

## PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS FRUTOS DE *Syzygium cumini* (L.) SKEELS

**Ketylin Fernanda Migliato\***, **Marcos Antonio Corrêa** e **Hériida Regina Nunes Salgado**

Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, CP 502, 14801-902 Araraquara - SP, Brasil

**João Olimpio Tognolli**

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14801-970 Araraquara - SP, Brasil

**Luis Vitor S. Sacramento**

Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14801-970 Araraquara - SP, Brasil

**João Carlos Palazzo de Mello**

Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá - PR, Brasil

**Maria José Soares Mendes Giannini**, **Ana Marisa Fusco Almeida** e **Antonio Carlos Pizzolitto**

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, CP 502, 14801902 Araraquara - SP, Brasil

Recebido em 14/5/10; aceito em 11/10/10; publicado na web em 9/2/11

FACTORIAL DESIGN OF THE OPTIMIZATION EXTRACTION OF *Syzygium cumini* (L.) Skeels FRUITS. The aim of this study was to standardize the extractive solution of *Syzygium cumini*. The extractive solution was selected through a full factorial design, considering the extraction method (maceration-5-days, turbo extraction, percolation), extractor solvent (ethanol 50, 70, 96%) and plant material particle size 0.302 mm into a plant:solvent ratio (1:10), using the dried residue and antimicrobial activity determination as evaluation criteria. The tests were performed in triplicate. It appeared that the percolation is the best procedure extractive, and ethanol mixture: water (50:50) the best solvent. ANOVA analysis showed the importance of these parameters.

Keywords: *Syzygium cumini*; extraction method; factorial design.

### INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas e processos interdisciplinares e multidisciplinares. As áreas de conhecimento envolvidas vão desde a antropologia botânica, botânica, agronomia, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia, química orgânica, tecnologia farmacêutica até ensaios clínicos.<sup>1</sup>

Dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular (etnofarmacologia) do que em plantas escolhidas ao acaso.

Para o conhecimento das substâncias ativas de plantas, um dos aspectos que deve ser observado consiste na preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos ativos. Um dos métodos que pode ser considerado adequado para a análise químico-farmacológica é a preparação de extratos hidroetanólicos 50% por maceração. Este extrato é análogo às tinturas realizadas na cultura popular, onde se misturam as partes ativas das plantas com bebidas alcoólicas.<sup>2</sup>

A espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) é árvore nativa dos trópicos que mede cerca de 10 m de altura e 3 a 4,5 m de diâmetro de projeção da copa. Os seus frutos são carnosos do tipo baga, elípticos, apresentando cerca de 3 a 4 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, com pericarpo de coloração roxa escura intensa, apresentando apenas uma semente. O mesocarpo é carnoso e sucoso com sabor ácido adocicado, oferecendo forte sensação de adstrin-

gência. No Brasil, esta espécie é encontrada em diversos estados das regiões Sudeste, Nordeste e Norte,<sup>3-6</sup> floresce nos meses de setembro a novembro e o fruto é encontrado abundantemente nos meses de dezembro a fevereiro.<sup>4,6</sup> O fruto é utilizado popularmente e conhecido em diversos países por: jambolão, 'jamun', 'jambolan', 'jambolana', 'jambol', 'jambul', 'black plum', 'indian blackberry', jamelão, jalão, azeitona, azeitona-roxa.<sup>7-11</sup>

Esta planta apresenta constituintes químicos como: nas sementes os taninos hidrolisáveis (ácido gálico, elágico, corilágico), a quercetina, a antimelina, no óleo essencial ( $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, *cis*-ocineno, *trans*-ocineno,  $\gamma$ -terpineno, acetato de bornila,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -humuleno e candineno), materiais resinosos e açúcares. Já, nas cascas dos caules foram encontrados o ácido acetil oleanólico, triterpenoides, ácido elágico, isoquercetina, quercetina, canferol e miricetina. Nas folhas foram encontrados ácido gálico, metilgalato, canferol, miricetina, ácido elágico, ácido clorogênico, quercetina e nilocitina. Enquanto na polpa dos frutos foram encontradas as antocianidinas e nas flores o ácido oleanólico.<sup>3</sup>

