

Otimização do Extrato Bruto Hidroetanólico das Folhas de *Eugenia dysenterica* DC. pelo Método Box-Behnken e Avaliação das suas Atividades Antioxidante e Antimicrobiana

Optimization of the Crude Hydroethanolic Extract of *Eugenia dysenterica* DC. Leaves Using the Box-Behnken Method and Assessment of its Antioxidant and Antimicrobial Activities

Fernanda M. da S. Vieira,^{a,*} Fernando Y. Abrao,^a Jeronimo R. de O. Neto,^a Luiz C. da Cunha,^a Tatiana S. Fiuza,^a José R. De Paula^{a,*}

^aUniversidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, CEP 74605-170, Goiânia-GO, Brasil

*E-mail: jose_realino@ufg.br

Recebido: 17 de Março de 2023

Aceito: 10 de Janeiro de 2024

Publicado online: 17 de Janeiro de 2024

Eugenia dysenterica DC., “cagaita”, is a tree whose leaves are popularly used for wounds, diarrhea and dysentery. The aim of this study was to obtain the standardized crude hydroethanolic extract from *E. dysenterica* leaves and evaluate the antioxidant and antimicrobial activities. Quality control was carried out using conventional techniques, extract elevated by Box-Behnken, antioxidant activity by DPPH and ABTS and antimicrobial activity by broth microdilution. The extract with the highest concentration of tannins was obtained with 60% hydrohydroethanolic solution, plant material/solvent ratio of 12 mg mL⁻¹. The concentration of tannins in the extract was 1.71 g TAE g⁻¹, phenols 6.23 mg GAE mg⁻¹ and flavonoids 4.70 mg of rutin per mg. The standardized crude hydroethanolic extract showed excellent antioxidant activity both by DPPH (IC₅₀ of 2.70 ± 0.005 µg mL⁻¹) and by ABTS (3479.21 ± 0.001 µM trolox g⁻¹). Moderate antifungal activity of the standardized hydroethanolic extract was verified against *C. gattii* and *C. neoformans*. This study represents the first standardization of the crude hydroethanolic extract of *E. dysenterica* that demonstrated high antioxidant activity. This species has antifungal potential, which encourages further studies.

Keywords: Cagaita; Myrtaceae; phytotherapy; standardization; free radicals; Brazilian savanna.

1. Introdução

Eugenia dysenterica DC., conhecida como “cagaita”, “beba”, “orvalha do campo”, “vagaiteira”, “uvalhia do cerrado” e “cagaiteira”, é uma árvore frutífera nativa do Cerrado podendo atingir uma altura de 10 metros.¹⁻² Suas folhas são membranáceas, simples, opostas cruzadas, formato oval ou elíptico e presença de tricomas esbranquiçados. As flores são delicadas e vistosas formando inflorescência de coloração branca. Os seus frutos são globosos, tipo bagáceo, cor amarelo-clara e epicarpo membranoso.³ As sementes possuem o formato elíptico globoso com tegumento de coloração amarelo pardacenta e moderadamente resistente.⁴

Na medicina popular, há relatos de uso das folhas de *E. dysenterica* para o tratamento de feridas, diabetes, distúrbios gástricos (diarreia e disenteria).²⁻⁸ A maceração e o chá das folhas de *E. dysenterica* são utilizados pela comunidade de Vista Alegre, Minas Gerais, para hipertensão, diarreia, gastrite, afecções dos rins e fígado, estomáquica, calmante;² a decocção das folhas em Buritis, Minas Gerais, para o tratamento de icterícia e o suco dos frutos como laxante; as folhas e os frutos em Teresina, Piauí, para problemas cardíacos.⁹⁻¹⁰ A atividade antidiarreica pode estar associada a presença de taninos, que são capazes de precipitar proteínas e reduz a motilidade intestinal resultando no seu restabelecimento. Essa complexação com as proteínas também pode influenciar na atividade antimicrobiana dos taninos.¹¹

Estudos científicos identificaram no extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* coletadas em Lassance, Minas Gerais, por análise de cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a detector por arranjo de diodos e a espectrômetro de massas (UFLC-DAD-MS) catequina e taninos condensados do tipo B, acoplados a onze unidades de flavan-3-ol, dentre eles: procianidina B-1 e procianidina O-galato.⁵ Gasca *et al.*⁶ isolaram a (+)-catequina e a quercetina no extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* coletadas em Brasília, por separação cromatográfica e purificação usando Sephadex LH-20 e metanol como fase estacionária e móvel.

Foi verificado na literatura atividade antioxidante de *E. dysenterica in vitro* da polpa dos frutos empregando os métodos espectrofotométricos DPPH, ABTS e FRAP, cujos melhores resultados foram $7,09 \pm 0,47 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ TE g}^{-1}$ (Sete Lagoas-MG), $9,34 \pm 0,34 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ trolox g}^{-1}$ (Paraopeba-MG) e $21,33 \pm 0,39 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ sulfato ferroso g}^{-1}$ (Paraopeba-MG), respectivamente.¹² Thomaz *et al.*¹³ observaram atividade antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *E. dysenterica*, obtidas em Trindade, com comportamento redox semelhante ao padrão quercetina. Costa *et al.*¹⁴ observaram que a fração acetona obtida a partir do extrato bruto aquoso das folhas de *E. dysenterica* foi capaz de estabilizar a carga eletrônica do radical livre DPPH com concentração inibitória (IC_{50}) de $3,53 \mu\text{g mL}^{-1}$. Oliveira *et al.*¹⁵ verificaram a atividade antioxidante *in vitro*, pelo método DPPH, do óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* obtidas em Mogi-Guaçu, São Paulo, com IC_{50} de $5,40 \pm 0,63 \text{ mg mL}^{-1}$.

Os metabólitos secundários podem ser obtidos através da extração assistida por ultrassom (EAU) que pode ser otimizada através dos métodos analíticos que informam estatisticamente quais são os parâmetros experimentais essenciais para a obtenção da melhor concentração dos metabólitos secundários desenvolvidos pelas espécies vegetais e, conseqüentemente, influenciam na padronização do processo extrativo.¹⁶ Para a triagem experimental dos teores hidroalcoólicos através da EAU pode-se utilizar a metodologia de superfície de resposta, o planejamento experimental *Box-Behnken* visando a determinação das melhores condições operacionais (proporção material vegetal/solvente, temperatura de extração e tempo de extração em minutos) que proporcionem a obtenção de extrato com alto rendimento dos metabólitos secundários de interesse.

O presente estudo teve como objetivos: fazer o controle de qualidade do pó das folhas de *E. dysenterica*; obter o extrato bruto hidroetanólico padronizado em taninos totais; realizar o doseamento dos taninos, fenóis e flavonoides totais e avaliar as atividades antioxidantes e antimicrobianas do extrato bruto hidroetanólico padronizado.

2. Experimental

2.1. Reagentes químicos e solventes

Lauril sulfato de sódio (90%), albumina (96%), trietanolamina (99%), cloreto de ferro (97%) e ácido tânico (96%) [Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA] foram usados para o doseamento dos taninos totais. Folin ciocalteu (95%), carbonato de sódio (99,5%) e ácido gálico (98%) (Sigma-Aldrich) [Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA] foram aplicados para o doseamento de fenóis totais. Rutina (94%) [Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA], solução de metanol (99,80%) [Neon®, Suzano, São Paulo, Brasil] e ácido acético (99,70%) 0,02 M (99:1

[Merck Millipore®, Molsheim, France] foram usados para o doseamento de flavonoides totais. DPPH (95%) [Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA] e álcool metílico (99,80%) [Neon®, Suzano, São Paulo, Brasil] foram empregados para a atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH. Persulfato de potássio (99,99%) [Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA], Trolox (98%), radical ABTS (98%) [Merck Millipore®, Molsheim, France] e álcool etílico [Neon®, Suzano, São Paulo, Brasil] foram aplicados para determinação da atividade antioxidante pelo método captura do radical ABTS. Tween 80, dimetil sulfoxido 99,90%, Roswell Park Memorial Institute (RPMI) [Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA], ágar Mueller-Hinton (Kasvi®, Itália), ampicilina, fluconazol [Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA] foram utilizados para a avaliação antimicrobiana.

2.2. Material vegetal

As folhas de *E. dysenterica* foram coletadas no período chuvoso no Câmpus I da Universidade Federal de Goiás (UFG), cidade de Goiânia (latitude: $16^{\circ} 40' 43'' \text{ S}$, longitude: $49^{\circ} 15' 14'' \text{ W}$, altitude: 749 m) pela manhã no dia 09 de outubro de 2021 à temperatura mínima de 23° C e umidade mínima de 36,40%. Após a coleta, as folhas foram submetidas a desidratação em estufa de esterilização e secagem (Solab) de ventilação forçada a 33° C para posterior secagem e armazenamento sob refrigeração no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) da UFG.

