

## Elaboração de microemulsão do extrato da planta *Syzygium cumini* com atividade antimicrobiana

Preparation of microemulsion of *Syzygium cumini* plant extract with antimicrobial activity

Preparación de microemulsión de extracto vegetal de *Syzygium cumini* con actividad antimicrobiana

Recebido: 10/09/2022 | Revisado: 27/09/2022 | Aceitado: 29/09/2022 | Publicado: 07/10/2022

### **Samuel Bruno dos Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6420-406X>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: samuelbruno@gmail.com

### **Igor Adriano de Oliveira Reis**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4941-9932>  
Instituto Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: reisigoradriano@gmail.com

### **Rosangela de Moraes Estevam**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2231-9886>  
Instituto Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: cse.ufs@gmail.com

### **Jeison Saturnino de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3035-2560>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: jeison\_fisioterapia@yahoo.com.br

### **Brancilene Santos de Araujo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0281-8677>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: brancily@gmail.com

### **Waldecy de Lucca Junior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2916-9101>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: wluccajr@academico.ufs.br

### **Mário Rodrigues Pereira da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2444-5798>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: Mariosilvarp29@gmail.com

### **Charles dos Santos Estevam**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6940-6891>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: cse.ufs@gmail.com

### **Resumo**

A *Syzygium cumini* (L.) Skeels é uma importante espécie da família Myrtaceae, por causa dos seus diferentes destinos na medicina popular. Devido a sua alta atividade biológica, o jambolão tem sido muito estudado ultimamente. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana e analisar a citotoxicidade do extrato e frações da *S. cumini*. Primeiramente realizou-se testes fitoquímicos de reconhecimento dos metabólitos secundários presente no extrato, com posterior teste de difusão em disco para investigar a capacidade de inibição do crescimento bacteriano do extrato frente às bactérias gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* *Escherichia coli* e gram-positiva, *Streptococcus mutans*. A microemulsão foi produzida a partir de testes físico-químicos e a citotoxicidade fora realizada em células do tipo fibroblastos. A prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico obteve a presença de metabólitos secundários, tais como: Flabobênicos, Flavonas, Flavonois, Xantonas, Flavononois, Leucoantrocianidinas, Catequinas, Esteroides e Saponinas. A fração ativa do extrato, neste caso Acetato de Etila, inibiu o crescimento bacteriano, sendo incorporada à microemulsão, que também apresentou atividade antimicrobiana, possibilitando a formulação do produto.

**Palavras-chave:** *Syzygium cumini*; Microemulsão; Antimicrobiano.

### **Abstract**

*Syzygium cumini* (L.) Skeels is an important species of the Myrtaceae family, because of its different fates in folk medicine. Due to its high biological activity, jambolan has been studied a lot lately. Thus, the objective of this work

was to evaluate the antimicrobial action and analyze the cytotoxicity of the extract and fractions of *S. cumini*. First, phytochemical tests were carried out to recognize the secondary metabolites present in the extract, with subsequent disk diffusion test to investigate the ability of inhibiting bacterial growth of the extract against gram-negative bacteria *Klebsiella pneumoniae* *Escherichia coli* and gram-positive, *Streptococcus mutans*. The microemulsion was produced from physical-chemical tests and cytotoxicity was performed in fibroblast-like cells. The phytochemical prospection of the hydroethanolic extract obtained the presence of secondary metabolites, such as: Flabobens, Flavones, Flavonols, Xanthonas, Flavononois, Leucoanthrocyanidins, Catechins, Steroids and Saponins. The active fraction of the extract, in this case Ethyl Acetate, inhibited bacterial growth, being incorporated into the microemulsion, which also showed antimicrobial activity, enabling the formulation of the product.

**Keywords:** *Syzygium cumini*; Microemulsion; Antimicrobial.

### Resumen

*Syzygium cumini* (L.) Skeels es una especie importante de la familia Myrtaceae, debido a sus diferentes destinos en la medicina popular. Debido a su alta actividad biológica, jambolan se ha estudiado mucho últimamente. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar la acción antimicrobiana y analizar la citotoxicidad del extracto y fracciones de *S. cumini*. En primer lugar, se realizaron pruebas fitoquímicas para reconocer los metabolitos secundarios presentes en el extracto, con posterior prueba de difusión en disco para investigar la capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano del extracto frente a bacterias gramnegativas *Klebsiella pneumoniae* *Escherichia coli* y grampositivas, *Streptococcus mutans*. La microemulsión se elaboró a partir de pruebas físico-químicas y la citotoxicidad se realizó en células tipo fibroblastos. La prospección fitoquímica del extracto hidroetanólico obtuvo la presencia de metabolitos secundarios, tales como: Flabobenos, Flavonas, Flavonoles, Xantonas, Flavononois, Leucoantrocianidinas, Catequinas, Esteroides y Saponinas. La fracción activa del extracto, en este caso Acetato de Etilo, inhibió el crecimiento bacteriano, siendo incorporado a la microemulsión, que también mostró actividad antimicrobiana, posibilitando la formulación del producto.