Diversas técnicas de planejamento experimental e análise estatística dos dados são empregadas para a otimização de diversos sistemas.<sup>12</sup> Neste sentido, o método mais utilizado para avaliar se um modelo construído é adequado ao sistema em avaliação é a análise de variância (ANOVA).<sup>13,14</sup>

Entre as diversas etapas de avaliação para extrativos vegetais por meio de um projeto fatorial, o mais importante é a extração, a qual tem a finalidade de separar as substâncias de interesse da matriz complexa.<sup>15</sup> Na extração deve ser considerada uma série de fatores, tais

\*e-mail: migliato@fcar.unesp.br

como: granulometria, polaridade do solvente, acidez do meio, agitação do sistema, método de extração, temperatura e o tempo de contato.<sup>16</sup>

A granulometria influencia diretamente na eficiência da extração, haja vista que a estrutura tecidual das diversas partes de uma planta é heterogênea. Órgãos como as raízes e os caules possuem tecidos mais densos, enquanto que em folhas e flores os tecidos apresentam uma densidade menor. Assim, é desejável que a granulometria seja homogênea para que a penetração de solventes no material seja facilitada e consistente.<sup>17</sup> Assim como a granulometria, a polaridade do solvente também influencia na extração, devendo este ser o mais seletivo possível, para que se consiga extrair as substâncias de interesse em quantidades satisfatórias para o estudo químico e/ou biológico. A seletividade do solvente ou misturas destes dependerá do grau de polaridade do grupo que se deseja extrair.<sup>15,18</sup> Os processos extrativos dependem em grande parte dos fenômenos de difusão, sendo que a renovação do solvente desempenha um papel importante na velocidade da dissolução, bem como a agitação pode determinar a duração do processo extrativo.<sup>16-18</sup>

O trabalho objetivou determinar o melhor método extrativo e o melhor solvente na produção do extrato bruto de frutos de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) empregando-se a análise fatorial e avaliando-se o teor de resíduo seco e a determinação da atividade antimicrobiana.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material vegetal

Os frutos de *S. cumini* (L.) Skeels foram coletados entre dezembro de 2008 a janeiro de 2009, no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da FCF/UNESP, em Araraquara – SP. Uma exsiccata está depositada sob o número SJRP 19586 no Herbário do Departamento de Botânica do IBILCE-UNESP, Campus de São José do Rio Preto, e identificada pela Dra. N. T. Ranga.

### Secagem e moagem

Os frutos colhidos foram secos em estufa de circulação forçada de ar aquecido a 40 °C. O seccionamento foi executado numa primeira etapa, em moinho de facas (Tecnal<sup>®</sup>) e em seguida utilizou-se um moinho de bolas (Soc Fabber<sup>®</sup>).

### Análise granulométrica

A granulometria foi avaliada segundo técnica descrita na Farmacopeia Brasileira.<sup>19</sup> Uma amostra de 25 g do pó dos frutos moídos foi adicionada em tamisador vibratório com tamises de 2,000; 0,840; 0,420; 0,177 e 0,125 mm e coletor, durante 30 min. Após isso, as frações foram devidamente pesadas (n=3). A passagem e retenção foram calculadas por meio das frequências percentuais e cumulativas.

### Preparo do extrato

O extrato bruto foi preparado por três métodos: turbólise, maceação e percolação, na proporção de 10% (p/v). Os líquidos extratores empregados foram soluções hidroetanólicas: 50, 70 e 96%. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e os extratos liofilizados. Todos os extratos foram preparados em triplicata.