2.3. Controle de qualidade do material vegetal

As folhas de *E. dysenterica* foram pulverizadas no moinho analítico (IKA® A11 basic) e caracterizadas segundo os procedimentos descritos na Farmacopeia Brasileira 6ª edição:¹⁷ determinação da granulometria do pó, da perda por dessecação (teor de voláteis), do índice de intumescência, do teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido. Todos os ensaios experimentais foram realizados em triplicata.

2.4. Planejamento experimental do tipo *Box-Behnken* para avaliação da influência dos fatores no método de extração dos taninos totais das folhas de *E. dysenterica*

A avaliação dos fatores envolvidos no processo de extração dos taninos totais do pó das folhas de *E. dysenterica* foi realizada por planejamento experimental do tipo *Box-Behnken* contendo três variáveis, três níveis e três pontos centrais, com a finalidade de determinar as condições capazes de extrair uma maior quantidade dos compostos de interesse.¹⁸

Uma triagem experimental dos teores hidroalcoólicos foi realizada a fim de selecionar os níveis com maior influência na extração dos taninos totais. Os fatores proporção material vegetal/solvente (20 mg mL^{-1}) e tempo

Tabela 1. Avaliação dos fatores proporção material vegetal/solvente (mg mL⁻¹), temperatura de extração (°C) e tempo de extração (minutos) analisados para a obtenção dos extratos a partir do pó das folhas de *E. dysenterica* e seus respectivos níveis

FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Proporção material vegetal/solvente X ₁ (mg mL ⁻¹)	12	16	20
Temperatura de extração X ₂ (°C)	25	35	40
Tempo de extração X ₃ (minutos)	10	20	30

de extração (20 minutos) foram fixados e as graduações hidroalcoólicas variaram de 0 a 90% (m m⁻¹), em intervalos de 10. A extração foi por ultrassom e os taninos totais dos 10 extratos obtidos foram quantificados, de acordo com o método espectrofotômetro descrito por Mole e Waterman,¹⁹ utilizando uma curva padrão de ácido tânico ($y = 27,8x - 0,1371$, $R^2 = 0,9994$).

Após triagem da graduação hidroalcoólica, os fatores analisados no planejamento experimental do tipo *Box-Behnken* foram: proporção material vegetal/solvente X₁ (mg mL⁻¹), temperatura de extração X₂ (°C) e tempo de extração X₃ (minutos) (Tabelas 1 e 2). Foram pesados 300, 400 e 500 mg do pó das folhas de *E. dysenterica* e transferidos para balões volumétricos de 25 mL contendo a solução etanólica na proporção definida pelo planejamento *Box-Behnken*. Posteriormente, as amostras foram submetidas a extração por ultrassom (Eco-Sonics) considerando o tempo de extração e a temperatura de extração dos respectivos níveis (Tabelas 1 e 2). Os taninos totais foram quantificados nos diferentes extratos pelo método espectrofotômetro descrito por Mole e Waterman.¹⁹ Os dados obtidos foram analisados por ANOVA, regressão

linear múltipla associada a metodologia de superfície de resposta (MSR), e tratados no *Software Statistica 7.0*. Os resultados foram considerados significativos a nível de 5%.

2.5. Obtenção do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica*

Selecionou-se a solução hidroetanólica que resultou em uma melhor performance na extração dos taninos totais do pó das folhas de *E. dysenterica*. O extrato bruto hidroetanólico padronizado foi preparado a partir de 4,80 g do pó das folhas macerado de forma estática com 400 mL da solução hidroetanólica 60% por 24 horas. Após esse período, realizou-se a percolação por exaustão conforme o método preconizado na Farmacopeia Brasileira 6^a edição.¹⁷ Posteriormente, o extrato bruto hidroetanólico de *E. dysenterica* passou pelo processo de concentração em placas revestidas por papel alumínio em uma estufa de circulação forçada a 35 °C até a completa evaporação das partículas voláteis e armazenado à temperatura ambiente em um dessecador. O cálculo do rendimento total do extrato obtido foi determinado utilizando a equação 1:²⁰

$$R_e = \frac{P_{\text{ext}}}{P_{\text{folhas}}} \times 100 \quad (1)$$

onde: R_e = Rendimento total do extrato (%); P_{ext} = Peso do extrato seco (g); P_{folhas} = Peso do pó das folhas (g)

2.6. Doseamento de taninos totais do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica*

O doseamento de taninos totais foi realizado de acordo com o método descrito Mole e Waterman.¹⁹ A concentração de 0,02 g mL⁻¹ do extrato bruto hidroetanólico padronizado foi submetida a leitura da absorbância, em triplicata, em espectrofotômetro digital UV/VIS (Tecnal) no comprimento de onda de 510 nm. A concentração de taninos totais presentes no extrato foi calculada com base em uma curva de calibração estabelecida com ácido tânico como padrão ($y = 27,8x - 0,1371$, $R^2 = 0,9994$, onde y representa a absorbância medida e x a concentração equivalente de ácido tânico). O resultado foi expresso em gramas equivalentes de ácido tânico (EAT) por gramas de amostra.

Tabela 2. Planejamento experimental Box Behnken para determinação da concentração de taninos totais presentes no pó folhas de *E. dysenterica*

EXPERIMENTO	X ₁ (mg mL ⁻¹)	X ₂ (°C)	X ₃ (minutos)
1	16	40	10
2	16	35	20
3	16	25	30
4	20	35	10
5	12	40	20
6	20	40	20
7	20	35	30
8	12	35	10
9	12	35	30
10	16	35	20
11	16	40	30
12	20	25	20
13	16	35	20
14	12	25	20
15	16	25	10

X₁ (proporção material vegetal/solvente), X₂ (temperatura de extração em °C) e X₃ (tempo de extração em minutos)

2.7. Doseamento dos compostos fenólicos totais do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica*

O doseamento dos compostos fenólicos totais foi realizado pelo método Folin Ciocalteu (FC)²¹ na concentração de 0,26 mg mL⁻¹ do extrato bruto hidroetanólico padronizado. A mensuração da absorvância em função da concentração foi feita em digital UV/VIS (Tecnal) no comprimento de onda de 760 nm, em triplicata. A equação obtida para a curva padrão de ácido gálico foi $y = 99,417x + 0,0552$, $R^2 = 0,9995$, onde y representa a absorvância medida e x a concentração equivalente de ácido gálico. O conteúdo dos compostos fenólicos totais foi expresso em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por mg de amostra.

2.8. Doseamento de flavonoides totais do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica*

O doseamento de flavonoides totais foi realizado pelo método por Rolim.²² que se baseia na propriedade dos mesmos em absorver radiação no comprimento de onda da luz ultravioleta (UV) proporcionalmente à sua concentração. A concentração de 0,32 mg mL⁻¹ do extrato bruto hidroetanólico padronizado foi submetida a leitura da absorvância em espectrofotômetro, em triplicata, no comprimento de onda de 361 nm. A equação obtida para a curva padrão de rutina foi $y = 30,46x - 0,0205$, $R^2 = 0,9995$, onde y equivale a absorvância medida, x equivale à concentração de rutina. O conteúdo de flavonoides totais foi expresso em mg equivalente a rutina (ER) por mg de amostra.

2.9. Determinação da atividade antioxidante do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica* pelo método de captura do radical livre DPPH

A atividade antioxidante do extrato bruto hidroetanólico padronizado foi avaliada pelo método DPPH.²³ Soluções nas concentrações de 0,0017; 0,0034; 0,0051; 0,0067 e 0,0084 mg mL⁻¹ foram adicionadas a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH a 0,06 mM. Após 15 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente, as absorvâncias das amostras foram medidas em 515 nm em espectrofotômetro digital UV/VIS (Tecnal), em triplicata. Construiu-se uma curva analítica (absorvância x concentração). A concentração de 50% de inibição (IC₅₀) foi calculada pela equação de regressão linear entre a concentração do extrato e o correspondente efeito de redução ($y = -47,141x + 0,51$, $R^2 = 0,9988$). O resultado de 50% de inibição (IC₅₀) foi expresso em µg mL⁻¹.

Neste trabalho foram adotados os critérios descritos por Scherer e Godoy²⁴ onde considera-se baixa atividade antioxidante quando índice for < 0,5, moderada atividade entre 0,5 e 1,0, forte atividade entre 1,0 e 2,0 e muito forte > 2,0.

2.10. Determinação da atividade antioxidante do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica* pelo método de captura do radical ABTS^{•+}

A determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica* foi efetuada de acordo com o método divulgado por Rufino *et al.*²⁵ Foram preparadas soluções do extrato nas concentrações: 1,0; 0,8; 0,6; 0,4 e 0,2 mg mL⁻¹ em álcool etílico. Posteriormente, realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro digital UV/VIS (Tecnal) a 734 nm, em triplicata. As concentrações foram plotadas no eixo x e os valores de absorvância correspondentes foram plotados no eixo y , gerando a equação: $y = -0,7195x + 0,7934$, $R^2 = 0,9806$. A capacidade antioxidante foi expressa como equivalentes de 1 µM Trolox g⁻¹, usando como curva de calibração padrão Trolox ($y = -0,0003x + 0,8866$, $R^2 = 1$).