**Palabras clave:** *Syzygium cumini*; Microemulsión; Antimicrobiano.

## 1. Introdução

*Syzygium cumini* (L.) Skeels pertence à família Myrtaceae, compreendendo em 129 gêneros e mais de 4.620 espécies (Stasi; Lima, 2002). Nativas dos trópicos, as espécies podem ser encontradas, no Brasil, em diversos estados das regiões Sudeste, Nordeste e Norte, sendo popularmente conhecida como jambolão, jamelão ou azeitona-roxa. Esta, mede cerca de 10m de altura e 3 a 4,5 m de diâmetro de projeção da copa, com folhagem abundante (Migliato, 2005).

A *S. cumini* destaca-se na medicina popular pelo seu uso no tratamento da Diabetes Mellitus (Veber, et al, 20015) por causa da sua ação hipoglicêmica e diurética. Além disso, apresenta ação antimicrobiana, cardiotônica, adstringente, antiinflamatória, antiemética, antipirética, anticonvulsivante e anti-hemorrágica, sobressaindo-se em relação as outras espécies (Migliato, 2005).

Devido à sua alta atividade biológica, o jambolão tem sido muito estudado, ultimamente. A literatura descreve a presença de diversos metabólitos secundários, tais como: flavonóides, alcalóides, glicosídeos, esteroides, fenóis, ácido gálico (Zanoello, et al. 2002) saponinas, terpenóides, glicosídeos e taninos cardiotônicos, nos extratos das folhas da espécie (Veber, et al, 2015). Esses que se associam, principalmente, à atividade antimicrobiana e antioxidante da planta (Zanoello, et al., 2002; Veber, et al., 20015).

Atualmente, há uma grande necessidade de introduzir novas alternativas ao arsenal farmacêutico quando se refere à terapêutica com o uso de antimicrobiano. Uma vez que, tem se tornado frequente, o aparecimento de cepas bacterianas cada vez mais resistentes, resultantes da utilização indiscriminada e automedicação destes tipos de fármacos. Portanto, a utilidade de plantas com ação antimicrobiana tem crescido com grandes perspectivas (Veber, et al., 20015).

A classificação, pelo senso comum, leva a entender que preparações à base de plantas são isentas de efeitos adversos. Entretanto, estas podem possuir compostos isolados que apresentem atividade citotóxica, trazendo agravos à saúde como reações alérgicas e tóxicas (Belcavello; Andrade, 2012; Desoti, et al., 2011).

Desta forma, é importante a realização dos testes de citotoxicidade dos extratos das plantas, visto que, é imprescindível o conhecimento da presença ou não da ação tóxica da espécie, para que assim seu uso seja realizado de maneira segura e eficaz (Gonçalves, et al., 2009).

Ademais, para que os compostos sejam utilizados como fármacos, é necessário um veículo que viabilize sua absorção. As microemulsões são alternativas eficazes, nessas situações, uma vez que são sistemas termodinamicamente estáveis e isotropicamente translúcido de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos (Damasceno, et al., 2011) e frequentemente combinado com um cotensoativo (Oliveira, et al., 2004).

Da perspectiva microestrutural podem ser do tipo água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) ou estruturas bicontínuas (D'cruz; Uckun, 2001). Desta forma, esses atuam como sistema de liberação e aperfeiçoa o grau de solubilização de fármacos e substâncias ativas, uma vez que solubiliza substâncias hidrofílicas em meio lipofílico ou lipofílica em meio aquoso e anfifílico na interface óleo/ água (Oliveira et. al., 2004; Formariz et al., 2005). Além de proteger as substâncias de hidrólise enzimática (D'cruz; Uckun, 2001).

Os sistemas microemulsionados apresentam como vantagens estabilidade termodinâmica, viscosidade adequada, transparência e a alta capacidade de solubilizar fármacos pouco solúveis em água na fase dispersa oleosa (Damasceno, et al., 2011). Proporcionam, também, alternativas terapêuticas modernas, farmacologicamente mais eficientes, uma vez que altera a biodisponibilidade da substância, e com efeitos colaterais bastantes reduzidos, pela diminuição da toxicidade (Oliveira, et al., 2004).

## 2. Metodologia

### Coleta e Identificação do Material Botânico

Folhas frescas de *S. cumini* foram coletadas em 13 de setembro de 2018, na Universidade Federal de Sergipe, localizado a 10°55'35.2"S 37°06'01.1"W, município de São Cristóvão (Sergipe). A identificação botânica foi realizada no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (ASE). As amostras coletadas foram mantidas em estufa com circulação de ar a 37°C, até completa desidratação.

### Preparação do Extrato Bruto

As folhas de *Syzygium cumini* foram secas em estufa a 37°C durante 5 dias. Em seguida, o material foi triturado, pesado e submetido à extração a frio com álcool etílico 99,9% por maceração exaustiva durante 5 dias. Posteriormente, o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 50°C, para eliminação do solvente e obtenção de extrato hidroetanólico da folha.