### Planejamento fatorial para otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini*

Para o planejamento fatorial completo (3<sup>2</sup>) foram considerados dois fatores: processo de extração (turbólise, maceação 5 dias e

percolação) e concentração de solvente (solução hidroetanólica 50, 70 e 96% m/m) (Tabela 1). Como parâmetros de análise foram utilizados a determinação do resíduo seco e a atividade antimicrobiana. Os resultados foram analisados estatisticamente empregando-se o programa Minitab. As determinações foram realizadas com 9 repetições, totalizando 81 ensaios.

### Determinação do teor de resíduo seco

Uma amostra de 20,0 g de cada solução extrativa foi exatamente pesada em pesa-filtro previamente tarado e evaporada até a secagem em banho de temperatura, sob agitação constante. O pesa-filtro foi colocado em estufa por 3 h regulada para 105 °C de temperatura. Após este período, as amostras foram resfriadas em dessecador e pesadas. O resultado foi expresso em relação a 100,0 g do extrato, pela média de três determinações.

### Método de difusão em ágar sólido

A atividade antimicrobiana do extrato de *S. cumini* foi avaliada pelo método de difusão em ágar sólido com disco de papel. Foram utilizados os seguintes microrganismos: *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) *E. faecalis* (ATCC 10541), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida parapsilosis* (22019) e *Candida krusei* (ATCC 6258).

### Padronização da suspensão bacteriana

O inóculo de bactérias foi adaptado e padronizado segundo Murray et al.<sup>20</sup> e o documento do *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (M100-S18).<sup>21</sup> As colônias foram obtidas através de culturas em ágar Mueller Hinton (MH) por 24 h, até a obtenção de turvação igual à escala 0,5 de Mc Farland, que equivale a aproximadamente 1,5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL.

### Padronização da suspensão fúngica

O inóculo de leveduras foi adaptado e padronizado segundo CLSI (M44-A),<sup>22</sup> através de cultivo de 24 h em placas de ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (250 mg/L) a 30 °C, onde uma alçada das leveduras, de colônias isoladas, foi suspensa em solução salina, sendo ajustada a contagem de leveduras em 1 x 10<sup>6</sup> – 5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL em câmara de Neubauer.

### Padrão de sensibilidade de bactérias – controle

Para os ensaios de verificação da sensibilidade bacteriana, foi utilizado o método da difusão em ágar por discos contendo 5 µg/50 µL de ciprofloxacino. Inóculos preparados na escala 0,5 de Mc Farland foram semeados através de *swabs* em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton. Após a secagem, foram colocados os discos impregnados com o agente antimicrobiano sobre a superfície do ágar e as placas foram incubadas a 37 ± 1 °C em estufa durante 24 h.

### Padrão de sensibilidade de leveduras – controle

Para os ensaios de verificação da sensibilidade das leveduras foi utilizado o método da difusão em ágar por discos contendo 16 µg/50 µL de anfotericina B (Cecon). Inóculos contendo 10<sup>5</sup> UFC/mL leveduras foram preparados como anteriormente descrito e semeados através de *swabs* em placas de Petri contendo ágar RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, acrescidos de 2% de glicose

tamponado em MOPS 0,165 M, adicionados de ágar. Após a secagem, foram colocados os discos contendo os agentes antifúngicos sobre a superfície e as placas foram incubadas a  $30 \pm 1$  °C em estufa por 24 a 48 h.

#### Verificação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais pelo método da difusão em discos

Para os ensaios de verificação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais obtidos através das técnicas de turbólise, maceração por 5 dias e percolação foi utilizado o método da difusão em ágar Mueller Hinton com discos que foram padronizados quanto aos seus tamanhos (15 mm de diâmetro), contendo concentração dos extratos vegetais (50 µg/50 µL), de dimetilsulfóxido 5% impregnada individualmente. Os discos impregnados com os extratos foram colocados sobre as placas e estas foram incubadas a  $37 \pm 1$  °C durante 24 h. A leitura foi realizada depois de 24 h pela medida do halo de inibição com auxílio de paquímetro.