2.11. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica*

Os microrganismos utilizados foram cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Cryptococcus gattii* ATCC 24.065, *Cryptococcus neoformans* ATCC 28.957, *C. neoformans* ATCC 90.112, *Candida albicans* ATCC 90.028, *C. albicans* ATCC 10.231, *Candida krusei* ATCC 34.135, *C. krusei* ATCC 6.285, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida glabrata* ATCC 90.030, *C. glabrata* ATCC 90.050, *Candida parapsilosis* ATCC 22.019, *Escherichia coli* ATCC 8.739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27.853, *Salmonella* sp. ATCC 14.028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29.213 e *C. neoformans* (L2) presente em amostra biológica de pacientes com HIV fornecida pelo laboratório de micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG. Os microrganismos foram congelados a -15 °C em solução crioprotetora de glicerol 20% em água no LPPN. A atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica* foi determinada de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (M7-A10 e M27-A3).²⁶⁻²⁷ O extrato bruto hidroetanólico padronizado foi preparado usando 0,01% (v/v) Tween 80 e 1% (v/v) de dimetil sulfóxido para testes de sensibilidade.²⁸

Realizou-se diluições em série variando de 2048 a 4 µg mL⁻¹ do extrato bruto hidroetanólico padronizado em microplacas de 96 poços de fundo plano de poliestireno. Os microrganismos foram preparados para uma concentração final de 10⁵ UFC mL⁻¹ para bactérias e 10³ UFC mL⁻¹ para leveduras e fungos filamentosos. Utilizou-se o Ágar Mueller-Hinton para os testes com bactérias e o meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 medium (com L-glutamina, sem bicarbonato, pH 7.0) para os testes com leveduras e fungos filamentosos. A concentração

inibitória mínima (CIM) foi estabelecida a partir da menor concentração do extrato bruto hidroetanólico padronizado capaz de impedir o crescimento dos microrganismos analisados, ausência de turvação. Foi feito o controle do crescimento dos microrganismos na ausência de extrato bruto hidroetanólico padronizado e o controle negativo da esterilidade do meio de cultura. O controle positivo foi determinado usando a ampicilina (Sigma-Aldrich), fluconazol (Sigma-Aldrich), *E. coli* ATCC 25.922 e *C. parapsilosis* ATCC 22.019. Incubou-se as placas a 35 ± 2 °C por 24 horas para bactérias, 48 horas para *Candida* spp. e *Saccharomyces cerevisiae*, e 72 horas para *Cryptococcus* spp.. Todos os testes foram feitos em triplicata.

Para análise da concentração inibitória mínima (CIM) utilizou-se os parâmetros descritos por Holetz *et al.*²⁹ que classifica como bioatividade forte (CIM < 100 µg mL⁻¹), bioatividade moderada (CIM entre 100 a 500 µg mL⁻¹), bioatividade fraca (CIM entre 500 a 1000 µg mL⁻¹) e sem bioatividade (CIM > 1000 µg mL⁻¹).

3. Resultados e Discussão

3.1. Controle de qualidade do material vegetal

O controle de qualidade do material vegetal consiste em verificar se ele atende os parâmetros de qualidade preconizados pela Farmacopeia brasileira 6ª edição⁷ ou por outros compêndios oficiais. Devido à ausência de dados do controle de qualidade para o pó das folhas de *E. dysenterica* foi padronizado no presente estudo dados importantes para o controle de qualidade da matéria prima. Determinou-se a granulometria do pó das folhas de *E. dysenterica* que foi classificado como moderadamente grosso.¹⁷ Partículas com diâmetro uniforme aumenta a superfície de contato entre o material vegetal e o solvente extrator, podendo interferir de modo satisfatório na extração dos metabólitos secundários.³⁰

A perda por dessecação (teor de voláteis) do pó das folhas de *E. dysenterica* que foi $9,06 \pm 0,20\%$. Esse resultado está de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição¹⁷ para as plantas em geral que preconiza o limite máximo de 20% de umidade residual no material vegetal. A perda por dessecação é responsável por determinar a quantidade de substâncias voláteis presente na amostra em estudo.¹⁷ Isso é importante para garantir o melhor controle de qualidade do material vegetal, pois se houver uma quantidade de água excessiva, ditos como água livre, pode propiciar a proliferação de microrganismos e afetar a estabilidade química, reação de hidrólise, do produto analisado.³¹

O índice de intumescência do pó foi de 0,83 mL g⁻¹ de amostra (água destilada) e 0,43 mL g⁻¹ de amostra (solução hidroetanólica 60%). Observa-se que a solução hidroetanólica 60% teve o intumescimento inferior em comparação à água destilada. Isso implica que o processo de liberação dos metabólitos secundários durante o processo de extração será mais eficiente na presença dessa solução,

pois não ocorrerá o descontrole de dispersão dos mesmos.¹⁷ Portanto, o índice de intumescimento permite identificar o volume ocupado do material vegetal na presença de água e/ou outro agente intumescente e auxilia na determinação do volume de solvente necessário para a extração de modo que não ocorra compactação da amostra.¹⁷

O teor de cinzas totais do pó das folhas foi de $1,99 \pm 0,01\%$. Esse resultado está de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição¹⁷ que informa o limite máximo aceitável para plantas em geral de 5% de cinzas totais presentes no material vegetal dessecado. O teor de cinzas do pó das folhas de *E. dysenterica* também foi determinado por Couto *et al.*³¹ que obtiveram um teor de $2,94 \pm 0,07\%$. A determinação de cinzas totais implica na quantificação de matérias inorgânicas metálicas não voláteis, contidas na amostra, a partir da queima dos compostos orgânicos.¹⁷ Portanto, teores superiores a 5% indicam presença de adulterações no material vegetal em compostos inorgânicos.³²

O teor de cinzas insolúveis em ácido do pó foi de $0,22 \pm 0,01\%$, estando conforme o limite estabelecido na Farmacopeia Brasileira 6ª edição¹⁷ para plantas em geral, cujo teor não pode exceder 2,0%, e próximo ao valor encontrado por Couto *et al.*³² no pó das folhas de *E. dysenterica* ($0,29 \pm 0,002\%$), coletada em Nova América, Goiás. O teor de cinzas insolúveis em ácido informa a quantidade de sílica e seus constituintes na amostra que não foram eliminadas na presença do ácido clorídrico.¹⁷ Os dados do presente estudo são importantes para a padronização do pó das folhas de *E. dysenterica* no controle de qualidade da matéria prima vegetal.

3.2. Planejamento experimental do tipo Box-Behnken para avaliação da influência dos fatores no método de extração dos taninos totais das folhas de *E. dysenterica*

Os resultados obtidos na triagem experimental dos teores hidroalcoólicos indicaram que a solução hidroetanólica 60% foi capaz de extrair maior concentração de taninos totais ($1,06 \pm 0,01$ gEAT g⁻¹) do pó das folhas de *E. dysenterica* (Figura 1), sendo considerada como solvente extrator padrão no planejamento experimental do tipo *Box-Behnken*. Portanto, esse nível de graduação hidroalcoólica com maior afinidade molecular com o metabólito secundário de interesse foi capaz de penetrar nas paredes celulares da matriz vegetal, interagir e solubilizar elevada quantidade das moléculas bioativas e dispersá-las para o meio externo.³⁰

O planejamento experimental do tipo *Box-Behnken* do pó (Tabela 3) determinou-se, através do teste ANOVA, onde o fator proporção material vegetal/solvente apresentou significância ao nível de 5% com valor de R² de 0,8262 e R ajustado de 0,5135. Observa-se na Tabela 3 que a concentração de taninos totais do pó foi superior no experimento 14 com proporção material vegetal/solvente de 12 mg mL⁻¹, temperatura de extração de 25 °C e tempo de extração de 20 minutos.

