



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**MARIA JAIANA GOMES FERREIRA**

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS**  
**AQUOSOS DAS FOLHAS DA AROEIRA-DO-SERTÃO (*Myracrodruon urundeuva***  
**Allemão) E SUA APLICAÇÃO COMO CONSERVANTE NATURAL EM QUEIJO**  
**FRESCAL ULTRAFILTRADO**

**FORTALEZA**

**2021**

MARIA JAIANA GOMES FERREIRA

POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS AQUOSOS  
DAS FOLHAS DA AROEIRA-DO-SERTÃO (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) E SUA  
APLICAÇÃO COMO CONSERVANTE NATURAL EM QUEIJO FRESCAL  
ULTRAFILTRADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Larissa Moraes Ribeiro da Silva.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- F442p     Ferreira, Maria Jaiana Gomes.  
            Potencial antibacteriano e antioxidante de extratos aquosos das folhas da aroeira-do-sertão  
            (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) e sua aplicação como conservante natural em queijo fresco  
            ultrafiltrado / Maria Jaiana Gomes Ferreira. – 2021.  
            140 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-  
            Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2021.  
            Orientação: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.  
            Coorientação: Profa. Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva.
1. Compostos bioativos. 2. Micrografia. 3. Simulação gastrointestinal. 4. Toxicidade. 5. Matriz alimentar.
- I. Título.

---

CDD 664

MARIA JAIANA GOMES FERREIRA

POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS AQUOSOS  
DAS FOLHAS DA AROEIRA-DO-SERTÃO (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) E SUA  
APLICAÇÃO COMO CONSERVANTE NATURAL EM QUEIJO FRESCAL  
ULTRAFILTRADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 07/07/2021.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Larissa Moraes Ribeiro da Silva (Coorientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr<sup>ª</sup>. Celli Rodrigues Muniz  
Embrapa Agroindústria Tropical

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Joelia Marques de Carvalho  
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana de Siqueira Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Francisco e Socorro pela educação e por sempre estarem ao meu lado apoiando nas minhas decisões, pelos ensinamento de valores e princípios éticos, resultando em quem sou e tendo todos os méritos por qualquer conquista minha. Sonhamos juntos, conquistamos juntos!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por iluminar sempre meu caminho e me ajudar a tomar as decisões corretas, pela oportunidade de aprendizagem, pela força e persistência a mim concedida.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) pelo curso oferecido, toda estrutura disponibilizada e oportunidade de crescimento profissional.

À minha orientadora, Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, por ter continuado me orientando nessa caminhada que vem desde o mestrado. Muito obrigada por toda estrutura laboratorial, todos os ensinamentos, pela confiança e por acreditar que eu era capaz de desenvolver a pesquisa.

À minha coorientadora, Larissa Moraes Ribeiro da Silva, por sempre estar presente em todos os momentos me incentivando e apoiando, pela parceria e amizade contruída nesse período.

A todos os professores do PPGCTA que contribuíram para o meu crescimento profissional com seus ensinamentos.

A caminhada não estaria completa sem as amigas, Elayne Cardoso de Vasconcelos e Flayanna Gouveia Braga Dias, obrigada pela amizade e por dividirem comigo as alegrias e angústias.

À Embrapa Agroindústria Tropical, representada pela Celli Rodrigues Muniz, obrigada pelos conhecimentos que dividiu comigo, pelas belas imagens de microscopia e pelas boas conversas.

À Sabrina Matias dos Santos e Nayara Coriolano de Aquino por cederem às amostras e compartilharem conhecimentos.

À minha família, Francisco, Socorro, Márcio e Michel, pela nossa união e por dividirem sempre todos os momentos. Obrigada pelo companheirismo e por acreditar na minha capacidade. Amo muito vocês!

Ao meu esposo, Adehilton, por sempre me apoiar, por me dar força pra seguir em frente mesmo diante das dificuldades, por torcer e festejar a cada vitória.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram e/ou torceram pelo meu sucesso. Obrigada!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

## RESUMO

*Myracrodruon urundeuva* Allemão, popularmente conhecida como “aroeira-do-sertão”, é uma planta medicinal que apresenta em sua constituição diversas substâncias com propriedades bioativas apresentando, desta forma, potencial para aplicação na indústria de alimentos. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano e antioxidante de extratos aquosos das folhas da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) e sua aplicação como conservante natural em queijo frescal ultrafiltrado. Os extratos foram obtidos das folhas secas e frescas cultivadas de *Myracrodruon urundeuva* e quatro diferentes métodos de extração (decocção, infusão, maceração e turbolização). Foi realizada a identificação dos compostos bioativos e quantificação de antioxidantes, compostos fenólicos, taninos e flavonóides dos extratos e testada a atividade antibacteriana sobre Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) avaliando os danos celulares ocasionados pela presença dos extratos. Averigou-se a toxicidade e bioacessibilidade *in vitro* obtendo o percentual de compostos bioativos após digestão gastrointestinal. Para os testes de aplicação foi utilizado o queijo frescal ultrafiltrado com teor normal de gordura e light, o extrato obtido por maceração e *Staphylococcus aureus*. O extrato aquoso obtido por decocção das folhas de aroeira-do-sertão apresentou-se efetivo contra todos os microrganismos testados. A atividade antimicrobiana foi verificada para *S. aureus* e *L. monocytogenes* (0,2 e 0,8 mg/mL respectivamente) e para *S. Enteritidis*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (6, 10 e 16 mg/mL respectivamente). Foram isolados vinte e quatro compostos secundários distribuídos em seis frações. As frações apresentaram atividade antimicrobiana sobre as bactérias Gram-positivas em baixas concentrações (0,011 e 0,095 mg/mL) e duas frações apresentaram atividade sobre bactérias Gram-negativas em concentrações mais elevadas (2,4 e 33 mg/mL). A análise de Ressonância Magnética Nuclear identificou a presença de galotaninos, ácido gálico, flavonóides, derivado da prolina (*N*-Metil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina) e ácido quínico. Os extratos aquosos das folhas secas obtidos por decocção e maceração apresentaram os melhores rendimentos, potencial antioxidante e antimicrobiano. Os danos estruturais bacterianos causados pelos extratos foram rugosidade, perda de parede celular, extravasamento celular e mudança para L- forma. A análise de UPLC-QTOF-MSE dos extratos das folhas secas obtidos por maceração e decocção identificou treze compostos, predominando os flavonóides, taninos, ácido gálico e ácido quínico. Após a digestão gastrointestinal simulada observou-se a presença significativa de compostos bioativos apresentando potencial antioxidante, demonstrando que estes compostos podem estar acessíveis



para as células do trato gastrointestinal e exercer seus benefícios à saúde no organismo. O extrato aquoso das folhas obtido por maceração mostrou-se seguro para aplicação no queijo não apresentando toxicidade nas concentrações utilizadas nos experimentos. A bioacessibilidade de compostos bioativos no queijo adicionado do extrato foi quantificada nos tempos inicial e final. O extrato apresentou potencial para uso como antibacteriano sobre *S. aureus* em queijo fresco ultrafiltrado com teor normal de gordura e light, obtendo mais eficiência no queijo light. Através das microscopias foi possível verificar a presença do *S. aureus* inoculada no queijo e atuação do extrato sobre a membrana plasmática. A presença de compostos bioativos do extrato adicionado ao queijo fresco ultrafiltrado promoveram ação antimicrobiana e antioxidante durante o armazenamento.

**Palavras-chave:** compostos bioativos; micrografia; simulação gastrointestinal; toxicidade; matriz alimentar.

## ABSTRACT

*Myracrodruon urundeuva* Allemão, popularly known as “aroeira-do-sertão”, is a medicinal plant that presents in its constitution several substances with bioactive properties, thus, potential for application in the food industry. In this context, the objective of this work was to evaluate the antibacterial and antioxidant potential of aqueous extracts of the leaves of aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) and its application as a natural preservative in ultrafiltered fresh cheese. The extracts were obtained from fresh and dry cultivated *Myracrodruon urundeuva* leaves and four different extraction methods (decoction, infusion, maceration and turbolization). The identification of bioactive compounds and quantification of antioxidants, phenolic compounds, tannins and flavonoids in the extracts was performed and the antibacterial activity was tested on Gram-positive (*Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) evaluating the cell damage caused by the presence of extracts. *In vitro* toxicity and bioaccessibility were investigated by obtaining the percentage of bioactive compounds after gastrointestinal digestion. For the application tests, ultrafiltered fresh cheese with normal fat and light content, the extract obtained by maceration and *Staphylococcus aureus* was used. The aqueous extract obtained by decoction of aroeira-do-sertão leaves was effective against all tested microorganisms. The antimicrobial activity was verified for *S. aureus* and *L. monocytogenes* (0.2 and 0.8 mg/mL respectively) and for *S. Enteritidis*, *P. aeruginosa* and *E. coli* (6, 10 and 16 mg/mL respectively). Twenty-four secondary compounds distributed in six fractions were isolated. The fractions showed antimicrobial activity against Gram-positive bacteria at low concentrations (0.011 and 0.095 mg/mL) and two fractions showed activity against Gram-negative bacteria at higher concentrations (2.4 and 33 mg/mL). The Nuclear Magnetic Resonance analysis identified the presence of galotannis, gallic acid, flavonoids, proline derivative (*N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-proline) and quinic acid. The aqueous extracts of dry leaves obtained by decoction and maceration showed the best yields, antioxidant and antimicrobial potential. The bacterial structural damages caused by the extracts were roughness, cell wall loss, cell extravasation and change to L-shape. The UPLC-QTOF-MSE analysis of dry leaf extracts obtained by maceration and decoction identified thirteen compounds, predominantly flavonoids, tannins, gallic acid and quinic acid. After simulated gastrointestinal digestion, the significant presence of bioactive compounds with antioxidant potential was observed, demonstrating that these compounds can be accessible to the cells of the gastrointestinal tract and exert their health benefits in the body. The aqueous extract of the

leaves obtained by maceration proved to be safe for application in cheese, not showing toxicity at the concentrations used in the experiments. The bioaccessibility of bioactive compounds in cheese added with the extract was quantified in the initial and final times. The extract showed potencial for use as an antibacterial against *S. aureus* in ultrafiltered fresh cheese with normal fat and light content, obtaining more efficiency in light cheese. Through microscopy it was possible to verify the presence of *S. aureus* inoculated in the cheese and the action of the extract on the plasma membrane. The presence of bioactive compounds from the extract added to ultrafiltered fresh cheese promoted antimicrobial and antioxidant action during storage.

**Keywords:** bioactive compounds; micrography; gastrointestinal simulation; toxicity; food matrix.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS•+	Radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
BOD	Biochemical Oxygen Demand
BST	Brine Shrimp Test
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CENAUREMN	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CEUA	Comitê de Ética Para Uso de Animais
CF	Compostos Fenólicos
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL	Cruzamento de Linhas
DAP	Diâmetro e Altura do Peito
DL <sub>50%</sub>	Dose Letal 50%
D.O	Densidade Óptica
DPPH•	Radical (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)
EAG	Equivalente em Ácido Gálico
EAT	Equivalente em Ácido Tânico
EQ	Equivalente em Quercetina
FFTURB	Folha Fresca por Turbolização
FSTURB	Folha Seca por Turbolização
FFMAC	Folha Fresca por Maceração
FSMAC	Folha Seca por Maceração
FFDEC	Folha Fresca por Decocção
FSDEC	Folha Seca por Decocção
FFINF	Folha Fresca por Infusão
FSINF	Folha Seca por Infusão
HMDS	Hexametildisilazano
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

HSCCC	Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade
IAL	Instituto Adolf Lutz
LAFIPLAN	Laboratório de Análises Fitoquímicas de Plantas Medicinais
LMA	Laboratório de Microbiologia de Alimentos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MHz	Mega-Hertz
NEPAU	Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana
OCDE	Guideline for Testing Acute Toxicity in Fishes
pH	Potencial Hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPM	Rotação por minuto
TSA	Ágar Trypticase de Soja
TSA+YE	Ágar Trypticase de Soja com Extrato de Levedura
TSB	Caldo Trypticase de Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPLC-QTOC-MS <sup>E</sup>	Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplado a um espectrômetro de massa de tempo de voo de quadrupolo de ionização por electrospray operando no modo MS <sup>E</sup>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>A espécie <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Métodos de extração.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.1</b>	<b><i>Maceração</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.2</b>	<b><i>Turbolização</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.3</b>	<b><i>Infusão</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.4</b>	<b><i>Decocção</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3</b>	<b>Atividade antimicrobiana .....</b>	<b>24</b>
<b>3.4</b>	<b>Atividade antioxidante .....</b>	<b>25</b>
<b>3.5</b>	<b>Simulação gastrointestinal <i>in vitro</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>3.6</b>	<b>Identificação e caracterização de metabolitos especiais.....</b>	<b>29</b>
<b>3.7</b>	<b>Toxicidade .....</b>	<b>29</b>
<b>3.8</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura, transmissão e Microscopia Confocal.....</b>	<b>30</b>
<b>3.9</b>	<b>Aplicação de extratos vegetais em queijos.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>6.1</b>	<b>Material vegetal e extração.....</b>	<b>34</b>
<b>6.2</b>	<b>Fracionamento do extrato aquoso por HSCCC.....</b>	<b>35</b>
<b>6.3</b>	<b>Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>7.1</b>	<b>Atividade antimicrobiana de frações de <i>M. urundeuva</i> .....</b>	<b>36</b>

7.2	Atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de <i>M. urundeuva</i> .....	40
8	CONCLUSÃO .....	41
9	CAPÍTULO II.....	42
10	INTRODUÇÃO .....	43
11	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
11.1	Material vegetal .....	44
11.2	Obtenção dos extratos.....	44
11.3	Identificação dos compostos químicos por Ressonância Magnética Nuclear .....	45
11.4	Potencial antimicrobiano.....	45
11.4.1	<i>Preparo do inóculo</i> .....	45
11.4.2	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i> .....	45
11.4.3	<i>Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)</i> .....	46
11.5	Microscopia eletrônica de varredura e transmissão .....	46
12	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
12.1	Ressonância magnética nuclear.....	47
12.2	Potencial antimicrobiano .....	49
12.2.1	<i>Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima</i> .....	49
12.3	Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão .....	52
13	CONCLUSÃO .....	56
14	CAPÍTULO III.....	57
15	INTRODUÇÃO .....	58
16	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
16.1	Material vegetal .....	59
16.2	Obtenção dos extratos .....	59
16.3	Determinação do rendimento e granulometria.....	60
16.4	Determinação de compostos fenólicos totais .....	60
16.5	Potencial antioxidante .....	61

16.5.1	<i>Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS<sup>•+</sup></i>	61
16.5.2	<i>Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical DPPH<sup>•</sup></i>	61
16.6	Quantificação de taninos	62
16.7	Quantificação de flavonóides totais	62
16.8	Análise de UPLC-QTOF-MS <sup>E</sup>	62
16.9	Bioacessibilidade	63
16.9.1	<i>Índices de Bioacessibilidade</i>	63
16.10	Análises estatísticas	64
17	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
17.1	Rendimento e granulometria	64
17.2	Potencial antioxidante, teor de compostos fenólicos, taninos e flavonóides	65
17.3	Análise de UPLC-QTOF-MS <sup>E</sup>	68
17.4	Simulação Gastrointestinal <i>in vitro</i>	71
18	CONCLUSÃO	73
19	CAPÍTULO IV	74
20	INTRODUÇÃO	75
21	MATERIAL E MÉTODOS	76
21.1	Material Vegetal	76
21.2	Obtenção dos Extratos	76
21.3	Determinação do rendimento	76
21.4	Identificação de metabólitos secundários por Ressonância Magnética Nuclear	77
21.5	Determinação de compostos fenólicos totais	77
21.6	Potencial antioxidante	77
21.6.1	<i>Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS<sup>•+</sup></i>	77
21.6.2	<i>Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical DPPH<sup>•</sup></i>	78
21.7	Quantificação de taninos	78
21.8	Quantificação de flavonóides totais	78



21.9	Potencial antimicrobiano .....	78
21.9.1	Concentração inibitória mínima (CIM).....	79
21.9.2	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) .....	79
21.10	Atividade toxicológica frente <i>Artemia salina</i> Leach.....	79
21.11	Análise estatística.....	80
22	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	80
22.1	Rendimento .....	80
22.2	Identificação de metabolitos secundários por Ressonância magnética nuclear ....	81
22.3	Potencial antioxidante, teor de compostos fenólicos, taninos e flavonóides.....	83
22.4	Atividade antimicrobiana.....	85
22.5	Toxicidade por <i>Artemia salina</i> Leach.....	87
23	CONCLUSÃO .....	88
24	CAPÍTULO V.....	90
25	INTRODUÇÃO.....	91
26	MATERIAL E MÉTODOS .....	92
26.1	Obtenção e secagem de folhas de <i>M. Urundeuva</i> .....	92
26.2	Obtenção dos extratos.....	92
26.3	Queijos.....	93
26.4	Toxicidade por <i>Artemia salina</i> Leach.....	93
26.5	Toxicidade <i>in vivo</i> usando Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ).....	93
26.6	Aplicação do FSMAC no queijo frescal ultrafiltrado .....	94
26.6.1	Microrganismo e condições de crescimento .....	94
26.6.2	Preparação, inoculação e armazenamento de amostras .....	95
26.6.3	Avaliação da atividade antimicrobiana de FSMAC em UC1 e UC2 .....	95
26.7	Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Confocal.....	96
26.8	Avaliação de compostos bioativos de FSMAC em UC1 .....	96
26.8.1	Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS• <sup>+</sup> .....	97

26.8.2	<i>Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical DPPH•</i> .....	97
26.8.3	<i>Determinação de compostos fenólicos totais</i> .....	97
26.8.4	<i>Quantificação de taninos</i> .....	98
26.8.5	<i>Quantificação de flavonóides totais</i> .....	98
26.9	<b>Bioacessibilidade</b> .....	98
26.9.1	<i>Índices de Bioacessibilidade</i> .....	99
26.10	<b>Análise Estatística</b> .....	99
27	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	99
27.1	<b>Toxicidade</b> .....	99
27.2	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana de FSMAC em UC1 e UC2</b> .....	101
27.3	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Confocal em UC1</b> .....	105
27.4	<b>Bioacessibilidade de compostos bioativos de FSMAC em UC1</b> .....	107
28	<b>CONCLUSÃO</b> .....	109
29	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	105
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	111
	<b>APÊNDICE A - LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	140
	<b>APÊNDICE B - LISTA DE TABELAS</b> .....	142

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas com finalidade terapêutica, conhecido como fitoterapia, é uma tradição preservada por diversas pessoas e serve como base inicial para estudos que buscam ações farmacológicas (CARNEIRO et al., 2014). A eficácia dos produtos naturais vem sendo elucidado pela comunidade científica (SALESSE et al., 2018) resultando em possíveis aplicações industriais.

Os antimicrobianos são compostos sintéticos ou naturais que tem como finalidade inibir ou destruir microrganismos, atuando diretamente sobre estes (DAVID, STEENSON e DAVIDSON, 2013). Há uma crescente preocupação dos consumidores com relação a produtos sintéticos e a propagação de microrganismos multirresistentes (SHAIKH et al., 2015), o que explica a popularidade dos antimicrobianos naturais.

Entre as plantas de uso popular, *Myracrodruon urundeuva* Allemão, popularmente conhecida como “aroeira-do-sertão”, pertencente à família Anacardiaceae, destaca-se por seu amplo uso popular como anti-inflamatório, cicatrizante, antialérgico e para o tratamento de infecções da pele e mucosas (SÁ, 2008; NAPOLEÃO et al., 2012).

Devido ao metabolismo secundário, os vegetais superiores são capazes de produzir metabólitos especiais tais como, terpenóides, alcalóides, compostos fenólicos (quinonas, taninos e flavonóides), carotenóides e saponinas, sendo utilizados como mecanismo de defesa contra microrganismos, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, e alterando estruturas de membranas dos mesmos (SILVA e FERNANDES JÚNIOR, 2010; MIRANDA et al., 2016).

A aroeira-do-sertão vem se destacando quanto ao seu potencial antimicrobiano e antioxidante. Possuem em sua constituição diversos metabólitos especiais, dentre eles, esteróides, fenóis simples, flavonas, flavonóide, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, saponinas, taninos e xantonas (PINHO et al., 2012). Alguns compostos fenólicos são vistos como antimicrobianos (MUKNE et al., 2011) e antioxidantes (LACHMAN et al., 2010) sendo considerados interessantes para a indústria de conservantes alimentícios.

Galo et al. (2018), define conservantes naturais como substâncias intencionalmente adicionadas aos alimentos capazes de conferir alguma características ou melhorar outras, como as propriedade de armazenamento. Sendo moléculas de origem natural que apresentam atividade biológica na conservação alimentar, tem função antioxidante, se enquadrando na conservação alimentar pela adição de aditivos.

A crescente procura pelos alimentos funcionais e os efeitos benéficos associados ao seu consumo tem estimulado o aumento de pesquisas sobre seu potencial bioativo (HELAL e

TAGLIAZUCCHI, 2018; HIDALGO et al., 2018). Nessas pesquisas são realizadas análises quantitativas e das atividades biológicas dos compostos bioativos, mas a maioria não considera as alterações físico-químicas que ocorrem durante o processo de digestão pelo organismo (CELEP et al., 2017). O modelo de digestão *in vitro*, simulando a digestão humana tem apresentado resultados confiáveis da biacessibilidade de compostos bioativos e da capacidade antioxidante total em produtos vegetais (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013).

Os testes de toxicidade são de importância para a avaliação dos efeitos causados por produtos químicos (SCHOLZ et al., 2013), a *Artemia salina* L. (microcrustáceo) e o zebrafish (*Danio rerio*) adulto (teleósteo) são utilizados na avaliação de toxicidade (BRAUNBECK et al., 2015; LACERDA et al., 2011). O método utilizando a *Artemia salina* L. é proposto como um bioensaio relativamente simples para avaliar atividades farmacológicas e toxicológicas de produtos naturais (ARAÚJO et al., 2010). O zebrafish adulto (*Danio rerio*) foi estabelecido em 2013, pela OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico), como modelo para avaliação de testes de toxicidade agudos e crônicos (OECD, 2013).

Os produtos naturais oriundos de plantas como os extratos aquosos e orgânicos e óleos essenciais, podem estender a vida útil de produtos alimentícios como o queijo, reduzindo ou eliminando a sobrevivência de bactérias patogênicas e melhorando a qualidade geral através da inibição de ranço oxidativo (BANDYOPADHYAY, CHAKRABORTY e RAYCHAUDHURI, 2008).

Neste contexto, pesquisas direcionadas a testar o potencial bioativo de extratos de plantas são essenciais para descobrir novas substâncias com ação antimicrobiana e antioxidante, com o propósito dessas substâncias serem aplicada na indústria de alimentos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial antibacteriano e antioxidante de extratos aquosos das folha de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva*) e sua aplicação como conservante natural em queijo fresco ultrafiltrado.

## 2.2 Objetivos específicos

- a) Realizar a coleta e herborização do material vegetal;
- b) Obter os extratos aquosos das folhas frescas e secas da aroeira-do-sertão;
- c) Obter a granulometria e o rendimento dos extratos;
- d) Avaliar a atividade antimicrobiana das frações e dos extratos aquosos das folhas secas e frescas da aroeira-do-sertão;
- e) Determinar a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais, taninos e flavonóides dos extratos aquosos das folhas secas e frescas da aroeira-do-sertão;
- f) Identificar compostos bioativos nos extratos aquosos das folhas secas e frescas da aroeira-do-sertão;
- g) Avaliar a toxicidade aguda dos extratos aquosos das folhas da aroeira-do-sertão;
- h) Verificar o mecanismo de ação antimicrobiana dos extratos aquosos das folhas secas da aroeira-do-sertão;
- i) Avaliar a bioacessibilidade *in vitro* dos compostos bioativos dos extratos aquosos das folhas secas da aroeira-do-sertão;
- j) Verificar a ação do extrato aquoso das folhas secas da aroeira-do-sertão aplicado no queijo fresco ultrafiltrado com teor normal de gordura e light;
- k) Avaliar o mecanismo de ação antimicrobiana do extrato aquoso das folhas secas da aroeira-do-sertão sob queijo fresco ultrafiltrado contaminado com *S. aureus*;
- l) Avaliar o potencial antioxidante, teor de compostos fenólicos, taninos, flavonóides e bioacessibilidade *in vitro* nas amostras de queijo fresco ultrafiltrado com teor normal de gordura contendo o extrato aquoso das folhas secas da aroeira-do-sertão.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 A espécie *Myracrodruon urundeuva* Allemão

*Myracrodruon urundeuva* Allemão é conhecida popularmente como “aroeira-preta”, “aroeira-do-sertão” ou “urundeuva”, sendo uma espécie da família Anacardiaceae, de distribuição natural limitada à América do Sul, nativa no Brasil e mais amplamente distribuída nas regiões nordeste, sudeste e centro-oeste, ocorrendo também na região da Bolívia, Paraguai e Argentina (DORNELES et al., 2005). A árvore é caducifólia, atinge de 5 a 20 m de altura e 30 a 60 cm de diâmetro a altura do peito (DAP, 1.30 m do solo) (CARVALHO, 2003).

Geralmente, a espécie floresce entre julho e setembro, e a maturação dos frutos ocorre de setembro a outubro (LORENZI, 1992). No Brasil, país de origem da planta, devido à sua exploração, aroeira-do-sertão foi incluído na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção (GUEDES et al., 2011).

A aroeira-do-sertão possui folhas alternas, com cinco a sete pares de folíolos, ovalado-obtusos, pubescentes em ambas as faces (Figura 1). Suas flores são purpúreas com pêlos e suas sementes estão contidas dentro de frutos drupáceos, pequeninos, globoso-ovais com exocarpo fortemente lignificado e envoltório membranáceo liso. A germinação ocorre em aproximadamente dois dias (QUEIROZ et al., 2002; SILVA, RODRIGUES e AGUIAR, 2002; GUERRA, 2008).

Figura 1. Folhas frescas (a) e folhas secas (b) de aroeira-do-sertão



Fonte: Próprio autor.

Seu potencial farmacológico e uso popular surgem como uma alternativa terapêutica. Atribuído, sobretudo a folhas e cascas do caule, as propriedades medicinais da aroeira-do-sertão se aplicam ao tratamento das afecções urinárias, respiratórias, ação anti-inflamatória e cicatrizante (ANDRADE et al., 2000). A utilização da aroeira-do-sertão abrange diversas possibilidades, possuindo inclusive propriedades antivirais e, em certa medida, validando assim os seus usos tradicionais na medicina popular (CECÍLIO et al., 2012). O chá de folhas tem sido associado com o tratamento de cefaleias, infecções orais e distúrbios gastrointestinais. Dependendo da combinação usada (chá e infusões), a planta é usada para o tratamento de febre, gripe, feridas, diarreia e gastrite, também sendo indicada para reumatismo (CARTAXO et al., 2010).

### 3.2 Métodos de extração

### **3.2.1 Maceração**

A maceração é o método escolhido quando os princípios ativos podem sofrer alteração pelo calor ou pelo ar e são solúveis a temperatura ambiente, em um solvente que não deve ser volátil (MARTÍNEZ e CUÉLLAR, 2001).

É a operação na qual a extração da matéria prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator (processo estático). Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Este processo fica restrito quando se trabalha com substâncias ativas pouco solúveis, plantas com elevado índice de intumescimento e possíveis proliferações microbianas. Apesar dos inconvenientes apresentados, ainda é uma das técnicas extrativas mais usuais devido à simplicidade e custos reduzidos (SCHMIDT, 2005).

### **3.2.2 Turbolização**

Nessa técnica, a extração ocorre concomitantemente com a redução do tamanho da partícula, resultado da aplicação de elevadas forças de cisalhamento em rotações de 2000 a 5000 rpm. A redução drástica do tamanho de partícula e o consequente rompimento das células favorece a rápida dissolução das substâncias, resultando em tempos de extração da ordem de minutos e o quase esgotamento da droga (SIMÕES et al., 2010).

