

Proposta de formulação contendo extrato de folhas de *Eugenia involucrata* e análise da atividade antimicrobiana

Proposal of formulation containing *Eugenia involucrata* leaf extract and antimicrobial activity analysis

DOI 10.5935/2446-4775.20180007

Sato, Tatiane Satie¹; Medeiros, Tatiane Moreira¹; Hoscheid, Jaqueline¹; Prochnau, Inara Staub¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUC, Faculdade de Farmácia, Avenida da União 500, CEP: 85902-532, Campus Toledo, Jardim Coopagro, PR, Brasil.

*Correspondência: tatianesatomn@hotmail.com; inara.prochnau@pucpr.br

Resumo

Eugenia involucrata, também conhecida como cerejeira-do-mato, é uma espécie nativa do sul do Brasil. O objetivo do trabalho foi otimizar um extrato das folhas de *E. involucrata*, empregando turbo-extração, e desenvolver uma emulsão, contendo o extrato, avaliando a atividade antimicrobiana. Para otimização do extrato foram avaliados dois fatores, determinando resíduo seco e teor de compostos fenólicos. Na elaboração da emulsão foi utilizado homogeneizador ultra turrax, e as concentrações do extrato adicionadas à emulsão foram de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%. As formulações foram avaliadas frente ao pH, características visuais, tamanho de partícula e polidispersão. Para o ensaio antimicrobiano foi aplicada técnica de difusão em ágar. Por meio do planejamento fatorial 3² do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - CEPPA, considerando os fatores polaridade do solvente e tempo de extração, foi possível verificar melhores resultados com o extrato obtido em solvente etanol e tempo de extração de 3 minutos. A formulação apresentou pH ácido, sem separação de fases, variações no tamanho de gotícula, indicando sistema com distribuição heterogênea e atividade antifúngica. O sistema emulsionado desenvolvido, contendo diferentes concentrações de extrato, apresentou atividade antifúngica em todas as concentrações testadas, indicando que novos estudos podem ser realizados para otimizar a formulação desenvolvida.

Palavras-chave: *Eugenia involucrata*. Cerejeira do mato. Turbo-extração. Emulsão. *Candida krusei*.

Abstract

Eugenia involucrata, popularly known as cerejeira-do-mato, is a native specie of brazilian south. The aim was to optimize an extract from the leaves of *E. involucrata*, using turbo-extraction, and developed an emulsion evaluation antimicrobial activity. Two factors were determined, time and polarity of the solvent, determining the dry residue and phenolic compounds content. Ultra turrax homogenizer was used for

preparation of the emulsion and the extract concentrations added were 0.5; 1.0; 1.5 and 2%. The formulations were evaluated for pH, visual characteristics, particle size and polydispersity. The microbiological assay agar diffusion technique was applied. Using the factorial design 3^2 of the Center for Research and Food Processing - CRFP, considering solvent polarity (hexane, dichloromethane and ethanol 70%) and extraction time (10, 20 and 30 minutes), was possible to verify the extract obtained of 3 minutes with the ethanol solvent was the better results. The formulation showed acidic pH, without phase separation, variations in droplet size, indicating system with heterogeneous distribution and antifungal activity. The emulsified system developed with different concentrations of extract showed antifungal activity in all the concentrations tested, indicating that new studies can be carried out to optimize the developed formulation.

Keywords: *Eugenia involucrata*. Cerejeira do mato. Turbo-extraction. Emulsion. *Candida krusei*.

Introdução

A utilização de plantas para fins medicinais ocorre de forma abrangente e disseminada pela população, constituindo uma das mais antigas formas de tratamento, seu uso muitas vezes corresponde como o único recurso terapêutico para algumas comunidades⁽¹⁻²⁾.

A flora brasileira apresenta grande heterogeneidade, considerando o número e a variedade de espécies, como a família Myrtaceae, que apresenta espécies nativas e exóticas⁽³⁻⁴⁾. Esta família abrange uma variedade de gêneros e espécies arbóreas, destaque especial ao gênero *Eugenia*, que apresenta valor econômico, devido à comercialização de seus frutos comestíveis e como planta ornamental⁽⁵⁾.

Estudos demonstram ainda, que esse gênero se destaca pelo potencial farmacológico⁽⁶⁾. Extratos das folhas de diferentes espécies do gênero *Eugenia*, e o óleo essencial extraído das folhas dessas, apresentaram atividades antibacteriana e antifúngica^(7,8,9), além disso, o extrato bruto do caule e folhas do gênero *Eugenia* apresentou atividade antioxidante⁽⁷⁾. Outras atividades descritas na literatura, a partir de estudos com extratos, foi atividade diurética e anti-inflamatória⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

A espécie *Eugenia involucrata* DC., conhecida popularmente como cerejeira do mato, é nativa da região Sul do Brasil. Possui valor econômico devido à qualidade de seus frutos, que podem ser consumidos *in natura* ou usados para confecção de doces, geleias, licores e são consumidos pela avifauna. A planta é indicada para plantação em áreas degradadas e ainda utilizada como planta ornamental. Folhas desta espécie são utilizadas na medicina popular, em forma de chás, com propriedades antidiarréica e digestiva⁽¹²⁾. Embora citada na literatura, e considerando a atividade antimicrobiana apresentada por outras espécies do gênero^(9,13,14,15,16), poucas são as pesquisas dedicadas ao estudo da *E. involucrata* ^(17,12). O estudo fitoquímico das folhas de *E. involucrata* ⁽¹⁶⁾ possibilitou o isolamento da (-) catequina, do fitol, e das substâncias inéditas 24,25-epoxi-28-hidroxicloartan-3-ona e 24,25-epoxi-28-hidroxi cicloartan-3-ona acetilado; ainda segundo o autor, foi possível observar, também, moderada atividade antimicrobiana e eficaz atividade antinociceptiva, relacionadas principalmente à substância isolada 24,25-epoxi-28-hidroxicloartan-3-ona.