### Obtenção das Frações

Para a obtenção das frações, parte do extrato bruto (27,9g) concentrado foi dissolvido em metanol 40% (v/v) e submetido à extração líquido-líquido com os solventes: Hexano, Clorofórmio e Acetato de etila. Cada uma das fases foi concentrada em rotaevaporador a 50°C, sob pressão reduzida, resultando em quatro frações: hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e hidrometanólica (FHM) as quais foram pesadas e o rendimento calculado em relação ao material seco.

### Prospecção Fitoquímica

Foram realizados testes qualitativos clássicos através de reações químicas que levam à formação de precipitados ou alteração de cor característica, com a finalidade de determinar a presença de classes de metabólitos secundários nas frações obtidas. Para isso, foram utilizadas reações propostas por Mattos (1997) as quais buscam identificar a presença de derivados

antracênicos, alcalóides, heterosídeos cardiotônicos, cumarinas, esteróis, fenóis totais, flavonóides, flavanonóis, flavanonas, antocianinas, antocianidinas, taninos e xantonas.

#### *Teste para fenóis e taninos*

Esse teste baseia-se na capacidade do grupo dos Taninos se complexarem com íons metálicos (Ferro, Manganês, Cobre e outros) formando, assim, precipitados. No tubo de ensaio contendo o extrato dissolvido foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  1 mol.L<sup>-1</sup>. Em seguida, agitou-se bem e observou-se qualquer variação de cor e/ou formação de precipitado escuro abundante. O resultado foi comparado com um teste em branco (água e  $\text{FeCl}_3$ ). A coloração variável entre azul e vermelha é indicativo da presença de fenóis. A formação de um precipitado azul escuro indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de cor verde, a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

#### *Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonoides*

Esse teste baseia-se na capacidade dos esqueletos flavônicos de mudarem de cor por ressonância eletrônica com equilíbrio ácido-base. Na reação, foram utilizados 3 tubos numerados 2, 3 e 4. O tubo de número 2 foi acidificado a pH 3 com  $\text{HCl}$  3 mol.L<sup>-1</sup> e os tubos 3 e 4 foram alcalinizados a pH 8,5 e 11 com  $\text{NaOH}$  1 mol.L<sup>-1</sup>. A observação de qualquer mudança da coloração da solução foi analisada como mostrado a seguir (Quadro 1).

**Quadro 1-** Detecção colorimétrica de antocinidinas, antocianidinas e flavonoides.

Constituintes	Cor		
	pH = 3	pH = 8	pH = 11
Antocianidinas e antocianinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho-púrpuro
Flavononóis	-	-	Vermelho-laranja

Fonte: Santos et al (2022).

#### *Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavononas*

O teste se baseia na possibilidade de levar a hidrólise dos O-heterosídeos flavônicos por temperatura. A hidrólise alcalinas e ácidas facilitam a identificação dos núcleos flavônicos. Para a reação, acidificou-se o tubo 5 por adição de  $\text{HCl}$  3 mol.L<sup>-1</sup> até pH 1-3 e alcalinizou-se o tubo com  $\text{NaOH}$  1 mol.L<sup>-1</sup> até pH 11. Os tubos foram aquecidos cuidadosamente. Foi observada a modificação na coloração por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior. A interpretação dos resultados foi realizada como mostrado a seguir (Quadro 2).

**Quadro 2** - Detecção colorimétrica e leucocianidinas, catequinas e flavononas.

Constituintes	Cor	
	Meio Ácido	Meio Alcalino
Leucocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	Vermelo-laranja

Fonte: Santos et al. (2022).

#### *Teste para Flavonóis, Flavononas, Flavononois e Xantonas*

Essa reação se baseia no fato de que os derivados flavônicos de cor amarela se reduzem adquirindo coloração avermelhada ou no caso dos antociânicos, azulada, quando em solução alcóolica ácida e em presena de magnésio. Nos tubos de número 7, foram adicionados 10 mg de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. O término da reação foi indicado pelo fim da efervescência. Observou-se por comparação mudança na cor da mistura da reação tubos nos tubos 5 e 7. O aparecimento ou a intensificação da cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonois e/ou xantonas livres ou seus heterosídeos.

#### *Teste para Esteroides e Triterpenoides (Liebermann-Buchard)*

Essa reação é usada para averiguar a presença de núcleo esteroidal ou triterpenoidal. Para este experimento, adicionou-se 10 mL de uma solução do EHEF, FAC, FHX, FAE e FHM em béqueres e, deixou-se secar em banho-maria. Extraiu-se o resíduo seco de cada béquer por três vezes com porções de 1-2 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Filtrou-se a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão coberta com mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro para um tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Acrescentou-se, cuidadosamente, três gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Agitou-se suavemente e observou-se o rápido desenvolvimento de cores. A coloração azul seguida de verde permanente é um indicativo da presença de esteroides livres. Coloração parda até vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres.