### **3.2.3 Infusão**

A extração ocorre pela permanência, por aproximadamente 30 minutos, do material vegetal em água fervente, num recipiente tapado. A infusão é aplicável a partes vegetais moles, as quais devem ser contundidas, cortadas ou pulverizadas, a fim de que possam ser mais facilmente penetradas e extraídas pela água (SIMÕES et al., 2010).

### **3.2.4 Decocção**

A decocção consiste em manter o material vegetal em contato, por aproximadamente 15 minutos, com um solvente (normalmente água) em ebulição. É uma técnica de emprego restrito, pois muitas substâncias ativas são alteradas por um aquecimento prolongado e costuma-se empregá-la com materiais vegetais duros e de natureza lenhosa (SIMÕES et al., 2010; PANDEY e TRIPATHI, 2014).

### 3.3 Atividade antimicrobiana

O estudo da atividade antimicrobiana, geralmente é baseado em microrganismos de importância epidemiológica, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, responsáveis por diferentes processos etiológicos tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes imunocomprometidos (ANTUNES et al., 2006; CATÃO et al., 2010).

Os compostos advindos das plantas medicinais capazes de inibir o crescimento de patógenos ou matá-los, além de apresentar toxicidade mínima para as células hospedeiras são consideradas candidatas para o desenvolvimento de novos antimicrobianos não somente pela atividade individual de um determinado composto bioativo, mas pela possibilidade de associados a outros produtos produzirem tal efeito (ASKARI et al., 2012). Estes compostos são metabólitos secundários, grupo diversificado de moléculas que possuem atividades biológicas envolvidas nos mecanismos de adaptação da planta a seu meio (DASH et al., 2011; PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Os principais grupos de compostos extraídos das plantas com atividade antimicrobiana incluem os terpenóides, alcalóides, lectinas, polipeptídeos, substâncias fenólicas e polifenóis (fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides), taninos e cumarinas (PINTO, 2008).

Ao longo dos anos, alguns estudos *in vitro* demonstraram que o extrato de aroeira-do-sertão apresentou potencial antimicrobiano frente a bactérias e fungos. Essa atividade antimicrobiana é atribuída aos biocompostos presentes nos derivados da planta, como uma lectina purificada extraída do caule, que apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium callunae*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium fusarioides* (SÁ et al., 2009).



Extrato hidroalcoólico e aquoso das folhas de aroeira-do-sertão coletadas em Selviria no estado do Mato Grosso do Sul, também mostraram atividade antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* e *Corynespora cassiicola*, reduzindo em até 100% o crescimento fúngico (NARUZAWA e PAPA, 2011). Alves et al. (2009) também observaram que o extrato hidroalcoólico tem atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*.

Além de agir sozinho, o extrato de aroeira-do-sertão é capaz de atuar em associação com antimicrobianos, como eritromicina, clindamicina, gentamicina e amicacina, potencializando sua ação (FIGUEREDO et al., 2014; JANDÚ et al., 2013).

Além da forma livre (planctônica), microrganismos podem ser encontrados associados em biofilmes. Biofilmes de bactérias e/ou fungos apresentam alta resistência a antimicrobianos e desinfetantes, causando infecções que persistem mesmo com tratamento adequado. Isso se deve a vários fatores presentes no biofilme que podem aumentar a resistência das células a antimicrobianos em até 1000 vezes (VAN et al., 2014).

Alguns estudos relatam que extratos de aroeira-do-sertão apresentam efeitos contra biofilmes microbianos, como aqueles formados por *Lactobacillus casei*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus imitis*, *Streptococcus mutans* (ALVES et al., 2009), *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, *in vitro* (JÚNIOR et al., 2011) e *in vivo* (MENEZES et al., 2010).

### 3.4 Atividade antioxidante

O termo antioxidante pode ser definido como uma classe heterogênea de moléculas naturais, que presentes em baixas concentrações, são geralmente usados para inibir, prevenir ou retardar a deterioração pela oxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Há um crescente interesse de pesquisadores na identificação de substâncias antioxidantes, principalmente a partir de produtos naturais oriundos de plantas. Assim, uma das técnicas atualmente utilizadas para detectar a capacidade antioxidante de compostos é o método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•). O radical DPPH• é bastante conhecido e apresenta muitas vantagens, tais como uma boa estabilidade na ausência da luz, aplicabilidade, simplicidade e viabilidade (DENG, CHENG e YANG, 2011; SCHERER e GODOY, 2009).

Segundo Moon e Shibamoto (2009), o método DPPH• é utilizado em mais de 90% dos estudos de avaliação antioxidante de substâncias puras, misturas ou matrizes complexas.

Outro método utilizado para medir a atividade antioxidante se baseia na captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

Os compostos fenólicos são substâncias bioativas, possuindo um grande grupo diversificado de metabólitos secundários que são amplamente distribuídos em todas as plantas (HATAMNIA et al., 2014). Em frutas, vegetais e condimentos alimentares, foram detectados a presença de diversos compostos fenólicos, tais como, monoterpenos (óleos etéreos), fenóis diterpenos (ácido carnósico, carnosol, rosmanol e epirosmanol), ácidos fenólicos (ácido rosmarínico e ácido caféico), flavonóides (procianidinas, quercitina, miricetina e luteolina), ácidos triterpenos (ácido ursólico e ácido oleanólico) e óleos voláteis (eugenol, timol e carvacrol) (MAHESWARAPPA et al., 2014), com o objetivo de serem aplicados em alimentos.

Os polifenóis pertencem a uma classe de biocompostos que incluem uma diversidade de estruturas, simples e complexas, amplamente distribuídas no reino vegetal, que devido a sua grande diversidade química, apresentam uma variedade de funções, contribuindo para o sabor, odor e coloração de diversas plantas, sendo importantes economicamente (FULLER, 2008).

Os compostos fenólicos incluem mais de oito mil estruturas químicas e podem ser classificados pelo número e arranjo de seus átomos de carbono, sendo divididos em pelo menos dez grupos: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, isocumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonóides e ligninas (CROZIER et al., 2009).

Os taninos são compostos polifenólicos distribuídos em plantas, alimentos e bebidas, possuem peso molecular relativamente elevado solúveis em água, formam complexos razoavelmente fortes com proteínas e outros polímeros. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas molestias como, por exemplo, o tratamento de feridas, já que possuem um poder antisséptico, devido a sua capacidade de precipitar proteínas das células superficiais das mucosas e dos tecidos, formando uma camada protetora, impedindo o desenvolvimento de microrganismos (DIAS et al., 2011).

Os antioxidantes podem ser de grande benefício para a melhoria da qualidade de vida, já que eles têm a capacidade de proteger um organismo dos danos causados pelos radicais livres, prevenindo ou adiando o início de várias doenças, como cardiovasculares, crônicas (câncer, aterosclerose, artrite reumática e hipertrofia muscular) e neurodegenerativas (mal de Alzheimer) (ALAM, BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; TINKEL, HASSANAIN e KHOURI, 2012; BORUT e RAJA, 2012).

### 3.5 Simulação Gastrointestinal *in vitro*

A digestão humana é um processo complexo no qual os alimentos ingeridos se transformam em nutrientes que podem ser utilizados pelo corpo tanto para o crescimento e manutenção das células quanto como energia. A principal função do sistema digestivo humano é a transferência de nutrientes, água e eletrólitos provenientes dos alimentos para o corpo (GUERRA et al., 2012).

A bioacessibilidade pode ser definido como a quantidade de composto solubilizado no intestino delgado e disponível para absorção subsequente. Este processo compreende a liberação de compostos da matriz alimentar e sua estabilidade sob a condição gastrointestinal (GAWLIK-DZIKI, 2012; TAGLIAZUCCHI et al., 2010). Estudos definitivos sobre a bioacessibilidade de compostos bioativos requerem experimentos *in vivo* com humanos. No entanto, os métodos *in vitro* também provaram ser útil na determinação de sua estabilidade em condições gastrointestinais (TOYDEMIR et al., 2013). Os métodos *in vitro* são aplicados a um sistema de digestão gastrointestinal simulada usando  $\alpha$ -amilase na fase bucal, pepsina na fase gástrica e uma mistura de pancreatina e sais biliares durante o período no trato intestinal. O elemento difundido através de uma membrana semipermeável na fase intestinal é usado como medida da bioacessibilidade de compostos (KULKARNI et al., 2007).

A fração de compostos bioativos liberados da matriz alimentar após a digestão que é solubilizada no intestino para a absorção intestinal é normalmente conhecida como fração bioacessível (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2015). Portanto, é interessante utilizar a ferramenta de bioacessibilidade (*in vitro*) para estimar a estabilidade digestiva dos constituintes alimentares de um composto em estudo, através de sistemas que simulem as condições gastrointestinais já que os estudos *in vitro* se mostram bem correlacionados com os *in vivo* (HELENO et al., 2015). Além disso, este recurso tem ampla aceitação no âmbito científico (APEA-BAH et al., 2016; PETRAT-MELIN et al., 2016).

### 3.6 Identificação e caracterização de metabolitos especiais

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas aplicadas para identificação e caracterização de metabolitos especiais, qualitativa e quantitativa altamente reprodutível e não seletiva, ou seja, não depende das características químicas dos compostos observados como polaridade e acidez (pKa) (MARKLEY et al., 2017).

A RMN é uma das técnicas mais importantes para a caracterização de estruturas moleculares em todos os estados físicos (líquido, sólido e de material heterogêneo) da matéria (WINNING et al., 2008). Vem sendo empregada em estudos de plantas, tanto para a elucidação estrutural de moléculas previamente isoladas e purificadas, quanto para o estudo de frações enriquecidas ou mesmo extratos brutos de alta complexidade (KIM, CHOI e VERPOORTE 2011; SCHRIPSEMA, 2010).

Nas últimas décadas, A RMN tem sido aplicada majoritariamente a estudos metabolômicos ao possibilitar a análise simultânea de diversos grupos de compostos oriundos do metabolismo secundário (flavonóides, alcalóides, terpenóides, etc) e primários (açúcar, ácidos orgânicos e aminoácidos). Tal aplicabilidade realiza uma comparação direta da concentração dos compostos sem a necessidade de se elaborar curvas de calibração, o que requer o uso de substâncias de referência de alto grau de pureza, muitas vezes rara e de difícil obtenção (PILON et al., 2020).

Desse modo, a espectroscopia de RMN pode fornecer detalhes de informações estruturais, químicas e eletrônicas de praticamente qualquer molécula (orgânica e inorgânica). Uma análise cuidadosa dos espectros obtidos pode fornecer informações precisas da dinâmica e estrutura molecular da amostra, bem como interações inter e intramoleculares. É utilizada pela síntese orgânica e inorgânica, química de produtos naturais, bioquímica e físico-química, na determinação de estereoquímica, na análise conformacional e no acompanhamento do curso de uma reação química (RODRIGUES, 2010).

A técnica UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> é uma cromatografia líquida denominada de “ultra-performance” que oferece vantagens significativas na resolução, sensibilidade, velocidade para as determinações analíticas, principalmente quando combinada com espectrômetros de massa capazes de aquisições de alta velocidade. O uso do UPLC é bastante relevante, pois emprega volumes de amostras reduzidos, em razão à dimensão das colunas cromatográficas que são menores que as de HPLC (MALDANER e JARDIM, 2009; 2012).

A UPLC vem sendo aplicada em detecção de impurezas, identificação de metabólitos, estudos farmacocinéticos, análises toxicológicas, estudos metabolômicos e análises de produtos naturais (KHAN e ALI, 2015).

Em contraste com as técnicas habituais de cromatografia em coluna, a cromatografia contracorrente não depende do uso de suporte sólido e utiliza duas fases líquidas imiscíveis para separação de solutos, excluindo assim qualquer chance de adsorção irreversível (ITO et al., 1970; SONG et al., 2017). As características distintas da fase líquida

estacionária e a facilidade com que pode ser ampliado tornam a cromatografia contracorrente um substituto para a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

A cromatografia contracorrente permite o acoplamento com outros instrumentos analíticos, estabelecendo uma hifenização de sistemas on-line. Por esta razão a técnica tem sido amplamente empregado em separações analíticas e/ou preparativas e purificações para um grande número de compostos, incluindo produtos farmacêuticos (HOCHLOWSKI et al., 2009), alcalóides (CRUZ et al., 2016), flavonóides (KHAN e BAKHT, 2016) e fenóis (SHU et al., 2014).

A cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) é composta por um fuso, um eixo de movimento planetário e um par de eixos rotativos. A força centrífuga é empregada para retenção na fase líquida em uma coluna em espiral de multicamadas, enquanto a outra fase é bombeada através desta coluna, aumentando assim a eficácia de separação. A elevada capacidade de carga de amostra, consumo de solvente truncado, ausência de adsorção irreversível de amostra e disponibilidade de uma gama diversificada de modos de eluição contribuem para o surgimento desta técnica como elemento vital, potente e procedimento eficaz preparado (HUANG et al., 2016).

### 3.7 Toxicidade

O bioensaio com *Artemia salina* (BST – Brine Shrimp Test) serve tanto como indicador de toxicidade como de bioatividade de diversas substâncias químicas, inclusive para extratos de plantas. Os testes apresentam vantagens como: rapidez, praticidade, simplicidade, baixo custo, requer pouca quantidade de amostra, além de apresentar uma boa relação com testes *in vivo*, sugerindo que é um método útil e de confiança (PARRA et al., 2001).

Por esse método, é possível determinar a concentração letal 50% (CL50) de componentes ativos e extratos em meio salino, considera-se que valores acima de 1000 µg/mL são considerados atóxicos e quando menor que 1000 µg/mL são considerados tóxicos (MEYER et al., 1982). Há na literatura diversos trabalhos que apresentam uma boa correlação entre os ensaios de toxicidade a *Myracrodruon urundeuva* e distintas atividades biológicas, tais como, antifúngica, antiviral, antimicrobiana, parasiticida, antitumoral, tripanossomicida, dentre outras (PISUTTHANAN et al., 2004).

Algumas espécies de peixes são consideradas bioindicadores, no Brasil a espécie mais utilizada é o *Danio rerio*, conhecida vulgarmente como peixe paulistinha ou peixe zebra (Zebrafish). O *Danio rerio* é um pequeno teleósteo que vem sendo usado mundialmente como

modelo experimental em diversas áreas de pesquisa, como exemplo a toxicologia (EGAN et al., 2009).

O Zebrafish, devido à existência de diversas características biológicas, pode ser utilizado em testes de triagem de alto rendimento, promovendo um aumento na relevância biológica, que é difícil de ser correspondida *in vitro* (LIN et al., 2013). A vantagem chave no teste de bioatividade de pequenas moléculas, utilizando larvas e embriões de Zebrafish é que os compostos podem ser simplesmente diluídos em água não estéril, e as moléculas de baixo peso molecular são rapidamente absorvidas pela pele e brânquias, promovendo aumento da capacidade de análise de centenas de moléculas por dia (ZON e PETERSON, 2005; LANGHEINRICH, 2003).

Segundo Olivi et al. (2008), o efeito medido em estudos de toxicidade aguda com organismos aquáticos é a letalidade ou alguma outra manifestação que a antecede, como por exemplo a imobilidade. Os parâmetros mais utilizados são a DL50 (Dose Letal Média) ou CL50 (Concentração Letal Média) dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição (24 a 96 h).

### **3.8 Microscopia eletrônica de varredura, transmissão e Microscopia Confocal**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) destina-se basicamente ao exame de superfície das amostras, coletando-se elétrons retro espalhados. É também possível a verificação de superfícies internas, se fraturadas e expostas, utilizando-se principalmente de elétrons secundários (SEGALA et al., 2006).

A microscopia eletrônica consiste numa ferramenta importante para avaliar a morfologia das bactérias e podem ser usadas para elucidar alvos celulares envolvidos nas interações bactéria e antibacterianos (SIQUEIRA et al., 2014). Quando se pretende examinar espécimes biológicos que apresentem detalhes delicados (cílios e dobras) na superfície ou ainda outras estruturas que se colapsam facilmente, há necessidade de se proceder à sua fixação para preservar a sua forma tridimensional (SEGALA et al., 2006). De acordo com Pizzolitto (1997) o MEV mostra uma imagem tridimensional, e a superfície topográfica da amostra é revelada com nitidez.

O microscópio eletrônico de transmissão (MET), fornece informações analíticas juntamente com a observação da ultraestrutura ou morfologia do objeto em estudo. De uma maneira geral, o MET funciona como um microscópio fotônico (de luz), com alto poder de resolução (MANNHEIMER, 2002). O emprego do MET é bastante difundido no estudo de

materiais biológicos, pois ele permite definição de imagens intracelulares, estudos de morfologia celular, organização molecular de vírus ou constituintes subcelulares, interação de parasitas celulares, fornecendo informações sobre alterações celulares ocasionados por vírus, fitoplasmas, micoplasmas e bactérias (GALLETI, 2003). Os métodos de preparo visam justamente contornar ou minimizar condições adversas, tornando as amostras resistentes e condutoras. Assim pode-se dizer que o sucesso de uma boa preparação é fundamental para se garantir a melhor imagem do espécimen biológico por microscopia eletrônica (MARCONDES e GARCIA, 2009; BAGNIEWSKA-ZADWORNA et al., 2012).

Uma das principais vantagens da microscopia confocal é a sua capacidade de produzir imagens tridimensionais de diferentes objetos, sejam finos ou espessos. A utilização de técnicas de fluorescência em microscopia tem grande vantagem de permitir a marcação específica de moléculas e estruturas biológicas, fornecendo um método sensível para a observação de processos bioquímicos (GOMES e SOUZA JR, 2010).

A microscopia de fluorescência é fundamental na emissão de luz por um fluoróforo endógeno ou exógeno da amostra e tem se tornado bastante comum, em virtude também da facilidade de manuseio do equipamento. Todavia, o preparo, marcação, análise e processamento das imagens devem ser feitos com o devido cuidado para não levar a interpretações equivocadas dos resultados (NORTH, 2006).

### **3.9 Aplicação de extratos vegetais em queijos**

O interesse de cientistas por extratos de plantas está relacionado ao efeito antimicrobiano que estes apresentam, podendo ser usados como conservante natural em alimentos (COSTA et al., 2015). Nos extratos são encontrados compostos fenólicos, tais como, timol, eugenol, carvacrol, linalol dentre outros, o que explica as propriedades antimicrobianas e antifúngicas (MORO et al., 2013; ASENSIO et al., 2015).

O queijo é um alimento consumido em todo o mundo devido ao seu sabor agradável e alto valor de proteína biológica. Queijos são muito suscetíveis à contaminação por organismos patogênicos e microrganismos de deterioração, que podem diminuir a vida útil, implicando em recalls e levando risco para a saúde do consumidor (GOUVEA et al., 2017). Entre os patógenos, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. são muitas vezes associados a surtos alimentares pelo consumo de queijo (HASSANIEN et al., 2014).

Extratos de produtos aromáticos e plantas medicinais como erva-doce, orégano, alecrim, endro, cominho, pimenta, sálvia, tomilho e salsa demonstraram atividade

antimicrobiana satisfatória *in vitro* contra patógenos e microrganismos de deterioração associados a contaminação em queijo indicando assim grande potencial para uso como conservantes (MORO et al., 2015; CALEJA et al., 2015; HASSANIEN et al., 2014).

Um dos fatores intrínsecos que prejudica a eficácia destes agentes antimicrobianos naturais é o conteúdo lipídico e a proteína presente nos alimentos (GOUVEA et al., 2017). Estas substâncias podem envolver a superfície do microrganismo, formando uma barreira física que impede o contato do composto bioativo com o microrganismo reduzindo assim a eficácia do composto natural (GOUVEA et al., 2017).

Devido a composição do queijo ser rico em proteínas e lipídios, as concentrações de compostos a serem adicionados para atingir uma determinada quantidade de inibição microbiológica deve ser superior aos testados *in vitro* (MORO et al., 2015). Gamariello et al. (2008) relataram que a concentração de compostos ativos usados para inibir o crescimento de microrganismos patogênicos em queijo Fior di Latte foi efetivamente superior ao nível testado *in vitro*. Resultado semelhante foi relatado por Shan et al. (2011), onde a concentração inibitória mínima do óleo essencial de romã contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, não foi superior a 2,5 mg/mL, enquanto que a concentração de 40 mg/mL no queijo Cheddar não conseguiu inibir a mesma população desses microrganismos.

Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008) avaliaram a interferência do lipídio na eficácia da atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano e tomilho em um modelo simulando uma matriz alimentar, e relataram que a adição de lipídios em altas concentrações reduziu a atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes*. Este efeito também foi relatado por Cava et al. (2007), onde a atividade antimicrobiana do óleo essencial de canela e cravo foi reduzida em amostras de leite com maior teor de gordura, enfatizando a importância da avaliação da interação dos óleos essenciais e extratos com a composição do produto.

De maneira semelhante, Hassanien et al. (2014) relataram que a concentração de 0,1% do óleo essencial de cominho resultou na redução do crescimento de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* Enteritidis em meio de cultura, enquanto que no queijo as concentrações não foram eficazes contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Estes resultados mostraram que a concentração de extratos vegetais e óleos essenciais necessária varia de acordo com o microrganismo e sua sensibilidade aos compostos biativos, bem como a composição do alimento.



#### 4. CAPÍTULO I

### ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE AROEIRA-DO-SERTÃO

Maria Jaiana Gomes Ferreira<sup>1\*</sup>

Flayanna Gouveia Braga Dias<sup>1</sup>

Sabrina Matias dos Santos<sup>2</sup>

Nayara Coriolano de Aquino<sup>2</sup>

Eurilany Silva de Oliveira<sup>1</sup>

Larissa Moraes Ribeiro da Silva<sup>1</sup>

Evânia Altina Teixeira de Figueiredo<sup>1</sup>

#### RESUMO

As plantas popularmente usadas no tratamento de diversas doenças, como *Myracrodruon urundeuva* Allemão, tem sido investigada quanto a ação sobre microrganismos visando a descoberta e utilização de novos aditivos naturais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato aquoso e frações das folhas de aroeira-do-sertão. O extrato aquoso foi obtido por decocção das folhas frescas e fracionado por cromatografia em contracorrente de alta velocidade. A atividade antimicrobiana foi realizada utilizando microdiluição em placa. O extrato aquoso das folhas de aroeira-do-sertão foi eficaz contra todos os microrganismos testados. A atividade antimicrobiana foi verificada para *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (0,2 e 0,8 mg/mL respectivamente) e para *Salmonella* Enteritidis, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (6, 10 e 16 mg/mL respectivamente). Foram isolados vinte e quatro compostos secundários distribuídos em seis frações. As frações apresentaram atividade antimicrobiana sobre as Gram-positivas em baixas concentrações (0,011 a 0,095 mg/mL) e em concentrações mais elevadas (2,4 a 33 mg/mL) duas frações apresentaram atividade sobre Gram-negativas. A união dos compostos no extrato foi favorável para atividade antimicrobiana sobre todas as bactérias estudadas, demonstrando que a suscetibilidade dos microrganismos ao extrato variou em função dos compostos químicos presentes.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais; Bactericida; Compostos isolados.

---

1. Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Alimentos, 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brasil. [\\*mjaiana@hotmail.com](mailto:*mjaiana@hotmail.com)

2. Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, 60020-181, Fortaleza, Ceará, Brasil.

## 5. INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de infecções, e isto tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa para o estudo dessa atividade, visando o isolamento de compostos químicos com atividade antimicrobiana, ou a otimização do uso dessas plantas (SILVA et al., 2012).

Vários estudos tem comprovado a eficácia dos extratos de plantas sobre patógenos bacterianos e fúngicos. Pesquisas mostraram que a sensibilidade microbiana indica a efetividade dos extratos utilizados para fins medicinais e como aditivos alimentares (FAWAD et al., 2012).

*Myracrodruon urundeuva* Allemão, conhecida popularmente como “aroeira-do-sertão”, “aroeira-preta”, “urundeuvinha” e “aroeira-do-campo” é encontrada na caatinga e nas matas secas do Ceará, sendo mais frequente na região Nordeste (GALVÃO et al., 2018).

Os compostos com atividade farmacológica de extratos do caule e folhas de *M. urundeuva* são os taninos, chalconas dimericas e flavonóides (GALVÃO et al., 2018). As pesquisas científicas, na sua grande maioria trabalhos *in vitro*, apontam os polifenóis como responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios, antiproliferativos, antioxidantes e antitumorogênicos (ROMANO et al., 2013) e alguns são considerados antimicrobianos (FIGUEREDO et al., 2014). Trentin et al. (2013), propuseram que os taninos obtidos a partir de *Myracrodruon urundeuva*, foram capazes de inibir a formação de biofilme por danificar a membrana bacteriana, tendo assim ação bacteriostática em alguns microrganismos.

Visando o potencial presente nas plantas medicinais e a deficiência de dados na literatura abordando a pesquisa destes como agentes de inibição de crescimento em microrganismos relacionados a alimentos, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato aquoso e frações das folhas de *M. urundeuva*.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Material vegetal e extração

As folhas da espécie *Myracrodruon urundeuva* foram coletadas em agosto de 2015 no Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana – NEPAU (3°44’16.0”S; 38°34’22.6”W) localizado na Universidade Federal do Ceará. O extrato aquoso foi produzido no Laboratório de Análises Fitoquímicas de Plantas Medicinais - LAFIPLAN do Departamento de Química

Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará com número de registro no SisGen A9B8196.

O material vegetal foi pesado (600 g de folhas frescas de *M. urundeuva*) e submetido à trituração manual, sendo posteriormente, submetido a hidrodeslilação com 2,5 L de água destilada por 2 horas. Após esse tempo foi obtido 0,8 mL de óleo essencial e 2,3 L do líquido de decocção. A solução aquosa foi desidratada utilizando um liofilizador (Christ Modelo Alpha 1-2 LD plus), obtendo-se 83,1 g do extrato e o óleo essencial foi armazenado (AQUINO et al., 2019).

## 6.2 Fracionamento do extrato aquoso por HSCCC

O extrato aquoso é muito polar, dessa forma, o isolamento de compostos pode ser dificultado se realizado sob condições cromatográficas normais. Para evitar adsorção irreversível que pode ocorrer com adsorventes polares como gel de sílica, o extrato foi fracionado por cromatografia em contracorrente de alta velocidade (HSCCC - High Speed Counter-Current Chromatography, (Tauto/Shimadzu LC-10A/Knauer) utilizando como sistema de solvente heptano/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (1:5:1:5). Para a purificação das misturas, foi usado em HPLC (Shimadzu Modelo LC-8A), uma coluna semi-preparativa com fase estacionária fenila. A identificação desses compostos foi feita por meio das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (MS), conforme descrito no trabalho anterior (AQUINO et al., 2019). Peso das frações: 34-43 (33 mg); 45-52 (38 mg); 57 (68,3 mg); 71-109 (1,02 g); 122-177 (3,9 mg); 181 (244 mg).

## 6.3 Atividade antimicrobiana

As análises de atividade antimicrobiana foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos – LMA da Universidade Federal do Ceará. As cepas de *Salmonella* Enteritidis IAL-1132, *Pseudomonas aeruginosa* IAL-1026, *Staphylococcus aureus* ATCC-27664 e *Escherichia coli* ATCC-25922 foram cultivadas no meio Ágar Trypticase de Soja – TSA (Difco, Sparks, USA), enquanto *Listeria monocytogenes* ATCC-19115 foi cultivada no mesmo meio de cultura, porém enriquecido com 0,1% extrato de levedura – TSA+YE (Difco, Detroit, EUA). As cepas foram incubadas a 35 °C/24 horas em BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26) e após esse período, colônias isoladas de cada microrganismo foram transferidas para 5 mL do caldo de enriquecimento tripticase de soja -

TSB (Difco, Sparks, USA). Em seguida, foram incubadas a 35 °C/24 horas na BOD para a obtenção de uma concentração bacteriana final de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL para cada microrganismo. A partir dessa concentração foram realizadas diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) a fim de obter uma suspensão bacteriana de 10<sup>5</sup> UFC/mL.

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato aquoso foi determinada sobre o crescimento de bactérias patogênicas pelo método de microdiluição em placas (96 poços, 300 µL de capacidade/poço; Microtest™, Becton Dickinson and Co. (BRANEN e DAVIDSON 2004).