Assim, o objetivo do trabalho foi obter extratos otimizados de folhas de *E. involucrata* por turbo-extração, considerando polaridade dos solventes e tempo de extração, para avaliar a atividade antimicrobiana desses

extratos, além de desenvolver emulsão, contendo o extrato otimizado, avaliando tamanho de partícula, índice de polidispersão e, também, atividade antimicrobiana da formulação.

Material e Métodos

Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *Eugenia involucrata* foram coletadas na época de pré floração, no mês de maio de 2016, no período da manhã, no município de Toledo/PR (S 24°43'34.529", W 53°44'41.189"). A identificação foi realizada pela bióloga Lilian Q. Cardoso, e a exsicata foi depositada no herbário central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Campus Curitiba (HUCP 24563).

Preparação dos extratos

As folhas foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar, em temperatura de 40 °C por quatro dias; posteriormente foram moídas, em moinho de facas (TECNAL, TE-650), até obtenção de um pó fino. Os extratos foram obtidos pelo método de turbo-extração, utilizando solventes de polaridade distintas como etanol, diclorometano e hexano, na proporção 1:20 (pó vegetal: solvente), em tempos de extração de 1, 2 e 3 minutos. Após a extração, foi realizada filtração simples e os extratos foram armazenados em frascos de vidro âmbar.

Determinação de resíduo seco dos extratos

Foram retiradas alíquotas de 10 mL de cada extrato e transferidas para frascos de vidro âmbar, previamente dessecados. As amostras foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar a 40 °C por 24 horas, dessecador por 24 horas e posterior pesagem do resíduo seco. A análise de cada extrato foi realizada em triplicata.

Determinação de compostos fenólicos dos extratos

O teor de compostos fenólicos foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, conforme metodologia⁽¹⁸⁾. Foram preparadas soluções do padrão de ácido gálico nas concentrações de 20, 30, 40, 50, 60 e 70 µg/mL. Em tubos de ensaios foram adicionados 0,2 mL das soluções do padrão ou 0,2 mL dos extratos (1:20, p/v), sendo em seguida adicionados 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e após dois minutos, adicionados 0,8 mL de carbonato de sódio (7,5 % p/v). A mistura foi incubada à temperatura de 24 °C por 1 hora e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (FENTO, Cirrus 80), com comprimento de onda de 765 nm. Como branco, foi utilizada solução empregada na preparação da curva, sem adição do ácido gálico. A quantidade de compostos fenólicos de cada extrato foi quantificada por meio da curva padrão de ácido gálico. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

Análise estatística

Para escolha do melhor extrato, considerando a determinação de resíduo seco e de compostos fenólicos totais, as análises estatísticas foram realizadas por meio de Excel 2007 e software Statistica®.

Preparação da emulsão

A emulsão foi preparada contendo 5% de núcleo oleoso. Para a formação da fase oleosa foi empregado o extrato otimizado, nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2%, ácido caprílico e 2% de monoestearato de sorbitan (span 60). A fase aquosa foi preparada com 2% de polissorbato 80 (tween 80) e água deionizada⁽¹⁹⁾. Inicialmente, as fases foram aquecidas separadamente e a fase aquosa vertida sobre a oleosa, com agitação a 6500 rpm, utilizando Ultra Turrax®T25 por 5 minutos. Ao final do processo, as formulações foram envasadas e acondicionadas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e denominadas F1, F2, F3 e F4, respectivamente (**TABELA 1**).

Foi preparada uma emulsão base, sem adição de extrato, composta de 5% de ácido caprílico, 2% span 60, 2% tween 80 e água deionizada, visando à comparação dos resultados obtidos. Foram preparadas 150 mL de cada uma das formulações.

TABELA 1. Emulsão preparada, contendo 5% de ácido caprílico, 2% de tensoativo e quantidade suficiente de água para volume total de 150 ml de solução e suas respectivas concentrações de extrato.

Componentes	Quantidade (g)				
	^a F. Base	^b F1	^c F2	^d F3	^e F4
Tween 80	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Span 60	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Ácido caprílico	7,50	6,75	6,00	5,25	4,50
Extrato	-	0,75	1,50	2,25	3,75
Água	136,50				

^aFormulação sem extrato; ^bFormulação com 0,5% de extrato; ^cFormulação com 1,0% de extrato; ^dFormulação com 1,5% de extrato; ^eFormulação com 2,0% de extrato.

Determinação de características organolépticas e pH

A análise das características visuais, cor e homogeneidade, e o pH foram realizadas no tempo inicial e após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) ao abrigo de luz. Nesse período, as amostras foram dispostas em béqueres de vidro vedados com papel filme. O pH da emulsão, em suas diferentes concentrações de extrato, foi determinado diretamente com potenciômetro (Hanna HI 2222), previamente calibrado.

Determinação do tamanho de partícula e polidispersão (PDI)

A determinação de distribuição do tamanho de partícula e índice de polidispersão das formulações preparadas foi realizada pela técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) (Beckman Coulter DELSA™Nano C, Califórnia). Para tanto, as amostras foram avaliadas após o preparo e a leitura foi realizada com diluição de 1:100 em água destilada.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Após evaporação dos solventes, o material seco foi pesado, acrescido de três gotas de polissorbato 20 (Tween 20) e solução salina 0,9%, obtendo concentrações dos extratos de 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0 mg/mL.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada em triplicata para todos os extratos, por meio do método de difusão em ágar⁽²⁰⁾. Foram empregadas cepas padronizadas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (NEWP 0028), *Streptococcus pyogenes* (NEWP 0015), *Candida albicans* (NEWP 0031), *Candida krusei* (ATCC 14243) e *Candida tropicalis* (NEWP 0133).

