06/2003.
- BRENDLER-SCWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, p. 245-254, 2005.
- BRUNETON, J. **Farmacognosia: fitoquímica plantas medicinales**. 2. ed. Zaragoza: Acríbia, 2001. p. 365-400.
- BUCKBERRY, L.D.; BLAGBROUGH, I.S.; SHAW, P.N. Cysteine conjugate toxicity in a human cell line: correlation with C-S lyase activity in human hepatic tissue. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 12, n. 4, p. 329-350, 1993.

- BUELGA, C.S.; SCALBERT, A. Proantocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J. Sci. Food Agr.**, v. 80, p. 1094-1117, 2000.
- BUGNO, A.; NICOLETTI, M.A.; ALMODÓVARI, A.A.B.; PEREIRA, T.C.; AURICCHIO, M.T. Antimicrobial efficacy of *Curcuma zedoaria* extract as assessed by linear regression compared with commercial mouth rinses. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, p. 440-445, 2007.
- BURLIN, G.B. **Avaliação da eficácia e da estabilidade química de conservantes em uma formulação de gel hidrofílico contendo vitamina A e E.** 2000. 130f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2000.
- CÁCERES, A.; GIRON, L.M.; ALVARADO, S.R.; TORRES, M.F. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. **J. Ethnopharmacol.**, v. 20, p. 223-237, 1987.
- CALIXTO, J.B. Bioterápia: a diversidade biológica na vida da indústria farmacêutica. **Ciênc. Hoje.** v. 28, n. 167, p. 36-43, 2000.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- CARDOSO, C.M.V.; SAJO, M.G. Vascularização foliar e a identificação de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) da bacia hidrográfica do Rio Tibagi, PR. **Rev. Bras. Bot.**, v. 27, n.1, 2004.
- CARDOSO, C.R.P. **Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae).** 2006. f. 39-40. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2006.
- CARTURAN, G. F. **Guia ABC de Microbiologia:** controle microbiológico na indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. 2.ed. São Paulo: ABC, 1999. p. 39 - 58.
- CARVALHO, H.A. A *Tradescantia* como bioindicador vegetal na monitoração dos efeitos clastogênicos das radiações ionizantes. **Radiol. Bras.**, v. 38, n. 6, p. 459-462, 2005.
- CAVALCANTE, A.A.M.; RUBENSAM, J.N.P.; DA SILVA, E.G.; MOREIRA, J.C.F.; HENRIQUES, J.A.P. Mutagenicity, antioxidant, potential, and antimutagenic activity against

- hydrogen heroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and Cajuina. **Environm. Molec. Mutagen.**, v. 41, p. 360–369, 2003.
- CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, n.1, p. 105-108, 2004.
- CHOI, D.W.; KIM, J.H.; CHO, S.Y.; HIM, D.H.; CHANG, S.Y. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. **Toxicology**, v. 181-182, p. 581-586, 2002.
- CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T. DE; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **J. Ethnopharmacol.**, v.79, n.2, p.213-220, 2002.
- COHEN, F.L.; TARTASKY, D. Microbial resistance to drugs therapy: a review. **Am. J. Infect. Control.**, v. 25, n. 1, p. 51-64, 1997.
- CORDEIRO, C.H.G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORREA, M. A.; PIZZOLITTO, A. C.; BAUAB, T. M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.42, n.3, p. 395-404, 2006.
- CORRÊA, A.D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.E. **Plantas Medicinais. Do Cultivo à Terapêutica**. 4. ed. Vozes: Rio de Janeiro, 2001. 264 p.
- COWEN, R.A.; STEIGER, B. Why a preservative system must be tailored to a specific product. **Cosmet. Toilet.**, v.92, n. 3, p. 15-20, 1977.
- CRAVEIRO, A.A.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. Essential oil of *Eugenia jambolana*. **J. Nat. Prod.**, v. 46, n. 44, p. 591-592, 1983.
- CRÉMIEUX, A.; CUPFERMAN, S.; LENS, C. Method for evaluation of the efficacy of antimicrobial preservatives in cosmetic wet wipes. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v. 27, p. 223–236, 2005.
- CRUZ, F.G.; ROQUE, N.F.; GIESBRECHT, A.M.; DAVINO, S.C. Antibiotic activity of diterpenes from *Mikania triangularis*. **Fitoterapia**, v. 67, n.1, p.189-190, 1996.