#### Verificação da atividade antifúngica dos extratos vegetais pelo método da difusão em discos

Para os ensaios de verificação da atividade antifúngica dos extratos vegetais obtidos através das técnicas de turbólise, maceração por 5 dias e percolação foi utilizado o método da difusão em ágar RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio acrescido de 2% de glicose tamponado em MOPS 0,165 M, adicionados de ágar com discos que foram padronizados quanto aos seus tamanhos (15 mm de diâmetro) e concentração dos extratos vegetais (50 µg/50 µL de dimetilsulfóxido 5%) impregnada individualmente. Os discos impregnados com os extratos foram colocados sobre as placas, as quais foram incubadas a  $37 \pm 1$  °C durante 24 h. A leitura foi realizada depois de 24 h pela medida do halo de inibição com auxílio de paquímetro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação do melhor método de extração e do melhor solvente para se obter um máximo de atividade antimicrobiana foi realizada otimizando as condições e empregando-se planejamentos fatoriais completos. Este estudo incluiu metodologia de análise estatística dos resultados e análise da variância (ANOVA), com os ensaios de resíduo seco e atividade antimicrobiana.

A avaliação granulométrica do material moído é uma etapa importante da padronização, pois representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo. A determinação do diâmetro médio de partículas forneceu  $d_{50}$  de 0,302 mm.

Partículas com dimensões homogêneas aumentam a área de contato entre o material sólido e o líquido extrator, podendo tornar, desta forma, mais eficiente a operação de extração.<sup>18,20</sup> A diminuição do tamanho de partículas dos frutos de *S. cumini* empregada neste trabalho, utilizando-se os moinhos de facas e o de bolas, permitiu rendimento satisfatório, uma vez que apenas 30% da droga vegetal moída foram reconduzidos ao processo de redução de partículas ao tamanho da partícula média.

Em todos os métodos de extração utilizados foram empregadas soluções hidroetanólicas 50, 70 e 96%, baseando-se na polaridade de compostos polifenólicos. A diversidade e a quantidade destes estão relacionadas à polaridade dos solventes empregados nas duas metodologias, haja vista que os compostos polifenólicos obtidos pelas duas concentrações de etanol (50 e 70%) apresentaram atividade contra micro-organismos constituídos por membranas de polaridades diferentes.<sup>3</sup>

Segundo Massart,<sup>23</sup> os fatores podem ser divididos em duas categorias, quantitativos e qualitativos. Portanto, para o presente estudo a concentração do etanol é um fator quantitativo, uma vez que é valor numérico e expressa a quantidade deste fator. Já o tipo de processo utilizado para a extração (turbólise, maceração e percolação) consiste em fator qualitativo.

Ao se considerar os resultados obtidos de forma independente, pôde-se avaliar que o melhor procedimento para a determinação do resíduo seco, a partir da solução extrativa 10%, foi a percolação, e o melhor solvente, o etanol 50%, conforme indica a Figura 1. A análise estatística dos resultados através da análise de variância (ANOVA) indica que os fatores considerados (processos extrativos e solventes) são significativos, assim como a interação entre eles (Tabela 1).

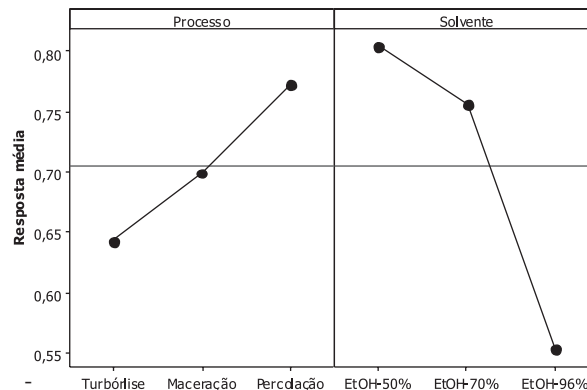


Figura 1. Gráfico de efeito principal dos fatores otimizados para o resíduo seco

Tabela 1. Análise de variância dos resultados para a determinação do teor de resíduo seco

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F	P
Processo	2	0,27454	0,13727	82,59	0,000
Solvente	2	0,87797	0,43899	264,12	0,000
Processo x Solvente	4	0,03162	0,00790	4,76	0,002
Erro	72	0,11967	0,00166		
Total	80	1,30380			

S = 0,0407682; R<sup>2</sup> = 90,82%; R<sup>2</sup> (ajust) = 89,80%. GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; F: valor de teste F; P: valor de significância; S: desvio padrão.