Após cultivo dos microrganismos, foram transferidas pequenas quantidades de cada cepa para cubetas de vidro, contendo solução salina 0,9%, até obtenção de suspensões microbiológicas com $25 \pm 2\%$ de transmitância, em fotocolorímetro (Micronal, B440) a 580 nm. A partir destas suspensões foram preparados os inoculos a 1%. Nas placas de Petri, para cepas bacterianas e fúngicas, foram adicionados 20 mL dos meios de cultura n° 1 e ágar Sabouraud-dextrose, respectivamente; e 5 mL dos inoculos a 1% nos respectivos meios de cultura. Após completa solidificação, os meios de cultura foram perfurados, com auxílio de perfurador estéril, formando 6 orifícios com diâmetro de 6 mm. Foram adicionados 20 µL de solução contendo os extratos em cada orifício. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C e 25 ± 2 °C, por 24 e 48 horas, para bactérias e fungos, respectivamente, sendo realizada posteriormente a determinação do tamanho dos halos de inibição formados.

Como padrões foram empregados antibióticos de amoxicilina 0,5 µg/µL e sulfato de neomicina 1,5 µg/µL, e para os fungos foram empregados cetoconazol e sulfeto de selênio nas concentrações de 1,5 µg/µL. Como controle negativo foi utilizada solução salina 0,9% contendo tween 20. Os resultados dos ensaios antimicrobianos foram expressos através do cálculo da média dos tamanhos dos halos de inibição formados.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana da emulsão contendo o extrato otimizado, foram empregadas cepas padronizadas de *C. krusei* e *S. aureus*. Aos furos formados no meio de cultura, foram adicionados 20, 30 e 40 µL de cada uma das formulações preparadas, com pH previamente ajustado em 7,0, com auxílio de hidróxido de sódio (NaOH) 10%. As placas foram incubadas em estufa por 24 e 48 horas, a uma temperatura de 35 ± 2 °C e 25 ± 2 °C, para *S. aureus* e *C. krusei*, respectivamente. Após este período, os halos de inibição formados foram medidos. Os testes foram realizados em triplicata para todas as formulações e como controle negativo foi utilizada a emulsão base. A **TABELA 2** demonstra as concentrações de extrato testadas em cada ensaio para as formulações desenvolvidas, considerando as quantidades de emulsão aplicadas em cada orifício.

TABELA 2. Concentração de extrato (mg/µL) adicionado em cada pocinho, conforme concentração de extrato adicionada à formulação e volume de formulação adicionada ao pocinho no ensaio microbiológico, para cepas de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Concentrações (mg/µL)			
Formulações	20 µL	30 µL	40 µL
F1 ^a	0,10	0,15	0,20
F2 ^b	0,20	0,30	0,40
F3 ^c	0,30	0,45	0,60
F4 ^d	0,50	0,75	1,00

^aFormulação com 0,5% de extrato; ^bFormulação com 1,0% de extrato; ^cFormulação com 1,5% de extrato; ^dFormulação com 2,0% de extrato.

Resultados e Discussão

A determinação de resíduo seco permite a visualização do potencial extrativo do método e do líquido extrator. Os índices de resíduo seco dos extratos apresentaram valores variáveis, entre 0,125% e 0,840%, considerando a polaridade e o tempo de extração, conforme demonstrado na **TABELA 3**.

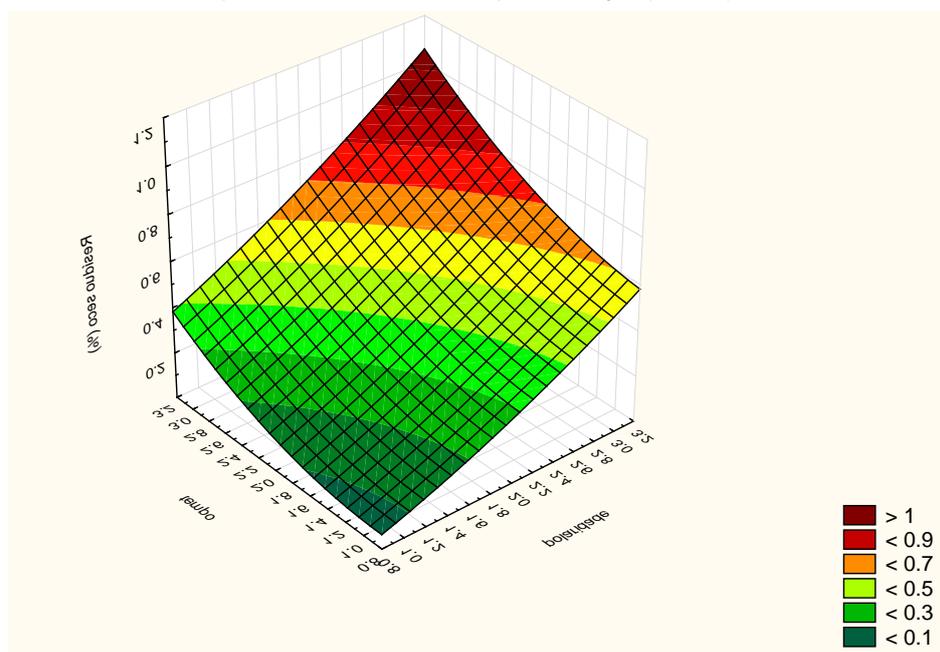
TABELA 3. Média \pm desvio padrão (D.P.) dos valores de porcentagem da determinação de resíduo seco dos extratos obtidos das folhas de *Eugenia involucrata*.

Extratos	1 minuto (%)	2 minutos (%)	3 minutos (%)
Hexano	0,125 \pm 0,000	0,236 \pm 0,014*	0,284 \pm 0,007**
Diclorometano	0,229 \pm 0,031	0,285 \pm 0,023*	0,796 \pm 0,052**
Etanol	0,570 \pm 0,004	0,727 \pm 0,031*	0,840 \pm 0,007**

* $P < 0,05$ comparado ao tempo de extração de 1 minuto; ** $P < 0,05$ comparado aos tempos de extração de 1 e 2 minutos.