- CSGMT. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Disponível em: <http://vm.cfsan.fda.gov/~redbook/red-toct.html>. Acesso em: 22 dez 2007.
- CTFA survey: test methods companies use. **Cosmet. Toilet.**, v.105, p. 79–82, 1990.
- CURRY, A.S. (Ed). **CFTA Microbiology Guidelines**. Washington, 1993.
- CURRY, J. Thoughts on preservation testing of water-based products. **Cosmet. Toilet.**, v.102, p. 93–95, 1987.
- CVETNIC, Z.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Antimicrobial activity of grape fruit seed and pulp ethanolic extract. **Acta Pharm.**, v. 54, n. 3, p. 243-250, 2004.
- DAMASCENO, D.C.; LIMA, P.H.O.; GALHIANE, M.S.; VOLPATO, G.T.; RUDGE, M.V.C. Avaliação do efeito hipoglicemiante da sapogenina extraída de sementes de *Eugenia jambolana* Lam. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 4, n. 2, p. 46 - 54, 2002.
- DAMOUR, O.; HUA, S.Z.; LASNE, F.; VILLAIN, M.; ROUSSELLE, P.; COLLOMBEI, C. Citotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. **Burns**, v. 18, n. 6, p. 479-485, 1992.
- DANADIO, L.C.; NACHTIGAL, J.C.; SACRAMENTO, C.K. **Frutas exóticas**. Jaboticabal: Funep, 1998. p. 119-120.
- DAVIES, H.W.; KENNEDY, S.M.; TESCHKE, K.; QUINTANA, P.J. Citogenetic analysis of South Asian berry pickers in British Columbia using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 416, p. 101-113, 1998.
- DE BOER, H.J.; KOOL, A.; MZIRAY, W.R.; HEDBERG, I.; LEVENFORS, J.J. Antifungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, n. 3, p. 461-469, 2005.
- DE LIMA, P.L.A.; DELMANTO, R.D.; SUGUI, M.M.; EIRA, A.F.; SALVADORI, D.M.F., SPEIT, G.; RIBEIRO, L.R. *Letinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents in vivo. **Mutat. Res.**, v. 496, p. 23-32, 2001.

- DEVIENNE, K.F. **Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides***. 2000. 126 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2000.
- EDENHARDER, R.; KRIEG, H.; KOTTGEN, V.; PATT, K.L. Inhibition of clastogenicity of benzo[a]pyrene and of its trans-7,8-dihydrodiol in mice *in vivo* by fruits, vegetables, and flavonoids. **Teratogen. Carcin. Mutagen.**, p. 16, p. 253–268, 2000.
- EDENHARDER, R.; SAGER, J.W.; GLATT, H.; MUCKEL, E.; PLATT, K.L. Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluoreno and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5-6] pyridine (PhIP) in metabolically competent V79 cells. **Mutat. Res.**, v.521, p. 57-72, 2002.
- ENNEVER, F.K.; ANDREANO, G.; ROSENKRANZ, H.S. The ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity. **Mutat. Res.**, v.205, p. 99-105, 1998.
- EVANS, H.J.; NEARLY, G.J.; WILLIAMSON, F.S. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays in *Vicia faba* roots and the effects of oxygen: Part II. Chromosome damage; the production of micronuclei. **Int. J. Rad. Biol.**, v. 1, p. 230-240, 1959.
- FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v. 339, p. 37-59, 1995.
- FAOAGALI, J.; FONG, J.; GEORGE, N.; MAHONEY, P.; O'ROURKE, V. Comparison of the immediate, residual, and cumulative antibacterial effects of Novaderm R, Novascrub R, Betadine Surgical Scrub, Hibiclens, and liquid soap. **Am. J. Infect. Control**, v. 26, n. 6, p. 337-343, 1995.
- FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu. 1988.
- FENNE, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.42, n. 3, p. 369-394, 2006.

- FENNECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes- a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutat. Res.**, v. 404, p. 155-165, 1998.
- FENNECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods Mol. Med.**, v. 111, p. 3-32, 2005.
- FERNANDES, M.J.B.; LIMAS, C.; ROSSI, M.H.; GONÇALVES, E.; SIMONI, I.C. Cytotoxicity of subfractions and compounds from *Polymnia sonchifolia*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, p. 338-341, 2005.
- FITOTERAPIA: entre o conhecimento popular e o científico. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/framereport.htm> . Acesso em: 22 jun. 2007.
- FLYVHOLM, M.A. Preservatives in registered chemical products. **Contact Derm.**, v. 53, p. 27-32, 2005.
- FOSTER, T.J. The *Staphylococcus aureus* “superbug”. The Journal of clinical investigation. **Ann. Arbor.**, v. 114, n. 12, p. 1693-1696, 2004.
- FRANKE, S.I.R.; PRÁ, D.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an *in vivo* analysis. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 279-283, 2005.
- FRANSWAY, A. F.T. The problem of preservation in the 1990s. Agents with preservative function independent of formaldehyde release. **Am. J. Contact Dermat.**, v.2, p. 145–174, 1991.
- FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3. ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 486p.
- FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. DNA Repair and Mutagenesis. **Am. Soc. Microbiol.**, Washington DC., 1995.
- FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 15, p. 178-182, 2005.