#### *Teste para Saponinas*

Essa reação se baseia no fato de que os heterosídeos saponosídeos (saponinas) têm propriedades detergentes e surfactantes e, quando tratados com HCl e aumento de temperatura, sofrem hidrólise, precipitam as agliconas e perdem suas propriedades detergentes.

Para o teste, os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, foram solubilizados em água destilada e posteriormente filtrados em um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução por 2-3 minutos e observou-se a formação de espuma. O aparecimento de espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas.

Em seguida, para confirmar a presença de saponinas, adicionou-se 2 mL de HCl concentrado ao conteúdo do tubo de ensaio e deixou-se por uma hora imerso em banho-maria. Posteriormente, neutralizou-se, resfriando e agitando novamente. A presença de precipitado e a não formação de espuma confirma a presença de saponina.

#### *Teste para Alcaloides*

Este teste se baseia na precipitação de alcaloides ao interagir com o reagente Dragendorff. Este reagente consiste numa solução de iodeto de bismuto de potássio, em ácido diluído. Quando em contato com amostras que contêm alcaloides e compostos nitrogenados, formam precipitados. A solução apresenta mudança de coloração que varia de amarela à vermelha

alaranjada. O precipitado é obtido através da formação de um complexo entre o átomo de bismuto e os agrupamentos amins presentes nos compostos a serem analisados.

Para tanto, diluiu-se pequena quantidade do EHE, bem como do FAC, FHX, FAE, e FHM, transferiu-se para tubos de ensaio, adicionou-se 3 gotas de Dragendorff e observou-se o resultado.

### **Atividade antimicrobiana**

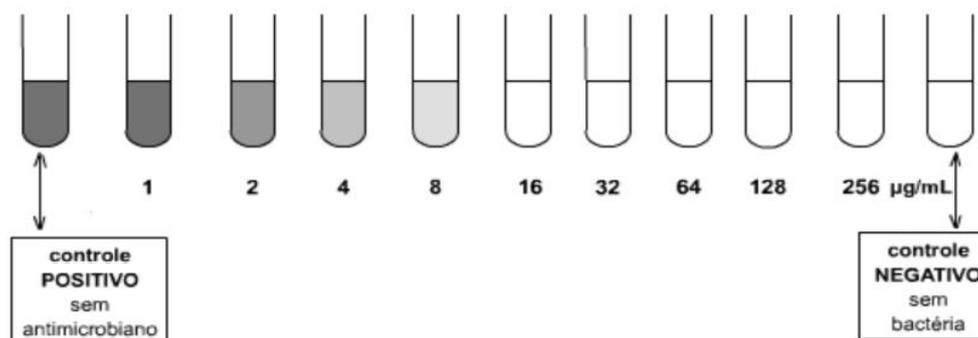
#### *Teste de Difusão em Ágar*

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada utilizando o teste de difusão em ágar, proposto por Santos et al (2022) cuja avaliação é qualitativa. Foram realizadas culturas das bactérias *Enterococcus durans/ hirae* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* derivada ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* deriva ATCC 700603, *Escherichia coli* derivada ATCC 25922, *Escherichia coli* enteropatogênica clássica 0111 derivada CDC 01111 e *Streptococcus mutans* INCQS 00446, mantidas no meio BHI suplementado com Agar (8 g L<sup>-1</sup>) em estufa bacteriológica (37 ± 1°C). Essas culturas foram semeadas com swab estéril em placas de Petri contendo meio Ágar Muller-Hilton em pH 7,2 - 7,4. Posteriormente, discos de papel filtro embebidos com 20 µL da amostra vegetal, em diferentes concentrações, foram depositados na superfície do meio de cultura inoculado com os microrganismos. Como controles negativos foram utilizados todos os reagentes em uso para diluição das amostras, enquanto para o controle positivo foi utilizado a Clorofenicol. Após incubação, serão realizadas as medidas dos halos de inibição e a interpretação dos resultados se dará pela comparação com valores de referência para o teste.

#### *Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada para cada microrganismo para o qual o(s) extrato(s) vegetal apresentou atividade antimicrobiana (Figura 1). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para isso, culturas bacterianas desenvolvidas em meio BHI por 6 horas a 35°C ±2 e diluídas convenientemente (cerca de 108 UFC/mL) foram inoculadas em tubos contendo meio BHI acrescido de diferentes concentrações dos extratos por diluição seriada 1:2. Após incubação de 24 horas a 37° C observou-se a ocorrência de turvação dos meios de culturas para determinação da CIM (Santos et al , 2022).

**Figura 1** - Representação esquemática do teste de macrodiluição em tubo, após a inoculação e incubação.



Fonte: Santos et al, (2022).

### Preparação das Microemulsões

A FAE proveniente do EHE da folha de *S. cumini* foi selecionada para incorporação na microemulsão, dada a atividade antimicrobiana apresentada.