Na **FIGURA 1**, obtida pelo software Statistica®, verifica-se que o aumento da polaridade do líquido extrator ocasionou maior teor de resíduo seco, de modo que o extrato etanólico, obtido com o tempo de extração de 3 minutos, apresentou maior potencial.

FIGURA 1. Superfície de resposta da determinação do teor de resíduo seco dos extratos das folhas de *Eugenia involucrata*, avaliando polaridade do solvente e tempo de extração (minutos).

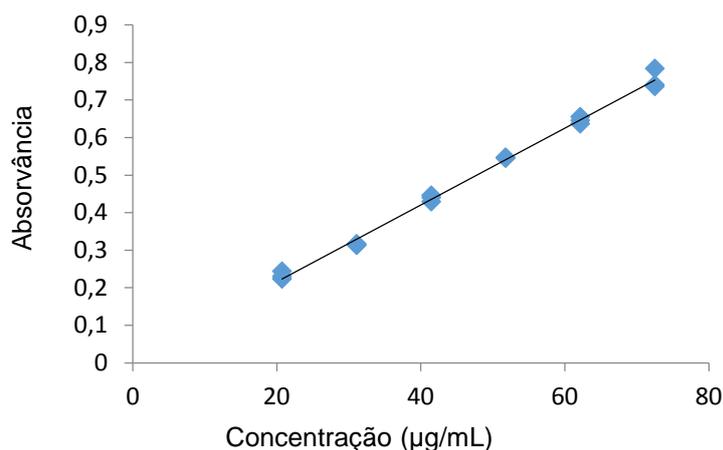


Observa-se uma correlação positiva em que, ao aumentar a polaridade e o tempo de extração, tem-se o aumento gradual de resíduo seco, sendo que os extratos que apresentaram maiores índices de resíduo seco foram aqueles obtidos com solventes polares. Podendo-se atribuir estes resultados, ao fato de que compostos presentes nas folhas de *Eugenia involucrata* possuem características polares. menor teor de resíduo seco apresentado em extratos obtidos com hexano⁽²¹⁾, deve-se à capacidade do mesmo em extrair maior quantidade de compostos apolares, enquanto o solvente diclorometano realiza extração de substâncias lipofílicas, óleos fixos, ceras e agliconas. O etanol por sua vez, é um solvente capaz de extrair grande quantidade de constituintes de interesse, pois, além de possuir ponto de ebulição favorável para

posterior extração do solvente (78,3°C)⁽²²⁻²³⁾, apresenta caráter anfifílico, permitindo a extração de substâncias com características apolares e polares⁽²⁴⁾, dentre os quais podem ser citados ceras, agliconas, sesquiterpenos, fitosteróis, hidrocarbonetos não voláteis, hidrocarbonetos de baixa massa molecular, sais orgânicos, polissacarídeos e substâncias fenólicas (flavonoides, taninos, fenóis simples e ácidos fenólicos)⁽²⁵⁻²³⁾, fato que pode justificar o maior teor de compostos fenólicos totais no extrato etanólico.

Compostos fenólicos existem naturalmente, em uma grande variedade de alimentos de origem vegetal, e podem estar em maior concentração em algumas partes das plantas como frutas, flores, folhas e sementes⁽²⁶⁻²⁷⁾. A determinação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos, empregando reagente de Folin-Ciocalteu, que envolve redução do mesmo, pelos compostos fenólicos presentes nas amostras com formação de complexo azul, foi realizada por meio da equação da reta $y=0,0102x+0,0117$, obtida através da elaboração da curva de calibração do ácido gálico. A mesma apresentou coeficiente de correlação 0,9949 (**FIGURA 2**).

FIGURA 2. Representação gráfica da curva padrão de ácido gálico, obtido por regressão linear, para a quantificação de compostos fenólicos totais, empregando espectrofotometria na região do ultravioleta com λ de 765 nm. Concentração de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$) x Absorvância.



Conforme esperado, os extratos apolares demonstraram menor teor de compostos fenólicos, comparado com aqueles obtidos com solventes polares, conforme **TABELA 4**.

TABELA 4. Média \pm D.P. da determinação do teor de compostos fenólicos dos extratos das folhas de *Eugenia involucrata* expresso em g equivalente de ácido gálico por 100 gramas de extratos (gEag/100g).

Extratos	1 minuto	2 minutos	3 minutos
Hexano	0,116 \pm 0,007	0,119 \pm 0,022	0,055 \pm 0,002**
Diclorometano	0,558 \pm 0,025	0,513 \pm 0,044	0,540 \pm 0,035
Etanol	8,149 \pm 0,006	10,699 \pm 0,001*	11,782 \pm 0,001**