Todas as análises foram realizadas em capela de fluxo laminar (Pachane/modelo 410) com três repetições. O volume total de 200 µL foi distribuído em partes iguais da suspensão bacteriana (10<sup>5</sup> UFC/mL) e solução antimicrobiana. Foram utilizadas as concentrações 0,03 a 16 mg/mL para o extrato e 0,004 a 50 mg/mL para as frações, preparadas com água destilada estéril. Foram utilizados os seguintes poços controles: inóculo, meio de cultura e água destilada estéril (controle positivo) para avaliar a viabilidade do microrganismo testado, assim como poços contendo meio de cultura e soluções antimicrobianas nas concentrações testadas (controle das soluções) para verificar a inocuidade. Ao término das distribuições, foi realizada a leitura de densidade óptica inicial D.O<sub>630nm</sub> (T=0) utilizando um leitor de absorbância em microplacas Elx 808 (Instruments BioTek, Inc. Winooski, VT, EUA). Em seguida, as placas foram incubadas a 35 ± 1 °C durante 24 horas. Após esse período, uma nova leitura de D.O<sub>630nm</sub> (T=24) foi realizada. Foram classificadas como inibitórias as concentrações que apresentaram resultados cuja variação ( $\Delta$ ) das leituras de DO<sub>630nm</sub> foram  $\leq$  0,05 (BRANDT et al., 2010).

Uma alíquota de 100 µL de cada concentração das soluções antimicrobianas testadas que se mostraram inibitórias, foi espalhada nas superfícies das placas (*Spread plate*) contendo o meio TSA/TSA+YE. Em seguida, as placas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas na BOD. A concentração da solução antimicrobiana testada que proporcionou redução de três ciclos logarítmicos (3,0 log<sub>10</sub> UFC/mL) de células viáveis a partir da concentração do inóculo inicial (10<sup>5</sup> UFC/mL) foi classificada como concentração bactericida mínima (BRANEN e DAVIDSON 2004; BRANDT et al., 2010).

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Atividade antimicrobiana de frações de *M. urundeuva*

Estudos preliminares do extrato indicam compostos característicos de galotaninos e outros derivados fenólicos, o que está de acordo com estudos realizados com o extrato etanólico das folhas de aroeira por Silva et al. (2011). A coluna de fase estacionária fenila mostrou-se eficiente na purificação das misturas contendo os compostos de alta polaridade.

Aquino et al. (2019) relacionaram a composição química de seis frações e a identificação de vinte e quatro compostos no extrato aquoso (Tabela 1). A composição das frações: Fração 34-43 (quinic acid; gentisic acid; quercetin 3-*O*-(2''-galloyl)- $\beta$ -D-arabinofuranoside; quercetin 3-*O*-(2''-galloyl)-  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside e quercetin 3-*O*-(3''-galloyl)- $\alpha$ - L-rhamnopyranoside), Fração 45-52 (*m*-digallic acid e *p*-digallic acid), Fração 57 (gallic acid), Fração 71-109 (methyl gallate; 2,3,4,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose; 1,2,3,4,6-Penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose; methyl *m*-digallate; methyl *p*-digallate e 3-*O*-(*m*-digalloyl)-1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose), Fração 122-177 (1-*O*-galloyl-6-*O*-luteoyl- $\alpha$ -glucose; corchoionosíde C; kaempferol 3-*O*-rutinoside; homovitexin; quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside; 1,2,3,4,6-Penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose; rhoifolin e 3-*O*-(*m*-digalloyl)-1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose) e Fração 181 (*N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-proline e quinic acid).

Os compostos químicos encontrados por Pinho et al. (2012) estão de acordo com os encontrados no presente trabalho. Os metabólitos isolados e identificados no extrato das folhas de *M. urundeuva* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Classe de metabólitos do extrato das folhas de *M. urundeuva*.

Classe de Metabólitos	Compostos	Referências
Aminoácido não-proteico	<i>N</i> -Methyl- <i>trans</i> -4-hydroxy-L-proline	(WINKLER, 2006)
Ácido carboxílico	Quinic acid	(KELLEY et al., 1976)
Derivados ácido polifenol carboxílico	Gallic acid/ Pyrogallol/ Gentisic acid/ <i>m</i> -Digallic acid/ <i>p</i> -Digallic acid/ Methyl gallate/ Methyl <i>m</i> -digallate/ Methyl <i>p</i> -digallate	(MOURA et al., 2011)/ (KULKARNI et al., 2008)
Flavonóide	Quercetin	-
Flavonóides glicosilados	Kaempferol 3- <i>O</i> -Rutinoside/ Homovitexin/ Quercetin 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside/ Rhoifolin/ Quercetin 3- <i>O</i> -(2''-galloyl)- $\beta$ -D-arabinofuranoside/ Quercetin 3- <i>O</i> -(2''-galloyl)- $\alpha$ -	(MOON et al., 2001)/ (SOUSA et al., 2014)

	L-rhamnopyranoside/ Quercetin 3- <i>O</i> -(3''-galloyl)- $\alpha$ - L-rhamnopyranoside	
Galotaninos	1- <i>O</i> -Galloyl-6- <i>O</i> -luteoyl- $\alpha$ - glucose/ 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> - galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose/ 1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -galloyl- $\beta$ -D- glucopyranose/ 3- <i>O</i> -( <i>m</i> - digalloyl)-1,2,4,6-Tetra- <i>O</i> - galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose	(WANG et al., 2013)/ (SANTOS et al., 2012)
Megastigmane	Corchoionoside C/9-epi- Blumenol	(YOSHIKAWA et al., 1997)/(MATSUNAMI et al., 2010)

Fonte: AQUINO et al., 2019.

Outros estudos descrevem que flavonóides (flavonas, flavonóis e flavanonóis) (CUSHNIE e LAMB 2005) e saponinas (VERDI et al., 2005) têm atividade antimicrobiana importante. Os compostos fenólicos estão presentes nas frações (Tabela 2) obtidas, estando relacionados com as condições de cultivo da planta, sendo sintetizados como resposta ao estresse, ataque de microrganismos ou radiação UV forte (OLIVEIRA et al., 2016a). O efeito inibitório destes pode ser explicado pela sua interação com as proteínas da membrana bacteriana por meio da ligação de hidrogênio, o que pode resultar em alterações na sua permeabilidade, causando destruição celular ou coagulação do seu conteúdo (OLIVEIRA et al., 2016a).

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana das frações das folhas de *M. urundeuva*.

Frações	Microrganismos									
	<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. Enteritidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
34-43	-	-	0,090	0,095	-	-	-	-	-	-
45-52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	0,040	0,070	0,008	0,011	-	-	-	-	-	-
71-109	0,070	-	0,070	0,085	2,4	2,4	33,0	33,0	33,0	33,0
122-177	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
181	35,0	-	30,0	-	-	-	-	-	45,0	-

Fonte: Próprio autor. CIM= Concentração Inibitória Mínima (mg/mL). CBM= Concentração Bactericida Mínima (mg/mL).

O ácido gálico pode ser considerado um potencial agente antibacteriano e foi encontrado em duas frações em associação com taninos, inclusive na fração 71-109 os resultados mostraram atividade sobre todas as bactérias estudadas e em pequenas concentrações para Gram-positivas. Segundo Borges et al. (2013), o ácido gálico produz alterações irreversíveis nas propriedades da membrana celular bacteriana como mudança de hidrofobicidade, diminuição da carga negativa superficial e ocorrência de ruptura ou formação de poros nas membranas celulares com consequente vazamento de constituintes intracelulares essenciais, como o potássio. Nessa pesquisa os autores evidenciaram atividade antimicrobiana sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* utilizando o ácido gálico corroborando com os resultados desta pesquisa.

O mecanismo de ação dos taninos pode ser explicado por sua capacidade de precipitar as proteínas das células superficiais das mucosas e dos tecidos, formando uma camada protetora, inibindo enzimas, causando uma ruptura da membrana plasmática e privação do substrato microbiano por formar um complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo, impedindo assim, o desenvolvimento de microrganismos (RODRIGUES et al., 2014).

Panizzi et al. (2002) observaram que frações de taninos e outros fenóis extraídos de *Rubus ulmifolius* mostrou alta atividade antimicrobiana. Os taninos apresentaram atividade sobre *P. aeruginosa* e *S. aureus*, variando as concentrações devido ao material vegetal se apresentar seco ou fresco e método de difusão em ágar e disco (RODRIGUES et al., 2014).

Por se tratar de frações, estas foram obtidas em pequenas quantidades principalmente a fração 122-177 e 45-52, fato que dificultou os ensaios não sendo possível encontrar atividade antibacteriana.

Nas frações 34-43 e 57 foi encontrado uma classe de metabólitos em comum, os derivados do ácido polifenol carboxílico e ambas as frações apresentaram apenas atividade para bactérias Gram-positivas em concentrações baixas. De modo geral, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos antimicrobianos de origem vegetal devido à sua membrana externa de lipopolissacarídeo, que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos, enquanto é permeável aos nutrientes (OH et al., 2013).

Segundo Rodrigues et al. (2014), em suas pesquisas demonstrou que isolamento dos taninos melhorou atividade antimicrobiana em relação ao extrato bruto de *Psidium guineense*. Esses dados corroboraram com as frações isoladas no presente trabalho. De acordo com a classificação proposta por Aligianis et al. (2001), CIM valores  $\leq 0,5$  mg/ml são considerados fortemente inibitórios no caso de material vegetal.

A presença do derivado da prolina provavelmente está ligada ao estresse hídrico sofrido pela planta, corroborando com estudos de Gimenez et al. (2013), que mostraram acúmulo de prolina como resposta ao déficit hídrico em cana-de-açúcar. Na fração 181 que continha o derivado da prolina (*N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-proline), foi evidenciado atividade inibitória sobre *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. O derivado da prolina também foi encontrado em *Syderoxylon obtusifolium* outra planta da Caatinga conforme relatado por Aquino et al. (2017).

## 7.2 Atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de *M. urundeuva*

O extrato aquoso das folhas de aroeira-do-sertão apresentou-se efetivo contra todos os microrganismos testados, variando nas concentrações de 0,2 a 16 mg/mL (Tabela 3).

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folha de *M. urundeuva*.

Microrganismos	Extrato aquoso <i>M. urundeuva</i>	
	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>L. monocytogenes</i>	0,04	0,8
<i>S. aureus</i>	0,1	0,2
<i>S. Enteritidis</i>	5,0	6,0
<i>E. coli</i>	6,0	16,0
<i>P. aeruginosa</i>	3,0	10,0

Fonte: Próprio autor. CIM= Concentração Inibitória Mínima. CBM= Concentração Bactericida Mínima.

Para as bactérias Gram-negativas (*S. Enteritidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) foi necessária uma maior concentração do extrato para obtenção de efeito bactericida (Tabela 3). Oliveira et al. (2016a), atribuíram a maior resistência das bactérias Gram-negativas a estrutura e composição celular desses microrganismos, uma vez que a dupla membrana forma um envelope complexo que restringe a penetração da maioria das moléculas, sendo responsável pela resistência destes microrganismos frente aos extratos vegetais.

Pinho et al. (2012), em seu estudo com extrato hidroalcóolico de folhas de aroeira, mostraram através do rastreamento fitoquímico, que as folhas contém metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, tais como, flavonóides (flavanonas e flavanonóis), saponinas, taninos e taninos caquéticos, em concordância com os encontrados no presente estudo. Esses metabólitos foram responsáveis pela atividade antimicrobiana do vegetal, constatando a inibição do crescimento de *S. aureus* em concentrações que variaram de 200 mg/mL a 500 mg/mL, com atividade bacteriostática de 200 mg/mL, mas não houve inibição da *E. coli*.



As concentrações encontradas na presente pesquisa foram bem inferiores, mostrando a importância do solvente na elaboração dos extratos. Já que o extrato aquoso mostrou melhor atividade antibacteriana para Gram-positivas e Gram-negativas quando comparadas com os dados de Pinho et al. (2012) que utilizaram extrato hidroalcolico.

Monteiro et al. (2006a) encontraram maiores quantidades de taninos nas folhas do que na casca de *M. urundeuva*. A ação antimicrobiana dos taninos é conhecida (AKIYAMA et al., 2001), e já foi inclusive constatado que extratos aquosos e acetônicos perdem a atividade frente a bactérias Gram-positivas quando eliminado seu conteúdo de tanino (DJIPA et al., 2000). Trentin et al. (2013) propuseram que os taninos obtidos de plantas da Caatinga, entre elas a *Myracrodruon urundeuva*, foram capazes de inibir a formação de biofilme por danificar a membrana bacteriana, exibindo assim propriedades bacteriostáticas.

As frações isoladas apresentaram importante atividade antimicrobiana sobre Gram-positivas, embora altas concentrações foram necessárias para mostrar atividade antimicrobiana sobre Gram-negativas. A combinação dessas frações teve efeito sinérgico potencializando o extrato analisado, mostrando que com concentrações menores foi possível obter atividade bactericida sobre *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

## 8. CONCLUSÃO

Em conclusão, o extrato aquoso de folhas da aroeira-do-sertão mostrou-se um agente antimicrobiano promissor, pois teve ação sobre *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. Enteritidis* e *P. aeruginosa*. Em virtude da composição das frações obtidas do extrato, uma importante atividade antimicrobiana foi observada em Gram-positivas.

## 9. CAPÍTULO II

### ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANÁLISE MORFOLÓGICA DA AÇÃO DE EXTRATOS DE *Myracrodruon urundeuva* Allemão SOBRE BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.

Maria Jaiana Gomes Ferreira<sup>1\*</sup>

Helen Paula da Silva Costa<sup>2</sup>

Celli Rodrigues Muniz<sup>3</sup>

Larissa Moraes Ribeiro da Silva<sup>1</sup>

Evânia Altina Teixeira de Figueiredo<sup>1</sup>

#### RESUMO

O uso de plantas para fins terapêuticos é uma tradição preservada por pessoas de diferentes partes do Brasil. O conhecimento popular pode ser usado como base para estudos que visam a aplicação de extratos. Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar os extratos aquosos das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão e avaliar a atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como investigar sua ação na integridade das paredes microbianas através do uso de microscopias eletrônicas de varredura e transmissão. Os extratos foram obtidos das folhas secas cultivadas de *Myracrodruon urundeuva* e quatro diferentes métodos de extração (decocção, infusão, maceração e turbolização). A análise de ressonância magnética nuclear identificou a presença de galotaninos, ácido gálico, flavonóides, derivado da prolina (*N*-Metil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina) e ácido quínico, compostos que já foram relatados na literatura por serem responsáveis pela atividade antimicrobiana. O potencial antimicrobiano dos extratos foram observados sobre *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os extratos obtidos por decocção e maceração apresentaram os melhores resultados e as micrografias mostraram os danos estruturais causados pelos extratos, como rugosidade, perda de parede celular, extravasamento celular e mudança para L- forma.

**Palavras-chave:** Métodos extrativos; Compostos químicos; Potencial antimicrobiano; Micrografia; Extravasamento celular.

---

1. Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Alimentos, 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brasil. [\\*mjaiana@hotmail.com](mailto:*mjaiana@hotmail.com)

2. Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular, 60714-903, Fortaleza, Ceará, Brasil.

3. Embrapa Agroindústria Tropical, Laboratório de Bioimagem, 60511-110, Fortaleza, Ceará, Brasil.

## 10. INTRODUÇÃO

Entre as plantas de uso popular, *Myracrodruon urundeuva* Allemão, conhecida como “aroeira-do-sertão”, pertencente à família Anacardiaceae, destaca-se por seu amplo uso como anti-inflamatório, cicatrizante, antialérgico e para o tratamento de infecções da pele e mucosas (NAPOLEÃO et al., 2012; SÁ, 2008).

Muitas pesquisas tentam resolver o problema da resistência aos antibióticos em todo o mundo, e os produtos de origem natural, tais como, extratos vegetais, compostos naturais isolados e óleos essenciais têm apresentado bons resultados, sendo uma alternativa para resolver esse impasse (SIMÕES et al., 2003; SILVA e ALBUQUERQUE 2005).

Estudos demonstraram o potencial antibacteriano dos extratos, óleos essenciais e decoctos de aroeira-do-sertão contra vários patógenos, bem como interações farmacológicas sinérgicas (WINK, 2003). Devido à atividade metabólica secundária, os vegetais superiores são capazes de produzir terpenóides, alcalóides, compostos fenólicos (quinonas, taninos e flavonóides), carotenóides e saponinas, sendo utilizados como mecanismo de defesa contra microrganismos, ativando ou bloqueando reações enzimáticas e alterando estruturas de membranas (MIRANDA et al., 2016; SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010).

O conhecimento das classes de compostos presentes em uma dada planta de interesse é necessário para se determinar os níveis de atividade desses metabólitos (FIGUEREDO et al., 2013). O estudo da atividade antimicrobiana, geralmente é baseado em microrganismos de importância epidemiológica, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Pseudomonas aeruginosa*, responsáveis por doenças transmitidas por alimentos (ANTUNES et al., 2006; CATÃO et al., 2010).

A microscopia eletrônica é uma técnica avançada que tem contribuído com a ciência na medida em que possibilita alcançar detalhes que antes eram imperceptíveis. Ao longo do tempo, o desenvolvimento dos microscópios eletrônicos de varredura (MEV) e transmissão (MET), ambos utilizando feixes de elétrons, possibilitou maior resolução das amostras. O MET oferece a possibilidade de observar o interior de amostras biológicas e detalhes em microestruturas (KESTENBACH e BOTTA FILHO 1989). O MEV permite observar a morfologia celular e alterações celulares ocasionadas por agentes antimicrobianos (GALLETI, 2003).

Neste contexto, este trabalho objetivou caracterizar os extratos aquosos das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão, e avaliar a atividade antimicrobiana sobre bactérias

Gram-positivas e Gram-negativas, assim como investigar sua ação sobre as integridades das paredes microbianas através do uso das microscopias eletrônicas de varredura e transmissão.

## **11. MATERIAL E MÉTODOS**

### **11.1 Material vegetal**

O material vegetal foi identificado por comparação com exsicata do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará depositada com a identificação EAC-46088 e consulta a material especializado (LORENZI, 1998; ALMEIDA et al., 1998). As folhas de aroeira foram obtidas no Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana – NEPAU (3°44'16.0"S; 38°34'22.6"W), localizado na Universidade Federal do Ceará nos meses de dezembro de 2017 e fevereiro de 2018. Logo após a coleta, as folhas foram lavadas em água corrente e secas em estufa à 40 °C/ 48 hs, apresentando umidade inicial de 64 % e umidade final de 12% (AZEVEDO e MOURA 2010).

O material vegetal e as bactérias estão cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número de acesso A9B8196, por meio da Universidade Federal do Ceará.

### **11.2 Obtenção dos extratos**

Para a elaboração dos extratos foram utilizadas folhas secas, seguindo a proporção de 100 g de folha seca para 1000 mL do solvente (água). Foram preparados extratos pelas técnicas de turbolização, maceração, decocção e infusão.

No método da turbolização (FSTURB), as folhas foram trituradas com água destilada a temperatura ambiente (25 °C) em liquidificador industrial por 1 min (ZORTÉA et al., 2015). Na maceração (FSMAC), o material vegetal foi colocado em contato com a água destilada por 18 hs à 25 °C. Na decocção (FSDEC), as folhas trituradas em liquidificador industrial permaneceram em aquecimento na água destilada em uma chapa aquecedora (Fisatom Modelo 752A) por cerca de 5 min à temperatura de 100 °C. Na infusão (FSINF) adicionou-se água destilada aquecida à 80 °C sobre as folhas, permanecendo em repouso por 20 min (BEVILAQUA et al., 2007).

Após elaboração, procedeu-se à filtração dos extratos em papel de filtro e secagem em um liofilizador (Christ Modelo Alpha 1-2 LD plus) obtendo o extrato seco (RODRIGUES et al., 2011).

### **11.3 Identificação dos compostos químicos por Ressonância Magnética Nuclear**

Visando identificar os compostos presentes, os extratos aquosos de aroeira-do-sertão foram submetidos à análise de Ressonância Magnética Nuclear. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance DPX-300 e frequência de 300,13 MHz ( $^1\text{H}$ ), pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear, da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN – UFC).

### **11.4 Potencial antimicrobiano**

#### **11.4.1 Preparo do inóculo**

As cepas de *S. Enteritidis* IAL-1132, *P. aeruginosa* IAL-1026, *E. coli* ATCC-25922 e *S. aureus* ATCC-27664 foram cultivadas no meio Ágar Trypticase de Soja – TSA (Difco, Sparks, USA), enquanto *L. monocytogenes* ATCC-19115 foi cultivada no mesmo meio de cultura enriquecido com 0,1 % extrato de levedura – TSA+YE (Difco, Detroit, EUA), ambas incubadas a 35 °C/24 h em BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26). Após esse período, colônias isoladas de cada microrganismo foram transferidas para 5 mL do caldo Trypticase de Soja - TSB (Difco, Sparks, USA). Em seguida, foram incubadas a 35 °C/24 h em BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26) para a obtenção de uma concentração bacteriana final de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL para cada microrganismo. A partir dessa concentração foram realizadas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) a fim de obter uma suspensão bacteriana de  $10^5$  UFC/mL, utilizada para os ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

#### **11.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

As concentrações inibitórias mínimas dos extratos foram determinadas sobre o crescimento de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* pelo método

de microdiluição em placa (96 poços, 300 µL de capacidade/poço; Microtest™, Becton Dickinson and Co.) (BRANEN e DAVIDSON 2004). A partir das diluições seriadas do inóculo em Caldo TSB (Difco, Sparks, USA), foram distribuídas alíquotas de 100 µL da suspensão bacteriana de  $10^5$  UFC/mL em cada poço em que se desejava testar a atividade antimicrobiana. Em seguida, aos mesmos poços foram adicionadas alíquotas de 100 µL da solução antimicrobiana já diluída em água destilada estéril, de acordo com as concentrações previamente estabelecidas. Ao término das distribuições dos tratamentos nas placas, foram realizadas as leituras de densidade óptica inicial D.O<sub>630nm</sub> (T=0) utilizando um leitor de absorbância em microplacas Elx 808 (Instruments BioTek, Inc. Winooski, VT, EUA). Em seguida, as placas foram incubadas a  $35 \pm 1$  °C/24 h. Após esse período, uma nova leitura de D.O<sub>630nm</sub> (T=24) foi realizada. Foram classificadas como inibitórias as concentrações que apresentaram resultados cuja variação ( $\Delta$ ) das leituras de DO<sub>630nm</sub> foram  $\leq 0,05$  (BRANDT et al., 2010).

#### **11.4.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)**

A CBM foi determinada a partir da suspensão bacteriana dos poços testes de cada microrganismo. Uma alíquota de 100 µL de cada concentração das soluções antimicrobianas testadas que apresentaram atividade inibitória, foram espalhadas nas superfícies das placas (*Spread plate*) contendo o meio TSA ou TSA+YE. Em seguida, as placas foram incubadas a 35 °C/24 h na BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26). As concentrações das soluções antimicrobianas testadas que proporcionaram redução de três ciclos logarítmicos ( $3,0 \log_{10}$  UFC/mL) de células viáveis a partir da concentração do inóculo inicial ( $10^5$  UFC/mL) foram classificadas como bactericidas (BRANEN e DAVIDSON 2004; BRANDT et al., 2010).

#### **11.5 Microscopia eletrônica de varredura e transmissão**

O preparo do inóculo foi realizado conforme o item 2.4.1 para os dois tipos de microscopia. A microplaca foi preenchida fazendo o controle positivo dos microrganismos e as concentrações bactericidas mínimas encontradas a partir dos extratos das folhas secas obtidas por maceração e decocção. O ensaio foi realizado no leitor de absorbância em microplacas Elx 808 (Instruments BioTek, Inc. Winooski, VT, EUA), onde foram feitas leituras seguidas e armazenamento da microplaca à 35 °C/24 h sob agitação. Em eppendorfs foram colocados

volumes iguais do fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4) e conteúdo de cada poço da microplaca, mantendo à 4 °C overnight (KARNOVSKY, 1965).

As amostras foram submetidas a três lavagens, onde a primeira lavagem foi feita no fixador Karnovsky e as outras três lavagens no tampão fosfato (pH 7,4). Entre cada lavagem foi realizada uma centrifugação a 5000 rpm/10 min/10 °C. Para a microscopia eletrônica de varredura as amostras foram submetidas a desidratação utilizando concentrações crescentes de álcool etílico (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), entre cada etapa foi feita centrifugação à 7000 rpm/10 min/10 °C. O pellet foi ressuscitado em 25 µL de hexametildisilazano (HMDS) e uma gota foi colocada em uma lamínula para secar. Posteriormente as lamínulas foram coladas em stubs para serem metalizadas com ouro e analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura FEG Quanta 450. Na microscopia eletrônica de transmissão, foi colocado uma gota do pellet no grid retirando o excesso após 3 min. Em seguida foi adicionado uma gota do contrastante ácido fosfotúngstico e o excesso foi retirado após 3 min, sendo as amostras analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura acoplado a um detector STEM Vega 3 Tescan.

## 12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 12.1 Ressonância magnética nuclear

Nos extratos aquosos da folha de aroeira-do-sertão foram identificados no espectrograma sinais referentes a galotaninos, ácido gálico, flavonóides, derivado da prolina (*N*-Metil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina) e ácido quínico, sendo que, alguns desses compostos já foram relatados na literatura como responsáveis pela atividade antimicrobiana (Figura 1).

O derivado da prolina e o ácido quínico foram os compostos identificados em todos os extratos. Das metodologias testadas a frio, ficou evidente que a turbolização não foi capaz de arrastar uma quantidade expressiva de compostos bioativos, talvez isso seja explicado pelo tempo de contato do solvente com o material vegetal, já que por maceração obtivemos um extrato com melhor composição. Foi possível revelar que a influência da temperatura na elaboração dos extratos foi positiva, pois, os espectros dos extratos obtidos por decocção e infusão destacaram a presença de mais dois compostos, os galotaninos e os flavonóides.

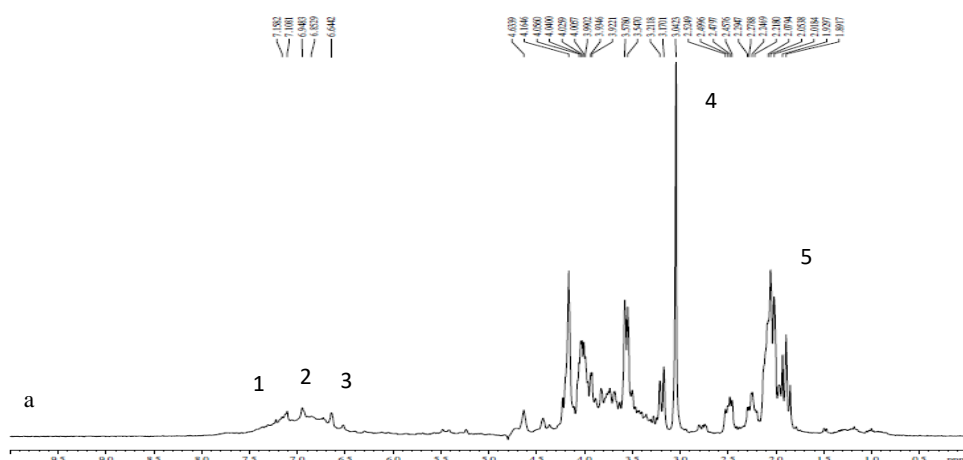
Galvão et al. (2018) em seus resultados de caracterização química por cromatografia acoplada a espectrometria de massa, demonstraram que a espécie é rica em polifenóis com cerca de 15 compostos identificados, dentre eles, o ácido gálico e flavonóides,

e evidenciaram o complexo fitoterápico presente na aroeira-do-sertão, corroborando com os estudos dessa pesquisa. Outros autores também encontraram diversos metabólitos secundários como taninos hidrolisáveis, flavonóides, saponinas (especialmente na folha), terpenos e esteroides (SILVA et al., 2013).