#### Composição

#### Tensoativo e Cotensoativo

O tensoativo utilizado foi o Polisorbato 80 (Tween<sup>®</sup> 80) INCI name: *Polysorbate 80*. Fabricante: Dinamica, e o cotensoativo que compôs a formulação foi o Propilenoglicol. INCI name: *Propylene Glycol*. Fabricante: Synth

*Fase oleosa e Fase aquosa composta por* Ácido oleico (INCI name: *Acid Olea*. Fabricante: Synth ) e Água destilada

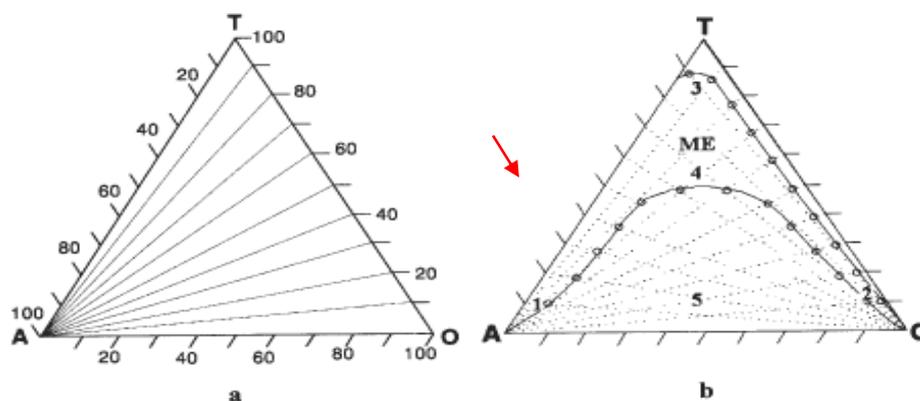
#### Diagrama de Fases Pseudo-ternário (DFPT)

O diagrama de fases pseudo-ternário foi realizado de acordo com Oliveira et. al. (2004). Segundo os autores, o diagrama descreve em que condição experimental é possível se obter microemulsões e as regiões limites de transição entre emulsões, fases separadas e microemulsões O/A e A/O. A fase aquosa, fase oleosa e mistura de tensoativo/co-tensoativo são representadas nos vértices do triângulo (Figura 2).

#### Desenvolvimento da microemulsão

Inicialmente, foi realizada, no dia anterior, uma mistura na proporção de 2:1, sendo 2 do tensoativo e 1 do cotensoativo. No dia seguinte, colocaram-se os volumes do TEM/COT de acordo com o diagrama de fases pseudo-ternário e levou-os para agitação em agitador magnético durante 20 minutos. Passado este tempo, deu-se início à incorporação das fases oleosa e aquosa, sendo o volume definido também pelo diagrama de fases pseudo-ternário. A fase oleosa foi adicionada gota a gota utilizando uma pipeta automática e, em seguida, a mistura foi levada para agitação durante 30 minutos. O mesmo foi feito para a fase aquosa. A mistura total foi, então, levada para o sonicador ultrassônico durante 30 minutos. Encerrado o procedimento, as formulações foram reservadas em local com pouca luminosidade durante 5 dias para sua completa estabilização.

**Figura 2** - Diagrama de fases pseudo-ternário. A seta vermelha indica a condição experimental para a elaboração da microemulsão.



Fonte: Oliveira et. al. (2004).

#### *Incorporação da Fração Acetato de Etila à microemulsão*

A concentração da solução final foi determinada pelo teste de Concentração Inibitória Mínima. Inicialmente, foi escolhida a formulação a qual possuiu características de microemulsão. Em seguida, a FAE foi adicionada à formulação e a mistura foi levada para a agitação em agitador magnético até completa dissolução e, logo após levada ao sonicador ultrassônico durante 30 minutos.

#### *Caracterização da microemulsão*

##### *Determinação do pH*

Para determinação do pH das formulações MFAE 10% e MV foi utilizado um potenciômetro digital Phtek PH 3B com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a  $25 \pm 0,5$  °C (Mehta et al., 2007). Neste sentido, o referido eletrodo foi diretamente introduzido nos sistemas, sem qualquer diluição. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três determinações.

##### *Determinação do Diâmetro, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta*

A determinação destes parâmetros foi realizada por espalhamento dinâmico de luz (DLS – Dynamic Light Scattering) ou espectroscopia de correlação de fóton (PCS) através de um Zetasizer Nano System ZS (Malvern-UK) no Nucleo de Sistemas Coloidais da Universidade Tiradentes. Para este procedimento, foram utilizadas as formulações MV e MFAE 10%. A MFAE 10%, por apresentar cor intensa, não foi incluída. Para tanto, os sistemas na presença e ausência da amostra teste foram colocados em cela de vidro de 1 cm de caminho óptico, cujas medições foram feitas a 25 °C. O equipamento realizou em média 12 determinações para cada análise. O diâmetro foi calculado por função de autocorrelação da intensidade espalhada pelas gotículas (Yuan et al., 2006).