Conjuntamente com as análises referentes aos extratos secos (100 µg/mL) a serem avaliados, e com o objetivo de se ter um controle positivo, inseriu-se cepas padrões de referência *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) para o controle da metodologia com as drogas anfotericina B e ciprofloxacino, respectivamente. Foram realizados ensaios para o controle da atividade do DMSO diluindo-se em água, de modo a se obter solução a 5%, com o objetivo de certificar-se de que esta solução não apresentaria qualquer atividade.

Não foi encontrada atividade antimicrobiana frente à concentração utilizada de extrato para os micro-organismos *E. faecalis*, *E. coli*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Considerando-se a otimização da extração em relação à inibição bacteriana frente a *S. aureus* e *S. epidermidis* cocos Gram-positivos pertencentes ao mesmo gênero, obtém-se como melhor sistema extrativo a percolação, empregando-se o etanol 50% como solvente, como demonstrado nas Figuras 2 e 3. Nestas condições, provavelmente, foram selecionados compostos polares que apresentaram maior facilidade para ligação nestas bactérias.

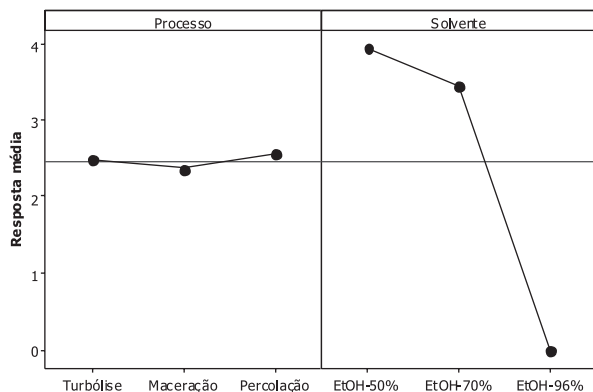


Figura 2. Gráfico de efeito principal dos fatores otimizados da atividade antimicrobiana do micro-organismo *S. aureus*

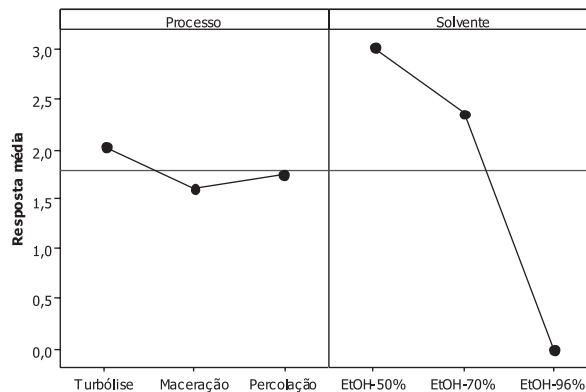


Figura 4. Gráfico de efeito principal dos fatores otimizados para a atividade antimicrobiana do micro-organismo *P. aeruginosa*

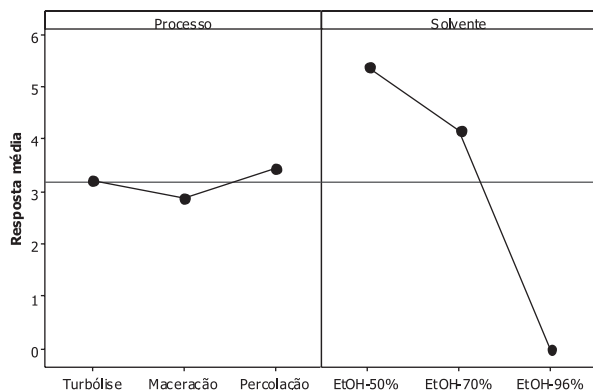


Figura 3. Gráfico de efeito principal dos fatores otimizados da atividade antimicrobiana do micro-organismo *S. epidermidis*