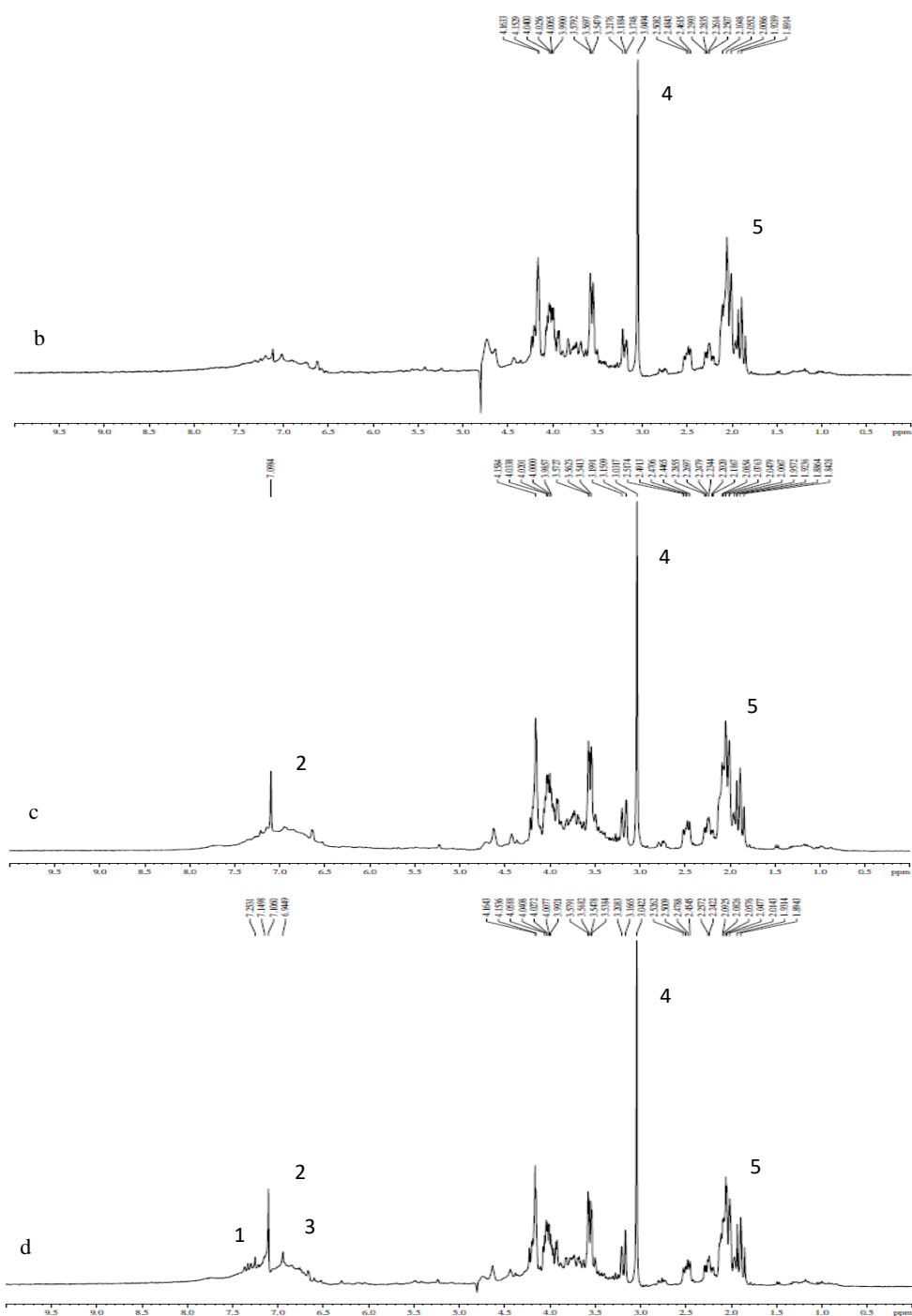
A espécie *M. urundeuira* Allemão possui altas concentrações de compostos fenólicos, especialmente taninos, e alguns estudos demonstraram os efeitos terapêuticos destes compostos (CHAVES et al., 1998; MORAIS et al., 1999; QUEIROZ et al., 2002; VIANA et al., 1997; MONTEIRO et al., 2006a).

Pesquisas demonstram que folhas de aroeira-do-sertão têm composição química semelhante à casca, tecido vegetal que é mais frequentemente usado na medicina popular. Deve-se destacar que o uso contínuo da casca pode provocar a extinção da planta, ressaltando a importância da pesquisa e utilização de outras partes da planta, como as folhas. Análise da composição fitoquímica de extrato metanólico das folhas de aroeira-do-sertão apresentaram fenóis, flavonóides e taninos condensados (JUNIOR et al., 2017). A presença de alcalóides nas folhas de aroeira-do-sertão também foi relatada (SILVA et al., 2010a). Silva et al. (2011) mostraram que o extrato etanólico de folhas de aroeira-do-sertão consistiram em ácido, galato de metila, flavonóides glicosídeos e taninos hidrolisáveis. Esses resultados corroboram com os encontrados, apontando a presença de flavonóides, ácido gálico, galotaninos, derivado da prolina e ácido quínico nos extratos aquosos das folhas de aroeira-do-sertão.

Figura 1 – Ressonância Magnética Nuclear – Folhas secas por infusão - FSINF (a), Folhas secas por turbolização - FSTURB (b), Folhas secas por maceração - FSMAC (c) e Folhas secas por decocção - FSDEC (d) [ $^1\text{H}/\text{D}_2\text{O}/303\text{K}$ ].







Fonte: Próprio autor. 1- Galotaninos; 2 – Ácido Gálico; 3 – Flavonóides; 4 – Derivado da Prolina (*N*-Metil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina); 5 – Ácido Quínico.

## 12.2 Potencial antimicrobiano

### 12.2.1 Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima

As concentrações que mostraram atividade antibacteriana dos extratos frente às bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) foram menores do que para as Gram-

negativas (*S. Enteritidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) (Tabela 1), estando de acordo com informações contidas na literatura, que relatam maior sensibilidade do primeiro grupo frente aos metabólitos secundários (FERREIRA et al., 2010). A dupla membrana apresentada pelas bactérias Gram-negativas forma um envelope complexo, sendo responsável pela menor sensibilidade destes microrganismos aos extratos vegetais (FRANCESCATO, 2007).

Os resultados de Ferreira (2017) obtidos com extrato das folhas secas de aroeira-do-sertão por decocção mostrou atividade bactericida sobre Gram-positivas em concentrações que variaram de 0,2 a 0,8 mg/mL e para Gram-negativas de 6 a 16 mg/mL. A concentração de 0,24 mg/mL utilizada na elaboração do extrato em comparação à concentração utilizada nesta pesquisa (0,1 mg/mL) mostrou maior conteúdo em compostos bioativos resultando no uso de concentrações inibitórias e bactericidas menores. Essas informações corroboram com a pesquisa de Pinho et al. (2012), na qual foi possível constatar que o uso de concentrações crescentes do extrato hidroalcoólicos de aroeira-do sertão, provocou um aumento do halo de inibição de *S. aureus*.

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos das folhas de aroeira-do-sertão expressos em mg/mL.

Extratos	<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. Enteritidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	mg/mL		mg/mL		mg/mL		mg/mL		mg/mL	
<sup>1</sup> FSTURB	0,4	14,0	0,2	0,5	18,0	20,0	20,0	42,0	18,0	30,0
<sup>2</sup> FSMAC	0,7	12,0	0,7	0,7	8,5	9,5	10,5	30,0	8,5	28,0
<sup>3</sup> FSDEC	0,2	12,0	0,2	0,5	11,0	12,0	11,0	26,0	8,0	28,0
<sup>4</sup> FSINF	0,9	8,0	0,2	2,2	10,0	22,0	15,0	42,0	11,0	22,0

CIM (Concentração inibitória mínima) e CBM (Concentração bactericida mínima). <sup>1</sup>FSTURB (Folhas secas por turbulização); <sup>2</sup>FSMAC (Folhas secas por maceração); <sup>3</sup>FSDEC (Folhas secas por decocção); <sup>4</sup>FSINF (Folhas secas por infusão).

A presença dos compostos do metabolismo secundário nos extratos aquosos de aroeira-do-sertão favorece a atividade antimicrobiana encontrada para cada extrato, tendo como melhores resultados os extratos obtidos por maceração e decocção. Corroborando com a pesquisa de outros autores que revelaram a presença de várias classes de metabólitos secundários que exibem uma ampla variedade de atividades, como antimicrobiana (MATIAS et al., 2010; FIGUEREDO et al., 2013).

Outros estudos descrevem que flavonóides (flavonas, flavonóis e flavanonóis) (CUSHNIE e LAMB 2005) e saponinas (VERDI et al., 2005) têm atividade antimicrobiana importante. A ação antimicrobiana dos taninos é também conhecida (AKIYAMA et al., 2001), e já foi inclusive mostrado que extratos aquosos e acetônicos perdem a atividade frente a bactérias Gram-positivas quando eliminado seu conteúdo de tanino (DJIPA et al., 2000). De acordo com essa informação é possível afirmar que devido ao elevado conteúdo de taninos encontrados nos extratos obtidos por maceração e decocção, comprovado pela presença de picos maiores de ácido gálico através da ressonância magnética nuclear, os mesmos demonstraram melhor atividade antibacteriana para as bactérias Gram-positivas (Figura 1c e 1d).

Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Uma série de bactérias são sensíveis aos taninos, dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* (CASTRO et al., 1999). Em outra pesquisa, os extratos obtidos a partir da folha e casca, tiveram ação sobre Gram-positivas, em especial os extratos da folha, possivelmente pela presença de compostos bioativos que afetam a síntese de peptidoglicanas (SILVA et al., 2013).

A alta concentração de compostos fenólicos aumentou as atividades antibacterianas. Esses resultados estão de acordo com investigações anteriores que mostraram que agentes antimicrobianos com alta atividade contra um organismo têm uma baixa concentração inibitória mínima enquanto um agente antimicrobiano com baixa atividade fornece uma concentração inibitória mínima alta (BANSO e ADEYEMO 2007; NITIEMA et al., 2012).

Estudos de atividades antimicrobianas dos extratos de aroeira-do-sertão, bem como sua composição química, foram relatados por Júnior et al. (2009), que demonstraram propriedades antibacterianas desta planta contra cepas bacterianas patogênicas usando o método de difusão em disco. A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico das folhas de aroeira-do-sertão foi 1,02 mg/mL para *E. coli* ATCC 10536 e cepa resistente EC 27, assim como, para a cepa resistente SA 358 de *S. aureus*, obtendo uma CIM ainda menor para cepa *S. aureus* ATCC 25923 (FIGUEREDO et al., 2014). Esses resultados sobre a atividade inibitória de Gram-positivas e negativas concordam com os resultados encontrados para os extratos aquosos de aroeira-do-sertão, porém foi observado que a concentração encontrada foi maior, provavelmente devido ao solvente utilizado no preparo dos extratos.

Pinho et al. (2012) comprovaram que os extratos alcoólicos obtidos das folhas de aroeira-do-sertão continham metabólitos secundários (flavonóides, saponinas e taninos) com potencial antimicrobiano e que os extratos de aroeira-do-sertão, barbatimão e erva-baleeira em

especial conseguiram inibir o crescimento de *S. aureus* em concentrações que variaram de 200 a 500 mg/mL. Apesar disso, não foi detectada atividade dos extratos frente a *E. coli*, o que pode estar relacionado à menor susceptibilidade das bactérias Gram-negativas a extratos vegetais. Provavelmente a utilização do álcool na elaboração desses extratos, não favoreceu a atividade sobre Gram-negativas, além de necessitar de uma concentração muito elevada para mostrar ação sobre *S. aureus*, diferentemente das concentrações obtidas nessa pesquisa com extrato aquoso.

Eller et al. (2015) estudaram a atividade dos extratos brutos de cajueiro, barbatimão, aroeira-do-sertão, favela, fedegoso e quixaba, frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Observou-se que nenhum dos extratos hidroalcoólicos apresentou atividade frente às cepas *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, enquanto os extratos brutos de cajueiro, barbatimão e aroeira mostraram-se ativos frente à cepa de *S. aureus* ATCC 25923, apresentando halos de inibição de crescimento respectivamente de 11, 17 e 13 mm de diâmetro.

Diante do exposto é possível usar plantas como fonte de novos compostos bioativos eficaz contra bactérias resistentes aos antibióticos convencionais (BUTTLER e BUSS 2006).

### 12.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão

As análises de microscopia foram realizadas após triagem das análises de ressonância magnética nuclear e atividade antimicrobiana. De acordo com os resultados das análises foi possível definir como melhores extratos os obtidos por maceração e decocção.

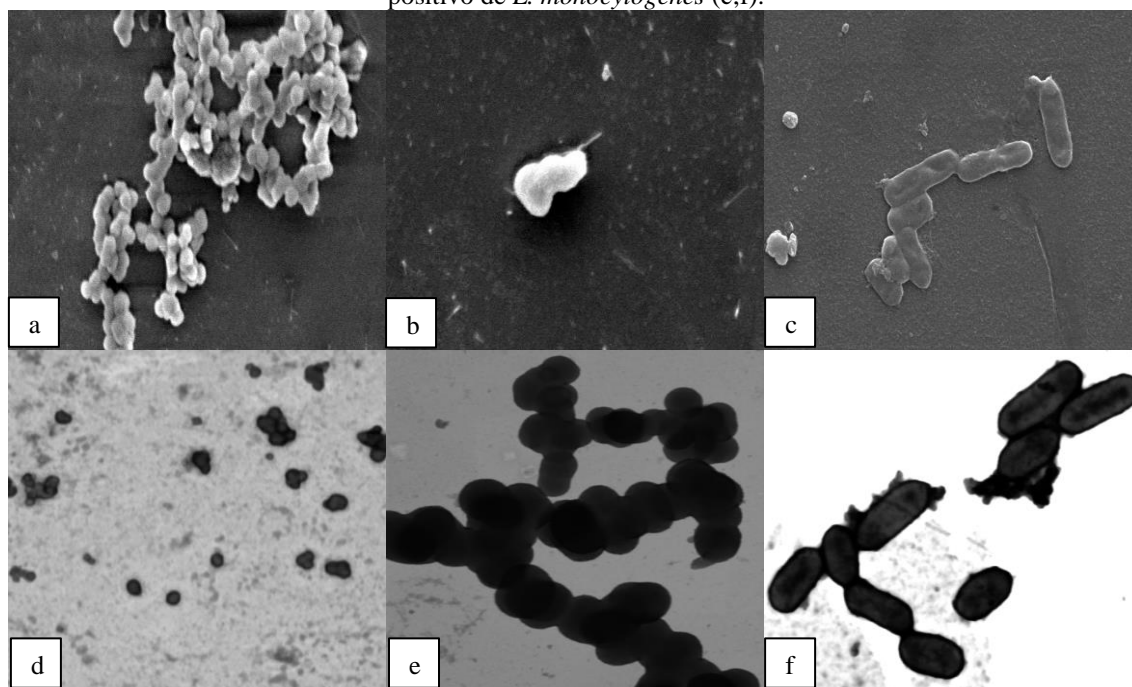
A forma de atuação das substâncias antimicrobianas geralmente está associada a lesões na parede celular ou degradação da membrana externa. As bactérias Gram-negativas são mais resistentes a ação dessas substâncias por possuírem a membrana interna, que impede o rompimento celular (TORTORA, FUNKE e CASE 2005). Outro ponto a ser observado é a membrana plasmática, que quando rompida por algum agente antimicrobiano resulta em perda de fluidos internos, causando a morte celular (TORTORA, FUNKE e CASE 2005).

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão mostraram danos nas paredes celulares das bactérias, que após o contato com os extratos FSMAC e FSDEC, passaram a ter uma nova forma, chamada pelos pesquisadores de L-forma (MICKIEWICZ et al., 2019) indicando que houve perda da parede celular, como pode ser comparado com os controles positivos, que mostram as células íntegras (Figuras 2, 4, 5 e 6). Todas as bactérias em forma de bastão utilizadas na pesquisa, após o contato com os extratos

mudaram sua forma assumindo a L-forma, Mickiewicz et al. (2019) mostraram que esse mecanismo acontece quando o antibiótico entra em contato com a bactéria, e esta por consequência perde a parede celular como mecanismo de resistência, porém muitas dessas bactérias acabam morrendo porque se tornam mais frágeis sem a parede celular.

Nas imagens geradas para *L. monocytogenes* (Figura 2) foi possível comparar as mudanças morfológicas nas bactérias do controle positivo com as tratadas com os extratos. É possível visualizar células em forma de bastão e com a presença de material genético (Figuras 2c e 2f) e após o tratamento apresentaram alterações morfológicas, sendo visualizadas formas arredondadas sugerindo perda da parede celular (Figuras 2a, 2b, 2d e 2e).

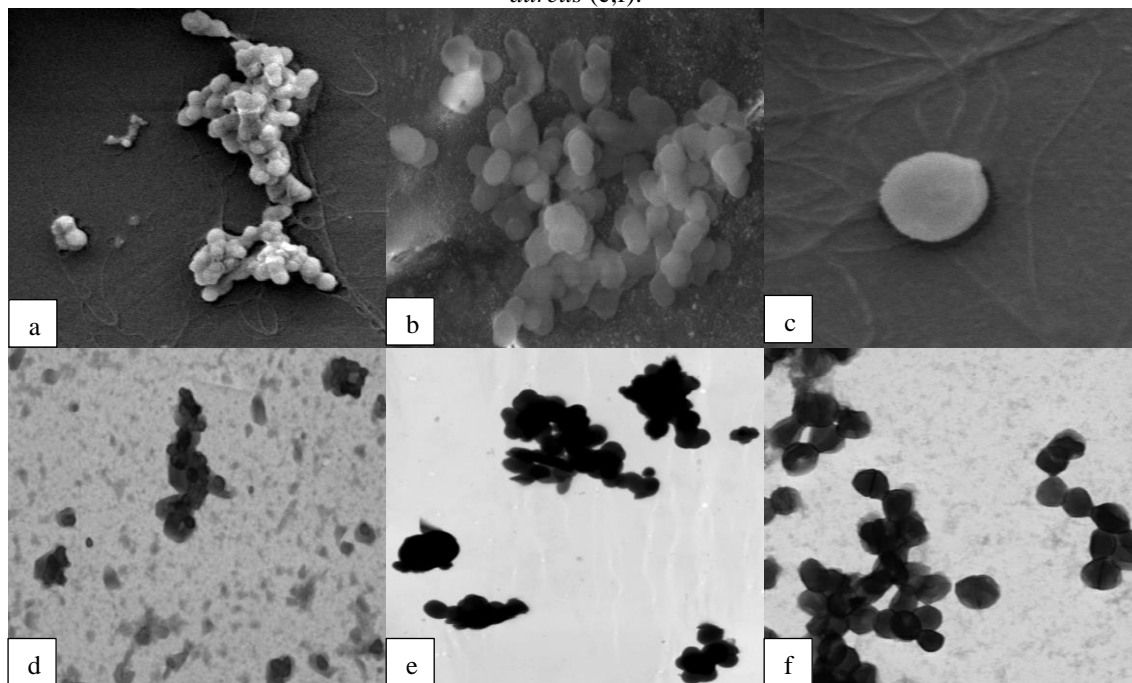
Figure 2 - Micrografia de *L. monocytogenes* sob ação dos extratos FSMAC (a;d), FSDEC (b;e) e controle positivo de *L. monocytogenes* (c;f).



Fonte: Próprio autor.

A imagem de MEV do controle positivo do *S. aureus* (Figura 3c), mostrou uma célula esférica, diferente do que foi observado das imagens na presença dos extratos, onde visualizamos uma rugosidade superficial (Figuras 3a e 3b). Nas imagens de MET, no controle pode ser visto agrupamento de células e divisão binária de algumas células (Figura 3f) e nas imagens com o extrato pode-se deduzir que ocorreu extravasamento celular com algumas células aparentemente murchas (Figuras 3d e 3e).

Figura 3 - Micrografia de *S. aureus* sob ação dos extratos FSMAC (a;d), FSDEC (b;e) e controle positivo de *S. aureus* (c;f).

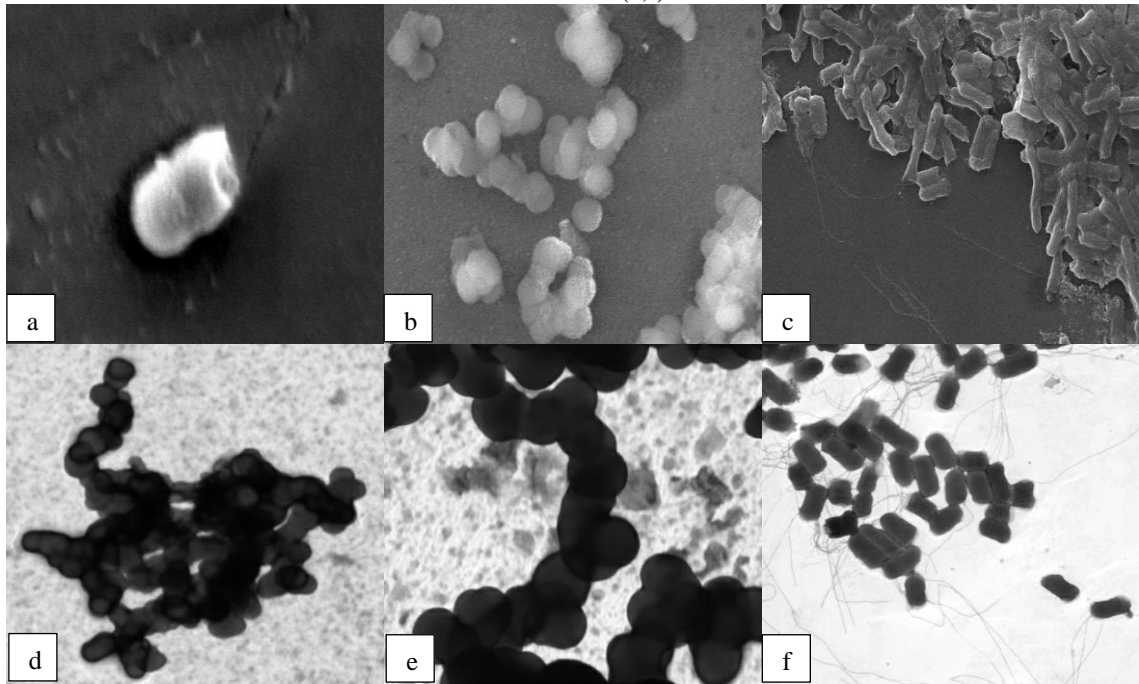


Fonte: Próprio autor.

As imagens do controle positivo de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* apresentaram células íntegras com morfologia em bastão e presença de flagelo (Figuras 4c, 4f, 5c, 5f, 6c e 6f). As imagens obtidas com os extratos mostraram que as células das três bactérias se apresentaram arredondadas e perda do flagelo (Figuras 4a, 4b, 4d, 4e, 5a, 5b, 5d, 5e, 6a, 6b, 6d e 6e) e no MEV observaram-se aberturas na superfície em forma de poros, podendo atribuir a extravasamento celular (Figuras 4a, 4b, 5a, 5b, 6a e 6b). Para a imagem de MET fica bem perceptível a mudança de forma (L-forma) das bactérias sugerindo perda da parede celular (Figuras 4d, 4e, 5d, 5e, 6d e 6e).

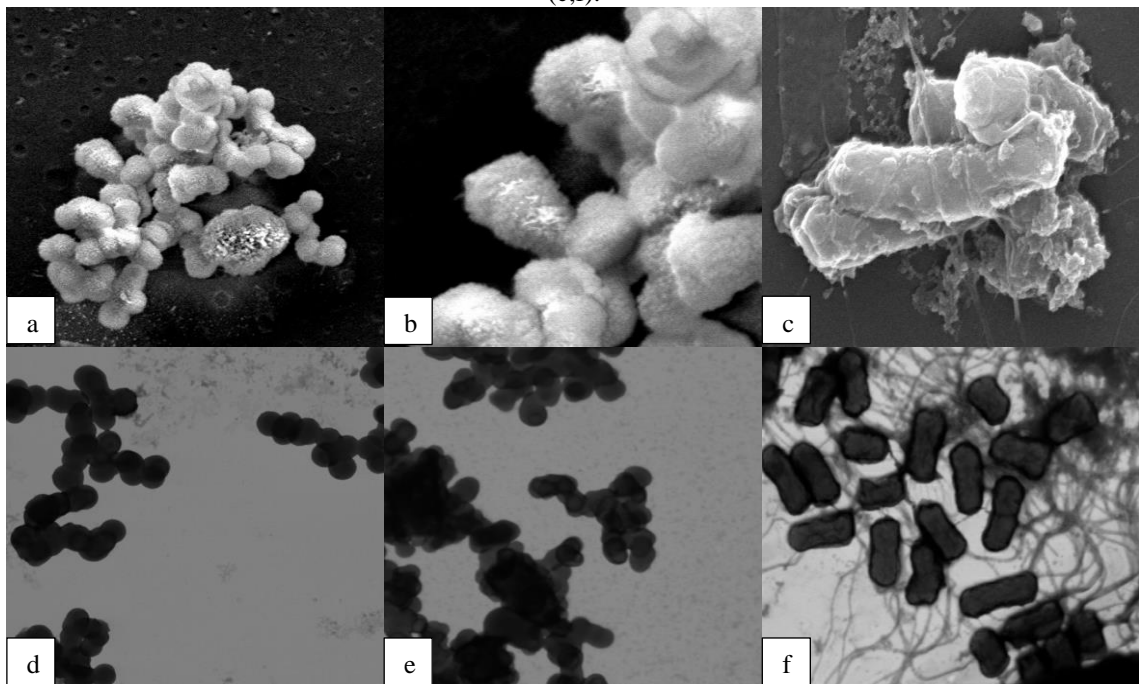
Amaduci (2007) investigou o efeito da estufa e do campo eletromagnético sobre a estrutura bacteriana da *E. coli*, através da análise das imagens foi possível constatar que a lise bacteriana ocorreu com maior intensidade nas bactérias expostas ao campo eletromagnético, assim como também foi evidenciado a forma arredondada.

Figura 4 - Micrografia de *S. Enteritidis* sob ação dos extratos FSMAC (a;d), FSDEC (b;e) e controle positivo de *S. Enteritidis* (c;f).



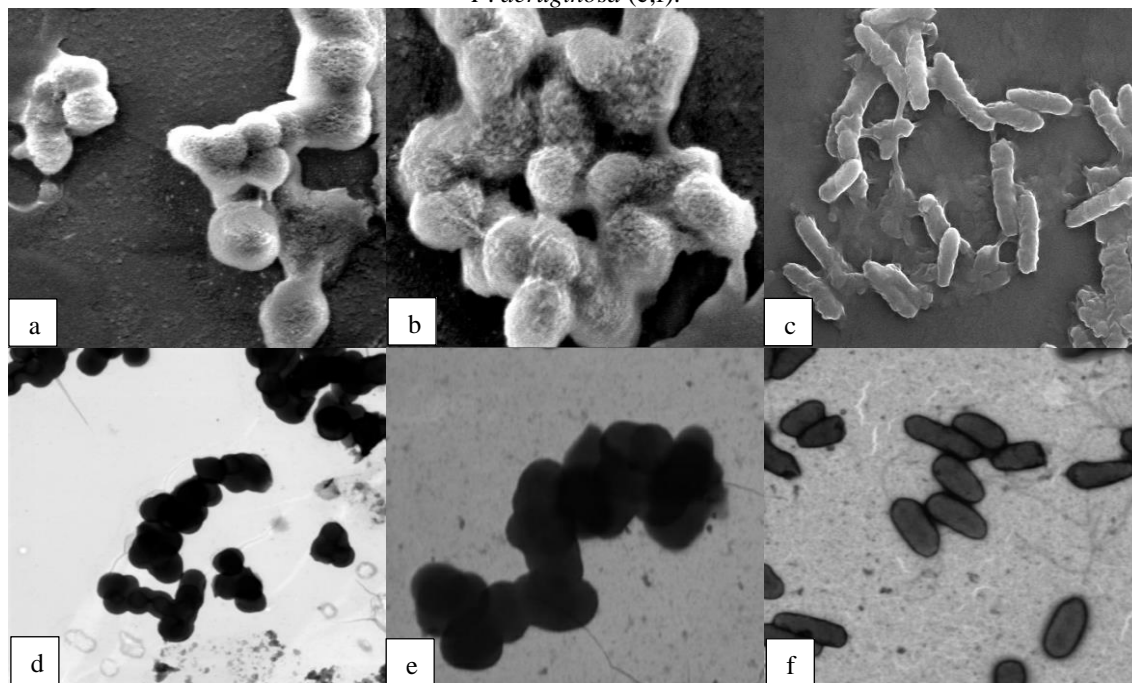
Fonte: Próprio autor.