#### **Análise de Citotoxicidade**

A citotoxicidade foi avaliada pela viabilidade das células de fibroblastos J774 ( $2 \times 10^4$  células), em triplicata após 24 h de exposição contínua da(s) frações mais ativas da *S. cumini* e medida através do ensaio colorimétrico de redução do MTT a formazan, conforme Mosmann (1983). Para isso, após a aderência celular em placa de 96 poços, o meio de cultura foi

substituído por 200µL de meio de cultura contendo as amostras diluídos em DMSO (0,5%) (dimetilsulfóxido), nas concentrações 10, 50 e 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 h. Decorrido este tempo, o meio de cultura foi substituído por 200 µL de uma solução a 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> do corante MTT, previamente filtrado em membrana milipore de 0,22 mm. Diante disso, as placas foram incubadas por 3 h, o suficiente para que ocorresse a redução do MTT a formazan. Após este período, todo o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e 200 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para a solubilização do formazan. Posteriormente, todo o conteúdo foi transferido para uma nova placa e encaminhado ao leitor de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) com absorvância ajustada a 570 nm. Para análise, os resultados foram normalizados de acordo com a equação:

$$\%VC = [DO(\text{células tratadas}) - DO(\text{branco}) / DO(\text{controle}) - DO(\text{branco})] \times 100.$$

### 3. Resultados e Discussão

#### Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica teve como objetivo conhecer os constituintes e/ou avaliar sua presença no extrato hidroetanólico de *Syzygium cumini*. A análise Fitoquímica preliminar indica os grupos de metabólitos secundários relevantes. O estudo fitoquímico do extrato alcoólico apresentou os seguintes grupos químicos: Taninos Flabobênicos, Flavonas, Flavonóis, Xantonas, Flavononóis, Leucoantrocianidinas, Catequinas, Esteroides e Saponinas (Tabela 1). A presença de esteroides também foi identificada por Zanoello, et al. (2002), já saponinas e taninos foi observada por Migliato (2005).

**Tabela 1** - Constituintes químicos do extrato hidroetanólico e das frações ativas de *Syzygium cumini*.

Constituintes Químicos	EHE	FAE	FC	FHM
Antocianidinas	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	-	-
Catequinas	+	+	+	+
Chalconas e Auronas	-	-	-	-
Esteróides	-	+	+	+
Fenóis	+	-	-	-
Flavononas	-	+	+	+
Flavononóis	+	+	+	+
Flavonas	+	+	+	+
Flavanoides	-	-	-	-
Flavonóis	+	+	+	+
Leucoantocianidinas	+	-	+	+
Saponinas	+	+	+	+
Taninos	+	+	+	+
Triterpenóides pentacíclicos livres	+	-	-	-
Xantonas	+	+	+	+

Fonte: Santos et al. (2022).

### Atividade Antimicrobiana

#### Teste de Difusão em Ágar

O teste para determinação da atividade antimicrobiana, realizado em triplicata, revelou que o extrato bruto e as frações ativas das folhas de *Syzygium cumini* foram eficazes para a inibição das cepas testadas, entretanto a fração de Acetato de Etila apresentou a melhor atividade. O teste foi realizado nas bactérias: *Enterococcus durans/hirae* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* derivada ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* deriva ATCC 700603, *Escherichia coli* derivada ATCC 25922, *Escherichia coli* enteropatogênica clássica 0111 derivada CDC 01111 e *Streptococcus mutans* INCQS 00446, entre elas, as cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*, apresentaram os resultados mais satisfatórios (Tabela 4).

A medida da sensibilidade foi baseada no critério de suscetibilidade sugerido por Santos et al., 2022: diâmetro do halo de inibição do crescimento  $\geq 14$  mm = sensível; 9 a 14 mm = intermediário; e  $\leq 8$  mm = resistente. De acordo com Scalbert (1991), esta atividade antibacteriana ocorre, principalmente, por causa de metabólitos secundários como os taninos, que atuam sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando o seu metabolismo.

**Tabela 2** – Média do teste qualitativo da atividade antimicrobiana do extrato Hidretanólico e da fração de Acetato de Etila da *Syzygium cumini*.

Cepas	FAE	Sensibilidade	EHE	Sensibilidade
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,5mm	Intermediário	8mm	Resistente
<i>Escherichia coli</i>	11mm	Intermediário	8,5mm	Resistente
<i>Streptococcus mutans</i>	12 mm	Intermediário	8 mm	Resistente

Fonte: Santos et al. (2022).

### Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade da fração de Acetato de Etila fora medida, em triplicata, frente às cepas de *Klebsiella pneumoniae* deriva ATCC 700603, *Escherichia coli* derivada ATCC 25922 e *Streptococcus mutans* INCQS 00446, havendo a diluição nas concentrações de 100ppm, 50ppm, 25ppm e 12,5ppm. Todas as cepas apresentaram sensibilidade à concentração de 50ppm, por isso, esta foi escolhida para a incorporação na microemulsão (ME) 10%.