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO EM TANINOS TOTAIS
DO PÓ DAS FOLHAS DE *E. dysenterica***

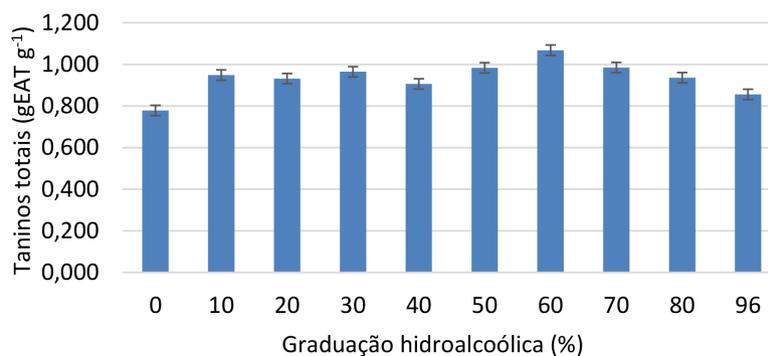


Figura 1. Triagem experimental dos teores hidroalcoólicos para selecionar o nível com maior influência na extração dos taninos totais presentes no pó das folhas de *E. dysenterica*

Tabela 3. Planejamento experimental do tipo Box Behnken e as concentrações de taninos totais no pó das folhas de *E. dysenterica*

EXPERIMENTO	X ₁ (mg mL ⁻¹)	X ₂ (°C)	X ₃ (minutos)	Taninos totais (gEAT g ⁻¹)
1	16	40	10	0,47
2	16	35	20	0,60
3	16	25	30	0,46
4	20	35	10	0,41
5	12	40	20	0,65
6	20	40	20	0,38
7	20	35	30	0,47
8	12	35	10	0,62
9	12	35	30	0,51
10	16	35	20	0,52
11	16	40	30	0,44
12	20	25	20	0,36
13	16	35	20	0,51
14	12	25	20	0,79
15	16	25	10	0,54

X₁ proporção material vegetal/solvente, X₂ temperatura de extração e X₃ tempo de extração

Ao analisar o Diagrama de Pareto (Figura 2) nota-se que a variável proporção material vegetal/solvente linear (L) foi significativa ao nível de 5%, apresentando influência significativa no processo de extração dos taninos totais no pó. A determinação da proporção material vegetal/solvente com melhor conteúdo de taninos totais foi estabelecida através da metodologia de superfície de resposta (Figuras 3 e 4), sendo 12 mg mL⁻¹ mais efetiva em comparação com as demais concentrações incluídas no estudo (16 e 20 mg mL⁻¹). As variáveis tempo e temperatura de extração, envolvidas no planejamento experimental do tipo *Box-Behnken*, não apresentaram interferência significativa frente à concentração de taninos totais extraídos do pó (Figuras 3 e 4).

Cada solução possui o seu coeficiente de solubilidade específico que é responsável por indicar a quantidade máxima de soluto (material vegetal) que pode se dissolver

em uma quantidade padrão de solvente, a uma determinada temperatura e pressão.¹⁶ Ao analisar o resultado fornecido através da metodologia de superfície de resposta (Figuras 3 e 4), nota-se que os metabólitos secundários presentes em 12 mg do pó foram solubilizados em 1 mL de solução. Contudo não atingiram o ápice do coeficiente de solubilidade. Esse processo pode ser classificado como solução insaturada ou não saturada, conforme observado nas concentrações de 13 e 14 mg mL⁻¹, estabelecida pelo *Software Statistica 7.0*, que continuam mostrando resultados significativos, embora inferiores em comparação a 12 mg mL⁻¹, frente a extração dos taninos totais. Já a quantidade de material vegetal existente nas concentrações de 16 e 20 mg mL⁻¹ atingiram a supersaturação, há mais soluto dissolvido de acordo com as condições normais. Após a extração o extrato obtido passa pelo processo de filtração, cujas partículas dos metabólitos

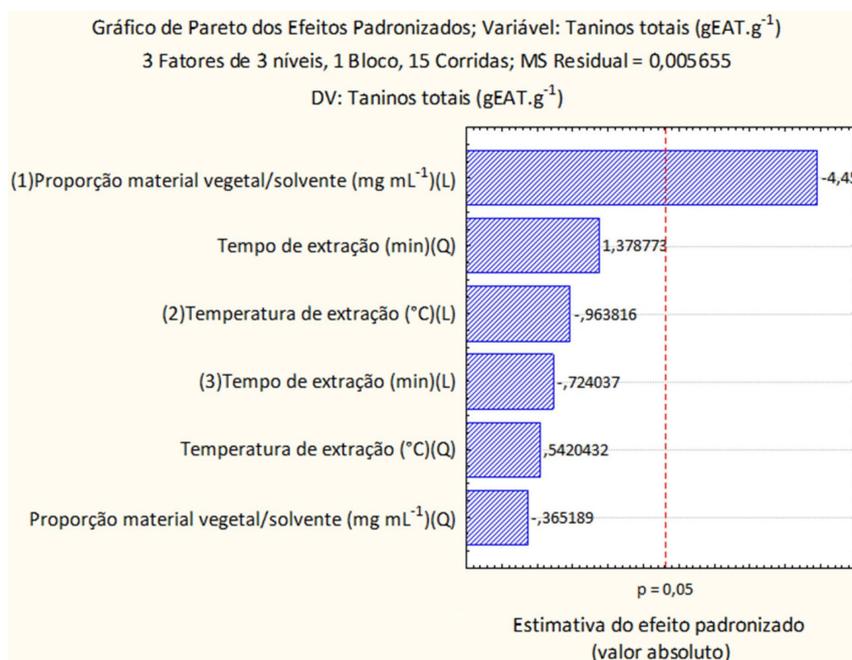


Figura 2. Gráfico de Pareto referente às variáveis analisadas na extração de taninos totais presentes no pó das folhas de *E. dysenterica*

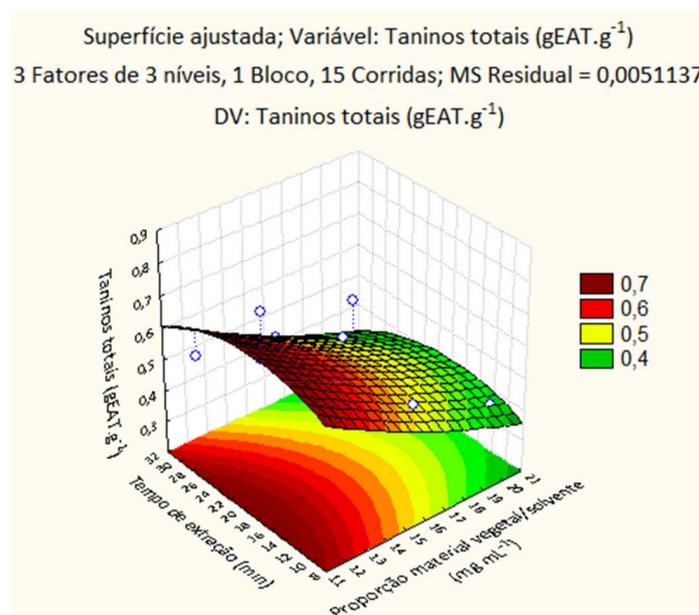


Figura 3. Gráfico de superfície de resposta da concentração de taninos totais obtido da extração do pó das folhas de *E. dysenterica* em função da proporção material vegetal (mg mL⁻¹) vs tempo de extração (min)

secundários que precipitaram no meio externo e/ou não foram dispersos para o meio extracelular podem ficar retidos no papel filtro. Assim, não fornecendo resultados significativos em relação ao conteúdo de taninos totais.

3.3. Obtenção do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica*

A solução hidroetanólica 60% e a concentração de 12 mg mL⁻¹ (proporção material vegetal/solvente) definida

respectivamente pela triagem experimental dos teores hidroalcoólicos e pelo planejamento experimental do tipo *Box-Behnken* foram significativas no processo de extração dos taninos totais e, portanto, consideradas como fatores essenciais para a obtenção do extrato bruto hidroetanólico padronizado.

O extrato padronizado com elevado teor de taninos totais foi empregado para quantificar os compostos fitoquímicos (taninos totais, fenóis totais e flavonoides totais), avaliar a atividade antioxidante (DPPH e ABTS^{•+})

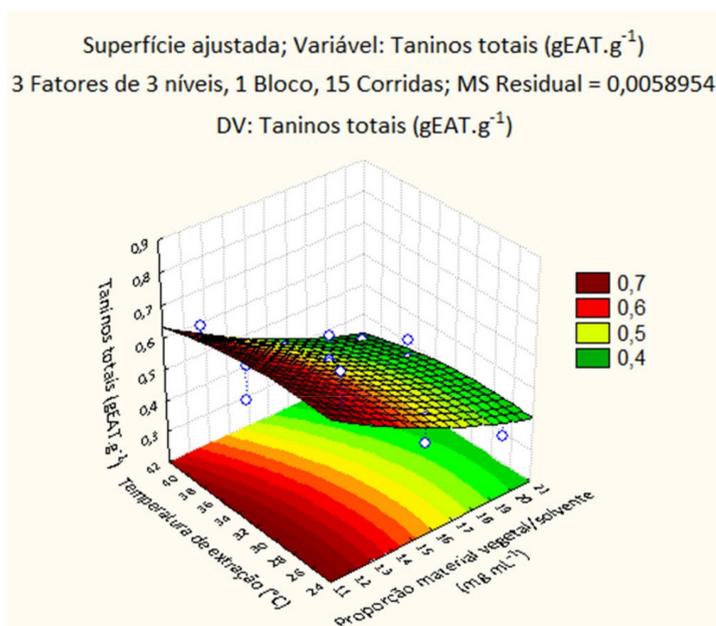


Figura 4. Gráfico de superfície de resposta da concentração de taninos totais obtido da extração do pó das folhas de *E. dysenterica* em função da proporção material vegetal (mg mL⁻¹) vs temperatura de extração (°C)

e atividade antimicrobiana. O rendimento do extrato bruto hidroetanólico padronizado após todo o processo de extração e evaporação do solvente extrator foi de 30,80%.