- GALINA, K.J. *Guazuma ulmifolia* Lam, **Sterculiaceae**: estudo botânico, químico e microbiológico. 2003, 110f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, 2003.
- GALLOWAY, S.M. Chromosome aberrations induced in vitro: mechanisms, delayed expression and intriguing questions. **Environ. Mol. Mutag.**, v.23, supl, n.4, p.44-53, 1994.
- GARCIA, E.S.; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B.; CORREA, C.V.B.; CAVALHEIRO, M.V.S.; SANTOS, R.R.; TOMASSINE, T. Fitoterápicos. Disponível em www.bdt.fat.org.br. Acesso em 20/01/2008.
- GÁTTAS, G.J.F.; LONGATTO FILHO, A.; MAEDA, M.Y.S.; SANTOS, D.R.; ANDREA FILHO, A. Identificação de micronúcleos (MN) em células de colo uterino de pacientes assintomáticas: Correlação dos métodos de Papanicolaou e Feugen-Fast Green. **Folha Med. Bras.**, v. 104, p. 57-59, 1992.
- GEISSMAN, T.A. Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds. In: FLORKIN, M.; STOTZ, E. H. (Ed.). **Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents**. New York: Elsevier, 1963. v. 9, p.265.
- GERBERICK, G.F.; RYAN, C.A.; KERN, P.S.; DEARMAN, R.J.; KIMBER, I.; GRACE Y.; PATLEWICZ, G.Y.; BASKETTER, D.A. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. **Contact Derm.**, v. 50, p. 274-288, 2004.
- GHASEMI, Y.; YASDI, M.T.; SHAFIEE, A.; AMINI, M.; SHOKRAVI, S.; ZARRINI, G. Parsiguine, a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*. **Pharm. Biol.** v. 42, n. 4-5, p. 318-322, 2004.
- GNAN, S.O.; DEMELLO, M.T. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous goiaba extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 103-108, 1999.
- GROVER, J.K.; VATS, V.; RATHI, S.S.; DAWAR, R. Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 233-238, 2001.

GUPTA, S., CHAUDHURI, T., GANGULY, D.K., GIRI, A.K. Antimutagenic effects of black tea (World blend) and its two active polyphenols theaflavins and thearubigins in *Salmonella* assays. **Phytother. Res.** v. 16, p. 655-661, 2002.

HASLAM, E., Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicines: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HAUSER, A.R.; SRIRAM, P. Severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. Tackling the conundrum of drugs resistance. **Postgrad. Med.**, v. 117, n. 1, p. 41-48, 2005.

HAYASHI, M.; MAC GREGOR, J.T.; GATEHOUSE, D.G.; ADLER, I.D., BLAKEY, D.H; DERTINGER, S.D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; SUTOU, S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, Integration with toxicity testing and automated scoring. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 234-252, 2000.

HEDDLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutat. Res.**, v. 18, p. 187-191, 1973.

HEDDLE, J.A.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHEELBY, M.D.; TUCKER, J.D.; VANPARYS, P.H.; MACCGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenic damage: past, present, and future. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 18, p. 277-291, 1991.

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

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

INTROINI, C. Theory and practice of the challenge test. **Boll. Chim. Farm.**, v. 124, n. 9, p. 365-381, 1985.

JAMBOLÃO. Disponível em: www.vivernatural.com.br/arvore/informa/medicinais_jambolao.htm. Acesso em: 07 dez. 2007.

- JAUREGUI, D.; RIOS, N.R. de; ROJAZ, C.E.B. de. Estudos anatômicos foliares em solanaceae de Venezuela. VI. Anatomia foliar de diez espécies de *Cestrum* L. **Acta Cient. Venez.**, v. 52, n. 4, p. 248–260, 2001.
- JAWETZ, E. **Microbiologia médica**. 21.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 142-143.
- JAYAPRAKASHA, G.K.; NEGI, P.S.; JENA, B.S.; RAO, J.M. Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. **J. Food Compost. Anal.**, v. 20, p. 330-336, 2007.
- KABARA, J.J. **Cosmetic and Drug Preservation**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 700-701.
- KANG, I.H.; KIM, H.J.; OH, H.; PARK, Y.I.; DONG, M.S. Biphasic effects of the flavonoids quercetin and naringenin on the metabolic activation of 2-amino-3,5-dimethylimidazol[4,5-f]quinoline by *Salmonella typhimurium* TA1538 co-expressing human cytochrome P450 1A2, NADPH-cytochrome P450 reductase, and cytochrome b5. **Mutat. Res.**, v. 545, p. 37–47, 2004.
- KHAN, M.R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A.D. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. **Fitoterapia**, v.72, n.7, p. 825-828, 2001.
- KLUMPP, A.; ANSEL, W.; KLUMPP, G.; CALATAYUD, V.; GARREC, J.P.; HE, S.; PENUELAS, J.; RIBAS, A.; RO-POULSEN, H.; RASMUSSEN, S.; SANZ, M.J.; VERGNE, P. *Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities. **Environ. Pollution**, v.139, p. 515-522, 2006.
- KOKOSKA, L.; POLESNY, Z.; RADA, V.; NEPOVIM, A.; VANEK, T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 82, p. 51–53, 2002.
- KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; LATTÉ, K.P.; FERREIRA, D. Evaluation of the antimicrobial of tannins and related compounds using the microdilution broth method. **Planta Med.**, v. 65, p. 444-446, 1999.
- KONAN, N.A.; BACCHI, E.M.; LINCOPAN, N.; VARELA, S.D.; VARANDA, E.A. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 30–38, 2007.

- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- KONG, J.M.; GOH, N.K.; CHIA, T.F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 24, n. 1, p. 7-21, 2003.
- KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.
- LE CURIEUX, F.; MARZIN, D.; ERB, F. Comparison of three short-term assays: results on seven chemicals : Potential contribution to the control of water genotoxicity. **Mutat. Res.**, v.319, n. 3, p. 223-236, 1993
- LEE, K.W.; EVERTS, H.; BEYNEN, A.C. Essential oils in broiler nutrition. **Int. J. Poult. Sci.**, v. 3, n. 12, p. 738-752, 2004.
- LEITE, K.R.; ANDRADE, L.S.; SENA, J.S.; VILAR, J.B.; CHEN, L.C. Avaliação da atividade mutagênica e genotóxica de *Ginkgo biloba* L. pelo teste do micronúcleo em camundongos. **Rev. Biol. Neotrop.**, v. 3, n. 2, p. 157-162, 2006.
- LEORNARDI, G.R. **Cosmetologia aplicada**. São Paulo: Medfarma, 2004, p. 2-12.
- LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; DE VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciênc. Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, mar-abr, 2005.
- LOPES, D.C.D.X.P.; TERESINHA, E.P.; TOMASSINI, T.C.B. Atividade anti-séptica de formulações contendo extrato etanólico de frutos de *Physalis angulata* L. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 86, n.2, p.75-77, 2005.
- LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil**. Nova Odessa, Instituto Plantarum, São Paulo, p. 544, 2002.
- LUNDMARK, L. The evolution of liquid soap. **Cosmet. Toilet.**, v.107, p. 49-53, 1992.
- MA, T.H. Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. A promising test system. **Mutat. Res.**, v. 64, p. 307-313, 1979.

MA, T.H. Tradescantia cytogenetic tests (root- tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis). A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program **Mutat. Res.**, v. 99, p. 293-302, 1982.

MA, T.H. Tradescantia micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. **Environ. Health Perspect.**, v. 37, p 85-90, 1981.

MA, T.H.; GRANT, W.F. The Tradescantias- adventurous plant. **Herbarist**, v. 48, p 36-44, 1982.

MACGREGOR, J.T.; CASCIANO, D.; MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 3-20, 2000.

MACGREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; HENIKA, P.R.; SHELBY, M.D. The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. **Fund. Appl. Toxicol.**, v. 14, p. 513-522, 1990.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr., V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

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

MANOU, I.; BOUILLARD, L.; DEVLEESCHOUWER, M.J.; BAREL, A.O. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, p. 368-376, 1998.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, v.113, p.173-215, 1983.

MAVOURNIN, K.H.; BLAKEY, D.H.; CIMINO, M.C. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat. Res.**, v. 239, p. 29-80, 1990.

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

MELO, J.G.; NASCIMENTO, V.T.; AMORIN, E.L.C.; ANDRADE LIMA, C.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata de vaca (*Bauhinia* spp) e ginkgo (*Ginkgo biloba* L). **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 14, n. 2, p. 111-120, 2004.

MIGLIATO, K.F. *Syzygium cumini* (L.) Skeels – **jambolão**: estudo farmacognóstico, otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade anti-séptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato. 2005, 179 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da 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 Farm. Bonaer.**, v. 25, n. 2, p. 310-304, 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. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 17, n.1, p 94-101, 2007.

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

MOLLER, P.; KNUDSEN, L.E.; LOFT, S.; WALLIN, H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. **Canc. Epidem.**, v. 9, p. 1005-1015, 2000.

MONTALVO, R.V.; PARRA, A.L.; LOPEZ, A.G.; FERRER, J.P.; ROMERO, J.L.S.; RAMIREZ, T.G. Toxicidad de un extracto tánico de *Pinus caribaea* Morelet. **Rev. Cubana Plant Med.**, v. 10, n. 2, p. 1-8, 2005.

- MONTEIRO, J.M.; PAULINO, A.U.; LIMA, A.E.; CAVALCANTE, A.E.L. Taninos: uma abordagem química à ecologia. **Quim. Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.
- MONTENEGRO, G. **Manual de técnicas de estudio estructural y ultraestructural em vegetales. Laboratorio de botánica de la facultad de ciencias biológicas.** Santiago de Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile, 1985.
- MONTHANA, R.A.A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, p.177-181, 2005.
- MORGANTI, P. Natural soap and syndet bars. **Cosmet. Toilet.**, v. 110, p. 89-97, 1995.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella* mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.
- MORTON, J. Jambolan. In: MORTON, J. **Fruits of warm climates.** Miami: Creative Resoursh Sistems, 1987. p. 375-378. Disponível em:
http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/jambolan_ars.html. Acesso em: 20/01/2008.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and citotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p. 55-63,1983.
- MOTOI, J.R.I. A proposed battery of tests for the initial evaluation of the mutagenic potential of medicinal and industrial chemicals. **Mutat. Res.**, v.205, p. 397-407, 1988.
- MULHOLLAND, M.; HIBBERT, D.B. Linearity and the limitations of squares calibration. **J. Chromatogr.**, v.762, n.1/2, p.73-82, 1997.
- MULLER, G.; KRAMMER, A. Comparative study of *in vitro* citotoxicity of povidine-iodine in solution, in ointment or in a liposomal formulation (Repithel) and selected antiseptics. **Dermatology**, v. 212, S. 1, p. 91-93, 2006.
- MULLIGAN, M.E.; MURRAY-LEISURE, K.A.; RIBNER, B.S.; STANDFORD, H.C.; JOHN, J.F.; KORVICH, J.A.; KAUFFMAN, C.A.; YU, V.L. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. **Am. J. Med.**, v. 94, p. 313-328, 1993.