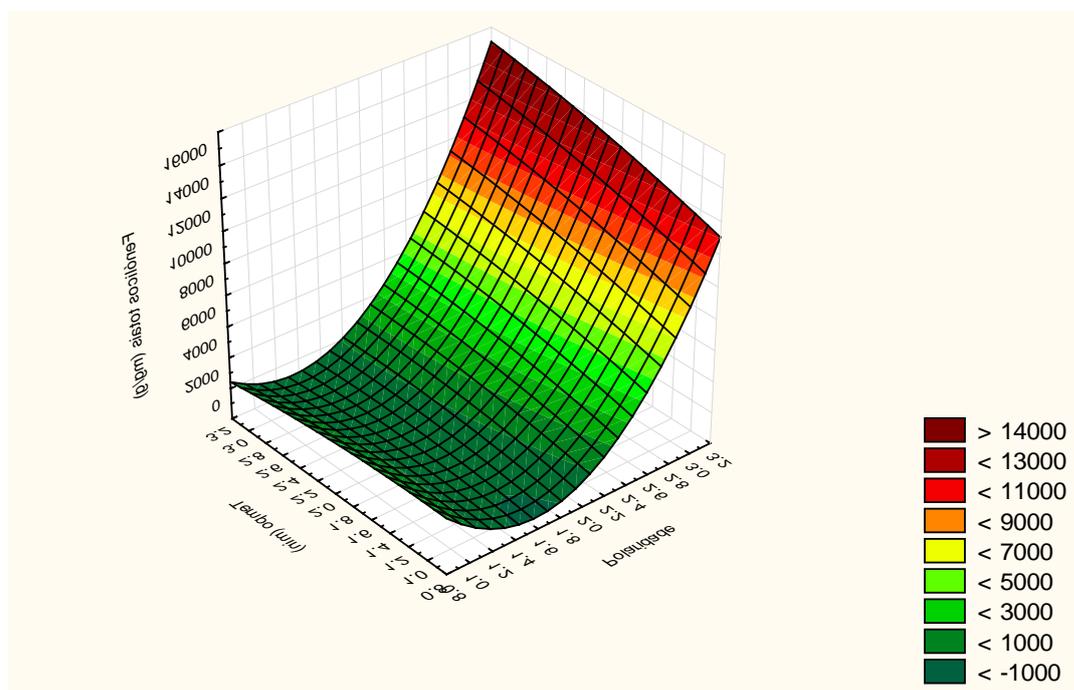
* $P < 0,05$ comparado ao tempo de extração de 1 minuto; ** $P < 0,05$ comparado aos tempos de extração de 1 e 2 minutos.

A quantificação dos compostos fenólicos demonstrou variações acentuadas nos valores de acordo com a polaridade do solvente utilizado. A maioria dos compostos fenólicos encontrados em *Eugenia* sp., apresenta solubilidade em água e em solventes orgânicos polares, em geral possuem características ácidas, sendo instáveis e facilmente oxidáveis⁽²⁸⁾.

Os compostos fenólicos exibem grande quantidade de propriedades fisiológicas, como antialérgica, antiarteriogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetiva e vasodilatadora⁽²⁹⁾. Extratos de diversas espécies do gênero *Eugenia* demonstram concentrações elevadas de compostos fenólicos, sendo que extratos obtidos com etanol acidificado permitiram maior quantidade de extração destes compostos⁽³⁰⁾.

Conforme esperado a polaridade dos solventes empregados exerceu correlação positiva significativa ($P < 0,05$) na extração de compostos fenólicos (**FIGURA 3**), sendo mais acentuada em comparação ao tempo de extração. O extrato etanólico, obtido com tempo de extração de 3 minutos, apresentou maior teor de compostos fenólicos totais, demonstrando a eficiência do solvente, do tempo e do método extrativo na quantificação de compostos fenólicos.

FIGURA 3. Superfície de resposta da determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos das folhas de *Eugenia involucrata*, avaliando polaridade do solvente e tempo de extração (minutos).



Dentre as diversas propriedades atribuídas aos compostos fenólicos, ressalta-se o crescente interesse pelo potencial antimicrobiano. Estes compostos atuam diretamente sobre microrganismos, prejudicando a sobrevivência e a multiplicação⁽³¹⁾, porém não existem padrões sensatos para comparação de medicamentos com os extratos aplicados em ensaios microbiológicos⁽³²⁾. Os ensaios antimicrobianos, empregando os extratos desenvolvidos, demonstraram inibição das cepas de *Staphylococcus aureus* e *Candida krusei* nas concentrações de 3,0; 6,0 e 12,0 mg/mL (**TABELA 5**). Nas demais cepas testadas, os

extratos não apresentaram inibição. Verificou-se que, ao aumentar as concentrações testadas, não houve aumento proporcional da atividade antimicrobiana.

TABELA 5. Média \pm desvio padrão (D.P.) do diâmetro dos halos de inibição obtidos em ensaio microbiológico – difusão em ágar- frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida krusei* (ATCC 14243), dos extratos das folhas de *Eugenia involucrata*. Extratos hexânico, diclorometano e etanólico. Tempos de extração de 1, 2 e 3 minutos por turbo-extração.

Extratos	Concentração 3 mg/mL (mm)		Concentração 6 mg/mL (mm)		Concentração 12 mg/mL (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>C. krusei</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. krusei</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. krusei</i>
Hexano 1 min.	9,9 \pm 0,4	0,0	11,9 \pm 0,1	7,8 \pm 0,3	12,9 \pm 0,4	15,2 \pm 0,3
Hexano 2 min.	0,0	0,0	12,9 \pm 1,5	10,1 \pm 0,2	15,0 \pm 0,6	14,2 \pm 0,5
Hexano 3 min.	0,0	0,0	13,2 \pm 0,5	10,1 \pm 0,4	13,9 \pm 0,4	14,2 \pm 0,3
Diclorometano 1 min.	0,0	0,0	0,0	8,8 \pm 0,3	14,4 \pm 0,4	14,6 \pm 0,2
Diclorometano 2 min.	0,0	0,0	0,0	13,8 \pm 0,8	14,3 \pm 0,6	14,1 \pm 0,5
Diclorometano 3 min.	14,2 \pm 0,6	0,0	15,8 \pm 1,2	9,8 \pm 0,8	16,0 \pm 0,4	15,8 \pm 0,4**
Etanólico 1 min.	14,7 \pm 0,1	10,0 \pm 0,1	14,7 \pm 0,2	10,0 \pm 0,1	16,1 \pm 0,4	14,0 \pm 0,1
Etanólico 2 min.	15,1 \pm 0,1	11,2 \pm 0,8 [#]	15,1 \pm 0,1	13,2 \pm 0,3 [#]	15,3 \pm 0,3	13,9 \pm 0,1
Etanólico 3 min.	11,9 \pm 0,1	11,9 \pm 0,1 [#]	16,2 \pm 0,3*	10,8 \pm 0,3 [#]	16,6 \pm 0,5*	16,5 \pm 0,3**
	<i>S. aureus</i> (mm)			<i>C. krusei</i> (mm)		
Amoxicilina 0,5 μ g/ μ L	35,7 \pm 0,6			0,0		
Sulfato de neomicina 1,5 μ g/ μ L	16,8 \pm 0,3*			0,0		
Cetoconazol 1,5 μ g/ μ L	0,0			16,2 \pm 0,3**		
Sulfato de selênio 1,5 μ g/ μ L	0,0			11,5 \pm 0,5 [#]		
Controle negativo	0,0			0,0		

*Não diferem significativamente ($P<0,05$) em relação ao controle Sulfato de neomicina. **Não diferem significativamente ($P<0,05$) em relação ao controle Cetoconazol. [#]Não diferem significativamente ($P<0,05$) em relação ao controle Sulfato de selênio.