A concentração inibitória mínima da ME, já incorporada com a fração de Acetato de Etila, também foi realizada em duplicata, sendo testada, portanto, nas mesmas bactérias e diluída nas mesmas concentrações (100ppm, 50ppm, 25ppm e 12,5ppm). A microemulsão obteve resultado positivo na cepa de *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus mutans* para as concentrações de 100, 50 e 25 ppm e para a cepa de *Escherichia coli* observou-se ação da atividade antimicrobiana até a diluição de 50ppm.

Silva (2015) relata a eficiência das microemulsões com extrato da *S. cumini* em cepas de *Escherichia coli*, uma vez que esses sistemas são agentes antimicrobianos altamente eficazes que atuam sobre a integridade estrutural da membrana plasmática, do microrganismo, causando sua desestruturação da sua bicamada fosfolipídica, afetando, assim, sua fluidez, o que levaria à morte celular.

### Caracterização da Microemulsão

#### Caracterização das MEs

#### Tamanho de Gotículas, pH, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta

A análise do tamanho das gotículas é feita para verificar se as formulações apresentam tamanho manométrico, facilitando a incorporação de moléculas e também facilita a perfusão e dispersão no tecido alvo. O índice de polidispersão revela a homogeneidade da população de gotículas, caracterizando uma distribuição de tamanho monomodal ou polimodal (Soares, 2009).

Quanto ao tamanho de gotícula, pode-se observar que ME e MFAE 10% apresentaram diâmetro 20,29 e 18,33nm respectivamente, enquadrando-se nos limites estabelecidos para microemulsões descrito por Pascoa, 2012 que são 10 - 30 nm. Diante disso, a mesma e seu veículo, foram submetidos à análise de espalhamento de raios-X a baixo ângulo, SAXS. Silva et al. 2014, em estudo de microemulsões com metil dihidrojasmonato, do tipo óleo/água, similar às do presente estudo, obtiveram gotículas de 47,7 a 181,1 nm para as microemulsões sem a presença do metil dihidrojasmonato e àquelas com esta substância incorporada, 11,6 a 82,2 nm.

Com relação ao pH, as formulações acima descritas apresentaram caráter levemente ácido (Tabela 3), ideal para aplicação tópica, dado que o pH da pele oscila entre 4,6–5,8, condição importante para proteção bactericida e fungicida em sua superfície (Leonardi; et al., 2002). Estatisticamente, nenhuma delas apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), entre si, em relação a este parâmetro.

**Tabela 3.** Parâmetros físico-químicos das formulações microemulsão veículo (MV), microemulsão com a fração acetato de etila da entrecasca da *S cumini* 10% (MFAE 10%).

FORMULAÇÃO	TAMANHO GOTÍCULA (nm)	DE	pH	IPD	PZ (mV)
MV	16,10		5,65 ± 0,20a	0,20	-14,7
MFAE10%	17,40		4,90 ± 0,31a	0,16	ND

Fonte: Santos et al. (2022).

O potencial Zeta, por sua vez, é um fator importante na previsão da estabilidade das amostras e na interação com as células. A técnica para determinação do diâmetro das ME, o espalhamento dinâmico de luz, utiliza a flutuação da intensidade da luz espalhada por gotículas em suspensão, sob movimento Browniano no tempo, para se obter a distribuição hidrodinâmica do tamanho (Xu, 2008). A partir desse princípio, as gotículas maiores movimentam-se mais lentamente e, conseqüentemente, a intensidade da luz flutua lentamente, enquanto que gotículas menores se movimentam mais rapidamente, resultando na flutuação mais rápida da intensidade da luz. O equipamento é responsável pela correlação desses dois parâmetros para o cálculo do diâmetro médio das gotículas (Sorares, 2009).

De acordo com a Tabela 1, pode-se também observar que tanto a ME quanto MFAE 10% apresentaram distribuição de tamanho menor que 0,5 para o parâmetro índice de polidispersividade (IPD), denotando homogeneidade na distribuição das gotículas em ambas formulações (Silva et al., 2014). Resende (2013) encontrou valores de IPD variaram de 0,1 a 0,32 ao estudar microemulsões contendo óleo essencial de *Citrus sinensis* L.

### **Análise de Citotoxicidade**

Neste estudo, extratos da *Syzygium cumini* (favoreceram significativamente ( $p < 0,05$ ) a viabilidade dos macrófagos J774 em todas as concentrações testadas 30, 100 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em comparação às células não tratadas, às quais funcionaram como controles. Todas as amostras aqui testadas apresentaram comportamento concentração-dependente. A maior viabilidade foi observada no tratamento com hidroetanólico que com a menor concentração de 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  que alcançou o valor de  $103,89\% \pm 5,68$  e nessa mesma fração observamos o menor resultado com a concentração 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  que alcançou o valor de  $78,33\% \pm 3,22$ , com resultado fora desenvolvida a microemulsão, indicando que não há toxicidade dos extratos de *Syzygium cumini*, ou seja, que nenhuma dessas amostras diminuiu a viabilidade dos macrófagos J774 em 75%, valor considerado citotóxico para extratos de plantas, conforme preconizam Ribeiro et al. (2012). Por outro lado, para Neri- Numa et al. (2014), um extrato que inibe mais de 50% do crescimento celular e exibe comportamento concentração-dependente é antiproliferativo.