- MURRAY, P.R.; BARRON, E.J.; PFALLER, M.A.; TECNOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington: ASM, 2003. p.1102-1106.
- NAGAO, M.; MOUTA, N.; YAHAGI, T.; SHIMIZU, M.; KUROYANAGI, M.; FUKUOKA, M.; YOSHIHARA, K.; NATORI, S.; FUJINO, T.; SUGIMURA, T. Mutagenicity of 61 flavonoids and 11 related compounds. **Environm. Mutagen.**, v. 3, p. 401–419, 1981.
- NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, n. 2, p. 247-256, 2000.
- NATARAJAM, A.T.; OBE, G. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. III-Restriction endonucleases. **Chromossoma**, v. 90, p. 120-7, 1984.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. New York, 2000.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed Standard. New York, 1997. M27-A.
- NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard—6th. ed. NCCLS document M7-A6. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003b.
- NISSEN, H.P.; OCHS, D. Triclosan an antimicrobial active ingredient with anti-inflammatory activity. **Cosmet. Toilet.**, v. 113, p. 61-64, 1988.
- NOSTRO, A.; CANNATELLI, M.A.; MORELLI, I.; MUSOLINO, A.D.; SCUDERI, F.; PIZZIMENTI, F.; ALONZO, V. Efficiency of *Calamintha officinalis* essential oil as preservative in two topical product types. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97, p. 395–401, 2004.
- NOVACOSKI, R.; TORRES, R.S.L.A. Sinérgica de óleos essenciais. **Cosmet. Toilet.**, v.17, p. 74-76, 2005.

- OBUKOWHO, P. Formulando emulsões para aditivos relaxantes. **Cosmet. Toilet.**, v. 19, p. 130-132, 2007.
- OLDAK, E.; TRAFNY, E.A. Secretion of proteases by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 8, p. 3281-3288, 2005.
- OLIVEIRA, A.M.; CALIRI, C.M., REGASINI, L.O.; TELASCREA, M.; PERON, M.C.C.; SILVA, D.H.S.; SANTOS, A.G.; BOLZANI, V.S.; CAVALHERIO, A.J.; SOARES, C.P. Evaluation of micronuclei frequency in *Tradescantia pallida* pollen mother cells treated with ethanolic extracts isolated from *Cryptocarya mandiocana*, *Cryptocarya moschata* and *Pterogyne nitens*. *Rev. Bras. Toxicol.*, 2008, *in press*.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 67-139.
- OLIVEIRA, F.P., LIMA, E.O., SIQUEIRA JÚNIOR, J.P., SOUZA, E.L., SANTOS, B.H.C., BARRETO, H.M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16,p. 510-516, 2006.
- OLIVEIRA, G.F. Avaliação da atividade antimicrobiana, *in vitro*, do extrato hidroalcoólico bruto da folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolão). 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Franca, Franca, 2005.
- OLIVEIRA, L.C.; BLOISE, M.I. Extratos e óleos naturais vegetais funcionais. **Cosmet. Toilet.**, v.7, p. 30-37, 1995.
- OLIVEIRA, R.V.M. Avaliação do sistema conservante em xampu anticasta com cetoconazol a 2%. 1999, 156 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo, 1999.
- ORTH, D.S. **Handbook of Cosmetic Microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1993. 591 p.
- ORTH, D.S. Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v. 30, p. 321-332,1979.

- ORTH, D.S.; KABARA, J.J. Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs. **Cosmet. Toilet.**, v.113, n.4, p. 51-58, 1998.
- ORTH, D.S.; LUTES, C.M. Adaptation of bacteria of cosmetic preservatives. **Cosmet. Toilet.**, v. 113, n. 4, p. 51-58, 1998.
- ORTH, D.S.; LUTES, C.M.; MILSTEIN, S.R.; ALLINGER, J.J. Determination of shampoo preservative efficacy testing. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v. 38, p. 307-319,1987.
- ORTH, D.S.; STEINBERG, D.C. Fator segurança no teste de eficácia de preservantes. **Cosmet. Toilet.**, v. 15, p 77- 81, 2003.
- ÖZER, Ö.; AYDIN, B.; YAZAN, Y. Efeito do tipo de óleo sobre a estabilidade das emulsões A/O/A. **Cosmet. Toilet.**, v. 19, p. 76-81, 2007.
- PACKER, J.F.; DA LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.
- PARRA, A.V.; LOPEZ, A.G.; RUIZ, A.R. Ausencia de potencial genotóxico in vitro e in vivo de um extracto fluido de *Piper auritum* H.K.B. **Rev. Cubana Plantas Med.**, v. 3, n. 2, p. 57-64, 1999.
- PAX-Y-MIÑO, C.; DÁVALOS, M. V.; SÁNCHEZ, M. E.; ARÉVALO, M.; LEONE, P. E. Shoul gaps be included in chromossomal aberration analysis? Evidence base on the comet assay. **Mutat. Res.**, v. 516, p. 57-61, 2002.
- PEDERSEN, L.K; AGNER, T.; HELD, E.; JOHANSEN, J.D. Methiyldibromoglutaronitrile in leave-on products elicits contact allergy at low concentration. **Br. J. Dermatol.**, v. 151, p. 817-822, 2004.
- PELCZAR Jr, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo: Mc Graw Hill do Brasil, 1997. v. 1, p. 212–220, 566 .
- PENNA, G.O.; HAJJAR, L.A.; BRAZ, T.M. Gonorréia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 5, p. 451-464, 2000.