3.4. Doseamento de taninos totais do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica*

A quantidade de taninos totais encontrado no extrato bruto hidroetanólico padronizado foi de $1,71 \pm 0,001$ g EAT g⁻¹ de amostra. Outros estudos encontraram valores de $95,22 \pm 1,84$ µg mg⁻¹ de taninos totais no pó das folhas de *E. dysenterica* coletadas em Nova América, Goiás,³² e $19,32 \pm 0,15\%$ (m m⁻¹) no extrato hidroalcoólico das folhas.³³ Estudos mostraram que taninos, tais como: procianidina, prodelfinidina e procianidina o-galato, identificadas no extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) podem estar associados à atividade citoprotetora da mucosa gástrica e efeito antidiarreico em camundongos.⁵ Efeito protetor sobre a mucosa intestinal também foi relatado por Lima *et al.*³⁴ que observaram a ação inibidora do extrato etanólico das folhas de *E. dysenterica*, na dose de 400 mg kg⁻¹, frente ao trânsito intestinal em ratos, estando em conformidade com o uso popular dessa planta como antidiarreico. Silva *et al.*³⁵ sugerem que os metabólitos secundários voláteis e não voláteis presentes nas folhas de *E. dysenterica* podem auxiliar no processo de cicatrização de feridas na pele a partir da estimulação da migração celular promovendo a inibição do óxido nítrico, efeito anti-inflamatório. As funções terapêuticas atribuídas pelos taninos de *E. dysenterica* demonstraram seu efeito medicinal.

3.5. Doseamento dos compostos fenólicos totais do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica*

A concentração de fenóis totais encontrada no extrato bruto hidroetanólico padronizado foi de 6,23 mg EAG mg⁻¹ de amostra no presente estudo. Couto *et al.*³² que verificaram no pó das folhas de *E. dysenterica* concentração de fenóis totais de $177,32 \pm 5,35$ µg mg⁻¹, Takao *et al.*³⁶ observaram no extrato aquoso do pó das folhas de *E. dysenterica* concentração de 412,10 ± 17,20 mg EAG g⁻¹, no extrato etanólico das folhas de *E. dysenterica* concentração de 204 ± 1,10 mg g⁻¹.³⁷ Tomborelli *et al.*³⁸ observaram para a fração de acetato de etila da polpa de *E. dysenterica* concentração de fenóis totais de 2,98 mg EAG g⁻¹ e para a fração butanólica de 1,47 mg EAG g⁻¹ e Rocha *et al.*³⁹ de 111 a 90 mg de EAG por 100 g de polpa. Donado-Pestana *et al.*⁴⁰ comprovaram que o extrato bruto metanólico da polpa de *E. dysenterica* rica em polifenóis protegeu os camundongos machos e obesos contra a dislipidemia, hiperglicemia de jejum, intolerância à glicose, reduziu a gliconeogênese hepática e a inflamação. Os compostos fenólicos presentes nos frutos de *E. dysenterica* pode ter influenciado na redução do peso corporal, das gorduras excessivas nos tecidos, do LDL-colesterol e dos níveis de triglicerídeos no fígado; na prevenção da hipoglicemia em jejum, da hipertrigliceridemia e do acúmulo hepático de triacilglicerol e na excreção fecal de triglicerídeos em camundongos que receberam uma dieta rica em gordura e sacarose.⁴¹ Os níveis de glicose no sangue após ingestão de alimentos ricos em carboidratos reduziram 64% após a ingestão de sucos dos frutos da cagaita que pode ser devido à presença dos compostos fenólicos.⁴²

Silva *et al.*⁴³ identificaram, por espectrometria de massas com ionização *paper spray* (PS-MS), a presença de ácidos orgânicos, açúcares, flavonoides e ácidos fenólicos (ácido p-cumárico) na polpa de *E. dysenterica*. Estudos na literatura relatam a presença de compostos fenólicos em outras espécies de Myrtaceae como ácido gálico e antocianinas na polpa dos frutos de *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC., identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);⁴⁴ rutina, isoquercitrina, luteolina-7-O-rutinosídeo, ácido mandélico, naringenina, luteolina-7-O-glicosídeo, quercetina, ácido elágico e ácido salicílico foram detectados nas folhas de *Eugenia involucrata* DC. por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem HPLC-MS/MS⁴⁵ e no extrato etanólico dos frutos foram identificados por cromatográfico líquido de alta performance com detector de arranjo de diodos (PDA) os compostos fenólicos epicaquina, catequina, rutina, ácido elágico, miricetina e quercetina.⁴⁶

3.6. Doseamento de flavonoides totais do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica*

O conteúdo de flavonoides totais no extrato bruto hidroetanólico padronizado encontrado foi de $4,70 \pm 0,003$ mg de rutina por mg de amostra. Outros estudos mostraram teor de flavonoides totais no extrato hidroetanólico das folhas de *E. dysenterica* coletadas em Campo Grande, Minas Gerais, de $147 \pm 1,40$ mg g⁻¹,³⁷ no pó das folhas coletadas em Nova América, Goiás, de $6,10 \pm 0,19$ µg mg⁻¹,³² na fração metanólica de $0,04$ µg mg⁻¹, na fração acetato de etila de $0,05$ mg mg⁻¹ e na fração butanólica de 21 mg g⁻¹.⁴⁷ Santos *et al.*⁴⁸ observaram teores de flavonoides na polpa de *E. dysenterica* atomizada de $42,93$ mg por 100 g de amostra, nos frutos fresco de $7,07$ mg por 100 g de amostra e na polpa congelada dos frutos de $4,86$ mg por 100 g de amostra. Foi encontrada teores de flavonoides nas frações orgânicas dos extratos aquoso bruto de 14 ± 9 mg equivalente a quercetina (EQ) g⁻¹ de amostra e extrato bruto hidroetanólico de $6,30 \pm 3$ mg EQ g⁻¹ de amostra da polpa dos frutos de *E. dysenterica*.⁴⁹

Vitek⁵⁰ identificaram os flavonoides derivado da quercetina [3-O-β-(6''-galoilglicopiranosídeo) e 3-O-β-galactopiranosil] no extrato bruto metanólico das folhas de *E. dysenterica* coletadas em Poconé, Mato Grosso. O uso popular das folhas dessa espécie como antidiarreico pode estar relacionado com o metabólito secundário quercetina que foi capaz de controlar o efeito da diarreia em camundongos.⁵¹ A quercetina possui como mecanismo de ação a inibição do movimento intestinal, diminuição da permeabilidade da cavidade abdominal e ação antioxidante nos hepatócitos primários de ratos intoxicados com etanol,⁵² podendo ser utilizado como medicamento fitoterápico para prevenir o estresse oxidativo.⁴³ Vitek *et al.*⁵⁴ isolaram das folhas de *E. dysenterica* os flavonoides 3-O-β-glicopiranosil-β-sitosterol, metil 3-hidroxi-4-metoxibenzoato, metil 4-hidroxifenil propionato, E-metil-

4-hidroxicinamato, quercetina-3-O-β-d-galactopiranosídeo e quercetina-3-O-(6''-O-galloil)-β-d-glicopiranosídeo. Verificaram efeito citotóxico da quercetina-3-O-(6''-O-galloil)-β-d-glicopiranosídeo contra leucemia de célula T aguda e linhagens de células Kasumi-1, apresentando potencial antileucêmico.

Os metabólitos secundários produzidos pelas espécies vegetais são influenciados pelas condições ambientais, tais como: sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta e nutrientes do solo,⁵⁵ o que pode justificar a variabilidade da concentração de taninos totais, fenóis totais e flavonoides totais entre o extrato bruto hidroetanólico padronizado e os dados da literatura.

O processo extrativo e o método de doseamento também são fatores que podem contribuir na melhor quantificação desses compostos bioativos. Isso justifica o presente trabalho que ao padronizar as características do processo de extração e método de doseamento, contribui para um extrato de melhor qualidade fornecendo teores de taninos totais, fenóis totais e flavonoides totais padrões.