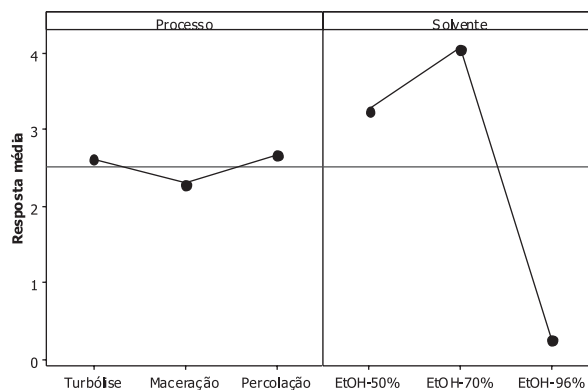


Figura 5. Gráfico de efeito principal dos fatores otimizados para a atividade antimicrobiana do microrganismo *C. krusei*

Quanto aos resultados de atividade antibacteriana do extrato de frutos de *S. cumini* frente a *P. aeruginosa*, bacilos Gram-negativos não fermentadores, observando-se a Figura 4 pode-se verificar que o extrato produzido através do processo turbólise resultou em melhor atividade antibacteriana, empregando-se o etanol 50%. Neste sentido, a escolha do processo de extração adequado parece influenciar na seleção de compostos diferentes daqueles obtidos por percolação, pois estes apresentaram atividade em um gênero de bactérias com estruturas morfológicas e bioquímicas diferentes. Esta situação já foi anteriormente observada em estudo realizado por Michielin *et al.*,<sup>24</sup> que verificaram atividade seletiva em diferentes extratos obtidos por diversos processos com diferentes solventes. Os resultados da atividade antibacteriana mostraram-se melhores para as bactérias Gram-positivas, pois as substâncias artemetin,  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -humulene e  $\beta$ -caryophyllene foram de alta polaridade, confirmando nossos dados preliminares.

Na prospecção de compostos com atividade antifúngica associados aos diferentes processos de obtenção de extratos e na escolha de solventes foi observada atividade inibitória contra *C. krusei*, levedura que apresenta resistência intrínseca ao fluconazol que é um antifúngico triazólico, multiformulação, utilizado em candidíases sistêmicas e nas superficiais.<sup>25</sup> A Figura 5 mostra que o etanol 70% como solvente associado à percolação resultou na seleção de compostos polares, que foram eficientemente obtidos através da percolação. Estes compostos apresentaram atividade antifúngica específica para *C. krusei*. Estes dados podem ser comparados com estudo realizado por Marzouk *et al.*,<sup>26</sup> que compararam componentes extraídos por diferentes solventes (acetona e água) pelo processo de turbólise a partir dos frutos maduros e imaturos, bem como das folhas de *Citrullus colocynthis* Schrad.

(Cucurbitaceae). Neste estudo os compostos polares apresentaram-se com propriedades anticandida, incluindo a espécie *C. krusei*.

De acordo com a avaliação antimicrobiana realizada e a determinação de resíduo seco, foi possível identificar o melhor processo extrativo e o melhor líquido extrator, conforme demonstra a Tabela 2. A análise de variância da atividade antimicrobiana encontra-se no material suplementar.