Figura 5 - Micrografia de *E. coli* sob ação dos extratos FSMAC (a;d), FSDEC (b;e) e controle positivo de *E. coli* (c;f).



Fonte: Próprio autor.

Figura 6 - Micrografia de *P. aeruginosa* sob ação dos extratos FSMAC (a;d), FSDEC (b;e) e controle positivo de *P. aeruginosa* (c;f).



Fonte: Próprio autor.

### 13. CONCLUSÃO

Os extratos aquosos das folhas de aroeira-do-sertão apresentaram galotaninos, ácido gálico, flavonóides, derivado da prolina (*N*-Metil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina) e ácido quínico em sua composição. Esses compostos químicos são provavelmente responsáveis pela atividade antimicrobiana evidenciada sobre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis e *Pseudomonas aeruginosa*, destacando-se os extratos obtidos por maceração e decocção. As micrografias mostraram os danos estruturais ocasionado pelos extratos, tais como, rugosidade, perda de parede celular, extravasamento celular e mudança para L-forma.



## 14. CAPÍTULO III

### CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE EXTRATOS DE

#### *Myracrodruon urundeuva* Allemão

Maria Jaiana Gomes Ferreira<sup>1\*</sup>

Lícia dos Reis Luz<sup>2</sup>

Fernando Lima de Menezes<sup>1</sup>

Celli Rodrigues Muniz<sup>3</sup>

Guilherme Julião Zocolo<sup>3</sup>

Larissa Moraes Ribeiro da Silva<sup>1</sup>

Raimundo Wilane de Figueiredo<sup>1</sup>

Evânia Altina Teixeira de Figueiredo<sup>1</sup>

### RESUMO

A aroeira-do-sertão é bastante utilizada na medicina popular, tendo efeito farmacológico associado a presença de compostos bioativos que possuem atividade antioxidante. Neste contexto, objetivou-se com esta pesquisa fazer a caracterização química, atividade antioxidante e avaliar a bioacessibilidade de compostos bioativos de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão. Os extratos foram obtidos a partir das folhas secas de *M. urundeuva* e quatro diferentes métodos extrativos (decoção, infusão, maceração e turbolização). As análises de antioxidante, compostos fenólicos, taninos e flavonóide foram realizadas em todos os extratos. Os extratos obtidos por decoção (utilização de uma temperatura mais elevada) e maceração (aumento do tempo de contato do material vegetal com o solvente) tiveram melhor rendimento e apresentaram melhor potencial antioxidante. A análise de UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> realizada nos extratos das folhas secas obtidas por maceração e decoção identificou a presença de 13 compostos, predominando os flavonóides, taninos, ácido gálico e ácido quínico. Após a digestão gastrointestinal *in vitro* observou-se a presença significativa de compostos bioativos apresentando potencial antioxidante, demonstrando que estes compostos podem estar acessíveis para as células do trato gastrointestinal e exercer seus benefícios à saúde no organismo.

**Palavras-chave:** Métodos extrativos; Compostos químicos; Digestão gastrointestinal *in vitro*; Potencial antioxidante.

1 - Department of Food Engineering, Federal University of Ceara (UFC), 60455-760, Fortaleza, CE, Brazil. Corresponding author, Fone: (88) 99932-3761, \*E-mail: [mjaiana@hotmail.com](mailto:mjaiana@hotmail.com).

2 - Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceara (UFC), 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil.

3 - Embrapa Tropical Agroindustry, 60511-110, Fortaleza, CE, Brazil.

## 15. INTRODUÇÃO

A espécie *Myracrodruon urundeuva* Allemão, popularmente conhecida como “aroeira-do-sertão”, “aroeira-preta” ou “urundeuva”, é uma espécie da família Anacardiaceae de ocorrência natural em regiões de Caatinga e Cerrado (ANDRADE et al., 2000; SILVA et al., 2002).

A aroeira-do-sertão possui alto poder medicinal, em suas entrecascas encontram-se vários componentes fitoquímicos, que possuem propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes (BERGER et al., 2007). As raízes são usadas no tratamento de reumatismo e as folhas são indicadas para o tratamento de úlceras (ALMEIDA et al., 1998).

Uma grande variedade de fontes vegetais biossintetizam compostos que possuem atividade antioxidante e podem ser utilizados como uma fonte natural de substâncias que possuem a capacidade de sequestrar os radicais livres (LACHMAN et al., 2010). Os extratos que possuem compostos antioxidantes são de particular interesse para as indústrias farmacêuticas pois estão associados a benefícios ao corpo humano como o combate ao envelhecimento. Além disso, também apresentam vantagens para indústrias de alimentos promovendo o retardo da deterioração, rancidez e descoloração (KARADAG et al., 2009).

A aroeira-do-sertão possui em sua constituição altas concentrações de compostos fenólicos, cujo principal efeito é a ação antioxidante (OKUDA e ITO, 2011). Os flavonóides são exemplos de compostos fenólicos que apresentam alto poder antioxidante e inúmeras plantas possuem em sua composição esse antioxidante natural (MORAIS et al., 2009). Os taninos também estão presentes na aroeira-do-sertão e estudos demonstraram os efeitos terapêuticos dessa substância (QUEIROZ et al., 2002; MONTEIRO et al., 2006).

Na indústria de alimentos, a tendência atual dos consumidores é procurar cada vez mais produtos naturais, tendo em vista a crescente preocupação com a saúde, tornando necessário o estudo do uso desses produtos como antioxidantes naturais em substituição aos convencionais BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol) e BHT (2,6-diterc-butil-p-creso), amplamente utilizados (MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2007). Dessa forma, os mesmos podem ser utilizados como aditivos alimentares, visando retardar a oxidação lipídica e/ou como conservantes naturais, além do uso desses extratos visando aumentar a atividade biológica de alimentos.

Para que um composto químico possa exercer seu efeito *in vivo*, o mesmo deve atingir o alvo fisiológico em concentração mínima que apresente esse efeito (SAURA-

CALIXTO et al., 2007). Dessa forma, no estudo de extração e caracterização desses compostos, é importante a avaliação da bioacessibilidade deles.

A bioacessibilidade é definida como a fração de um composto que é liberado de sua matriz no trato gastrointestinal e que, portanto, torna-se disponível para absorção intestinal. Ela inclui toda uma sequência de eventos que ocorrem durante a transformação digestiva da substância testada, em material que pode ser assimilado pelo corpo e pelas células do epitélio intestinal (SHIM et al., 2009).

Dessa forma, o estudo sobre a bioacessibilidade fornece informações importantes que podem contribuir para avaliar a real ingestão de nutrientes e assegurar a eficácia nutricional dos produtos alimentares (KHOUZAM et al., 2011). Estudos envolvendo a influência do método de extração dos compostos bioativos na bioacessibilidade são considerados escassos. Neste contexto, objetivou-se com esta pesquisa fazer a caracterização química, atividade antioxidante e avaliar a bioacessibilidade de compostos bioativos de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão.

## **16. MATERIAL E MÉTODOS**

### **16.1 Material vegetal**

As folhas de *M. urundeuva* foram obtidas no Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana - NEPAU (3°44'16.0"S; 38°34'22.6"W), localizado na Universidade Federal do Ceará nos meses de dezembro de 2017 e fevereiro de 2018. Foram secas em estufa à 40 °C/48 h, apresentando umidade inicial de 64% e umidade final de 12% (AZEVEDO e MOURA, 2010). O material vegetal foi identificado por comparação com exsicata do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará depositada com a identificação EAC-46088 e consulta a material especializado (LORENZI, 1998; ALMEIDA et al., 1998).

O material vegetal está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número de acesso A9B8196, por meio da Universidade Federal do Ceará.

### **16.2 Obtenção dos extratos**

Para a elaboração dos extratos, foram utilizadas folhas secas, seguindo a proporção de 100 g de folha seca para 1000 mL do solvente (água destilada). Foram preparados extratos

pelas técnicas de turbolização (FSTURB), maceração (FSMAC), decocção (FSDEC) e infusão (FSINF). Após elaboração, procedeu-se à filtração dos extratos e secagem em um liofilizador (Christ Modelo Alpha 1-2 LD plus) obtendo o extrato seco (ZORTÉA et al., 2015; BEVILAQUA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2011).

### 16.3 Determinação do rendimento e granulometria

Os extratos obtidos foram submetidos a cálculo de rendimento total de acordo com a fórmula abaixo (RODRIGUES et al., 2011):

$$Re = (P_{ext} / P_{folhas}) \times 100.$$

Onde:

Re = Rendimento total do extrato (%);

P<sub>ext</sub> = Peso do extrato seco (g);

P<sub>folhas</sub> = Peso das folhas secas (g).

O tamanho particular do material vegetal seco nebulizado foi determinado através da pesagem de 100 g do material e passagem forçada através de tamises previamente tarados, com aberturas de malha de 10 µm, 20 µm, 32 µm, 42 µm, 60 µm, 80 µm, 100 µm, 150 µm, 200 µm, 270 µm, 400 µm e 500 µm. A operação foi realizada em tamis com movimentos horizontais rotativos e movimentos verticais por 20 minutos, ou até que a operação estivesse completa. Após a tamisação, os materiais recolhidos dos tamises foram pesados individualmente e classificados quanto a faixa granulométrica do material vegetal (VOIGT, 1982).

### 16.4 Determinação de compostos fenólicos totais

Este ensaio foi realizado de acordo com o método proposto por Larrauri et al. (1997). A análise foi realizada em triplicada e a alíquota utilizada foi 0,05 mL para uma solução de extrato na concentração de 1 mg/mL. O volume foi completado para 0,5 mL com água destilada e então adicionado 0,5 mL do reagente de Folin Ciocalteau (1:3), 1 mL de carbonato de sódio à 20% e 1 mL de água destilada, procedendo a homogeneização em agitador de tubos de ensaio. As leituras foram realizadas após 30 minutos utilizando espectrofotômetro marca Shimadzu (Modelo UV- 1800) à 700 nm. A quantificação de compostos fenólicos totais das

amostras foi realizada por meio de curva padrão preparada com ácido gálico e o resultado foi expresso em mg EAG/g de extrato seco.

## **16.5 Potencial antioxidante**

### **16.5.1 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS<sup>•+</sup>**

A atividade antioxidante foi determinada através do ensaio com ABTS<sup>•+</sup>, obtido pela reação de 5 mL de ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (140 mM), conforme método descrito por Rufino et al. (2007a). A solução foi mantida em repouso a temperatura ambiente de 12 a 16 horas em ausência de luz. Uma vez formado, o ABTS<sup>•+</sup> foi diluído em álcool etílico grau analítico até obter valor de absorbância de  $0,70 \pm 0,05$  à 734 nm.

Os extratos testados foram preparados nas concentrações de 100 µg/mL, 250 µg/mL e 350 µg/mL. Em ambiente escuro, foi transferido 30 µL de cada concentração para tubos de ensaio, onde foi adicionado 3,0 mL da solução do radical ABTS<sup>•+</sup> com absorbância entre 0,695 a 0,705 nm, logo em seguida ocorreu homogeneização em agitador de tubos de ensaio. A leitura em espectrofotômetro marca Shimadzu (Modelo UV- 1800) (734 nm) foi realizada após 6 minutos da mistura e utilizou-se álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. A quantificação de antioxidante total das amostras foi realizada por meio de curva padrão preparada com Trolox e resultados expressos como equivalentes de µM Trolox/g de extrato seco. Todas as análises foram realizadas em três experimentos independentes, cada um em triplicata.

### **16.5.2 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical DPPH•**

A atividade antioxidante foi medida segundo o método descrito por Rufino et al. (2007b), usando o radical livre estável DPPH• (0,06 mM), monitorando-se o consumo do radical livre DPPH• pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. Foram adicionados 3,9 mL de solução etanólica de DPPH• a tubos de ensaio contendo alíquotas de 0,1 mL dos extratos nas concentrações de 100 µg/mL, 250 µg/mL e 350 µg/mL. Os tubos foram homogeneizados e mantidos no escuro à temperatura ambiente até estabilização da absorbância que foi medida à 515 nm em espectrofotômetro marca Shimadzu (Modelo UV- 1800). O álcool etílico foi utilizado para calibrar o equipamento. Os resultados foram expressos pelo valor CE<sub>50</sub> (Concentração Efetiva

50 %), todas as medidas foram realizadas em três experimentos independentes, cada um em triplicata.

### **16.6 Quantificação de taninos**

Os teores de taninos totais nos extratos foram obtidos por dissolução de cada extrato em água destilada, obtendo a concentração de 0,07 mg/mL. Em um balão de 100 mL contendo 75 mL de água destilada, foi adicionado 5 mL da solução dos extratos, 5 mL do reagente de Folin-Denis e 10 mL da solução aquosa saturada de carbonato de sódio, completando o volume com água destilada. A solução foi agitada e a leitura foi realizada à 760 nm em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo UV- 1800) após 30 minutos. A partir das absorbâncias obtidas, foi construída uma curva de calibração analítica, utilizada posteriormente para o cálculo dos teores de taninos totais, expressos em mg de EAT/g de extrato seco (IAL, 2008).

### **16.7 Quantificação de flavonóides totais**

A determinação dos teores de flavonóides totais foi realizada segundo o método descrito por Woisky e Salatino (1998). Utilizou-se a concentração de 3 mg/mL e uma alíquota de 0,5 mL em triplicata de cada extrato aquoso, adicionou-se 0,5 mL da solução de Cloreto de alumínio 5% ( $\text{AlCl}_3$ ), 1 mL de metanol e 1 mL de água destilada, completando o volume de 3 mL. Após repouso de 30 min, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo UV- 1800) à 425 nm. O conteúdo de flavonóides totais foi determinado usando a equação da curva padrão de quercetina, sendo os resultados expressos em mg EQ/g de extrato seco.

### **16.8 Análise de UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>**

As análises foram realizadas em Sistema cromatográfico Acquity UPLC (Waters), acoplado a um quadrupolo/tempo de voo (QTOF, Waters). As execuções cromatográficas foram realizadas em um Waters Acquity UPLC BEH (150 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ), temperatura fixa de 40 °C. O Sistema de eluição de gradiente binário consistia em 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B). As condições de eluição UPLC foram otimizadas da seguintes forma: gradiente linear de 2 a 95% B (0-15 min), 100% B (15-17 min), 2% B (17,01 min), 2% (17,02-19,01 min), um fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup>, e um volume de injeção de amostra de 5  $\mu\text{L}$ .

O perfil químico das amostras foi realizado acoplando o sistema Waters ACQUITY UPLC ao espectrômetro de massa QTOF (Waters, Milford, MA, USA) com interface de ionização por eletrospray em modo de ionização negativa (ESI<sup>-</sup>). O modo (ESI<sup>-</sup>) foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo de gás de dessolvatação de 500 L.h<sup>-1</sup>, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 3 kV. A leucina encefalina foi usada como massa de bloqueio. O modo MS usado Xevo G2-XS QTOF. O espectrômetro operou com programação centróide MS<sup>E</sup> usando uma rampa de tensão de 20 a 40 V. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 software (Waters Corporation, USA).

## 16.9 Bioacessibilidade

Os ensaios de bioacessibilidade foram realizados seguindo protocolo adaptado de Holanda et al. (2020), que descreve a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*, através das fases gástrica e intestinal. O método descreve a digestão de 1 g de extrato misturado com a enzima pepsina em banho de água com agitação à 37 °C durante 2 h. Após esse período foi realizada uma segunda digestão com pancreatina-bile com pH intestinal (pH 7,5) usando uma membrana de diálise contendo um sistema base para elevar gradualmente o pH e permitir a difusão dos analitos de interesse. O método permite determinar a quantidade de compostos fenólicos, taninos, flavonóides e antioxidantes potencialmente disponíveis para posterior absorção. Para monitorar a liberação dos compostos bioativos a partir dos extratos, foram analisadas as alíquotas referentes à fase gástrica e à fase intestinal (dialisado e não dialisado), visando quantificar esses compostos bioacessíveis.

### 16.9.1 Índices de Bioacessibilidade

A bioacessibilidade dos compostos bioativos foi expressa em porcentagem do valor encontrado para o dialisado em relação à quantidade inicial presente no extrato:

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = [D/I] * 100$$

Onde:

D = teor do composto dialisado

I = teor do composto inicial no extrato

## 16.10 Análises estatísticas

Os resultados das análises de fenólicos totais, taninos, flavonóides e antioxidantes foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software Statistica 10, para cálculo da análise de variância (ANOVA) e aplicação do teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 17. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 17.1 Rendimento e granulometria

Levando em consideração os resultados obtidos (Tabela 1), verifica-se que o tipo de método extrativo influenciou diretamente nos rendimentos dos extratos. Observou-se um rendimento maior para extrato por decocção, seguido por maceração. Na extração por decocção, provavelmente o aumento da temperatura favoreceu o amaciamento das partículas de folhas pulverizadas, aumentando sua solubilidade, constituindo-se numa extração com maior rendimento (SIMÕES et al., 2010). No caso da maceração é importante verificar a permeabilidade do solvente e saturação, que são fatores importantes para o rendimento (HOSTETTMAN et al., 2003).

**Tabela 1.** Rendimento dos extratos aquosos a partir das folhas de aroeira-do-sertão.

Extratos	Peso Folhas (g)	Peso Extrato Seco (g)	Rendimento (%)	Concentração (g/mL)
<sup>1</sup> FSTURB	100	14,08	14,08	0,1
<sup>2</sup> FSMAC	200	44,93	22,47	0,1
<sup>3</sup> FSDEC	100	33,33	33,34	0,1
<sup>4</sup> FSINF	150	24,65	16,43	0,1

Fonte: Próprio autor. <sup>1</sup>FSTURB (Folhas secas por turbolização); <sup>2</sup>FSMAC (Folhas secas por maceração); <sup>3</sup>FSDEC (Folhas secas por decocção); <sup>4</sup>FSINF (Folhas secas por infusão).

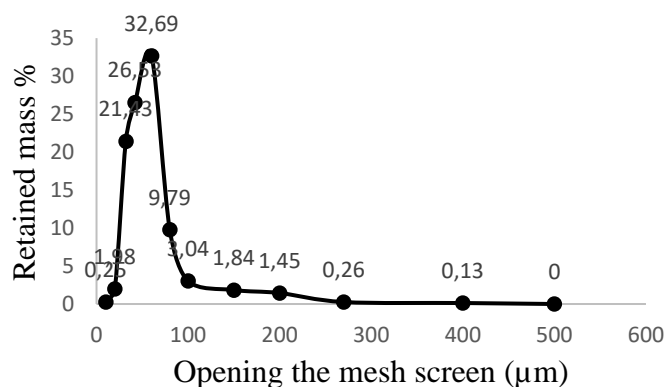
A secagem das folhas visa minimizar a perda de princípios ativos e retardar a sua deterioração em decorrência da redução da atividade enzimática, permitindo a conservação das plantas por um período maior (COSTA et al., 2005). Para elaboração dos extratos das folhas secas, houve uma trituração manual das folhas antes do preparo, com exceção do extrato por decocção, onde a trituração foi feita no liquidificador industrial. O estado de fragmentação do material vegetal teve importância para a otimização extrativa, pois quanto maior a divisão, mais expostos estarão os princípios ativos (COSTA et al., 2005). Outro estudo com secagem de



capim-limão recomenda o uso de secagem em estufa com temperaturas variando entre 30 e 50 °C para o maior rendimento e composição química (BUGGLE et al., 1999).

A análise granulométrica do material vegetal por tamisação demonstrou que as partículas se encontraram predominantemente distribuídas nas classes entre 10 e 100 µm (Figura 1). Segundo a classificação da Farmacopéia Brasileira (1988), a faixa granulométrica do material vegetal foi classificada como pó finíssimo. A faixa de tamanho também é uma variável importante, de acordo com Costa et al. (2005), a matéria seca reduzida a pó proporciona maior rendimento do que os fragmentos com 1 e 20 cm de comprimento, concordando com os resultados encontrados para o extrato da folha seca por decocção.

Figura 1 - Determinação da distribuição granulométrica das folhas secas e trituradas de aroeira-do-sertão.



Fonte: Próprio autor.

## 17.2 Potencial antioxidante, teor de compostos fenólicos, taninos e flavonóides

O conteúdo encontrado de compostos fenólicos nos extratos aquosos das folhas de aroeira-do-sertão variou de 1008,76 a 1081,94 mg EAG/g de extrato seco (Tabela 2) não havendo diferença estatística entre as metodologias de extração.

Vieira et al. (2015) utilizaram como solventes o metanol e o hexano para o extrato das folhas de aroeira-do-sertão por maceração, obtendo teores de compostos fenólicos maiores para o extrato metanólico (194 mg EAG/g), em relação ao extrato hexânico (77 mg EAG/g), mostrando que o metanol, assim como a água, são substâncias polares e compostos como saponinas, taninos e flavonóides são extraídos pelo solvente devido suas características de polaridade, corroborando com os resultados encontrados.

Os extratos obtidos por maceração e decocção apresentaram concentrações de compostos fenólicos um pouco maiores que os outros métodos extrativos. Estes resultados concordam com os obtidos por Costa (2011), que mostrou uma alta concentração de compostos

fenólicos em extratos da folha seca de aroeira-do-sertão obtidos por maceração (322 mg EAG/g) devido o tempo de contato do solvente com as folhas.

Em outra pesquisa, o extrato etanólico das folhas de aroeira-do-sertão apresentou teor fenólico total de 388,86 mg EAG/g (JUNIOR et al., 2017). Em comparação aos resultados obtidos nessa pesquisa, o extrato etanólico da folha de aroeira-do-sertão obtidos por maceração tiveram valores bem inferiores, reafirmando a importância do tipo de solvente na extração desses compostos, já que a água é uma substância polar e o etanol apresenta menor polaridade. A utilização da água como solvente para preparação dos extratos é uma alternativa para substituir solventes que apresentam nocividade a saúde humana e ao meio ambiente, englobando-se assim na química sustentável ou química verde (CUNHA et al., 2015).

A relação entre concentração de fenólicos totais e a capacidade de sequestrar radicais livres dos extratos parece ser bastante significativa, visto que extratos aquosos da folha de aroeira-do-sertão obtidos por maceração e decocção que obtiveram maior conteúdo de fenólicos totais também tiveram expressiva atividade antioxidante. Esses resultados concordam com os da pesquisa de Vieira et al. (2015), sugerindo que os compostos secundários com atividade antioxidante se concentram preferencialmente nos extratos polares das folhas e cascas do caule de aroeira-do-sertão. Os resultados de outros estudos atribuem atividade antioxidante à presença de fenólicos (CHAVES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012; SOUSA et al., 2007).

Os teores de flavonóides variaram de 629,67 a 850,69 mg EQ/g de extrato seco (Tabela 2). Os resultados mostraram diferença estatística entre os métodos a frio e a quente. O uso de temperaturas mais elevadas na elaboração de extratos facilita a extração de flavonóides, fato que foi observado como resposta para os teores de flavonóides nos extratos obtidos por decocção e infusão (Tabela 2). Pereira et al. (2009) constataram que nos extratos de chá verde e chá preto obtidos por infusão, havia um aumento dos fenólicos totais e flavonóides à medida que se aumentava o tempo de contato do material vegetal com a água aquecida.

**Tabela 2.** Conteúdo de fenólicos totais, taninos, flavonóides e antioxidante dos extratos aquosos das folhas de aroeira-do-sertão.

Extratos	Fenólicos Totais mg EAG/g	Taninos mg EAT/g	Flavonoides mg EQ/g	ABTS μM Trolox/g	CE <sub>50</sub> mg/L
<sup>1</sup> FSTURB	1008,76±3,56 <sup>a</sup>	32,21±0,03 <sup>c</sup>	629,67±1,91 <sup>b</sup>	4504,31±0,05 <sup>b</sup>	146,51±1,75 <sup>b</sup>
<sup>2</sup> FSMAC	1080,88±1,54 <sup>a</sup>	84,06±0,09 <sup>a</sup>	644,08±2,42 <sup>b</sup>	4763,32±0,16 <sup>b</sup>	183,62±0,68 <sup>a</sup>
<sup>3</sup> FSDEC	1081,94±1,56 <sup>a</sup>	51,93±0,06 <sup>b</sup>	850,69±0,68 <sup>a</sup>	5710,55±0,08 <sup>a</sup>	115,89±1,38 <sup>c</sup>
<sup>4</sup> FSINF	1038,44±0,68 <sup>a</sup>	34,25±0,11 <sup>c</sup>	801,26±7,64 <sup>a</sup>	4304,75±0,06 <sup>b</sup>	171,33±2,28 <sup>a</sup>

Fonte: Próprio autor. <sup>1</sup>FSTURB (Folhas secas por turbolização); <sup>2</sup>FSMAC (Folhas secas por maceração); <sup>3</sup>FSDEC (Folhas secas por decocção); <sup>4</sup>FSINF (Folha seca por infusão). Resultados: média de três repetições; Mesma letra indica que não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de cada análise; Letras diferentes houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de cada análise.

O conteúdo de taninos nos extratos aquosos da folha de aroeira-do-sertão variou de 32,21 a 84,06 mg EAT/g de extrato seco (Tabela 2), apresentando diferença estatística entre os métodos de extração com exceção dos extratos obtidos por turbolização e infusão. As Anacardiáceas são reconhecidas pela ampla distribuição de fenólicos (AGUILAR-ORTIGOZA, 2003).

Estudos mostraram que taninos hidrolisáveis, taninos condensados e flavonóides glicosilados derivados da quercetina e kaempferol, grupos do metabolismo secundário das plantas, tem caráter mais polar (OLIVEIRA, 2012; RATTMANN et al., 2011), outro fator importante são as metodologias de extração, que no caso da maceração e decocção, além de ocorrer um maior tempo de contato das folhas com a água, a temperatura mais elevada na decocção também facilita a solubilização desses compostos, justificando os resultados encontrados para taninos.

Monteiro et al. (2005) avaliaram extratos metanólicos das folhas de aroeira-do-sertão por decocção através da metodologia de precipitação da caseína e encontraram uma variação de 13,50 a 50,87 mg de taninos/g de extrato seco. Araújo et al. (2008) classificaram as espécies *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e aroeira-do-sertão como as que possuem os níveis mais altos de taninos.

O interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado muito, devido principalmente à habilidade antioxidante dessas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais são prejudiciais à saúde humana (ALVES et al., 2007; NEVES et al., 2009).

O potencial antioxidante dos extratos aquosos das folhas de aroeira-do-sertão em sequestrar radicais livres foi expresso como concentração final do extrato necessária para inibir a oxidação dos radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup> em 50%, e os resultados são descritos na Tabela 2. Pelo método ABTS os resultados variaram de 4304,75 a 5710,55  $\mu$ M Trolox/g de extrato seco, havendo diferença estatística do extrato obtido por decocção em relação as outras técnicas de extração. Plantas da família Anacardiaceae apresentam alta atividade antioxidante, Cristofoli et al. (2018) verificaram que os extratos das folhas de cajazeira apresentaram atividade antioxidante variando de 282,1 a 3030,1  $\mu$ M Trolox/g de extrato confirmando a presença de compostos antioxidantes. Junior et al. (2017), em seus estudos com o extrato etanólico das folhas de aroeira-do-sertão obteve pelo método ABTS (279  $\mu$ M Trolox/g), resultados que foram

estatisticamente semelhantes ao BHT (309  $\mu$ M Trolox/g), mostrando que os extratos podem substituir o antioxidante sintético na indústria de alimentos.