3.7. Determinação das atividades antioxidantes do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica* pelo método de captura do radical livre DPPH

O extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica* apresentou uma atividade antioxidante muito forte pelo método DPPH com concentração inibitória (IC₅₀) de $2,70 \pm 0,005$ µg mL⁻¹. Malheiros *et al.*⁵⁶ verificaram a atividade antioxidante por DPPH dos extratos etanólico, hidroetanólico (70:30) e hidroetanólico (50:50) das folhas de *E. dysenterica* com IC₅₀ de 730; 1680 e 1830 µg mL⁻¹, respectivamente. A polaridade do solvente extrator pode ser um dos fatores que influencia na extração dos metabólitos secundários com potencial antioxidante visto que a proporção hidroetanólica de 70:30 e 50:50 não teve uma boa afinidade com os compostos de interesse quando comparado com a solução hidroetanólica 60% (m m⁻¹).⁵⁷ A IC₅₀ encontrada no presente estudo também foi boa em comparação com a atividade antioxidante encontrada na literatura por DPPH das folhas ($8,30$ µg mL⁻¹), do extrato da polpa ($132,50$ µg mL⁻¹), da casca ($21,50$ µg mL⁻¹) e da semente ($23,80$ µg mL⁻¹) de *E. dysenterica*.⁵⁸ Justino *et al.*⁵⁹ observaram pelo método DPPH a atividade antioxidante no extrato aquoso bruto com IC₅₀ de 240 µg mL⁻¹, na fração de acetato de etila do extrato aquoso com IC₅₀ de 230 µg mL⁻¹ e no extrato etanólico com IC₅₀ de 10 µg mL⁻¹ da polpa dos frutos de *E. dysenterica*.

3.8. Determinação da atividade antioxidante do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica* pelo método captura do radical ABTS⁺

Os metabólitos secundários presentes no extrato bruto hidroetanólico padronizado foram analisados quanto à capacidade em reduzir o radical ABTS⁺ e, assim, atuando

quimicamente como antioxidante pela estabilização desse radical livre.²⁵ A atividade antioxidante do extrato bruto hidroetanólico padronizado apresentou uma ótima atividade antioxidante pelo método de captura do radical ABTS^{•+} com concentração de $3479,21 \pm 0,001 \mu\text{M trolox g}^{-1}$. Silva *et al.*¹² observaram atividade antioxidante utilizando o mesmo método dos frutos de *E. dysenterica* em diferentes regiões, cujos valores foram de $9,34 \pm 0,34 \mu\text{M trolox g}^{-1}$ de amostra (Paraopeba), $6,44 \pm 0,26 \mu\text{M trolox g}^{-1}$ de amostra (Sete Lagoas) e $6,80 \pm 0,19 \mu\text{M trolox g}^{-1}$ de amostra (Prudente de Moraes). Santos *et al.*⁴⁸ que verificaram atividade antioxidante dos frutos de *E. dysenterica* coletados na Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás de $517,04 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$ (polpa atomizada), de $357,73 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$ (polpa congelada) e de $276,07 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$ na polpa fresca. Não foi encontrado na literatura estudos antioxidantes empregando o método ABTS nas folhas de *E. dysenterica*.

Os radicais livres são moléculas instáveis que desencadeiam diversas anormalidades à saúde humana como o envelhecimento precoce, na patogênese de doenças crônicas incluindo o câncer, aterosclerose, doença cardiovascular, diabetes, doença de Parkinson e Alzheimer, lesão hepática e imunológica.⁶⁰ Thomaz *et al.*¹³ observaram através dos ensaios eletroquímicos que a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. dysenterica* coletadas em Trindade, Goiás, foi termodinamicamente viável, auxiliando no efeito neuroprotetora em camundongos. O extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica*, coletadas em Brasília, em combinação com o digluconato de clorexidina promoveram o aumento da ação citoprotora na mucosa gengival humana, o efeito sinérgico na viabilidade celular pode estar associado aos compostos antioxidantes presentes no extrato.¹⁴ Ferreira-Nunes *et al.*⁶¹ verificaram que as formulações do sistema microemulsionante do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) do extrato aquoso de folhas de *E. dysenterica*, coletadas em Brasília, resultaram no aumento da atividade antioxidante *in vitro* em comparação com a catequina isolada, proporcionando tecnologia farmacêutica para o desenvolvimento de novos produtos dermatológicos promissores no tratamento de doenças da pele.

3.9. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica*

O extrato bruto hidroetanólico padronizado apresentou atividade antimicrobiana moderada contra *C. gattii* ATCC 24.065 (CIM de $256 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *C. neoformans* ATCC 28.957 (CIM de $128 \mu\text{g mL}^{-1}$) e fraca contra *C. neoformans* ATCC 90.112 (CIM de $512 \mu\text{g mL}^{-1}$), *C. neoformans* (L2) (CIM de $512 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *C. glabrata* ATCC 90.050 (CIM de $512 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 4).

De acordo com a literatura verificou-se a atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* forte contra *C. neoformans* (CIM de

$24 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *C. gattii* (CIM de $24 \mu\text{g mL}^{-1}$).⁶¹ As frações aquosas do extrato das cascas e folhas de *Eugenia calycina* foram fortes contra *Cryptococcus* sp. (CIM de $15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$) e as frações hexânicas do extrato aquoso foram fortes frente *C. gattii* L48, *C. neoformans* L3 (CIM de $31,20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Cryptococcus* sp. D (CIM de $62,50 \mu\text{g mL}^{-1}$).⁶² O óleo essencial extraído das folhas de *E. dysenterica* apresentou atividade moderada contra 22 cepas de *Cryptococcus* com CIM de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ e forte contra três cepas de *Cryptococcus* com CIM de $62,50$; $31,25$ e $15,60 \mu\text{g mL}^{-1}$.⁶³

A criptococose é uma micose sistêmica adquirida através da inalação dos propágulos dos fungos *C. neoformans* (agente oportunista encontrado nas excretas de aves como *Columba livia*) e *C. gattii* (localizado em eucaliptos e material vegetal em decomposição) dispersos no meio ambiente. A doença afeta inicialmente o pulmão (criptococose pulmonar) podendo se desencadear para o sistema nervoso central resultando em meningite criptocócica e meningoencefalite (sua forma clínica mais grave e recorrente).⁶⁴ O tratamento medicamentoso dessa micose geralmente é a anfotericina B (AmB), associada ou não a outros antifúngicos, principalmente, fluconazol (FZ) e 5-fluorocitosina (5-FC). No entanto, pesquisas relatam à resistência dos mesmos aos antifúngicos administrados.⁶⁵

O extrato bruto hidroetanólico padronizado não apresentaram atividade antibacteriana contra os microrganismos testados (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica* frente ao crescimento ou inibição microbiana visível

Microrganismos	Extrato bruto hidroetanólico padronizado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Fungos	
<i>C. gattii</i> ATCC 24.065	256
<i>C. neoformans</i> ATCC 28.957	128
<i>C. neoformans</i> ATCC 90.112	512
<i>C. neoformans</i> (L2)	512
<i>C. albicans</i> ATCC 90.028	1024
<i>C. albicans</i> ATCC 10.231	> 2048
<i>C. krusei</i> ATCC 34.135	1024
<i>C. krusei</i> ATCC 6.285	1024
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	2048
<i>C. glabrata</i> ATCC 90.030	1024
<i>C. glabrata</i> ATCC 90.050	512
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22.019	> 2048
Bactérias Gram-negativas	
<i>E. coli</i> ATCC 8.739	> 2048
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27.853	> 2048
<i>Salmonella</i> sp. ATCC 14.028	> 2048
Bactérias Gram-positivas	
<i>S. aureus</i> ATCC 29.213	> 2048

4. Conclusões

O teor de voláteis do pó das folhas de *E. dysenterica* foi de $9,06 \pm 0,20\%$, índice de intumescência de $0,83 \text{ mL g}^{-1}$ de amostra (água destilada) e $0,43 \text{ mL g}^{-1}$ de amostra (solução hidroetanólica 60%), teor de cinzas totais de $1,99 \pm 0,01\%$ e cinzas insolúveis em ácido de $0,22 \pm 0,01\%$. O presente estudo fornece dados para o controle de qualidade do pó das folhas de *E. dysenterica* ainda não padronizados na literatura.

Foi padronizado o extrato bruto hidroetanólico padronizado de *E. dysenterica* a partir da solução hidroetanólica 60% e proporção material vegetal/solvente de 12 mg mL^{-1} a 25°C por 20 minutos. A concentração de taninos totais no extrato bruto hidroetanólico padronizado foi de $1,71 \pm 0,001 \text{ g EAT g}^{-1}$, de fenóis totais de $6,23 \text{ mg EAG mg}^{-1}$ e de flavonoides de $4,70 \pm 0,003 \text{ mg}$ de rutina por mg. Observou-se a atividade antifúngica moderada do extrato bruto hidroetanólico padronizado contra *C. gattii* (CIM de $256 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *C. neoformans* (CIM de $128 \mu\text{g mL}^{-1}$) e elevada atividade antioxidante pelo método DPPH (IC_{50} de $2,70 \pm 0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$) e pelo método ABTS ($3479,21 \pm 0,001 \mu\text{M trolox g}^{-1}$). O potencial antioxidante está relacionado aos compostos fenólicos presentes nesse extrato. Este trabalho representa a primeira padronização do extrato bruto hidroetanólico de *E. dysenterica* em taninos totais.