## **4. Considerações Finais**

A partir do presente estudo, pode-se observar diante da prospecção fitoquímica, que o extrato hidroetanólico de *Syzygium cumini* possui importantes metabólitos secundários, neste caso Flabobênicos, Flavonas, Flavonois, Xantonas, Flavononois, Leucoantrocianidinas, Catequinas, Esteroides e Saponinas, que são favoráveis a inibição do crescimento bacteriano. A fração de Acetato de Etila apresentou importantes resultados na sua ação antibacteriana frente as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*, em comparação as outras frações, o que viabilizou a incorporação do extrato à microemulsão. Além disso, esse sistema nanoestruturado, formado por propilenoglicol e tween, resultou, também, na inibição do crescimento destas cepas, além de apresentar baixa toxicidade, tornando um produto viável com grande potencial.

## **Referências**

- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Microbiol.*, 40: 2413-5.
- Belcavello, L., & Andrade, M. A. (2012). Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, medicinal plant. 10, 140–145.
- D’Cruz O. J., & Uckun, F. M. (2001). Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. *Contraception*. Aug;64(2):113-23.
- Damasceno, B. P. G. L. (2011). Microemulsão: Um promissor carreador para moléculas insolúveis. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, 32(1), 9–18.
- Desoti, C. V. (2011). Triagem Fitoquímica E Avaliação Das Atividades Antimicrobiana E Citotóxica De Plantas Mediciniais Nativas Da Região Oeste Do Estado Do Paraná. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, Umarama, 15(1), 3-13.

- Formariz, T. P. (2005). Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(3), 301-313.
- Gomes, F. E. S., Maciel, M. A. M., Anjos, G. C., Dantas, T. N. C., Esteves, A., & Echevarria, A. (2006). Obtenção de Nanoformulações do Tipo Microemulsão Objetivando a Biodisponibilização de *Anacardium occidentale* e sua Eficiência como Agente Antioxidante. *Revista Fitos*, 2(3), 82-88.
- Gonçalves, A. R. (2009). Citotoxicidade de plantas com indicativo etnográfico para a desinfecção de água. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 11(3), 305-309.
- Khan, M. R. (2001). Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. *Fitoterapia, Milão*, 72(7), 825-828.
- Loguercio, A. P. (2005). Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*, 35(2), 371-376.
- Machado, A. M. O., & Gales, A. C. (2008). Interpretacao de dados microbiológicos. *Anvisa*.
- Mahajan, H. S., & Rasal, A. D. (2013). Microemulsions for Nasal Drug Delivery Systems: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 5(4), 1825-1831.
- Migliato, K. F. (2006). Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) skeels. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25(2), 310-314.
- Migliato, K. F. (2000). *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. 181 f, *Universidade Estadual Paulista, Araraquara*.
- Oliveira, A. G. D. (2004). Microemulsões: Estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*, 27(1), 131-138.
- Ostrosky, E. A. (2007). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da CMI de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 18(2), 301-307.
- Santos, V. L., et al. (2011). Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae) Rev. Bras. Pl. Med.13(1), 68-72.
- Santos, S. B. (2022) Modulação antimicrobiana do extrato da entrecasca *libidibia ferrea*. *International Journal of Development Research*. 12(0)3, 54538-54543, March.
- Santos, P. A. L., Santos, L.C., Costa, R. A., Estevam, A. S., Silva, M. R. P., Reis, I.A. O., Oliveira, J. S., Araujo, B. S., Lucca Junior, W., Santos, S. B., & Estevam, C. S. (2022) Perfil químico e atividade antimicrobiana de abarema cochliacarpos. *Research, Society and Development*. 11(4), e22911427226.
- Scalbert, A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, Chichester, 30(12), 3875-3883.
- Silva, J. D. F. (2015) Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. *Quim. Nova*, Pelotas, 20(00), 1-11, ago.
- Silva, M. L. A. (2007) Antimicrobial Activity of *Syzygium Cumini* (Myrtaceae) Leaves Extract. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 381-384.
- Silveira, L. L. (2009) Desenvolvimento e Caracterização de um Sistema Microemulsionado contendo Anfotericina B para uso Oftalmológico. Universidade Federal de Rio Grande do Norte Natal, 65 p.
- Stasi, L. C. D., & Lima, C. A. (2002) Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. (2a ed.): Ed. UNESP. 323 - 324.
- Veber, J. (2015) Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 17(2), 267-273.
- Volpato, A. M. M. (2005) Investigação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico. 115 f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Zanoello, A. M. (2002) Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra diabetes mellitus induzido por aloxano em ratos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 21(1), 31-35.