Pelo método DPPH, os resultados variaram de 115,89 a 183,62 mg/L, mostrando diferença estatística entre os métodos de extração com exceção dos extratos obtidos por infusão e maceração. Esses resultados são diferentes do encontrado por Vieira et al. (2015) que obtiveram para extrato metanólico das folhas de aroeira-do-sertão 12,9 mg/L. Junior et al. (2017), avaliaram a atividade antioxidante de extrato etanólico das folhas de aroeira-do-sertão pelo método DPPH• e obtiveram 217 mg/L, resultado que diferiu estatisticamente do padrão BHT (165 mg/L).

O grau de descoloração indica o potencial antioxidante do extrato. Quanto maior o consumo de DPPH• por uma amostra, menor será a sua CE<sub>50</sub>, e maior será sua atividade sequestradora (ALVES et al., 2007). Segundo Cabral et al. (2009), diferenças na atividade antioxidante da amostra podem ocorrer devido ao método usado. Rufino et al. (2010) demonstraram que o método ABTS é geralmente indicado para compostos hidrofílicos e o método DPPH pode ser usado rotineiramente com extratos orgânicos aquosos contendo compostos hidrofílicos e lipofílicos. Ambos os métodos são amplamente utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro*.

### 17.3 Análise de UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>

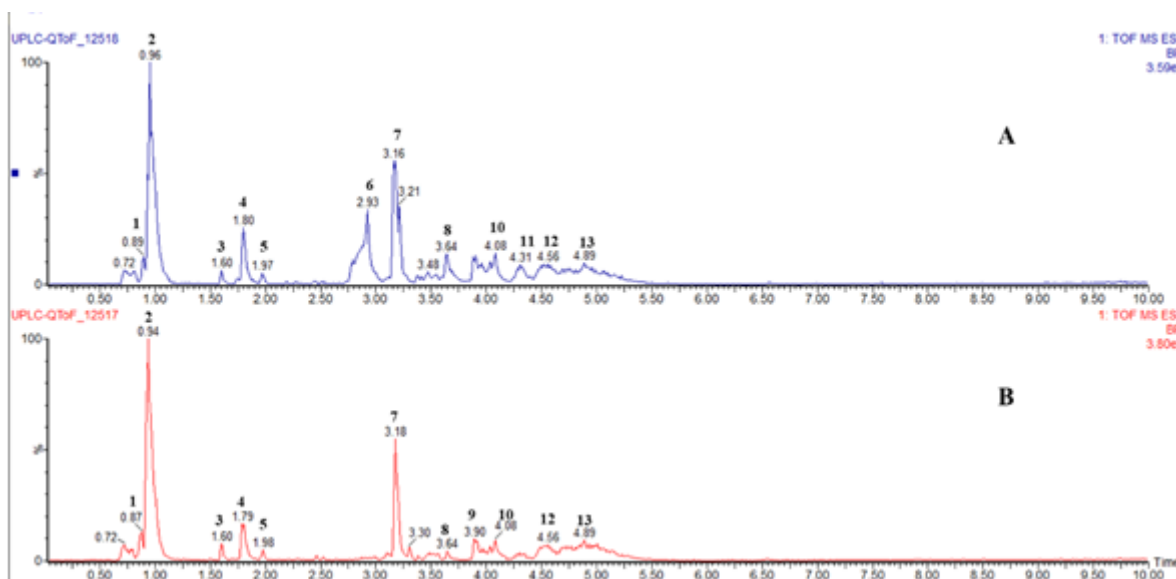
Os extratos de *Myracrodruon urundeuva* que apresentaram melhores efeitos antioxidantes, conteúdo de compostos fenólicos, flavonóides e taninos foram analisados por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>. Uma análise comparativa foi realizada entre os perfis dos metabólitos foliares obtidos em duas extrações distintas (FSMAC e FSDEC) a fim de mostrar uma melhor definição de seus componentes químicos (Figura 2). No total, cerca de 13 metabólitos foram identificados, incluindo diferentes classes de compostos como flavonóides e taninos, usando os espectros MS e MS/MS de cada extrato vegetal, juntamente com o mecanismo de fragmentação, relacionados à família (Anacardiaceae), gênero (*Myracrodruon*) e espécie (*urundeuva*), e os bancos de dados SciFinder, ChemSpider and PubChem. Os compostos predominantes nas folhas foram derivados do ácido gálico e do ácido quínico (Tabela 3).

Todas as fórmulas moleculares encontradas tinham erro inferior a 10 ppm calculado pelo MassLynx software (Waters Corporation) seguindo a seguinte equação:

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{(\text{massa observada} - \text{massa calculada})}{\text{massa observada}} \times 10^6$$

Santos et al. (2017) em seus estudos com extrato hidroetanólico da casca do caule de aroeira-do-sertão constataram através de HPLC a presença de flavonóides, compostos terpenóides, terpenos e compostos aromáticos. Já com a fração hidrometanol identificou perfis semelhantes aos taninos como ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol, e com o extrato hidroacetônico mostrou a presença de fisetina, ácido gálico e ácido elágico. De acordo com essa pesquisa podemos dizer que a aroeira é uma planta com bastante compostos químicos distribuídos por toda planta, já que alguns desses compostos também foram identificados nos extratos aquosos FSDEC e FSMAC incluindo os flavonóides, taninos, ácido gálico e ácido quínico, cuja presença está associada a atividade antioxidante encontrada concordando com os ensaios realizados.

Figura 2 – Cromatogramas de extratos aquosos de *M. urundeuva* FSDEC e FSMAC em modo de ionização negativa.



Fonte: Próprio autor. FSDEC: Folhas secas por decoção (A), FSMAC: Folhas secas por maceração (B).

**Table 3.** Tentativa de identificar metabólitos secundários presentes em extratos aquosos das folhas de *M. urundeuva*.

Picos	t <sub>r</sub> (min)	Modo de ionização negativo			Fórmula molecular	Tentativa de identificação	FSMAC	FSDEC	Referências
		MS [M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	ppm					
<b>1</b>	0,86	207,0500	144,0734 129,0156	-2,4	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	N.I	+	+	-
<b>2</b>	0,96	191,0509	127,0402 85,0319	6,3	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O	N.I	+	+	(CASTRO et al., 2019)
<b>3</b>	1,60	331,0665	271,0433 169,0121 89,0237	0,0	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	Glucose galloyl	+	+	(CASTRO et al., 2019; DORTA et al., 2014)
<b>4</b>	1,80	391	191,0538 169,0123 125,0240	-	-	Derivado de ácido gálico	+	+	-
<b>5</b>	1,98	343,0676	191,0432 169,0132 125,0290	3,2	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	Galloyl quinic acid	+	+	(ABU-REIDAH et al., 2015; CASTRO et al., 2019; ERŞAN et al., 2016)
<b>6</b>	2,93	321,0226	169,0115 125,0234	-6,5	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	Digallic acid	-	+	(ABU-REIDAH et al., 2015; CASTRO et al., 2019)
<b>7</b>	3,18	951,0683	933,0610 300,9964	-6,0	C <sub>41</sub> H <sub>28</sub> O <sub>27</sub>	Geraniin	+	+	(CASTRO et al., 2019; KUMAR et al., 2015)
<b>8</b>	3,65	953,0915	300,9965 169,0124	2,0	C <sub>41</sub> H <sub>30</sub> O <sub>27</sub>	Geraniinic acid	-	+	(CASTRO et al., 2019; POJCHAIJO NGDEE et al., 2010)
<b>9</b>	3,92	609,1434	301,0239 300,0243	-3,6	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	Rutin	+	+	(ABU-REIDAH et al., 2015; CASTRO et al., 2019)
<b>10</b>	4,08	463,0872	301,0279	-1,1	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	Quercetin 3- <i>O</i> -galactoside	+	+	(CASTRO et al., 2019; ERŞAN et al., 2016)

<b>11</b>	4,30	1091,1234	939,1096 769,0826	-3,5	C <sub>41</sub> H <sub>40</sub> O <sub>35</sub>	Hexagalloyl hexoside isomer I	-	+	(CASTRO et al., 2019; ERŞAN et al., 2016)
<b>12</b>	4,55	1091,1272		0,0	C <sub>41</sub> H <sub>40</sub> O <sub>35</sub>	Hexagalloyl hexoside isomer II	+	+	-
<b>13</b>	4,90	621,0543	469,0366 393,1707 169,0158	-5,2	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>21</sub>	Valoneic acid-galloyl lactone	+	+	(ABU-REIDAH et al., 2015; CASTRO et al., 2019)

Fonte: Próprio autor. FSDEC: Folhas secas por decocção, FSMAC: Folhas secas por maceração.

### 17.4 Simulação Gastrointestinal *in vitro*

O efeito da simulação gastrointestinal *in vitro* sobre os compostos fenólicos totais, taninos, flavonóides e atividade antioxidante está apresentado na Tabela 4. Os extratos analisados pelas técnicas de maceração e decocção exibiram teores mais elevados de compostos bioativos, indicando que poderiam ser utilizados como fonte potencial de fenólicos naturais e antioxidantes (Tabela 2). Após todas as etapas das condições gastrointestinais simuladas, se obteve uma boa quantidade de fenólicos totais (7,62 a 12,64%), taninos (103,57 a 185,09%), flavonóides (1,21 a 1,46%) e antioxidantes (ABTS 7,97 a 8,34%; DPPH 1316,19 a 1747,09%) (Tabela 4).

A digestão gástrica proporcionou a liberação de 54,22 e 75,71% dos compostos fenólicos, este fato pode ser atribuído principalmente ao pH ácido e à atividade enzimática, que pode induzir a hidrólise de alguns compostos fenólicos ligados a outros constituintes, havendo uma redução para 7,62 e 12,64% na digestão total final (CARVALHO, 2017) (Tabela 4).

Similarmente, Baublis et al. (2000) e Liyana-Pathirana e Shahidi (2005) sugeriram que as condições gástricas aumentam a capacidade de extração de compostos fenólicos da matriz alimentar. Por outro lado, a fase dialisada apresentou a menor concentração de compostos fenólicos, provavelmente devido a interação destes com outros constituintes podendo favorecer a formação de complexos com baixa solubilidade ou grande peso molecular, que não podem atravessar a membrana de diálise causando uma redução em sua concentração. Retendo esses compostos na parte não dialisada, cujo resultado foi bastante elevado, Scalbert e Williamson (2000) também relacionaram o peso molecular de compostos fenólicos a sua capacidade de absorção no intestino.

**Tabela 4.** Bioacessibilidade de compostos bioativos de extratos aquosos das folhas de aroeira-do-sertão.

<b>Fenólicos Totais (mg EAG/g extrato seco)</b>					
<b>Extratos</b>	<b>CBI</b>	<b>Digerido gástrico</b>	<b>Não dialisado</b>	<b>Dialisado</b>	<b>Bioacessibilidade (%)</b>
<sup>1</sup> FSMAC	1080,88 <sup>a</sup>	586,06 <sup>a</sup>	544,95 <sup>a</sup>	82,37 <sup>a</sup>	7,62
<sup>2</sup> FSDEC	1081,94 <sup>a</sup>	819,20 <sup>a</sup>	812,14 <sup>b</sup>	136,75 <sup>b</sup>	12,64
<b>Taninos (mg EAT/g extrato seco)</b>					
<sup>1</sup> FSMAC	84,06 <sup>a</sup>	806,67 <sup>a</sup>	729,85 <sup>a</sup>	87,06 <sup>a</sup>	103,57
<sup>2</sup> FSDEC	51,93 <sup>b</sup>	957,39 <sup>a</sup>	712,46 <sup>a</sup>	96,12 <sup>a</sup>	185,09
<b>Flavonóides (mg EQ/g extrato seco)</b>					
<sup>1</sup> FSMAC	644,08 <sup>a</sup>	13,57 <sup>a</sup>	43,34 <sup>a</sup>	9,41 <sup>a</sup>	1,46
<sup>2</sup> FSDEC	850,69 <sup>b</sup>	16,73 <sup>a</sup>	47,02 <sup>a</sup>	10,30 <sup>b</sup>	1,21
<b>ABTS (μM trolox/g extrato seco)</b>					
<sup>1</sup> FSMAC	4763,32 <sup>a</sup>	1269,32 <sup>a</sup>	1201,23 <sup>a</sup>	397,53 <sup>a</sup>	8,34
<sup>2</sup> FSDEC	5710,55 <sup>b</sup>	1149,25 <sup>a</sup>	1231,49 <sup>a</sup>	455,02 <sup>a</sup>	7,97
<b>CE<sub>50</sub> (mg/L)</b>					
<sup>1</sup> FSMAC	183,62 <sup>a</sup>	642,33 <sup>b</sup>	401,25 <sup>b</sup>	3208,00 <sup>b</sup>	1747,09
<sup>2</sup> FSDEC	115,89 <sup>b</sup>	256,67 <sup>a</sup>	352,61 <sup>a</sup>	1525,33 <sup>a</sup>	1316,19

<sup>1</sup>FSMAC (Folhas secas por maceração); <sup>2</sup>FSDEC (Folhas secas por decocção); CBI: composto bioativo inicial; Mesma letra indica que não houve diferença estatística (p<0,05) entre as amostras em cada análise; Letras diferentes houve diferença estatística (p<0,05) entre as amostras em cada análise.

Além disso, Saura-Calixto et al. (2007), relataram que os fenóis ligados a compostos de alta massa molar, como proteínas e carboidratos, pode ser liberada pela ação da enzima digestiva levando a um aumento significativo nas suas concentrações após a simulação gástrica. Estudos de intervenção em humanos mostraram uma baixa porcentagem (5 a 10%) de compostos fenólicos disponíveis para absorção no intestino demonstrando que a fração bioacessível de fenólicos é pequena, mas significativa para exercer seus efeitos funcionais e nutricionais (CLIFFORD, 2004).

Os flavonóides e taninos estão inseridos no grupo dos compostos fenólicos. Os flavonóides apresentaram baixas porcentagens de bioacessibilidade 1,21 e 1,46%, segundo Piskula (2000) relatou uma diminuição no conteúdo de isoflavonas durante a digestão gástrica devido à falta de solubilidade em condições ácidas. Sanz e Luyten (2006) observaram que o pH



gástrico (não ação enzimática) influenciou significativamente na concentração e partições de isoflavonas.

Os taninos apresentaram comportamento diferente, com mais de 100% do total solubilizado na etapa final após simulação gastrointestinal. Essa alta porcentagem de taninos está relacionada com elevada quantidade desse composto nas folhas, classificados como taninos hidrolisáveis se apresentando como galotaninos e na presença do solvente ocorre o rompimento da ligação liberando novas substâncias (AQUINO et al., 2019; SOUZA, 2012). No caso da simulação gastrointestinal os taninos hidrolisáveis por hidrólise ácida liberam ácidos fenólicos (SGARBIERI, 1996).

A diminuição da atividade antioxidante em condições intestinais pode ser atribuída ao fato de que algumas substâncias com antioxidante, como fenólicos, pode ser transformado em diferentes formas estruturais com outras propriedades químicas devido a sua sensibilidade ao pH alcalino (BERMÚDEZ-SOTO et al., 2007). Os resultados mostraram uma variação de 7,97 a 8,34% no caso da análise por ABTS, enquanto por DPPH• os resultados foram elevados mostrando que a atividade antioxidante foi reduzida, já que se trata de uma grandeza inversamente proporcional. Segundo Rodríguez-Roque et al. (2014), alguns compostos antioxidantes podem ser perdidos pela digestão enzimática ou por mudanças de pH em simulações *in vitro*.

## 18. CONCLUSÃO

Nos extratos aquosos das folhas secas de aroeira-do-sertão obtidos por maceração e decocção foram identificados 13 compostos químicos, dentre eles flavonóides, taninos, derivados do ácido gálico e ácido quínico. Em todos os extratos pesquisados foram quantificados altos teores de compostos fenólicos, taninos, flavonóides e atividade antioxidante, obtendo quantidades significativas desses compostos bioativos após a simulação gastrointestinal, indicando que os extratos podem ser utilizados como fonte de compostos bioativos pela indústria de alimentos.

## 19. CAPÍTULO IV

### POTENCIAL ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANO E TOXICOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Myracrodruon urundeuva* Allemão

Maria Jaiana Gomes Ferreira<sup>1\*</sup>  
Francisco Lucas Alves Batista<sup>2</sup>  
Francisco Ernani Alves Magalhães<sup>2</sup>  
Larissa Moraes Ribeiro da Silva<sup>1</sup>  
Raimundo Wilane de Figueiredo<sup>1</sup>  
Evânia Altina Teixeira de Figueiredo<sup>1</sup>

#### RESUMO

*Myracrodruon urundeuva* Allemão é uma planta conhecida como “aroeira-do-sertão”, “aroeira-preta” ou “urundeuva”, espécie da família Anacardiaceae, amplamente utilizada pela população por possuir propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes. Tendo em vista a importância dos compostos bioativos presentes nessa planta, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante, antibacteriano e toxicológico das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão. Os extratos foram obtidos utilizando diferentes métodos extrativos (decoção, infusão, maceração e turbolização) e foram submetidos a análise de Ressonância Magnética Nuclear, atividade antioxidante, antimicrobiana e toxicidade, se destacando os extratos obtidos por maceração e decoção. Foram identificados nos extratos galotaninos, ácido gálico, flavonóides, derivado da Prolina (*N*-Metil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina) e ácido quínico. Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e negativas, constantemente associadas a contaminação de alimentos. O potencial antioxidante, teor de compostos fenólicos, taninos e flavonóides foram quantificados e os extratos avaliados não apresentaram toxicidade frente a *Artemia salina*, indicando que podem ser utilizados como fonte de compostos bioativos em substituição a casca do caule, além de evitar a extinção da planta.

**Palavra-chaves:** Métodos extrativos; Compostos químicos; Potencial antioxidante; Potencial antimicrobiano; *Artemia salina*.

---

1 - Department of Food Engineering, Federal University of Ceara (UFC), 60455-760, Fortaleza, CE, Brazil. Corresponding author, Fone: (88) 99932-3761, \*E-mail: [mjaiana@hotmail.com](mailto:mjaiana@hotmail.com).

2 – Department of Chemistry, Laboratory of Natural Product Bioprospecting and Biotechnology (LBPNB), State University of Ceara (UECE), 60000-000, Tauá, CE, Brazil.

## 20. INTRODUÇÃO

*Myracrodruon urundeuva* Allemão, uma árvore de madeira amplamente distribuída no Brasil e comumente conhecida como “aroeira-do-sertão”, pertence à família Anacardiaceae. Os produtos naturais representam uma rica fonte de diversidade estrutural e atividades biológicas (NEWMAN e CRAGG, 2016). Em preparações feitas com extratos de *M. urundeuva* foram observadas atividades antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória e analgésica, fazendo com que esse vegetal seja objeto de pesquisas (CECÍLIO et al., 2016).

As atividades biológicas de *M. urundeuva* estão associadas aos compostos bioativos, essa espécie possui altas concentrações de compostos fenólicos, principalmente taninos, e vários estudos demonstraram as qualidades terapêuticas desses compostos (VIANA et al., 2003; MONTEIRO et al., 2006a).

A decocção, maceração, infusão e turbolização são metodologias de baixo custo e simples de serem usadas. A infusão é um processo de diluição do soluto por um solvente em ebulição, na decocção o solvente é adicionado ao soluto e ambos são aquecidos e mantidos em fervura (PANDEY e TRIPATHI, 2014), na maceração o material vegetal é colocado em contato com o solvente e deixado por um período (HANDA et al., 2008) e na turbolização, a extração acontece ao mesmo tempo com a redução do tamanho de partícula do material vegetal, devido à aplicação de elevadas forças de cisalhamento (SIMÕES et al., 2003).

Os solventes mais utilizados são água, etanol, metanol, clorofórmio, éter e acetona (PANDEY e TRIPATHI, 2014). Popularmente, os supostos princípios ativos são extraídos das folhas, frutos, cascas, sementes, raízes das plantas, utilizando a água, solução hidroalcolica ou outros reagentes químicos como solventes (PANDEY e TRIPATHI, 2014). Os extratos aquosos surgiram como substitutos mais ambientalmente viáveis porque não produzem nenhum resíduo tóxico ao mesmo tempo que atendem às normas da “química verde” (CUNHA et al., 2015).

De acordo com Yunes e Calixto (2001), os estudos de plantas e de novas substâncias torna-se um balanço entre a atividade biológica *versus* a toxicidade, um parâmetro fundamental para verificar sua aplicabilidade na indústria alimentícia. O bioensaio com *Artemia salina* (BST – Brine Shrimp Test) serve tanto como indicador de toxicidade como de bioatividade de diversas substâncias químicas, inclusive para os extratos de plantas (KARCHESY et al., 2016). Por fim, apresentam vantagens como: rapidez, praticidade, simplicidade, baixo custo, requer pouca quantidade de amostra, além de apresentar uma boa relação com testes *in vivo*, sugerindo que é um método útil e de confiança, segundo Silva et al. (2017).

A planta é explorada como fonte de madeira, combustível e principalmente remédio. Essas práticas são responsáveis por colocar a planta na categoria de ameaçadas de extinção (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002). No intuito de resolver essa questão, o uso das folhas surge como alternativa para substituir a casca do caule, e Freitas et al. (2018) mostraram em sua pesquisa que o extrato da casca do caule apresentou toxicidade.

Tendo em vista a importância dos compostos bioativos presentes nessa planta, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante, antibacteriano e toxicológico das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão .

## **21. MATERIAL E MÉTODOS**

### **21.1 Material Vegetal**

As folhas de *M. urundeuva* foram coletadas no Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana – NEPAU (3°44'16.0"S 38°34'22.6"W) localizado na Universidade Federal do Ceará. O extrato aquoso foi produzido no Laboratório de Frutos e Hortaliças do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará.

O material vegetal e as bactérias estão cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número de acesso A9B8196, por meio da Universidade Federal do Ceará.

### **21.2 Obtenção dos Extratos**

Os extratos foram preparados pelas técnicas de turbolização (FFTURB), maceração (FFMAC), decocção (FFDEC) e infusão (FFINF) utilizando 200 g de folhas frescas para 1000 mL de água. Após elaboração, procedeu-se à filtração dos extratos em filtros de papel e secagem em um liofilizador (Christ Modelo Alpha 1-2 LD plus) obtendo o extrato seco (ZORTÉA et al., 2015; BEVILAQUA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2011). Os extratos secos foram armazenados sob congelamento.

### **21.3 Determinação do rendimento**

Os extratos obtidos foram submetidos a cálculo de rendimento total de acordo com a fórmula abaixo (RODRIGUES et al., 2011):

$$Re = (P_{ext} / P_{folhas}) \times 100.$$

Onde:

Re = Rendimento total do extrato (%);

P<sub>ext</sub> = Peso do extrato seco (g);

P<sub>folhas</sub> = Peso das folhas frescas (g).

## 21.4 Identificação de metabólitos secundários por Ressonância Magnética Nuclear

Os extratos das folhas frescas de *M. urundeuva* foram submetidos a análise de Ressonância Magnética Nuclear visando identificação dos compostos presentes. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DPX-300 utilizando frequência de 300,13 MHz (<sup>1</sup>H).

## 21.5 Determinação de compostos fenólicos totais

A análise foi realizada de acordo com o método proposto por Larrauri et al. (1997). Foi realizada em triplicata e a alíquota utilizada foi 0,05 mL para uma solução de extrato na concentração de 1 mg/mL. As leituras foram realizadas após 30 minutos utilizando espectrofotômetro marca Shimadzu (Modelo UV- 1800) à 700 nm. A quantificação de compostos fenólicos totais das amostras foi realizada por meio de curva padrão preparada com ácido gálico, sendo o resultado expresso em mg EAG/g de extrato seco.

## 21.6 Potencial antioxidante

### 21.6.1 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS<sup>•+</sup>

A atividade antioxidante foi determinada conforme método descrito por Rufino et al. (2007a). Os extratos testados foram preparados nas concentrações de 100 µg/mL, 250 µg/mL e 350 µg/mL utilizando o volume de 30 µL. A leitura foi realizada em espectrofotômetro marca Shimadzu (Modelo UV- 1800) à 734 nm utilizando álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. Todas as análises foram realizadas em três experimentos independentes, cada um em triplicata. A quantificação de antioxidante total das amostras foi realizada por meio

de curva padrão preparada com Trolox e resultados expressos como equivalentes de  $\mu\text{M}$  Trolox/g de extrato seco.

#### **21.6.2 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical DPPH•**

A atividade antioxidante foi medida segundo o método descrito por Rufino et al. (2007b). Os extratos testados foram preparados nas concentrações de 100  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$  e 350  $\mu\text{g/mL}$ . A absorbância foi medida a 515 nm em espectrofotômetro marca Shimadzu (Modelo UV- 1800). O álcool etílico foi utilizado para calibrar o equipamento. Todas as medidas foram realizadas em três experimentos independentes, cada um em triplicata. Os resultados foram expressos pelo valor  $\text{CE}_{50}$  (Concentração Efetiva 50%).

#### **21.7 Quantificação de taninos**

Os teores de taninos totais nos extratos foram quantificados segundo método descrito por IAL (2008). A concentração dos extratos utilizados foram 0,07 mg/mL e alíquota de 5 mL. A leitura foi realizada à 760 nm em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo UV- 1800). Todas as análises foram realizadas em três experimentos independentes, cada um em triplicata. A partir das absorbâncias obtidas, foi construída uma curva de calibração analítica, utilizada posteriormente para o cálculo dos teores de taninos totais, expressos em mg de equivalente de ácido tânico/g de extrato seco.

#### **21.8 Quantificação de flavonóides totais**

A determinação dos teores de flavonóides totais foi realizada segundo o método descrito por Woisky e Salatino (1998), sendo utilizada concentração de 3 mg/mL. Os experimentos foram feitos em triplicata e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo UV- 1800) à 425 nm. Todas as análises foram realizadas em três experimentos independentes, cada um em triplicata. O conteúdo de flavonóides totais foi determinado usando a equação da curva padrão de quercetina, sendo os resultados expressos em mg de quercetina/g de extrato seco.

#### **21.9 Potencial antimicrobiano**

### 21.9.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

As concentrações inibitórias mínimas dos extratos foram determinadas sobre o crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pelo método de microdiluição em placa (96 poços, 300 µL de capacidade/poço; Microtest™, Becton Dickinson and Co.) (BRANEN e DAVIDSON, 2004). O inóculo foi preparado na concentração  $10^5$  UFC/mL, sendo utilizado 100 µL de inóculo em cada poço para teste de atividade antimicrobiana. Em seguida, nos mesmos poços foram adicionadas alíquotas de 100 µL da solução antimicrobiana já diluída em água destilada estéril nas concentrações que variaram de 0,2 a 42,0 mg/mL. Foram utilizados os seguintes poços controles:

1. Inóculo, meio de cultura e água destilada estéril (controle positivo) para avaliar a viabilidade do microrganismo testado.
2. Meio de cultura e soluções antimicrobianas nas concentrações testadas (controle das soluções) para verificar a inocuidade.

Após distribuições dos tratamentos nas placas, foram realizadas as leituras de densidade óptica inicial e final  $D.O_{630nm}$  (T=0; T=24) após 24 horas de incubação a 35 °C utilizando um leitor de absorbância em microplacas Elx 808 (Instruments BioTek, Inc. Winooski, VT, EUA). Foram classificadas como inibitórias as concentrações que apresentaram resultados cuja variação ( $\Delta$ ) das leituras de  $DO_{630nm}$  foram  $\leq 0,05$  (BRANDT et al., 2010).

### 21.9.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

As concentrações que mostraram atividade inibitória foram submetidas a avaliação da concentração bactericida mínima. Uma alíquota de 100 µL de cada concentração das soluções antimicrobianas, foi espalhada nas superfície das placas (*Spread plate*) contendo o Tryptic Soy Ágar (TSA/Difco, Detroit, EUA) ou Tryptic Soy Ágar enriquecido com 0,1 % extrato de levedura (TSA+YE/Difco, Detroit, EUA). As placas foram incubadas a 35 °C/24 horas em BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26). As concentrações das soluções antimicrobianas testadas que proporcionaram redução de três ciclos logarítmicos ( $3,0 \log_{10}$  UFC/mL) de células viáveis a partir da concentração do inóculo inicial ( $10^5$  UFC/mL) foram classificadas como bactericidas (BRANEN e DAVIDSON, 2004; BRANDT et al., 2010).