Tabela 2. Resultado dos fatores otimizados para a determinação do resíduo seco e atividade antimicrobiana dos micro-organismos investigados

	Processo	Solvente
Resíduo seco	Percolação	Etanol 50%
<i>S. aureus</i>	Percolação	Etanol 50%
<i>S. epidermidis</i>	Percolação	Etanol 50%
<i>P. aeruginosa</i>	Turbólise	Etanol 50%
<i>C. krusei</i>	Percolação	Etanol 70%

Como evidencia a Tabela 2, na determinação de resíduo seco e na atividade antimicrobiana, o processo de percolação empregando-se o etanol 50% constituiu o melhor procedimento extrativo. Isto se deve ao processo de percolação levar a um esgotamento da droga vegetal.<sup>27</sup> O processo por turbólise selecionou compostos com atividade antibacteriana específicas contra *P. aeruginosa*, enquanto que para a atividade antifúngica, o melhor processo extrator foi a percolação, e o solvente com atividade frente a *C. krusei* foi o etanol 70%.

Taninos são tóxicos para fungos e bactérias, e estas atividades são devidas a algumas de suas propriedades como a inibição de enzimas

extracelulares, de privação de substrato, inibição da fosforilação oxidativa, além de mecanismos que envolvem de privação de ferro.<sup>28</sup> Além disto, a literatura revela a similaridade de ação dos taninos em comparação ao apresentado pelos compostos fenólicos e bi-fenólicos sintéticos, materiais estes largamente empregados como antissépticos na atualidade.<sup>29</sup>

As propriedades antimicrobianas e o espectro de atividade dos compostos polifenólicos apresentados parecem estar associadas ao grau de polaridade dos mesmos obtidos com etanol 50% e à polaridade das membranas dos bacilos Gram negativos.<sup>26</sup> A atividade antimicrobiana específica para *P. aeruginosa* pode ser justificada pela polaridade da membrana externa deste agente, ao contrário do que se apresenta nos cocos Gram positivos, que têm estrutura celular mais rígida, parede celular quimicamente menos complexa e menor teor de lipídico do que as Gram negativas.<sup>30,31</sup> Segundo Michelin *et al.*,<sup>32</sup> a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *S. cumini* é atribuída aos taninos, que também apresentam atividade contra bactérias resistentes aos antibióticos. Os resultados estão de acordo com a maioria dos autores citados, que apresentam atividade de compostos tânicos obtidos a partir de diferentes concentrações de etanol contra micro-organismos que também são resistentes a alguns grupos de antibióticos, como é o caso da *P. aeruginosa* e, adicionalmente, atividade antifúngica contra *C. krusei*, que apresenta resistência natural ao fluconazol.

A atividade antifúngica pode ser atribuída pela combinação de vários compostos, de acordo com os diferentes processos de extração e escolha dos solventes que apresentam propriedades capazes de causar danos às membranas celulares, causando vazamento de material celular e, finalmente, a morte de micro-organismos.<sup>33,34</sup>

## CONCLUSÃO

O planejamento fatorial aplicado na otimização do processo extrativo indicou a percolação como o método mais eficiente para a extração das substâncias solúveis em solução hidroetanólica. O tamanho da partícula e o líquido extrator etanol: água 50% foram os fatores mais importantes na eficiência do método de extração, considerando-se a quantidade de resíduo seco e a atividade antimicrobiana como critério de avaliação.

Recomenda-se o planejamento fatorial previamente aos estudos em que se pretende prospectar atividade antimicrobiana.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre. As Tabelas (1S, 2S, 3S e 4S) de ANOVA para os resultados antimicrobianos estão aí apresentadas.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES (Brasília), ao CNPq (Brasília), INCT\_if, à FAPESP (São Paulo) e PADC-FCF-UNESP (Araraquara).