- PEPATO, M.T, MORI, D.M.; BAVIERA, J.B.; HARAMI, R.C.; VENDRAMINI, R.; BRUNETTI, I.L. Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, p. 43-48, 2004.
- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 81-98, 219-258, 261-280.
- PRESTON, J.R. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assay: a report of the U.S.EPA's genotox program. **Mutat. Res.**, v. 87, p. 143-88, 1981.
- PRESTON, R.J.; SAN SEBASTIAN, J.R., MACFEE, A.F. The clastogenicity of chemical agents. **Mutat. Res.**, v. 189, p. 175-83, 1987.
- RAMIRES, A.; GÁTTAS, G.S.J.; CARVALHO, M.B. RAPOPORT, A.; SALDANHA, P.H. Clinical implications of micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas. In: VARMA, A.K. **Oral Oncology**, v. VI Macmillan, 1999, p. 199-204.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicol.**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.
- RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 43, p. 1433-1439, 2005.
- REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; GRESPAN, R.; CUMAN, R.K.N.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; MELLO, J.C.P.; BERSANIAMADO, C.A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 101-104, 2002.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, C.F.S.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, São Paulo, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

- RIBEIRO, A.; AIUB, C.; STANKEVICINS, L.; COSTA, V.; FERREIRA, F.; MAZZEI, J.; MOURA, R.S.; FELZENSZWALB, I. Genotoxic evaluation of a vinifera skin extract that present pharmacological activities. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 969-973, 2004.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutag. Amb.** Canoas: ULBRA, p. 173-198, 2003.
- RIBEIRO, P.A.M.; ARANTES, M.C.B.; SANDOVAL Jr., J.C.S.; AMORIM, L.L.R.S.S.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Controle de qualidade fisico-químico de matérias-primas vegetais. **Rev. Eletrônica Farm. Supl.**, v. 2, n. 2, p. 176-179, 2005.
- RIDEL, R.J.; CLOTHIER, R.H.; BALLS, M. An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. **Food Chem. Toxicol.**, v. 24, p.469-71, 1986.
- ROCHA FILHO, P.A. Fitocosméticos. **Cosmet. Toilet.**, v.7, p. 18 - 20, 1995.
- RODEIRO, I.; CANCINO, L.; GONZÁLES, J.E.; MORFFI, J.; GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, R.M.; NUÑEZ, A.; DELGADO, R. Evaluation of genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vinang), a new natural product with antioxidant activity. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 1707-1713, 2006.
- RODGERS, B.E.; BAKER, R.J. Frequencies of micronuclei in bank voles from zones of high radiation at Chornobil, Ukraine. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 19, n. 6, p. 1644-1648, 2000.
- ROMANOWSKI, P.; SCHUELLER, R. Microorganisms and personal-care products. **Cosmet. Toilet.**, v. 110, n. 11, p. 71–78, 1995.
- ROSS, I.A. **Medicinal Plants of the World: Chemical constituents, traditional and modern uses.** Totowa: Human, 1999. p. 283-289.
- ROTH, I. **Microtecnica Vegetal.** Caracas: Imprenta Universitária, 1964. 88 p.
- RUSSEL, A.D. Challenge testing: principles and practice. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v. 25, p. 147-153, 2003.
- SÁ, E.N.M. Plantas Mediciniais: Um Ambiente Digital de Estudo Elizabete Novaes Marques de Sá. [cited 2002, Mar]. 1999.

- SANCHES, A.C.C. **Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos.** 2004. 61–63, 167-168. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2004.
- SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C.R.; FIGUEIREDO, M.E.; RODRIGUES, C.M.; SANTOS, L.C.; SANTOS, F.V.; SERPELONI, J.M.; CÓLUS, I.M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. *J Ethnopharmacol.*, v. 112, n. 2, p. 319-26, 2007.
- SANTOS FILHO, D.; SARTI, S.J.; BASTOS, J.K.; LEITÃO FILHO, H.F.; MACHADO, J.O.; ARAÚJO, M.L.C.; LOPES, W.D.; ABREU, J.E. Atividade antibacteriana de extratos vegetais. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 12, n. 1, p. 39-46, 1990.
- SANTOS, C.A.P. Extratos vegetais em cosméticos. **Cosmet. Toilet.**, v. 18, p. 96-103, 2006.
- SANTOS, H. Preservantes utilizados na indústria cosmética brasileira. **Cosmet. Toilet.**, v. 9, n. 5, p. 50-59, 1997.
- SANTOS, P.R.V.; OLIVEIRA, A.C.X.; TOMASSINI, T.C.B. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. **Rev. Farm. Bioquím.**, v. 31, n. 1, p. 35-38, 1995.
- SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In SIMÕES, C.M.O; SCHEKEL, E.P.; GUSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVIK, P.R. (Org). **Farmacologia:** da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis, UFSC, 2003. cap 4, p. 615-656.
- SASAKI, Y.F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBAH, S.; TSUDA, T; SHUJI, T.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 393, p. 133-139, 1997.
- SASSEVILLE, D. Hypersensitivity to preservative. **Dermatol. Ther.**,v. 17, p. 251-263, 2004.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochem.**, v. 30, n. 12, p. 3875-1883, 1991.