A boa atividade antifúngica do extrato bruto hidroetanólico padronizado faz da *E. dysenterica* uma espécie promissora como alternativa no tratamento de patologias não responsivas aos antifúngicos existentes no mercado. A boa atividade antioxidante, possivelmente associada à presença dos compostos fenólicos, estimula novos estudos deste extrato padronizado para ser utilizado na indústria de alimentos e/ou de cosméticos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES, Código de Financiamento 001); do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

Referências Bibliográficas

- Naves, R. V.; Borges, J. D.; Chaves, L. J.; A cagaiteira. *Revista Brasileira de Fruticultura* **2002**, *24*, 1. [Crossref]
- Fagundes, N. C. A.; Oliveira, G. L.; Souza, B. G.; Etnobotânica de plantas medicinais utilizadas no distrito de Vista Alegre, Claro dos Poções – Minas Gerais. *Revista Fitos* **2017**, *11*, 62. [Link]
- Silva, R. S. M.; Chaves, L. J.; Naves, R. V.; Characterization of cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruits and tree in southeastern region of Goiás state, Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura* **2001**, *23*, 330. [Crossref]
- Silva, S. M. M.; Silva, C. A. G.; Fonseca-Bazzo, Y. M.; Magalhães, P. O.; Silveira, D.; *Eugenia dysenterica* Mart. Ex DC. (cagaita): planta brasileira com potencial terapêutico. *Infarma Ciência Farmacêutica* **2015**, *27*, 49. [Crossref]
- Prado, L. C. S.; Silva, D. B.; Oliveira-Silva, G. L.; Hiraki, K. R. N.; Canabrava, H. A. N.; Bispo-da-Silva, L. B.; The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2014**, *37*, 722. [Crossref] [PubMed]
- Gasca, C. A.; Catillo, W. O.; Takahashi, C. S. Fagg, C. W.; Magalhães, P. O.; Fonseca-Bazzo, Y. M.; Silveira, D.; Assessment of anti-cholinesterase activity and cytotoxicity of cagaita (*Eugenia dysenterica*) leaves. *Food and Chemical Toxicology* **2017**, *109*, 996. [Crossref] [PubMed]
- Queiroz, J. M. G.; Suzuki, M. C. M.; Motta, A. P. R.; Nogueira, J. M. R.; Carvalho, E. M.; Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. *Fitos* **2015**, *9*, 73. [Crossref]
- Cruz, A. V. M.; Kaplan, M. A. C.; Uso medicinal de espécies das famílias myrtaceae e melastomataceae no Brasil. *Floresta e Ambiente* **2004**, *11*, 47. [Link]
- Ferrão, B. H.; Oliveira, H. B.; Molinari, R. F.; Teixeira, M. B.; Fontes, G. G.; Amaro, M. O. F.; Rosa, M. B.; Carvalho, C. A.; Importância do conhecimento tradicional no uso de plantas medicinais em Buritis, MG, Brasil. *Ciência e Natura* **2014**, *36*, 321. [Link]
- Conceição, G. M.; Ruggieri, A. C.; Araujo, M. F. V.; Conceição, T. T. M. M.; Conceição, M. A. M. M.; Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. *Scientia plena* **2011**, *7*, 1. [Link]
- Monteiro, J. M.; Albuquerque, U. P.; Araújo, E. L.; Amorim, E. L. C.; Taninos: uma Abordagem da Química à Ecologia. *Química Nova* **2005**, *28*, 892. [Crossref]
- Silva, M. R.; Freitas, L. G.; Souza, A. G.; Araújo, R. L. B.; Lacerda, I. C. A.; Pereira, H. V.; Augusti, R.; Melo, J. O. F.; Antioxidant activity and metabolomic analysis of cagaitas (*Eugenia dysenterica*) using paper spray mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2019**, *30*, 1034. [Crossref]
- Thomaz, D. V.; Peixoto, L. F.; Oliveira, T. S.; Fajemiroye, J. O.; Neri, H. F. S.; Xavier, C. H.; Costa, E. A.; Santos, F. C. A.; Gil, E. S.; Ghedini, P. C.; Antioxidant and neuroprotective properties of *Eugenia dysenterica* leaves. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2018**, *2018*, 1. [Crossref] [PubMed]
- Costa, C. R. R.; Amorim, B. R.; Silva, S. M. M.; Acevedo, A. C.; Magalhães, P. O.; Guerra, E. N. S.; In vitro evaluation of *Eugenia dysenterica* in primary culture of human gingival fibroblast cells. *Brazilian Oral Research* **2019**, *33*, e-035. [Crossref]
- Oliveira, D. C. S.; Kaneko, T. M.; Young, M. C. M.; Murakami, C.; Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Eugenia dysenterica* DC essential oil. *Emerging Science Journal* **2018**, *2*, 410. [Crossref]

16. Silva, R. S.; Barbieri, H. B.; Ferreira, H. S.; Silva, C. A.; Nebo, L.; Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos bioativos da espécie *Caryocar brasiliense*. *Research, Society and Development* **2021**, *10*, e41310916493. [[Crossref](#)]
17. Brasil. Farmacopeia Brasileira 6ª edição. Agência Nacional de Vigilância Sanitária **2019**, 1. [[Link](#)]
18. Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S.; *Statistics for Experimenters*, 2ª edição, Wiley: New York, 1978.
19. Mole, S. A.; Waterman, P. G.; A critical analysis techniques for measuring tannins in ecological studies. *Oecologia* **1987**, *72*, 137. [[Crossref](#)]
20. Rodrigues, T. S.; Guimarães, S. F.; Rodrigues-Das-Dôres, R. G.; Gabriel, J. V.; Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai* **2011**, *13*, 587. [[Crossref](#)]
21. Agbor, G.; Vinson, J.; Donnelly, P. E.; Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* **2014**, *3*, 147. [[Link](#)]
22. Rolim, A.; Maciel, C. P. M.; Kaneko, T. M.; Consiglieri, V. O.; Salgado- Santos, I. M. N.; Velasco, M. V. R.; Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) commercial extract. *Journal of AOAC International* **2005**, *88*, 1015. [[Crossref](#)]
23. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **1995**, *28*, 25. [[Crossref](#)]
24. Scherer, R.; Godoy, H. T.; Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* **2009**, *112*, 654. [[Crossref](#)]
25. Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Jiménez, J. P.; Calixto, F. D. S.; Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. *Comunicado técnico: 128*, **2007**. [[Link](#)]
26. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-tenth edition. CLSI Document M07-A10. *Clinical and Laboratory Standards Institute* **2015**. [[Link](#)]
27. CLSI. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard-second edition. CLSI Document M38-A2. *Clinical and Laboratory Standards Institute* **2008**. [[Link](#)]
28. Paula, J. A. M.; Silva, M. R. R.; Costa, M. P.; Diniz, D. G. A.; Sá, F. A. S.; Alves, S. F.; Costa, E. A.; Lino, R. C.; Paula, J. R.; Phytochemical analysis and antimicrobial, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of two chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
29. Holetz, F. B.; Pessini, G. L.; Sanches, N. R.; Cortez, D. A. G.; Nakamura, C. V.; Filho, B. P. D.; Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 1027. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
30. Correia, D. C. C.; Assunção, C. T.; Damião, V. H. B.; Martins, A. P. C.; Coelho, E. M. P.; Métodos de extração de metabólitos secundários da planta jovem de capim limão (*Cymbopogon citratus*) para identificação por cromatografia líquida de alta eficiência. *Brazilian Journal of Development* **2023**, *9*, 22251. [[Crossref](#)]
31. Oliveira, E. S.; Cardoso, D. T.; Barbosa, R. T. P.; Costa, N. B.; Santos, B. A.; Sousa, T. C.; Mouchrek, A. N.; Teles, A. M.; Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias isoladas de saladas de restaurantes do tipo *self-service*. *Research, Society and Development* **2022**, *11*, 1. [[Crossref](#)]
32. Couto, R. O.; Valgas, A. B.; Bara, M. T. F.; Paula, J. R.; Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia* **2009**, *6*, 59. [[Crossref](#)]
33. Couto, R. O.; Martins, F. S.; Chaul, L. T.; Conceição, E. C.; Freitas, L. A. P.; Bara, M. T. F.; Paula, J. R.; Spray drying of *Eugenia dysenterica* extract: effects of in-process parameters on product quality. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2013**, *23*, 115. [[Crossref](#)]
34. Lima, T. B.; Silva, O. N.; Silva, L. P.; Rocha, T. L.; Grossi-de-Sá, M. F.; Franco, O. L.; Leonardez, E.; *In vivo* effects of cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) leaf extracts on diarrhea treatment. *Hindawi* **2010**, *2011*, 1. [[Crossref](#)]
35. Silva, S. M. M.; Costa, C. R. R.; Gelfuso, G. M.; Guerra, E. N. S.; Nóbrega, Y. K. M.; Gomes, S. M.; Pic-Taylor, A.; Fonseca-Bazzo, Y. M.; Silveira, D.; Magalhães, P. O.; Wound healing effect of essential oil extracted from *Eugenia dysenterica* DC (myrtaceae) leaves. *Molecules* **2018**, *24*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
36. Takao, L. K.; Imatomi, M.; Gualtieri, S. C. J.; Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). *Brazilian Journal of Biology* **2015**, *75*, 948. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
37. Santana, L. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2016. [[Link](#)]
38. Tomborelli, P. M.; Oliveira, M. L.; Oliveira, M.; Costa, D. L. M. G.; Resumos do 58º Congresso Brasileiro de Química, São Luís, Brasil, 2018. [[Link](#)]
39. Rocha, W. S.; Lopes, R. M.; Silva, D. B.; Vieira, R. F.; Silva, J. P.; Agostini-Costa, T. S.; Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do Cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura* **2011**, *33*, 1215. [[Link](#)]
40. Donado-Pestana, C. M.; Santos-Donado, P. R.; Daza, L. D.; Belchior, T.; Festuccia, W. T.; Genovese, M. I.; Cagaita fruit (*Eugenia dysenterica* DC.) and obesity: role of polyphenols on already established obesity. *Food Research International* **2018**, *103*, 40. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
41. Donado-Pestana, C. M.; Belchior, T.; Genovese, M. I.; Phenolic compounds from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit prevent body weight and fat mass gain induced by a high-fat, high-sucrose diet. *Food Research International* **2015**, *77*, 177. [[Crossref](#)]
42. Balisteiro, D. M.; Araujo, R. L.; Giacaglia, L. R.; Genovese, M. I.; Effect of clarified Brazilian native fruit juices on postprandial glycemia in healthy subjects. *Food Research International* **2018**, *100*, 196. [[Crossref](#)]