## 21.10 Atividade toxicológica frente *Artemia salina* Leach

O ensaio de letalidade em *Artemia salina* Leach foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Meyer et al. (1982), com modificações. Os cistos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em 1 L de solução salina preparada com a seguinte formulação: 15,15 g de cloreto de sódio (NaCl); 3,13 g de cloreto de magnésio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ); 3,87 g de sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); 9,88 g de cloreto de cálcio bihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); 0,41 g de cloreto de potássio (KCl) e 0,11 g de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ).

O pH da solução salina foi mantido entre pH 8-9 utilizando-se solução de NaOH a 1N. A eclosão dos ovos se deu à 27 °C e sob luz de 100 W por um período de 24 a 48 horas. Uma parte da solução salina foi reservada para o preparo das concentrações de 10, 100, 500 e 1000 µg/mL dos extratos. O controle negativo foi preparado utilizando apenas solução salina. Os náuplios foram coletados com uma micropipeta e transferidos para os frascos contendo os extratos nas diferentes concentrações, o teste foi realizado em triplicata.

Os frascos foram colocados sob controle de luz e temperatura (27 °C) por 24 horas. Passado este período, registrou-se a quantidade de náuplios vivos. A relação entre o número de náuplios mortos e o aumento da concentração dos extratos foi utilizada para o cálculo dos valores da  $\text{CL}_{50}$ . As substâncias testadas em diferentes concentrações foram classificadas como tóxicas quando apresentassem  $\text{CL}_{50}$  menor que 1000 µg/mL e não tóxicas com  $\text{CL}_{50}$  maior que 1000 µg/mL.

### **21.11 Análise estatística**

Os resultados das análises de fenólicos totais, taninos, flavonóides e antioxidantes foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Todas as análises foram realizadas como auxílio do software Statistica 10, para cálculo da análise de variância (ANOVA) e aplicação do teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). E para *Artemia salina* foi estimado a  $\text{CL}_{50\%}$  dos náuplios, através da análise Probit no software Statistica 10, nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **22. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **22.1 Rendimento**



O uso etno medicinal de materiais vegetais por diversas pessoas estimularam alguns pesquisadores na preparação do extrato vegetal a partir de tecidos vegetais frescos (NCUBE, AFOLAYAN e OKOH, 2008; DAS, TIWARI e SHRIVASTAVA, 2010).

O rendimento dos extratos variou em função do método de extração, obtendo melhor resultado os extratos produzidos pelas metodologias a quente (Tabela 1). Segundo Tiwari et al. (2011), os métodos extrativos influenciam diretamente na extração, e consequentemente no rendimento total do extrato. Vongsak et al. (2013) em suas pesquisas com extrato da folha fresca de *Moringa oleífera* demonstrou que a metodologia de decocção proporcionou maior rendimento que a de compressão.

**Tabela 1.** Rendimentos dos extratos aquosos a partir das folhas frescas de aroeira-do-sertão.

Extratos	Peso Folhas (g)	Peso Extrato Seco (g)	Rendimento (%)	Concentração (g/mL)
<sup>1</sup> FFTURB	742,66	41,18	5,54	0,2
<sup>2</sup> FFMAC	200,00	15,03	7,52	0,2
<sup>3</sup> FFDEC	140,00	16,19	11,56	0,2
<sup>4</sup> FFINF	146,00	17,31	11,86	0,2

Fonte: Próprio autor. <sup>1</sup>FFTURB (Folhas frescas por turbolização); <sup>2</sup>FFMAC (Folhas frescas por maceração); <sup>3</sup>FFDEC (Folhas frescas por decocção); <sup>4</sup>FFINF (Folhas frescas por infusão).

A eficiência da extração está diretamente relacionada a fatores intrínsecos do processo, tais como, tempo de contato do vegetal com o líquido extrator, renovação do solvente, velocidade de agitação e temperatura (SIMÕES et al., 2010).

Os menores rendimentos encontrados na extração a frio podem ter sido ocasionados pela baixa velocidade de equilíbrio entre as substâncias e o solvente (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996). No caso da turbolização pode ser atribuído ainda o menor tempo de contato do solvente com as folhas.

## 22.2 Identificação de metabolitos secundários por Ressonância magnética nuclear

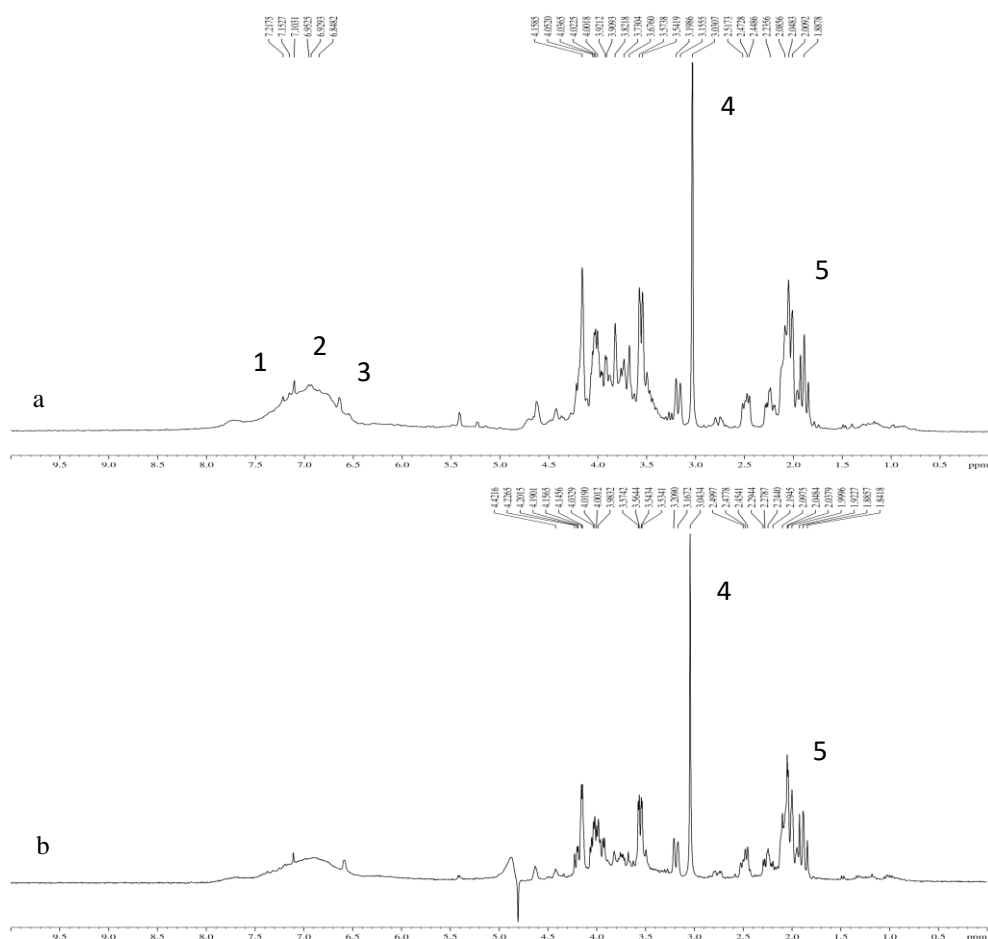
A análise de ressonância magnética nuclear nos extratos aquosos das folhas frescas de aroeira-do-sertão mostrou a presença de Galotaninos, Ácido Gálico, Flavonóides, Derivado da Prolina (*N*-Metil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina) e Ácido Quínico (Figura 1). Lopes et al. (2018) identificaram a presença de flavonóides e compostos fenólicos no extrato etanólico das folhas de aroeira-do-sertão, corroborando com os dados do presente estudo.

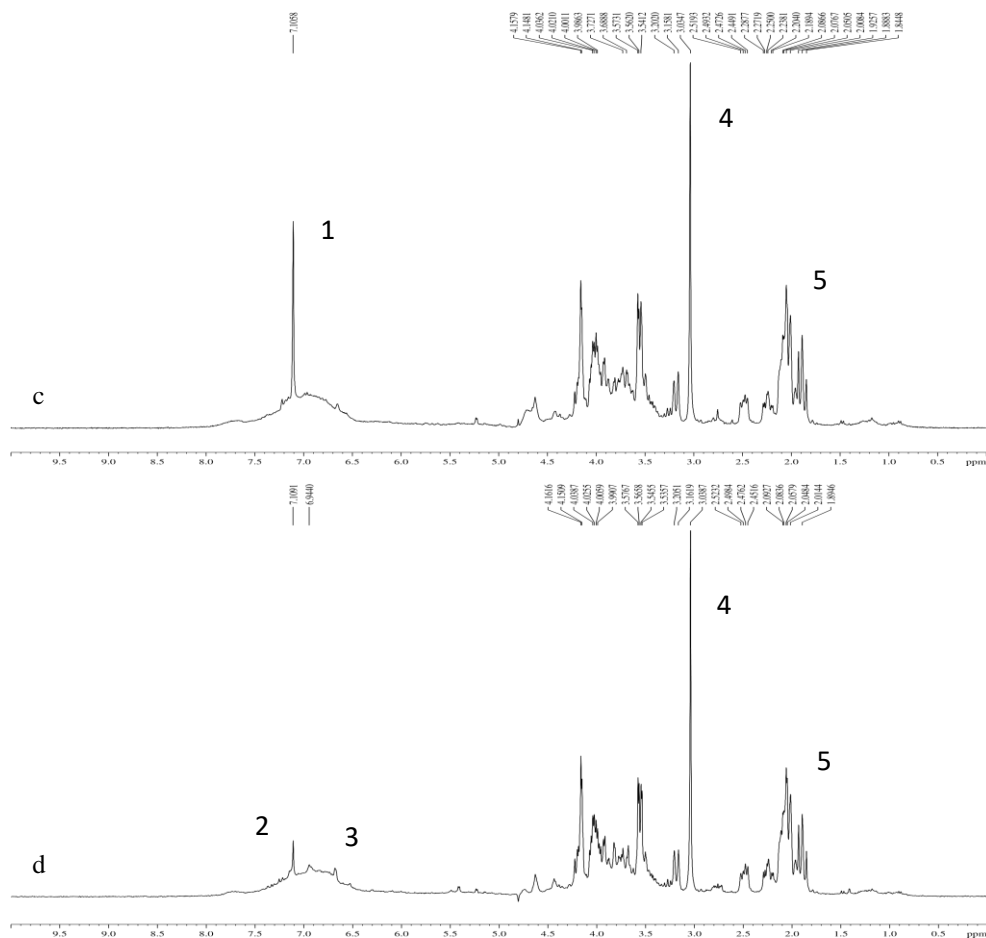
Nos estudos de Machado (2013) foi verificado a presença de galotaninos e derivados de ácido gálico, enquanto Sá (2008) descobriu no extrato metanólico os flavonóides

e fenólicos. A mudança de substâncias encontradas em cada pesquisa está relacionada com o método extrativo e o solvente utilizado (SOUZA, 2012). Outras pesquisas têm apontado a presença de taninos, que são compostos responsáveis pela resistência à degradação natural da planta (SCHOFIELD et al., 2001; VIANA, 2003).

De modo geral, as folhas têm menor concentração de agentes antimicrobianos que as cascas das plantas (VASCONCELOS et al., 2004). Porém, a elaboração de extratos a partir de folhas e frutas tem a vantagem de ser uma prática sustentável que promove a sobrevivência da planta (PINHO et al., 2012).

Figura 1 - Ressonância magnética nuclear – FFINF (Folhas frescas por infusão/a); FFTURB (Folhas frescas por turbolização/b); FFMAC (Folhas frescas por maceração/c); FFDEC (Folhas frescas por decocção/d) [ $^1\text{H}/\text{D}_2\text{O}/303\text{K}$ ].





Fonte: Próprio autor. 1 – Galotaninos; 2 – Ácido Gálico; 3 – Flavonóides; 4 – Derivado da Prolina (*N*-Metil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina); 5 – Ácido Quínico.

Pinho et al. (2012) realizaram rastreamento fitoquímico no extrato hidroalcólico das folhas de aroeira e detectaram a presença de esteróides, fenóis simples, flavonas, flavonóides, flavonóis, flavononas, flavononóis, saponinas, taninos e xantonas.

### 22.3 Potencial antioxidante, teor de compostos fenólicos, taninos e flavonóides

Para atividade antioxidante pelo método ABTS os resultados variaram de 5407,95 a 6287,62  $\mu$ M trolox/g de extrato seco, onde o extrato obtido por maceração diferiu estatisticamente dos demais extratos apresentando maior resultado (Tabela 2).

**Tabela 2.** Conteúdo de fenólicos totais, taninos, flavonóides e antioxidante dos extratos aquosos das folhas frescas de aroeira-do-sertão.

Extratos	Fenólicos Totais mg EAG/g	Taninos mg EAT/g	Flavonóides mg EQ/g	ABTS• <sup>+</sup> $\mu$ M trolox/g	CE <sub>50</sub> mg/L
<sup>1</sup> FFTURB	994,87 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>	33,32 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>	578,62 $\pm$ 1,46 <sup>a</sup>	5496,64 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	94,84 $\pm$ 2,41 <sup>b</sup>

<sup>2</sup> FFMAC	905,82±2,71 <sup>a</sup>	101,66±0,13 <sup>a</sup>	445,28±1,78 <sup>b</sup>	6287,62±0,16 <sup>a</sup>	153,11±1,95 <sup>a</sup>
<sup>3</sup> FFDEC	1049,36±1,53 <sup>a</sup>	72,67±0,04 <sup>b</sup>	642,28±3,17 <sup>a</sup>	5407,95±0,22 <sup>b</sup>	137,64±0,60 <sup>a</sup>
<sup>4</sup> FFINF	1018,14±1,04 <sup>a</sup>	36,66±0,06 <sup>c</sup>	603,24±1,83 <sup>a</sup>	5527,45±0,14 <sup>b</sup>	88,83±1,39 <sup>b</sup>

Fonte: Próprio autor. FFINF (Folhas frescas por infusão); FFTURB (Folhas frescas por turbolização); FFMAC (Folhas frescas por maceração); FFDEC (Folhas frescas por decocção). Resultados: média de três repetições; Mesma letra indica que não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de cada análise; Letras diferentes houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de cada análise.

Os extratos das folhas frescas de aroeira-do-sertão são compostos por fenólicos (1a, 1b, 1c e 1d) e flavonóides (Figura 1a e 1d) que contribuem diretamente para a atividade antioxidante (ANJO, 2004; DORMAS et al., 2007).

O potencial antioxidante dos diferentes extratos aquosos das folhas de aroeira-do-sertão em sequestrar radicais livres foi expresso como concentração final do extrato necessária para inibir a oxidação do radical DPPH• em 50%, e os resultados são descritos na Tabela 2, a CE<sub>50</sub> variou de 88,83 a 153,11 mg/L. Nas metodologias de extração a frio (turbolização e maceração) houve diferença estatística apresentando melhor resultado o extrato que teve menor tempo de contato com a água, assim como ocorreu com as metodologias a quente (decocção e infusão). Na extração por turbolização ocorre uma redução do tamanho da partícula da folha proporcionando uma passagem mais eficiente dos compostos bioativos para a água (COSTA et al., 2005) e no caso da infusão, a temperatura mais elevada provoca um amaciamento das partículas da folha ocasionando uma maior solubilidade dos compostos (SIMÕES et al., 2010).

Segundo Azizah et al. (1999) os compostos antioxidantes são sensíveis à ação da luz, oxigênio e calor. No estudo realizado por Medsen e Bertelsen (1995), o aquecimento do material vegetal resultou na redução da atividade antioxidante da maioria dos extratos ativos devido, principalmente, às reações dos compostos fenólicos com outras substâncias.

Estudos demonstraram o potencial antioxidante de *M. urundeuva* (DOSS e THANGAVEL, 2011; IFESAN et al., 2013). Vieira et al. (2015) constataram que a CE<sub>50</sub> para o extrato metanólico das folhas obtido por maceração foi de 12,9 µg/L, mostrando um potencial antioxidante melhor do que os extratos aquosos.

Os fenólicos totais variaram de 905,82 a 1049,36 mg EAG/g de extrato seco, não havendo diferença estatística entre os extratos obtidos por diferentes metodologias (Tabela 2). Junior et al. (2017) mostraram com a análise da composição fitoquímica da folha de aroeira-do-sertão a presença de fenóis e flavonóides. Os compostos fenólicos promovem a defesa química das plantas contra microrganismos, patógenos e radiação UV (CROTEAU et al., 2000).

Junior et al. (2017) constataram que a presença de compostos fenólicos nos extratos foi responsável pela atividade antioxidante encontrada pelos métodos ABTS e DPPH, concordando com os resultados do presente estudo. Tendo em vista que os extratos aquosos de *M. urundeuva* apresentaram elevada quantidade de compostos fenólicos que por sua vez influenciaram na atividade antioxidante.

O teor de taninos variou de 33,32 a 101,66 mg EAT/g de extrato seco, havendo diferença estatística entre os extratos (Tabela 2). Godinho et al. (2015) através da análise fitoquímica identificaram a presença de taninos utilizando três reagentes (cloreto férrico, acetato de chumbo neutro e acetato de cobre) em extrato etanólico das folhas da aroeira-do-sertão, corroborando com os resultados obtido nessa pesquisa. Os taninos são compostos encontrados em maior abundância nos tecidos de plantas fornecendo proteção contra desidratação (ROCHA et al., 2002). São adstringentes, antissépticos e antioxidantes (CUNHA e BATISTA, 2005).

Os taninos são compostos fenólicos de alto peso molecular, solúveis em água e álcool (CASTRO, 2004). Devido a solubilidade em água o extrato obtido por maceração apresentou o maior teor de taninos provavelmente devido ao tempo de contato da água com as folhas.

O teor de flavonóides variou de 445,28 a 642,28 mg EQ/g de extrato seco. O extrato obtido por maceração apresentou o menor teor diferindo estatisticamente dos demais extratos (Tabela 2). Godinho et al. (2015) e Machado et al. (2016) também confirmaram a presença de flavonóides nas folhas de aroeira-do-sertão. O extrato obtido por decocção apresentou maior quantidade de flavonóides concordando com os resultados de Oliveira et al. (2016b) que quantificaram flavonóides em extratos de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook obtidos por maceração, turbolização, infusão, decocção, ultrassom e soxhlet. Como propriedade medicinal, os flavonóides possuem funções antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena (VERDI et al., 2005).

#### **22.4 Atividade antimicrobiana**

O potencial antimicrobiano foi evidenciado em todos os extratos aquosos das folhas frescas de aroeira-do-sertão (Tabela 3). As concentrações encontradas como inibitórias foram consideradas baixas para todos os microrganismos testados. Conforme esperado, as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis aos extratos e mesmo as bactérias Gram-negativas sendo mais resistentes devido a presença da membrana externa que forma um envelope complexo

(HOLLEY e PATTEL, 2005), encontramos concentrações bactericidas relativamente baixas, mostrando a eficácia desses extratos sobre bactérias de importância epidemiológica.

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos das folhas frescas de aroeira-do-sertão.

Extratos	<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. Enteritidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	mg/mL		mg/mL		mg/mL		mg/mL		mg/mL	
<sup>1</sup> FFTURB	0,3	8,0	0,2	0,2	5,0	12,0	12,0	42,0	5,0	27,0
<sup>2</sup> FFMAC	0,9	8,5	0,2	0,4	8,0	10,0	11,0	28,0	10,0	26,0
<sup>3</sup> FFDEC	0,4	9,0	0,2	0,8	6,0	7,0	9,0	27,0	6,5	20,0
<sup>4</sup> FFINF	1,0	8,0	1,0	1,0	11,0	14,0	12,0	42,0	10,0	24,0

Fonte: Próprio autor. CIM (Concentração inibitória mínima) e CBM (Concentração bactericida mínima). <sup>1</sup>FFTURB (Folhas frescas por turbolização); <sup>2</sup>FFMAC (Folhas frescas por maceração); <sup>3</sup>FFDEC (Folhas frescas por decocção); <sup>4</sup>FFINF (Folhas frescas por infusão).

Os extratos obtidos por maceração e decocção mostraram melhores resultados em relação aos obtidos por turbolização e infusão, supostamente devido ao tempo de contato e a temperatura que favoreceram o arraste de compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana.

A prospecção fitoquímica de extratos mostrou a presença de várias classes de metabólitos secundários, exibindo uma grande variedade de atividades, como antimicrobiana (MATIAS et al., 2010; FIGUEREDO et al., 2013). Estudos de atividades antimicrobianas dos extratos de *M. urundeuva*, bem como sua composição química, foram relatados por Junior et al. (2009). Segundo a literatura, certamente essa atividade antimicrobiana está diretamente relacionada com as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias da aroeira-do-sertão extensivamente relatadas (CALOU et al., 2014).

Figueiredo et al. (2014) testando extrato etanólico das folhas de aroeira-do-sertão, mostraram uma concentração inibitória mínima menor para cepas padrão e multirresistentes de *E. coli* e *S. aureus* em comparação as concentrações encontradas nessa pesquisa, resultado que pode estar associado a metodologia de extração e solvente utilizado.

Os taninos protegem a planta contra o ataque de microrganismos patogênicos (TRUGILHO et al., 2003). Pinho et al. (2012) associaram potencial antimicrobiano a presença de taninos e flavonóides em extratos hidroalcóolicos da folha de aroeira-do-sertão. A presença desses compostos secundários nos extratos proporciona o rompimento da parede celular ou membrana plasmática facilitando a captação de drogas, inibem a síntese de ácidos nucleicos e

interrompem o metabolismo bacteriano (FIGUEREDO et al., 2013; MATIAS et al., 2010; CUSHNIE e LAMB, 2005).

Autores revelaram que extratos obtidos a partir da folha de aroeira-do-sertão tem resultados expressivos contra bactérias Gram-positivas, possivelmente pela presença de compostos bioativos que afetam a síntese de peptidoglicanas, afirmando os resultados obtidos nesse estudo. Além disso, realizaram testes de identificação com os extratos e observaram a presença de diversos metabólitos secundários como taninos hidrolisáveis, flavonóides, saponinas, terpenos e esteróides (SILVA et al., 2013), comprovando que atividade antimicrobiana dos extratos está relacionada a presença de tais compostos.

O potencial antimicrobiano dos extratos aquosos das folhas de aroeira-do-sertão sobre bactérias Gram-negativas é visto de forma positiva, já que poucos produtos de origem natural conseguem demonstrar atividade contra esses microrganismos. Os resultados de Junior et al. (2011) mostraram que os extratos alcoólicos das folhas de *M. urundeuva* apresentaram boa atividade contra *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, cepas Gram-negativas de referência oral e isolados clínicos em condições planctônicas e de biofilme.

## 22.5 Toxicidade por *Artemia salina* Leach

Nos extratos aquosos provenientes das folhas frescas de aroeira-do-sertão não foi observado morte dos microcrustáceo *Artemia salina* no bioensaio em nenhuma das concentrações testadas, assim como no controle (Tabela 4). Dessa forma, o método de extração não influenciou na toxicidade das amostras.

**Tabela 4.** Atividade tóxica dos extratos aquosos das folhas frescas de aroeira-do-sertão sobre *Artemia salina*.

Extratos	Nº de <i>Artemia salina</i> testadas	Concentrações µg/mL	% de <i>Artemia salina</i> vivas
<sup>1</sup> FFTURB	10	10, 100, 500 e 1000	100
<sup>2</sup> FFMAC	10	10, 100, 500 e 1000	100
<sup>3</sup> FFDEC	10	10, 100, 500 e 1000	100
<sup>4</sup> FFINF	10	10, 100, 500 e 1000	100
CN	10	-	100

Fonte: Próprio autor. <sup>1</sup>FFTURB (Folhas frescas por turbolização); <sup>2</sup>FFMAC (Folhas frescas por maceração); <sup>3</sup>FFDEC (Folhas frescas por decocção); <sup>4</sup>FFINF (Folhas frescas por infusão); CN (Controle Negativo).

Freitas et al. (2018), em seus ensaios com extrato hidroalcolico da entrecasca da aroeira-do-sertão, mostraram alta taxa de mortalidade quando submetido a concentrações superiores a 20 µg/mL. Fator preocupante por ser a parte da planta costumeiramente usada pela população e que seu uso abusivo causa sua extinção.

Com o intuito de resolver o problema do uso constante da casca do caule, os extratos obtidos das folhas frescas de aroeira-do-sertão não se mostraram tóxicos, sendo, portanto, seguros para uso. Estudo realizado por Meyer et al. (1982) considera tóxica, substâncias que apresentam valores de dose letal abaixo de 1000 µg/mL em *Artemia salina*.

Carvalho e Oliveira (2012) mostraram que extrato metanólico das folhas de aroeira-do-sertão não apresentaram citotoxicidade no teste *in vitro* de hemólise. Mesmo utilizando outro solvente na elaboração do extrato, essa pesquisa corroborou com os resultados encontrados. Porém Cavalcante et al. (2016) demonstraram a toxicidade do extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva* nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL, sendo este capaz de causar a morte de mais de 70% de larvas de *Artemia salina*. A utilização da água nos métodos extrativos dessa pesquisa é uma alternativa para substituir solventes que apresentam nocividade a saúde humana e ao meio ambiente, fazendo parte da química verde (CUNHA et al., 2015).

Embora estudos fitoquímicos demonstrem a presença de compostos possivelmente tóxicos na aroeira-do-sertão como terpenos, alcalóides, taninos e substâncias esteroidais (KATO e AKISUE, 2002; LIMA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2006b) o ensaio de toxicidade *in vitro* desta planta não mostrou resultados condizentes, provavelmente porque a quantidade desses compostos varia de acordo com o método de extração, quantidade de material vegetal e solvente.

Em outro estudo, a CL<sub>50</sub> (Concentração letal que reduz 50% da população avaliada) para o extrato aquoso da casca de aroeira-do-sertão foi de 263,10 µg/mL (SENIGALIA et al., 2020). O autor concluiu que quando a CL<sub>50</sub> for maior do que 1000 µg/mL, o extrato é considerado atóxico, entre 500 e 1000 µg/mL apresenta baixa toxicidade, entre 100 e 500 µg/mL moderada toxicidade e menor que 100 µg/mL, alta toxicidade (AMARANTE et al., 2011).

## 23. CONCLUSÃO

Nos extratos aquosos das folhas frescas de aroeira-do-sertão foram identificados Galotaninos, Ácido Gálico, Flavonóides, Derivado da Prolina (*N*-Metil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina) e Ácido Quínico. Esses compostos químicos foram responsáveis pelas atividades



antioxidante e antimicrobiana, destacando-se os extratos obtidos por decocção e maceração. Nenhum extrato apresentou toxicidade frente *Artemia salina* nas concentrações testadas, indicando que podem ser utilizados como fonte de compostos bioativos em substituição a casca do caule, além de evitar a extinção da planta.