- SCHAPOVAL, E.E.S.; ALICE, C.B.; ZUANAZZI, J.A.; SILVA, G.A.A.B.; HENRIQUES, A.T. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de *Syzygium cumini*. **Rev. Port. Farm.**, v. 28, n. 4, p. 55-57, 1988.
- SCHELEGEL, R.; MACGREGOR, J.T The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice. **Mutat. Res.**, v. 104, p. 367-369, 1982.
- SCHMIDT, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 31, p. 915, 1975.
- SCHMITT, A.C.; DE ALMEIDA, A.B.P.F.; DA SILVEIRA, T.A.; IWAKURA, C.T.; MENDES, K.F.; DA SILVA, M.C. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da planta *Bryophyllum pinnatum* Kurz (“Folha-da-fortuna”) colhida em Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil. **Acta Sci. Veter.**, v. 31, n. 1, p. 55-58, 2003.
- SCHMITTA, E.M.M.; JONASA, R.; DEKANTA, W.; STOPPER, H. Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. **Mutat. Res.**, v. 542, p. 43-48, 2003.
- SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.
- 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.
- SHAH, A.A.; HASAN, F.; AHMED, S.; HEMEED, A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-Negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. **Res. Microbiol.**, v. 155, n. 6, p. 409-421, 2004.
- SHARMA, S.B.; NASIR, A.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **J. Ethnopharmacol.**, v. 104, p. 367-373, 2006.

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

SIDRIM, J.J.C.; DIÓGENES, M.J.N.; PAIXÃO, G.C. Dermatofitose. In: SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 108-131.

SILVA, C.H.P.M.; NETTO, H.T. Contaminação microbiana em produtos cosméticos. **Sci. News**, v. 1, n. 2, p. 5-7, 2002.

SILVA, G.N.; BRAZ, M.G.; DE CAMARGO, E.A.; SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, D.A. Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to regular and white mineral trioxide aggregate. **Oral Org. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 102, n. 5, p. 50-54, 2006.

SILVA, T.M.A.; AOYAMA, H.; HAUN, M.; FERREIRA, C.V. Citotoxicidade do promotor de tumor e sua ação mitogênica sobre os linfócitos humanos. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v.36, n. 4, p. 237-239, 2004.

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

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SHEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 237, p. 123-130, 1988.

SINGH, N.P.; STTEPHENS, R.E. Microgel electrophoresis sensitivity, mechanisms and DNA electrostretching. **Mut. Res.**, v. 3383, p. 167-175, 1996.

SIQUEIRA, V.L. Estratégias de proteção microbiológica de cosméticos. **Cosmet. Toilet.**, v. 16, p. 100-104, 2004.

- SMITH, M.A. Antibiotic Resistance. **Nurs. Clin. North Am.**, v. 40, n. 1, p. 63-75, 2005.
- SÓLIS, C.; BECERRA, J.; FLORES, C.; ROBLEDO, J.; SILVA, M. Antibacterial and antifungal terpenes from *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 49, n. 2, p. 157-161, 2004.
- SONI, M. G.; TAYLOR, S.L.; GREENBERG, N.A.; BURDOCK, G.A. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. **Food Chem. Toxicol.**, v. 47, p. 1335 – 1373, 2002.
- SOUZA, T.M.; MOREIRA, R.D.M.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, n.1, p. , 2007.
- SRINIVASAN, D.; NATHAN, S.; SURESH, T.; PERUMALSAMY P.L. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v.74, n. 2, p. 217-220, 2001.
- STEVANATO, B.M. **Estudo da eficiência da lactoferrina como conservante em formulações semi-sólidas para produtos cosméticos e farmacêuticos.** 2005, 139 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2005.
- STULZER, H.K.; TAGLIARI, M.P.; FERREIRA, M.P. Estabilidade de shampoos contendo extratos vegetais. **Cosmet. Toilett.**, v. 17, p. 77-79, 2005.
- SUGIMURA, T.; NAGAO, M.; MUTSUSHIMA, T.; YAHAGI, T.; SEINO, Y.; SHIRAI, A.; SAWAMURA, M.; NATORI, S.; YOSHIHARA, K.; FUKUOKA, M.; KUROYANAGI, M. Mutagenicity of flavone derivatives. **Proceed. Japan Acad.**, v. 56, p. 194–197, 1977.
- SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica* and *Eugenia jambolana* Lam. trees. **Food Chem.**, v. 104, p. 1106-1114, 2007.
- SUMITA, N.M.; MENDES, M.E.; MACCHIONE, M.; GUIMARÃES, E.T.; LICHTENFELS, A.J.F.C; LOBO, D.J.A.; SALDIVA, P.H.N. *Tradescantia pallida* cv. *purpurea* boom in the

characterization of air pollution by accumulation of trace elements. **J. Air Waste Manage. Assoc.**, v. 53, p. 574-579, 2003.

TADDEI, E.B.; HENRIQUES, V.A.R.; SILVA, C.R.M.; CAIRO, C.A.A.; BOTTINO, M.C. Ensaio de citotoxicidade e influência do tratamento de solubilização na microestrutura da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta para potenciais aplicações ortopédicas. **Rev. Matéria**, v. 12, n. 1, p. 120-127, 2007.