Os padrões empregados nos ensaios antimicrobianos foram efetivos para os microrganismos utilizados, pois apresentaram formação de halos de inibição. O controle negativo, preparado com tween 20 e solução salina 0,9%, não apresentou atividade antimicrobiana, de modo a demonstrar que o uso deste tensoativo não apresenta interferência no ensaio microbiológico⁽³³⁾.

É possível observar que os extratos obtidos utilizando etanol como líquido extrator apresentaram atividade semelhante ao antibiótico sulfato de neomicina frente a *S. aureus* nas concentrações de 6 e 12 mg/mL. Além disso, o extrato etanólico obtido por turbo-extração durante 3 minutos apresentou atividade antifúngica semelhante ao Cetoconazol na concentração de 12 mg/mL, e semelhante (nas concentrações 3 e 6 mg/mL) ou superior (na concentração 12 mg/mL) ao antifúngico sulfato de selênio, demonstrando o potencial antimicrobiano do extrato.

Para o preparo da formulação, foi utilizado o extrato obtido em etanol com tempo de extração de 3 minutos, pois o mesmo apresentou resultado significativamente superior ($P<0,05$) frente à avaliação de resíduo seco

e teor de compostos fenólicos em comparação aos demais extratos preparados, além de apresentar atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus* e *C. krusei*. O extrato foi adicionado à formulação em diferentes concentrações e o pH da formulação, obtido no tempo inicial e em 30 dias de armazenamento, foi 3,0. Quanto à análise visual, as mesmas mantiveram-se estáveis, com coloração esverdeada, aspecto homogêneo e sem separação de fases.

A **TABELA 6** apresenta os resultados do tamanho de gotícula e PDI das formulações desenvolvidas. Verifica-se que o método de agitação em ultra turrax acarretou a formação de emulsões com escala micrométrica.

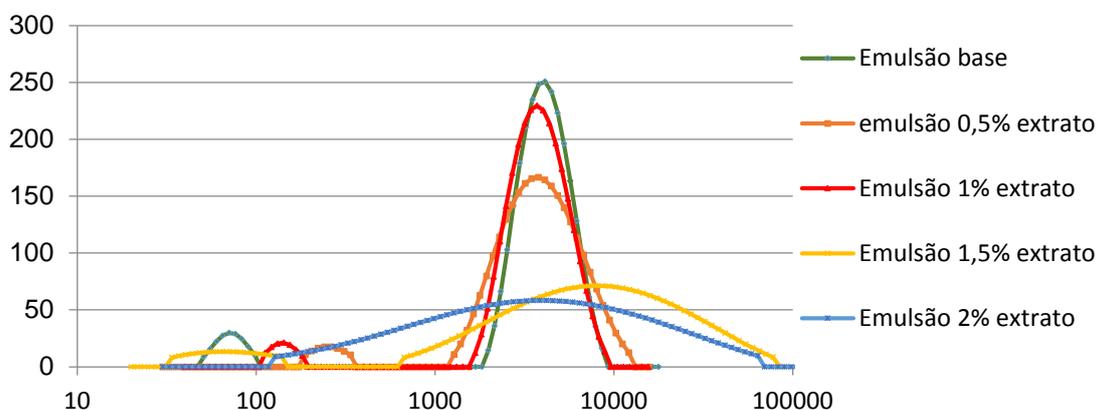
TABELA 6. Média \pm D.P. do tamanho de partículas (μm) e polidispersão (PDI) de cada formulação desenvolvida, realizado por técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Formulações	Tamanho médio das partículas (μm)	PDI
F. base ^a	3,36 \pm 0,32	0,87
F1 ^b	3,91 \pm 0,61	1,00
F2 ^c	3,69 \pm 0,62	0,97
F3 ^d	2,48 \pm 0,51	1,01
F4 ^e	3,20 \pm 0,20	1,32

^aFormulação sem extrato; ^bFormulação com 0,5% de extrato; ^cFormulação com 1,0% de extrato; ^dFormulação com 1,5% de extrato; ^eFormulação com 2% de extrato.

A PDI é um parâmetro adimensional da amplitude do tamanho de gotícula, podendo variar de 0 a 1. Um valor de PDI próximo a 0, indica população de gotículas monodispersas, enquanto que PDI com valores mais elevados, indica ampla distribuição de tamanho de gotícula⁽³⁴⁾. Conforme demonstrado na **FIGURA 4**, a emulsão, nas diferentes concentrações de extrato, possui elevada polidispersão, visto que os valores variaram de 0,87 a 1,32; portanto, mais próximos a 1,0, o que demonstra um sistema com distribuição heterogênea. Observa-se que ao aumentar a quantidade de extrato incorporado às formulações (1,5 e 2,0%), o sistema torna-se mais polidisperso, fato diretamente relacionado ao aumento da área superficial do núcleo oleoso, portanto as técnicas de preparo das emulsões e a composição qualitativa e quantitativa dos constituintes são os principais fatores que alteram a estrutura final das partículas⁽³⁵⁾.

FIGURA 4. Gráfico de distribuição relacionado ao tamanho médio das partículas e polidispersão das formulações, com as diferentes concentrações de extrato.