## REFERÊNCIAS

- Heinzmann, B. M.; Barros, F. M. C.; *Saúde* **2007**, *33*, 43.
- Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 99.
- Migliato, K. F.; Baby, A. R.; Zague, V.; Velasco, M. V. R.; Corrêa, M. A.; Sacramento, L. V. S.; Salgado, H. R. N.; *Acta Farm. Bonaerense* **2006**, *25*, 310.
- Alber-ton, J. R.; Ribeiro, A.; Sacramento, L. V. S.; Franco, S. L.; *Rev. Bras. Farmacog.* **2001**, *11*, 37.
- Mahmoud, I. I.; Marzouk, M. S. A.; Maharram, F. A.; El-Gindi, M. R.; Hassan, A. M. K.; *Phytochemistry* **2001**, *58*, 1239.
- Grover, J. K.; Vats, V.; Rath, S. S.; Dawar, R.; *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 233.
- Oliveira, F.; Akisue, G.; *Fundamentos de farmacobotânica*, 2ª ed., Atheneu: São Paulo, 2000.
- Sharma, S. B.; Nasir, A.; Prabhu, K. M.; Murthy, P. S.; Dev, G.; *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *85*, 201.
- Timbola, A. K.; Szpoganicz, A. B.; Monache, F. D.; Pizzolatti, M. G.; *Fitoterapia* **2002**, *73*, 174.
- Grover, J. K.; Yadav, S.; Vats, V.; *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *81*, 81.
- Garcia, C. G.; Polo, A. S.; Iha, N. Y. M.; *Annals Braz. Acad. Sci.* **2003**, *75*, 163.
- Clarke, G. M.; Kempson, R. E.; *Introduction to the design & analysis of experiments*, Arnold: London, 1997.
- de Barros Neto, B.; Scarmínio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como fazer experimentos na ciência e na indústria*, Unicamp: Campinas, 2001.
- Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 338.
- Bandeira, K. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2004.
- Soares, L. A. L.; González, O. G.; Petrovick, P. R.; Bassani, V. L.; *Cad. Farm.* **1998**, *14*, 21.
- Mello, J. C. P.; Petrovick, P. R.; *Acta Farm. Bonaerense* **2000**, *19*, 211.
- Prista, L. N.; Alves, A. C.; Morgado, R.; *Tecnologia farmacêutica*, 4ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1996.
- Farmacopéia Brasileira*; 4ª ed., Atheneu: São Paulo, 1988.
- Murray, P. R.; Barron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H.; *Manual of clinical microbiology*, 8ª ed., ASM: Washington, 2003.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); (2008) CLSI; [document M100-S18].
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); (2004) CLSI; [document M44-A].
- Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N.; Michotte, Y.; Kaufman, L.; *Chemometrics: a textbook*, Elsevier: Amsterdam, 1988.
- Michielin, E. M. Z.; Salvador, A. A.; Riehl, C. A. S.; Smânia Jr., A.; Smânia, E. F. A.; Ferreira, S. R. S.; *Bioresour Technol.* **2009**, *100*, 6615.
- Myoken, Y.; *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **2009**, *50*, 225.
- Marzouk, B.; Marzouk, Z.; Décor, R.; Edziri, H.; Haloui, E.; Fenina, N.; Aouni, M.; *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *125*, 344.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.; *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, UFSC: Porto Alegre, 2003.
- Chandrasekaran, M.; Venkatesalu, V.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *91*, 105.
- Sanchez, A. C. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2004.
- Loguercio, A. P.; Battistin, A.; De Vargas, A. C.; Henzel, A.; Witt, N. M.; *Ciênc. Rural* **2005**, *35*, 371.
- Oliveira, G. F.; Furtado, N. A. J. C.; Silva Filho, A. A.; Martins, C. H. G.; Bastos, J. K.; Cunha, W. R.; Silva, M. L. A.; *Braz. J. Microbiol.* **2007**, *38*, 381.
- Michelin, D. C.; Moreschi, P. E.; Lima, A. C.; Nascimento, G. G. F.; Paganelli, M. O.; Chaud, M. V.; *Rev. Bras. Farmacog.* **2005**, *15*, 316.
- Mshvildadze, V.; Favel, A.; Delmas, F.; Elias, R.; Faure, R.; Decanosidze, Q.; Kemertelidze, E.; Balansard, G.; *Pharmazie* **2000**, *55*, 325.
- Abdel Ghani, S. B.; Weaver, L.; Zidan, Z. H.; Hussein, M. A.; Keevil, C. W.; Brown, R. C. D.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 518.