43. Silva, P. R.; Mendonça, H. O. P.; Nogueira, L. A.; Paula, A. C. C. F. F.; Guedes, M. N. S.; Augusti, R.; Araújo, R. L. B.; Silva, M. R.; Reina, L. D. C. B.; Melo, J. O. F.; Avaliação biométrica e físico-química e estudo do perfil químico da *Eugenia dysenterica*. *Ciências Agrárias: o avanço da ciência no Brasil* **2021**, *1*, 366. [[Link](#)]
44. Braga, E. C. O.; Pacheco, S.; Santiago, M. C. P. A.; Godoy, R. L. O.; Jesus, M. S. C.; Martins, V. C.; Souza, M. C.; Porte, A.; Borguini, R. G.; Compostos bioativos de frutos de *Eugenia punicifolia*: uma rica fonte de licopeno. *Brazilian Journal of Food Technology* **2023**, *26*, 1. [[Crossref](#)]
45. Cipriani, A.; Sousa, A. L.; Tenfen, A.; Siebert, D. A.; Gasper, A. L.; Vitali, L.; Mücke, G. A.; Alberton, M. D.; Phenolic compounds of *Eugenia involucrata* (Myrtaceae) extracts and associated antioxidant and inhibitory effects on acetylcholinesterase and α -glucosidase. *Natural Product Research* **2020**, *6*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
46. Girardelo, J. R.; Munari, E. L.; Dallorsoleta, J. C. S.; Cechinel, G.; Goetten, A. L. F.; Sales, L. R.; Reginatto, F. H.; Chaves, V. C.; Smaniotto, F. A.; Somacal, S.; Emanuelli, T.; Benech, J. C.; Soldi, C.; Winter, E.; Conterato, G. M. M.; Bioactive compounds, antioxidant capacity and antitumoral activity of ethanolic extracts from fruits and seeds of *Eugenia involucrata* DC. *Food Research International* **2020**, *137*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
47. Caxeiro, G. C.; Crepaldi, V. B.; Alves, A. B.; Luz, T. E. R.; Barros, W. M.; Costa, D. L. M. G.; Resumos do Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, Brasil, 2017. [[Link](#)]
48. Santos, M. N. G.; Silva, E. P.; Godoy, H. T.; Silva, F. A.; Celestino, S. M. C.; Pineli, L. L. O.; Damiani, C.; Effect of freezing and atomization on bioactive compounds in cagaíta (*Eugenia dysenterica* DC) fruit. *Food Science and Technology* **2018**, *38*, 600. [[Crossref](#)]
49. Justino, A. B.; Moura, F. R. B.; Franco, R. R.; Espindola, F. S.; α -Glucosidase and non-enzymatic glycation inhibitory potential of *Eugenia dysenterica* fruit pulp extracts. *Food Bioscience* **2020**, *35*, 2212. [[Crossref](#)]
50. Vitek, R.; *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Mato Grosso, 2013. [[Link](#)]
51. Gálvez, J.; Crespo, M. E.; Jiménez, J.; Suárez, A.; Zarzuelo, A.; Antidiarrhoeic activity of quercitrin in mice and rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1993**, *45*, 157. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
52. Zhang, W.; Chen, B.; Wang, C.; Zhu, Q.; Mo, Z.; Mechanism of quercetin as an antidiarrheal agent. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* **2003**, *23*, 1029. [[PubMed](#)]
53. Liu, S.; Hou, W.; Yao, P.; Zhang, B.; Sun, S.; Nussler, A.; Liu, L.; Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Toxicology in Vitro* **2010**, *24*, 516. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
54. Vitek, R.; Novais, L. M. R.; Torquato, H. F. V.; Paredes-Gamero, E. J.; Carvalho, M. G.; Sousa Jr., P. T.; Jacinto, M. J.; Silva, V. C.; Chemical constituents and antileukemic activity of *Eugenia dysenterica*. *Natural Product Research* **2017**, *31*, 1930. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
55. Bonilla, O. H.; Lecena, E. M. P.; Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. *Iheringia Série Botânica* **2018**, *73*, 31. [[Crossref](#)]
56. Malheiros, R. P.; Mapeli, A. M.; Machado, L. L.; Atividades antioxidante e alelopática de extratos foliares obtidos de *Eugenia dysenterica*. *Ciência e Natura* **2016**, *38*, 601. [[Crossref](#)]
57. Freire, J. M.; Abreu, C. M. P.; Rocha, D. A.; Corrêa, A. D.; Marques, N. R.; Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. *Ciência Rural* **2013**, *43*, 2291. [[Crossref](#)]
58. Justino, A. B.; Silva, H. C. G.; Franco, R. R.; Pimentel, I. O. C.; Silva, N. F.; Saraiva, A. L.; Flavonoids and proanthocyanidins-rich fractions from *Eugenia dysenterica* fruits and leaves inhibit the formation of advanced glycation end-products and the activities of α -amylase and α -glucosidase. *Journal of Ethnopharmacology* **2022**, *285*, 114902. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
59. Justino, A. B.; Moura, F. R. B.; Franco, R. R.; Espindola, F. S.; α -Glucosidase and non-enzymatic glycation inhibitory potential of *Eugenia dysenterica* fruit pulp extracts. *Food Bioscience* **2020**, *35*, 2212. [[Crossref](#)]
60. Oliveira, A. C.; Pinto, C. A. S. O.; Baby, A. R.; Bedin, V.; Velasco, M. V. R.; Efeitos do ácido ascórbico no combate ao envelhecimento cutâneo. *BWS Journal* **2018**, *1*, 1. [[Link](#)]
61. Ferreira-Nunes, R.; Silva, S. M. M.; Souza, P. E. N.; Magalhães, P. O.; Cunha-Filho, M.; Gratieri, T.; Gelfuso, G. M.; Incorporation of *Eugenia dysenterica* extract in microemulsions preserves stability, antioxidant effect and provides enhanced cutaneous permeation. *Journal of Molecular Liquids* **2018**, *265*, 408. [[Crossref](#)]
62. Júnior, J. A. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Brasília Faculdade de Ciências da Saúde, 2016. [[Link](#)]
63. Ferreira, F. P. S.; Morais, S. R.; Bara, M. T. F.; Conceição, E. C.; Paula, K. R.; Carvalho, T. C.; Vaz, V. G.; Costa, H. B.; Romão, W.; Rezende, M. H.; *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, *99*, 89. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
64. Rial, R. C.; Merlo, T. C.; Santos, P. H. M.; Melo, S. L. D.; Freitas, O. N.; Barbosa, R. A.; Nazário, C. E. D.; Viana, L. H.; Fatty acid content and physicalchemical properties of cagaíte seed oil (*Eugenia dysenterica* DC) obtained by different extraction methods. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2023**, *34*, 785. [[Crossref](#)]
65. Bastos, A. L.; Manrique, E. J. C.; Trilles, L.; Lazéra, M. S.; Melhem, M. S. C.; Oliveira, G. C.; Silva, K. O. G.; Furtado, A. C. S.; Rodrigues, D. X.; Soares, A. J.; Costa P. S. S; Perfil clínico-epidemiológico da criptococose associada e não associada à infecção pelo HIV na região Centro-Oeste do Brasil. *Brazilian Journal of Development* **2022**, *8*, 18214. [[Crossref](#)]