As cepas padronizadas de *C. krusei* e *S. aureus*, foram utilizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana da emulsão, seguindo como parâmetro os resultados obtidos nos estudos com os extratos. Considerando que, o controle negativo apresentou halos de inibição consideráveis para as cepas empregadas e que, ácidos graxos livres podem exercer atividade contra fungos e bactérias, sendo sua ação intensificada em valores de pH ácido⁽³⁶⁾, fez-se ajuste do pH das formulações, antes da aplicação das mesmas nas placas de Petri. Essa alteração de pH da formulação também conferiu à emulsão, um leve aumento na viscosidade.

Após ensaio antimicrobiano com as formulações contendo extrato, verificou-se que as preparações apresentaram atividade frente à *C. krusei* (TABELA 7) e que não foi possível verificar a presença de halos de inibição frente à bactéria, nas concentrações testadas. Da mesma forma, no estudo com os extratos etanólicos de folhas de *E. involucrata*, foram obtidos resultados positivos para a cepa *C. krusei*, demonstrando atividade inibitória em concentrações de 3, 6 e 12 mg/mL de extrato.

TABELA 7. Média \pm D.P. dos halos de inibição obtidos em ensaio microbiológico – difusão em ágar- frente à *Candida krusei*, das formulações contendo diferentes concentrações de extrato etanólico, obtido por turbo-extração por 3 minutos, de folhas de *Eugenia involucrata*, utilizando quantidade de 20 μ L, 30 μ L e 40 μ L das preparações em cada pocinho.

Formulações	Quantidade 20 μ L (mm)	Quantidade 30 μ L (mm)	Quantidade 40 μ L (mm)
F. Base ^a	0	0	0
F1 ^b	10,3 \pm 1,5	12,7 \pm 0,6*	12,3 \pm 0,6*
F2 ^c	10,1 \pm 0,2	9,7 \pm 0,6	10,0 \pm 0,0
F3 ^d	10,7 \pm 3,0	12,6 \pm 2,3	13,6 \pm 0,6
F4 ^e	0	5,0 \pm 0,0*	7,5 \pm 3,5*

^aFormulação sem extrato; ^bFormulação com 0,5% de extrato; ^cFormulação com 1,0% de extrato; ^dFormulação com 1,5% de extrato; ^eFormulação com 2% de extrato. * $P < 0,05$ comparado à 20 μ L.

A formulação, contendo o extrato otimizado nas concentrações 0,5 e 1,0% permitiu o desenvolvimento de um sistema emulsionado em escala micrométrica, com PDIs inferiores as demais concentrações avaliadas (1,5 e 2,0%). É importante salientar que, apesar da concentração inferior (0,5%) de extrato na emulsão F1, a mesma apresentou atividade antimicrobiana, sendo o tamanho dos halos formados semelhantes aos obtidos nas demais concentrações do extrato. Mais estudos são necessários, entretanto a formulação F1, contendo 0,5% de extrato, mostra-se promissora para possível utilização no tratamento tópico de infecções cutâneas por *C. krusei*.

Considerações Finais

Com base no desenvolvimento do planejamento fatorial 3², o extrato de folhas de *Eugenia involucrata*, que melhor demonstrou eficácia nos parâmetros de determinação de resíduo seco e compostos fenólicos, foi o extrato obtido com o solvente etanol em tempo de extração de 3 minutos, empregando a turbo-extração. Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* e *Candida krusei*. As formulações, contendo diferentes concentrações de extrato, apresentaram-se com pH ácido e sem separação de fases e apresentaram atividade antifúngica para *C. krusei*, em todas as concentrações testadas. A elaboração de uma emulsão, contendo o extrato otimizado na concentração 0,5% permitiu o desenvolvimento de um sistema emulsionado polidisperso de escala micrométrica, com PDI 1,0, indicando

um sistema de distribuição heterogênea, com atividade antifúngica satisfatória. Novos estudos devem ser realizados para otimizar a formulação desenvolvida, e verificando também a sua estabilidade físico-química.

Agradecimentos

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), por todo suporte disponibilizado para o desenvolvimento do estudo. À Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela disponibilização de equipamentos.

Referências

1. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Junior VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím Nova**. 2002; 25(3):429-438. ISSN: 1678-7064. [\[CrossRef\]](#)
2. Junior VFV, Pinto AC. Plantas Medicinais: cura segura? **Quím Nova**. 2005; 28(3):519-528. ISSN: 1678-7064. [\[CrossRef\]](#)
3. Arantes AA, Monteiro R. A família Myrtaceae na estação ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**. 2002; 3(2): 111-127. ISSN: 1676-6180 [\[Link\]](#)
4. Scherer A, Maraschin-Silva F, Baptista LRM. Florística e estrutura do componente arbóreo de matas de Restinga arenosa no Parque Estadual de Itapuã, RS, Brasil. **Acta Bot. Bras**. 2005; 19(4): 717-726. ISSN: 1677-941X. [\[CrossRef\]](#)
5. Vendruscolo GS, Rates SMK, Mentz LA. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Farmacogn**. 2005; 15(4): 361-372. ISSN: 1981-528X. [\[CrossRef\]](#)
6. Queiroz MCMS, Motta APR, Nogueira JMR, Carvalho, R.M. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápicos. **Rev. Fitos**. 2015; 5(2): 73-159. ISSN: 2446-4775. [\[CrossRef\]](#)
7. Magina MDA, Dalmarco ED, Wisniewski Jr A, Simionatto EL, et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **J. Nat. Med**. 2009; 63: 345-350. ISSN: 1861-0293. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Voss-Rech D, Klein CS, Techio VH, Scheuermann GN, et al. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of *Salmonella*. **Ciênc. Rural**. 2011; 41: 314-320. ISSN: 1678-4596. [\[CrossRef\]](#)
9. Pessini GL, Holetz FB, Sanches NR, Cortez DAG, Dias Filho BP, Nakamura CV. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Rev. Bras. Farmacogn**. 2003; 13(Supl.1): 21-24. ISSN: 0102-695X. [\[CrossRef\]](#)
10. Schapoval EES, Silveira SM, Alice CB, Henriques AT. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **J. Ethnopharmacol**. 1994; 44:137-142. ISSN: 0378-8741. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