TASSANEYAKUL, W.; VANNAPRASAHT, S.; YAMAZOE, Y. Formation of omeprazole sulphone but not 5-hydroxymeprazone is inhibited by grapefruit juice. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 49, p. 139-144, 2000.

TEIXEIRA, C.C.; FUCHS, F.D.; WEINERT, L.S.; ESTEVES, J.F. The efficacy of folk medicines in the management of type 2 diabetes mellitus: results of a randomized controlled trial of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **J. Clin. Pharmacy Ther.**, v. 31, p. 1-5, 2006.

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

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E. RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TICE, R.R.; FURED-MACHACEK, M.; SATTERFIELD, D.; UDUMUDI, A.; VASQUEZ, M.; DUNNICK, J.K. Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenic female mice heterozygous for the p53 gene. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 31, n. 2, p. 113-124, 1998.

TICE, R.R.; STRAUSS, G.H. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. **Stem Cells.**, v. 13, p. 207-214, 1995.

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

TOMETSKO, A.M.; DERTINGER, S.D.; TOROUS, D.K. Analysis of micronucleated cells by flow cytometry. 4- Kinetic analysis of cytogenetic damage in blood. **Mutat. Res.**, v. 334, p. 9-18, 1995.

TOROUS, D.K.; DERTINGER, S.D.; HALL, N.E.; TOMETSKO, C.R. An automated method for discriminating Aneugen vs. Clastogen- induced micronuclei. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.31, p. 340-344, 1998.

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

UNDERBRINK, A.G.; SCHAIRER, L.A.; SPARROW, A.H. *Tradescantia* stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. In: HOLLAENDER, A. (Ed). **Chemical Mutagens: principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1973, p. 171-207.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. **Guidance for industry: ICH Q2B** Validation of analytical procedures: methodology. Rockville, 1995. (CPMP/ICH/281/95). Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/ichq2bmeth.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2007.

UNITED STATES. Food and Drug Administration (FDA). **Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Method**. 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/>. Acesso em: 21 dez. 2007.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Biopharmaceutics. **Bioanalytical method validation**. 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance>. Acesso em: 21 dez. 2007.

USP 26. The United States Pharmacopeia. 26th. ed. Rockville: Pharmacopeial Convention, 2003.

VANPARYS, P.; DEKNUDT, G.; VERMEIREN, F.; SYSMANS, M.; MARSBOOM, R. Sampling times in micronucleus testing. **Mutat. Res.**, v. 282, p. 191-196, 1992.

- VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.
- VARELLA, S.D.; POZETTI, G.L.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 2029-2035, 2004.
- VEIGAS, J.M.; NARAYAN, M.S.; LAXMAN, P.M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chem.**, v.105, p. 619-627, 2007.
- VIANA, M.E.S.; CARNEIRO, M.R.G.; FELZENSWALB, I.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Evaluation of β -myrcene and (+) and (-)- α -pinene in the *Salmonella* micrososome assay. **Mut. Res. Genetic Toxicol. Env. Mutagen.**, v. 557, p. 85-97, 2005.
- VIJAYALAXMI, K.K; VENU, R. *In vivo* anticlastogenic effects of L-ascorbic acid in mice.. **Mutat. Res.**, v.438, p. 47-51, 1999.
- VIJAYANAND, L.; RAO, J.M.; NARASIMHAM, P. Volatile flavour component of jamun fruit (*Syzygium cumini* L.). **Flavour Fragrance J.**, v. 16, n. 1, p. 47-49, 2001.
- VILLASEÑOR, I.M.; LAMADRID, M.R.A. Comparative anti-hyperglycemic potentials of medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 104, p. 129-131, 2006.
- VISTICA, D.T. Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting forazam production. **Cancer Res.**, v. 51, n.5, p. 2515-20, 1991.
- WILCOX, M.H. Antibiotic prescribing as a risk factor for MRSA. **Hosp. Med.**, v. 66, n. 3, p. 180-184, 2005.
- WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. **Harry's Cosmetology**. 7. ed. New York: Chemical Publ., 1982. p. 1-16, 92-110, 653-674.
- WILSON, A.P. Cytotoxicity and viability assays. In: FRESHNEY, R. I. **Animal cell culture: a practical approach**. 2. ed. New York: Oxford University 1992. cap. 8, p. 263-303.

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

YABLONSKI, J.I.; MANCUSO, S.E. Conservação de sistemas “atípicos” de produtos cosméticos. **Cosmet. Toilet.**, v. 16, p. 118-124, 2004.

YAMAMOTO, C.H.; PINTO, T.J.A.; MEURER, V.M.; CARVALHO, A.M.; REZENDE, P. Controle de qualidade microbiológico de produtos farmacêuticos, cosméticos e fitoterápicos produzidos na zona da mata, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2. 2004, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte, 2004.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Eds.). **Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p.17-46.

ZACCHINO, S. Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A.; E CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. 2001. p. 435-479.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro. Editora Médica e Científica, 1998.

ZAMBRANO, M.A.; TARGA, H.J.; RABELLO-GAY, M.N. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. **Stain Technol.**, v. 57, p 48-49, 1982.

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

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

ZHOU, J.; SAKR, A.; LICHTIN, J.L. Triclosan em desodorantes comerciais. **Cosmet. Toilet.**, v. 5, p. 44-48, 1993.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)