11. Pietrovski EF, Magina MD, Gomig F, Pietrovski CF, et al. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **J. Pharm. Pharmacol.** 2008; 60(4): 479-487. [[CrossRef](#)]
12. Sausen TL, Löwe TR, Figueredo LS, Buzatto CR. Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* DC. e *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret. **Polibotânica**. México. 2009; 27: 145-158. ISSN 1405-2768. [[Link](#)]
13. Auricchio MT, Bugno A, Barros SBM, Bacchi EM. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Lat. Am. J. Pharm.** 2007; 26(1): 76-81. ISSN 0326-2383. [[Link](#)]
14. Auricchio MT, Bacchi EM. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. 2003; 62(1): 55 – 61. [[Link](#)]
15. Chavasco JM, Prado BHM, Cerdeira CD, Leandro FD, et al. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais cerrado. **Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo**. 2014; 56(1): 13-20. [[CrossRef](#)]
16. Vechi G. **Potencial biológico e composição química das folhas de *Eugenia involucrata* DC. (cerejinha do mato)**. Itajaí, 2015. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] Universidade do Vale do Itajaí. [[Link](#)]
17. Degenhart J, Frazon RC, Costa R.R. Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*). **Documentos 211**. Pelotas - RS: EMBRAPA, p.1-23, 2007. [[Link](#)]
18. Santos ES, Hoscheid J, Da Mata PTG. Antibacterial activity of crude ethanolic and fractionated extracts of *Punica granatum* Linn. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 2015; 36(2): 219-225. ISSN: 1808-4532. [[Link](#)]
19. Veríssimo ML. Desenvolvimento de sistemas farmacêuticos emulsionados para veiculação gênica. Natal, 2007. Dissertação [Mestrado em Genética e Biologia Molecular] Universidade Federal do Rio Grande do Norte. [[Link](#)]
20. Brasil. ANVISA. Farmacopeia Brasileira 5ª ed. v.2. Brasília: Anvisa, 2010. [[Link](#)]
21. Almeida NA. **Atividade antifúngica de extratos da própolis contra o fungo *Botrytis* sp. isolados de morango**. Francisco Beltrão, 2014. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Tecnologia de Alimentos] Universidade Tecnológica Federal do Paraná. [[Link](#)]
22. Simões CMO. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010. ISBN: 9788570259271.
23. Cruz EDEM, Silva ER, Maquiaveli CDOC, Alves ES, et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, 2013; 89:71-7. ISSN: 0031-9422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Oliveira NT, Almeida SSMS. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* Aublet (Apocynaceae). **Biota Amazônia**, 2016; 6(1): 20-25. [[CrossRef](#)]. Disponível em: [[Link](#)].

25. Moraes SAL, Nascimento EA, Melo DC. Análise da Madeira de Pinus oocarpa Parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **R. Árvore**. 2005; 29(3):461-470. ISSN 1806-9088. [[CrossRef](#)]
26. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**. 2007; 30(2): 351-355. ISSN 1678-7064 [[CrossRef](#)]
27. Yunes RA, Calixto JB. **Plantas Mediciniais: sob a ótica da química medicinal moderna**. 1.ed. Chapecó: Argos, 2001. ISBN 8575350021.
28. Rodrigues NM, Sandini TM, Perez E. Avaliação farmacognóstica de folhas de *Eugenia uniflora* L., *Myrtaceae* (Pitangueira), advindas da cidade de Guarapuava, PR. **Biosaúde**. 2010,12(1): 1-13. ISSN: 2525-555X. [[Link](#)]
29. Andreo D, Jorge N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **CEPPA - Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**. 2006; 24(2): 319-336.
30. Souza W. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais**. Campo Mourão, 2013. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Tecnologia de Alimentos] Universidade Tecnológica Federal do Paraná. [[Link](#)]
31. Infante J. **Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente e folhas de espécies frutíferas nativas do Brasil**. Piracicaba, 2013. Dissertação [Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos] Universidade de São Paulo. [[Link](#)]
32. Mendes LPM, Maciel KM, Vieira ABR, Mendonça LCV, et al. Atividade antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Rev. Ciênc. Farm. Bás. Aplic**. 2011; 32(1):121-125. ISSN: 1808-4532. [[ResearchGate](#)]
33. Brazão MAB. **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* L. e seu componente, dilapiol frente a *Staphylococcus spp.* multirresistentes**. Belém, 2012. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] Universidade Federal do Pará. [[Link](#)]
34. Souza PMS, Lobo FA, Rosa AH, Fraceto LF. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Quím. Nova**. 2012, 35(1): 132-137. ISSN: 0100-4042. [[CrossRef](#)]
35. Fronza T, Campos A, Teixeira H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Lat. Am. J. Pharm**. 2004; 23(4): 558-556. ISSN: 0326-2383. [[Link](#)]
36. Messens W, Goris J, Dierick N, Herman L, Heyndrickx M. Inhibition of *Salmonella typhimurium* by mediumchain fatty acids in an in vitro simulation of the porcine cecum. **Vet. Microbiol**. 2010, 141(1-2):73-80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Histórico do artigo: Submissão: 25/10/2017 | Aceite: 12/02/2018 | Publicação: 05/04/2018

Como citar este artigo: Sato TS, Medeiros TM, Hoscheid J, Prochnau IS. Proposta de formulação contendo extrato de folhas de *Eugenia involucrata* e análise da atividade antimicrobiana. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro. 2018; 12(1): 83-89. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/582>>. Acesso em: 05 abril 2018.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.