## 24. CAPÍTULO V

### EFEITO DA APLICAÇÃO DE EXTRATO DE *Myracrodruon urundeuva* Allemão EM QUEIJO FRESCAL ULTRAFILTRADO: ATIVIDADE SOBRE *Staphylococcus aureus* E BIOACESSIBILIDADE DE BIOATIVOS

Maria Jaiana Gomes Ferreira<sup>1\*</sup>

Celli Rodrigues Muniz<sup>2</sup>

Maria Kueirislene Amâncio Ferreira<sup>3</sup>

Francisco Ernani Alves Magalhães<sup>4</sup>

Raimundo Wilane de Figueiredo<sup>1</sup>

Larissa Moraes Ribeiro da Silva<sup>1</sup>

Evânia Altina Teixeira de Figueiredo<sup>1</sup>

#### RESUMO

O queijo é um alimento cuja composição propicia o crescimento de muitos microrganismos e a procura por conservantes naturais para esse alimento tem crescente demanda. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência da aplicação do extrato aquoso das folhas secas de *Myracrodruon urundeuva* na atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* e bioacessibilidade de compostos bioativos em queijo fresco ultrafiltrado. O extrato aquoso foi obtido por maceração e submetido aos testes de toxicidade (*Artemia salina* e Zebrafish), sendo posteriormente adicionado ao queijo (0,35; 0,7; 2,1 e 4,2 mg/mL), seguido de aplicação de inóculo do *Staphylococcus aureus*. O extrato mostrou-se seguro para aplicação no queijo não apresentando toxicidade. O efeito antibacteriano do extrato aquoso foi constatado pela diminuição das contagens de *S. aureus* analisados a cada sete dias durante trinta dias e confirmada por visualização através da microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal. A bioacessibilidade de compostos bioativos foi quantificada nos tempos inicial e final de armazenamento. O extrato apresentou potencial para uso como antimicrobiano sobre *S. aureus* em queijo fresco ultrafiltrado com teor normal de gordura e light (4,2 mg/mL), obtendo maior eficiência no queijo light, mostrando redução de 2 ciclos logarítmicos. A análise de microscopia indicou atuação do extrato sobre a membrana plasmática de *S. aureus*. A adição do extrato ao queijo fresco ultrafiltrado com teor normal de gordura proporcionou ação antioxidante durante o armazenamento.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano natural; Aroeira-do-sertão; Contaminação alimentar; Matriz alimentar; *Staphylococcus aureus*.

1- Department of Food Engineering, Federal University of Ceara (UFC), 60455-760, Fortaleza, CE, Brazil. Corresponding author, Fone: (88) 99932-3761, \*E-mail: [mjaiana@hotmail.com](mailto:mjaiana@hotmail.com).

2 - Embrapa Tropical Agroindustry, 60511-110, Fortaleza, CE, Brazil.

3- Laboratoty of Natural Product Chemistry, State University of Ceara (UECE), 60714-903, Fortaleza, CE, Brazil.

4- Department of Chemistry, Laboratory of Natural Product Bioprospecting and Biotechnology (LBPNB), State University of Ceara (UECE), 60000-000, Tauá, CE, Brazil.

## 25. INTRODUÇÃO

O queijo é um alimento consumido em todo o mundo. Os diferentes tipos de produção e tecnologias permite que as pessoas obtenham uma variedade enorme de produtos. Devido ao seu sabor agradável e alto valor proteico, seu consumo aumentou nos últimos anos, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, o consumo per capita de queijos no Brasil é de 5,5 Kg (ABIQ, 2019). Por causa de sua composição e propriedades únicas, leite e produtos lácteos representam excelentes meio de crescimento para muitos microrganismos deteriorantes e patogênicos (NADA et al., 2012; CLAEYS et al., 2013).

Devido ao alto manuseio durante o processo de fabricação, cadeia de frio inadequada e características intrínsecas, os microrganismos contaminantes podem diminuir a vida de prateleira desse produto, além de representarem um risco para saúde do consumidor (GOUVEA, ROSENTHAL e FERREIRA, 2017). Vários surtos de doenças de origem alimentar são associados ao consumo de laticínios, principalmente queijo (MELO, ANDREW e FALEIRO, 2015). Entre os patógenos, *Staphylococcus aureus* é constantemente associado a surtos de alimentos a partir do consumo de queijo (HASSANIEN, MAHGOUD e EL-ZAHAR, 2014).

*S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva relatada principalmente em queijos produzidos sob más condições de higiene, tendo em vista que essa bactéria se encontra frequentemente associada a manipulação. Este patógeno produz enterotoxina que pode colocar em risco a saúde dos consumidores (GOUVEA, ROSENTHAL e FERREIRA, 2017). A produção de enterotoxinas é influenciada pela temperatura, pH, atividade de água ( $A_w$ ), tamanho do inóculo, fonte de carbono e nitrogênio, concentração de sal e condições atmosféricas do substrato (FRANCO e LANDGRAF, 2005). Dessa forma, a utilização de aditivos no queijo que possam controlar o crescimento de *S. aureus* e consequentemente a produção de toxinas se torna uma alternativa para garantir a segurança microbiológica desses produtos.

A fim de atender as novas demandas de consumidores, a indústria de alimentos e instituições de pesquisas têm procurado por conservantes provenientes de fontes naturais como alternativas aos sintéticos (GOUVEA, ROSENTHAL e FERREIRA, 2017).

*Myracrodruon urundeuva* Alleenho é considerada uma das plantas mais utilizadas na medicina popular (DUARTE et al., 2009). As folhas e cascas do caule são indicadas para o tratamento de diversas condições de saúde (ALBUQUERQUE et al., 2007), apresentando

efeitos antiséptico, antidiarréico, cicatrizante (DUARTE et al., 2009), além de ação antimicrobiana (SÁ et al., 2009) e anti-inflamatória (BANDEIRA et al., 2013).

Tendo em vista as propriedades funcionais associados aos metabolitos secundários extraídos de vegetais, a incorporação dessas substâncias nos alimentos apresenta relevância e uma alternativa para aliar efeito antimicrobiano natural e compostos naturais com atividade antioxidante. Os polifenóis, presentes largamente em plantas medicinais, são muito utilizados na indústria e por pesquisadores com a finalidade de retardar a degradação oxidativa dos lipídeos nos alimentos (JAVANMARDI et al., 2003). Neste sentido, vários pesquisadores têm utilizado o queijo como produto alimentício para inclusão de extratos, condimentos e polifenóis puros (FAION et al., 2015; EL-DIN et al., 2010; LIBRÁN et al., 2013; MARINHO et al., 2015; SILVA et al., 2015).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de extrato de *M. urundeuva* na atividade contra *Staphylococcus aureus* e bioacessibilidade de bioativos em queijo frescal ultrafiltrado.

## **26. MATERIAL E MÉTODOS**

### **26.1 Obtenção e secagem de folhas de *M. urundeuva***

As folhas de *M. urundeuva* foram obtidas no Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana - NEPAU (3°44'16.0"S;38°34'22.6"W), localizado na Universidade Federal do Ceará nos meses de dezembro de 2017 e fevereiro de 2018. Logo após a coleta, as folhas foram lavadas em água corrente e retirada o excesso de umidade com papel toalha. As folhas foram secas em estufa à 40 °C/48 h, apresentando umidade inicial de 64% e umidade final de 12% (AZEVEDO e MOURA, 2010). O material vegetal foi identificado por comparação com exsicata do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará depositada com a identificação EAC-46088 e consulta a material especializado (LORENZI, 1998; ALMEIDA et al., 1998). O material vegetal e *Staphylococcus aureus* estão cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número de acesso A9B8196, por meio da Universidade Federal do Ceará.

### **26.2 Obtenção dos extratos**

O extrato foi elaborado com 100 g da folha seca para 1000 mL do solvente (água), utilizando a técnica de extração por maceração (FSMAC). Após elaboração, procedeu-se à filtração do extrato em papel de filtro e secagem em liofilizador (Christ Modelo Alpha 1-2 LD plus) obtendo o extrato seco (ZORTÉA et al., 2015; BEVILAQUA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2011).

### 26.3 Queijos

Os queijos frescos ultrafiltrados com teor normal de gordura (UC1) e light (UC2) foram obtidos em supermercados localizados em Fortaleza (Ceará/Brasil).

### 26.4 Toxicidade por *Artemia salina* Leach

O ensaio de letalidade em *Artemia salina* Leach foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Meyer et al. (1982), com modificações. Os cistos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em 1 L de solução salina (15,15 g de cloreto de sódio (NaCl); 3,13 g de cloreto de magnésio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ); 3,87 g de sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); 9,88 g de cloreto de cálcio bihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); 0,41 g de cloreto de potássio (KCl) e 0,11 g de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) à 27 °C e sob luz de 100 W por um período de 24 a 48 h. O pH da solução salina foi corrigido entre pH 8-9 com solução de NaOH a 1N. Os náuplios foram coletados com uma micropipeta e transferidos para os frascos contendo FSMAC nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 µg/mL, o controle negativo foi preparado utilizando apenas água salina e o teste foi realizado em triplicata. Os frascos foram colocados sob controle de luz e temperatura (27 °C) por 24 h. Passado este período, os frascos foram analisados para registrar a quantidade de náuplios mortos e assim obter o valor da  $\text{CL}_{50}$ .

### 26.5 Toxicidade *in vivo* usando Zebrafish (*Danio rerio*)

Peixes-zebra selvagens adultos de ambos os sexos, com idade entre 60 e 90 dias, com tamanho ( $3,5 \pm 0,5$  cm) e peso ( $0,4 \pm 0,1$  g), estiveram aclimatados por 24 h em tanque de vidro contendo água da torneira tratada com anticloro (ProtecPlus®) e uma bomba de ar com filtro submerso a 25 °C e pH 7,0, em ritmo circadiano (14:10 h de claro/escuro). O peixe recebeu ração *ad libitum* 24 h antes do experimento. Os bioensaios realizados estão de acordo com os

Princípios Éticos de Experimentação Animal e sendo previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (# 5639090320).

No primeiro dia do experimento, os animais foram selecionados aleatoriamente e transferidos para uma esponja úmida para tratamento com FSMAC (0,7; 2,1 e 4,2 mg/mL), controle (água destilada estéril) e grupo sem tratamento (Naive). Foram utilizados seis peixes para cada grupo, e as amostras (20 µL) foram administradas via oral (*v.o.*). Após a administração da amostra, os animais foram transferidos para um becker (250 mL) contendo 150 mL da mesma água do tanque (MAGALHÃES et al., 2017; EKAMBARAM, PERUMAL e PAVADAI, 2017).

Após 1 h da administração das amostras, os animais foram submetidos a Teste de Locomoção (Campo Aberto) para avaliar alteração ou não na coordenação motora, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. Os animais foram colocados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e foi realizada a contagem do número de cruzamentos de linhas (CL). Além do grupo controle com água destilada, um grupo controle de peixes do aquário sem aplicação de nenhuma substância (Naive) também foi testado. Usando o valor de CL do grupo Naive como referência (100%), foi calculado a porcentagem de atividade locomotora individualmente por 5 min (AHMAD e RICHARDSON, 2013).

Para a toxicidade aguda, ao final de 96 h, contabilizou-se o número de mortes de animais em cada grupo para cálculo da CL<sub>50</sub>. Depois do experimento, os peixes foram sacrificados com água fria (2 a 4 °C).

## **26.6 Aplicação do FSMAC no queijo frescal ultrafiltrado**

### **26.6.1 Microrganismo e condições de crescimento**

A cepa de *S. aureus* ATCC-27664 foi cultivada no Agar Trypticase Soy – TSA (Difco, Sparks, EUA) e incubada a 35 °C/24 h em BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Model Q316-M26). Após esse período uma colônia isolada e uniforme foi transferida para 5 mL de Caldo Trypticase Soy – TSB (Difco, Sparks, EUA) e incubada a 35 °C/24 h em BOD, a fim de obter uma concentração bacteriana final de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL. A partir dessa concentração, foram realizadas diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) para se obter uma suspensão bacteriana de 10<sup>5</sup> UFC/mL, utilizada na aplicação das amostras de queijo.

### 26.6.2 Preparação, inoculação e armazenamento de amostras

Previamente a inoculação de *S. aureus*, realizou-se a avaliação dos queijos quanto a qualidade microbiológica (SILVA et al., 2010b; ANVISA, 2001). Essa avaliação foi realizada objetivando verificar contaminação/esterilidade dos produtos. Foram realizadas análises de Coliformes a 45 °C, *Staphylococcus* coagulase positiva/g, *Salmonella* sp/25 g e *Listeria monocytogenes*/25 g.

Para inoculação de *S. aureus*, os UC1 e UC2 foram fracionados em amostras de 25 g cada e transferidos para frascos de vidro estéreis. As concentrações de FSMAC foram estabelecidas tomando como base a Concentração Bactericida Mínima (CBM – 0.7 mg/mL) para *S. aureus* (encontrada previamente).

Foram testadas CBM/2, CBM, 3xCBM e 6xCBM (0,35; 0,7; 2,1 e 4,2 mg/mL). FSMAC foi esterelizado em filtro (Kasvi) de 0,22µm e aplicadas nas amostras de 25 g do queijo, seguindo a homogeneização manual com bastão de vidro. Os frascos foram mantidos em refrigeração (9 °C) por 24 h, visando absorção do extrato pela massa do queijo. Após esse período, ocorreu a aplicação do inóculo na concentração de 10<sup>5</sup> UFC/mL no volume de 1% do peso da amostra (250 µL), sendo realizada a homogeneização com bastão de vidro, repouso por 30 min para absorção total do inóculo e armazenadas a 9 °C até o momento da análise (HEALTH CANADA, 2012). Todas as análises foram realizadas em condições assépticas, utilizando-se cabine de fluxo laminar (Pachane Biotecnologia/PA 40 ESP).

As amostras foram preparadas para serem analisada no período de 1 mês, divididos em 6 tempos (T0, T1, T7, T15, T23 e T30 dias) e 6 amostras para cada tempo. As amostras foram codificadas como C1 (Controle), C2 (Queijo+Inóculo), C3 (Queijo+Inóculo+Extrato – 0.35 mg/mL), C4 (Queijo+Inóculo+Extrato – 0.7 mg/mL), C5 (Queijo+Inóculo+Extrato – 2.1 mg/mL) e C6 (Queijo+Inóculo+Extrato – 4.2 mg/mL), para UC1 e UC2.

### 26.6.3 Avaliação da atividade antimicrobiana de FSMAC em UC1 e UC2

As amostras foram analisadas nos tempos estabelecidos seguindo a metodologia de Silva et al. (2010b). Cada frasco contendo 25 g de amostra foi colocado em 225 mL de água peptonada, procedendo-se a homogeneização e diluição seriada em tubos contendo 9 mL de água peptonada. Logo após, ocorreu o plaqueamento das diluições em meio Agar Baird-Parker (Merck/Darmstadt/Alemanha) através da técnica Spread Plate. As placas foram incubadas na

BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Model Q316-M26) à 35 °C/48 h e posteriormente efetuou-se a contagem das colônias.

### **26.7 Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Confocal**

UC1 foi fracionado para obter as amostras (C1, C2 e C4) de 25 g e colocados em frascos de vidro estéreis. Para esta análise, a concentração de FSMAC utilizada referiu-se a Concentração Bactericida Mínima (CBM – 0,7 mg/mL) para *S. aureus*. O preparo do inóculo e da amostra seguiu os itens 2.6.1 e 2.6.2.

Para a microscopia eletrônica de varredura, as amostras preparadas previamente permaneceram em refrigeração a 9 °C/48 h, logo após, pedaços dos queijos foram colocados em eppendorfs e foi adicionado o fixador Karnovsky até cobertura total das amostras. As amostras ficaram em refrigeração a 9 °C/48 h, sendo posteriormente realizada uma lavagem no fixador Karnovsky seguida de três lavagens utilizando tampão fosfato (PBS). Em seguida adicionou-se o segundo fixador, Tetróxido de Ósmio, permanecendo em contato com a amostra por 10 min. Foram realizadas três lavagens com água destilada estéril e depois iniciada a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70%). No dia posterior finalizou-se a desidratação (70, 80, 90 e 100%), sendo repetida a etapa de 100% por mais duas vezes. Prontamente as amostras foram secas no Equipamento Ponto Crítico (Critical Point Dryer/Quorum/K 850), metalizadas com ouro e analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (Tescan STEM Vega 3).

Para a microscopia confocal, as amostras (C2 e C4) preparadas anteriormente permaneceram em refrigeração a 9 °C/7 dias, logo após, pedaços dos queijos foram transferidos para eppendorfs e adicionado 10 µL do Iodeto de Propídio (IP) na concentração de 1mM. Os queijos foram dispostos em lamínulas de vidro, onde adicionou-se uma gota de tampão fosfato (PBS) para fazer o esfregaço e em seguida observá-los no Microscópio Confocal (Zeiss/LM 710).

### **26.8 Avaliação de compostos bioativos de FSMAC em UC1**

Para avaliação de compostos bioativos foi pesado 10 g do queijo em frascos estéreis e adicionado FSMAC (5 mg/mL), procedendo-se a homogeneização até completa absorção do volume de aproximadamente 2 mL. As amostras foram analisadas nos T0 e T30 dias. O controle (queijo sem FSMAC) não foi realizado tendo em vista o queijo não apresentar em sua



constituição os compostos bioativos avaliados neste estudo. Seguindo a metodologia de Larrauri et al. (1997) foi preparado o extrato da amostra (queijo+extrato) utilizando o peso de 12 g. Adicionou-se 20 mL de etanol 50% homogeneizou-se e a mistura foi deixada em repouso por 60 min à 22 °C. O material foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 min e logo após filtrado em balão volumétrico de 50 mL. A partir do resíduo da primeira extração, adicionou-se 20 mL de acetona 70%, homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 60 min à 22 °C. Novamente o conteúdo foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 min, filtrado e adicionado no balão, sendo completado o volume total do balão com água destilada, obtendo-se uma concentração final de 240 mg/mL.

#### **26.8.1 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS•<sup>+</sup>**

A atividade antioxidante foi determinada pelo método ABTS conforme descrito por Rufino et al. (2007a). Para essa análise, testou-se o extrato obtido em 2.8 nas concentrações de 24 mg/mL, 48 mg/mL e 108 mg/mL utilizando o volume de 30 µL. Todas as análises foram realizadas em três experimentos independentes, cada um em triplicata. O álcool etílico foi utilizado como branco (leitura 734 nm) em espectrofotômetro (Shimadzu/Modelo UV-1800) e a quantificação de antioxidante total das amostras foi realizada por meio de curva padrão preparada com Trolox, sendo os resultados expressos como equivalentes de µM Trolox/g de extrato.

#### **26.8.2 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical DPPH•**

A atividade antioxidante foi medida segundo o método DPPH conforme descrito por Rufino et al. (2007b). O extrato foi obtido conforme descrito no item 2.8, nas concentrações de 24 mg/mL, 48 mg/mL e 108 mg/mL sendo utilizado o volume de 0,1 mL. O álcool etílico foi utilizado como branco (leitura 515 nm) em espectrofotômetro (Shimadzu/Modelo UV-1800) e todas as análises foram realizadas em três experimentos independentes, cada um em triplicata. Os resultados foram expressos pelo valor CE<sub>50</sub> (Concentração Efetiva 50%).

#### **26.8.3 Determinação de compostos fenólicos totais**

Os compostos fenólicos foram quantificados através do método proposto por Larrauri et al. (1997). O extrato foi obtido conforme item 2.8, sendo utilizado 100 µL nas

concentrações 24 mg/mL (T0) e 36 mg/mL (T30). As leituras foram realizadas após 30 min utilizando espectrofotômetro (Shimadzu/Modelo UV- 1800) à 700 nm. As análises foram realizadas em triplicada e a quantificação de compostos fenólicos totais das amostras foi realizada por meio de curva padrão preparada com ácido gálico, sendo o resultado expresso em mg EAG/g de extrato.

#### **26.8.4 Quantificação de taninos**

Os teores de taninos foram quantificados segundo método descrito por IAL (2008). O extrato foi obtido conforme descrito no item 2.8, sendo utilizado 150 µL nas concentrações de 24 mg/mL (T0) e 36 mg/mL (T30). A leitura foi realizada a 760 nm em espectrofotômetro (Shimadzu/ Modelo UV- 1800). A partir das absorbâncias obtidas, foi construída uma curva padrão preparada com ácido tânico, utilizada posteriormente para o cálculo dos teores de taninos totais, expressos em mg de EAT/g de extrato.

#### **26.8.5 Quantificação de flavonóides totais**

A determinação dos teores de flavonóides totais foi realizada segundo o método descrito por Woisky e Salatino (1998), utilizando-se 0,5 mL do extrato obtido no item 2.8. Os experimentos foram feitos em triplicata e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo UV- 1800) à 425 nm. O conteúdo de flavonóides totais foi determinado usando a curva padrão preparada com quercetina, sendo os resultados expressos em mg de EQ/g de extrato.

### **26.9 Bioacessibilidade**

Para os ensaios de bioacessibilidade foi pesado em frascos estéreis 20 g de UC1, e adicionado o extrato FSMAC (10 mg/mL), procedendo-se a homogeneização até completa absorção do volume de aproximadamente 4 mL. As amostras foram analisadas nos T0 e T30 dias.

Os ensaios de bioacessibilidade foram realizados seguindo o protocolo adaptado de Holanda et al. (2020) que descreve a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*, através das fases gástrica e intestinal. O método descreve a digestão de 24 g de extrato (queijo+extrato) misturado com a enzima pepsina em banho-maria com agitação a 37 °C por 2 h. Após esse

período, uma segunda digestão com pancreatina-bile com pH intestinal (pH 7,5) foi realizada utilizando uma membrana de diálise contendo um sistema de base para aumentar gradativamente o pH e permitir a difusão dos analitos de interesse. Foi determinado a quantidade de compostos fenólicos, taninos, flavonóides e antioxidantes potencialmente disponíveis para absorção posterior. Para monitorar a liberação de compostos bioativos dos extratos, foram analisadas as alíquotas referentes à fase gástrica e à fase intestinal (dialisada e não dialisada), a fim de quantificar esses compostos bioacessíveis.

### 26.9.1 Índices de Bioacessibilidade

A bioacessibilidade dos compostos bioativos foi expressa como uma porcentagem do valor alcançado para o dialisado em relação à quantidade inicial presente no extrato:

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = [D/I] * 100$$

Onde:

D= conteúdo de composto dialisado

I= conteúdo do composto inicial no extrato

### 26.10 Análise Estatística

Os resultados das análises de fenólicos totais, taninos, flavonóides e antioxidantes foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software Statistica 10, para cálculo da análise de variância (ANOVA) e aplicação do teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Para os dados estatísticos do zebrafish foi utilizado software GraphPad Prism v. 8.0, para cálculo da 2way ANOVA, nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) e para *Artemia salina* foi estimado a  $CL_{50\%}$  dos náuplios, através da análise Probit no software Statistica 10, nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 27. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 27.1 Toxicidade

Buscando extratos bioativos e atóxicos, diversos laboratórios de pesquisa de produtos naturais têm empregado o uso de animais de laboratório em testes toxicológicos

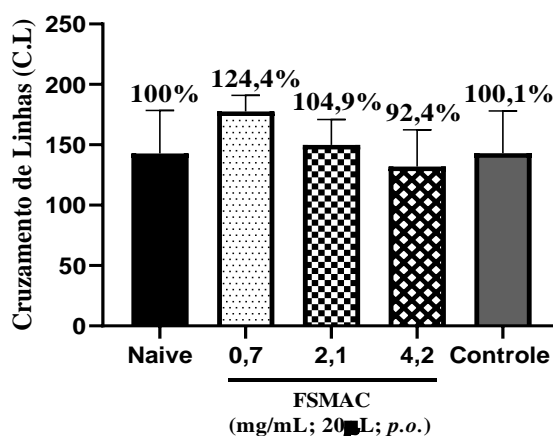
(HUNG et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2018). Dentre deles, podemos citar os testes *in vitro* em *Artemia salina* Leach (invertebrado) (MEYER et al., 1982), assim como o peixe-zebra adulto (*Danio rerio*), um vertebrado usado em testes *in vivo* (EKAMBARAM, PERUMAL e PAVADAI, 2017).

FSMAC não mostrou toxicidade frente *Artemia salina* nas concentrações testadas (10, 100, 500 e 1000 µg/mL) não havendo morte de náuplios durante as 24 h de análise, enquanto os estudos realizados por Cavalcante et al. (2016) constataram que o extrato etanólico da aroeira-do-sertão se mostrou tóxico com CL<sub>50</sub> de 100 µg/mL. Ressalta-se a importância da utilização da água como solvente na extração dos compostos bioativos da folha de aroeira-do-sertão, tendo em vista não apresentar toxicidade, não ser prejudicial ao meio ambiente e estar amplamente disponível.

Senigalia et al. (2020) verificaram que o extrato aquoso obtido por maceração das cascas da aroeira-do-sertão mostrou toxicidade havendo mortalidade da *Artemia salina* (CL<sub>50</sub> de 263,10 µg/mL). De acordo com Nguta et al. (2011), quanto menor for a CL<sub>50</sub> mais tóxica serão os extratos orgânicos e aquosos.

O teste de campo aberto é comumente utilizado para avaliar efeitos ansiogênicos, ansiolíticos, sedativos ou estimulantes em animais submetidos à vários agentes tóxicos (JOHNSON e HAMILTON, 2017), sendo um dos parâmetros de análise usados para avaliar a ação de drogas que podem agir sobre o sistema nervoso central do zebrafish e causar ou não deficiência locomotora (TAYLOR et al., 2017). FSMAC não apresentou nenhum efeito sedativo ou alterou o sistema locomotor, verificou-se que os animais apresentaram atividade locomotora semelhante entre os grupos amostrais, bem como em relação aos controles (Figura 1).

Figura 1 - Atividade locomotora do zebrafish adulto (*Danio rerio*) em Teste de Campo Aberto de FSMAC



Fonte: Próprio autor. Naive – animais não tratados; v.o. – administração via oral do extrato FSMAC; Control – água destilada estéril; Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média para seis animais/grupo; ANOVA seguido pelo teste de Tukey; Os números acima de cada coluna indicam a porcentagem de atividade locomotora.

Para o teste de toxicidade aguda, FSMAC nas concentrações (0,7; 2,1 e 4,2 mg/mL) mostrou-se seguro, pois não causou mortalidade dos animais em até 96 h de análise.

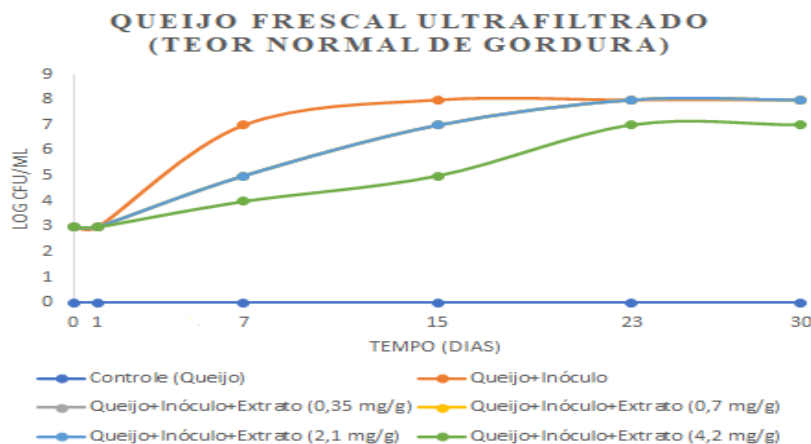
## 27.2 Avaliação da atividade antimicrobiana de FSMAC em UC1 e UC2

Inicialmente, os queijos frescos ultrafiltrados com teor normal de gordura (UC1) e light (UC2) foram submetidos as análises microbiológicas de Coliformes a 45 °C, *Staphylococcus* coagulase positiva/g, *Salmonella* sp/25 g e *Listeria monocytogenes*/25 g. As amostras se mantiveram dentro dos padrões da Resolução RDC nº 12/2001 (ANVISA, 2001), pois não foi detectado nenhum tipo de contaminação, mostrando que o processo de ultrafiltração e as condições de envasamento foram eficientes. Os testes foram realizados em outros queijos comerciais e foi observado um alto índice de contaminação tornando-se inviável a utilização dos produtos.

A maioria dos estudos disponíveis envolvendo atividade antimicrobiana considerou o efeito bactericida para aplicação do extrato em alimentos, sendo este então selecionado como parâmetro para estabelecer as diferentes concentrações testadas (CBM/2; CBM; 3xCBM; 6xCBM).

UC1 adicionado de diferentes concentrações de FSMAC, apresentou no tempo inicial e após 1º dia, contagens iguais de *S. aureus*, assim como a amostra C2. No decorrer do experimento, as amostras que continham FSMAC inibiram o crescimento da bactéria até o 15º dia. No 23º e 30º apenas a maior concentração de FSMAC (C6) reduziu 1 ciclo logarítmico as contagens de *S. aureus*. Constatou-se através da amostra controle inocuidade do material utilizado, mesmo após realizar seu fracionamento (Figura 2).

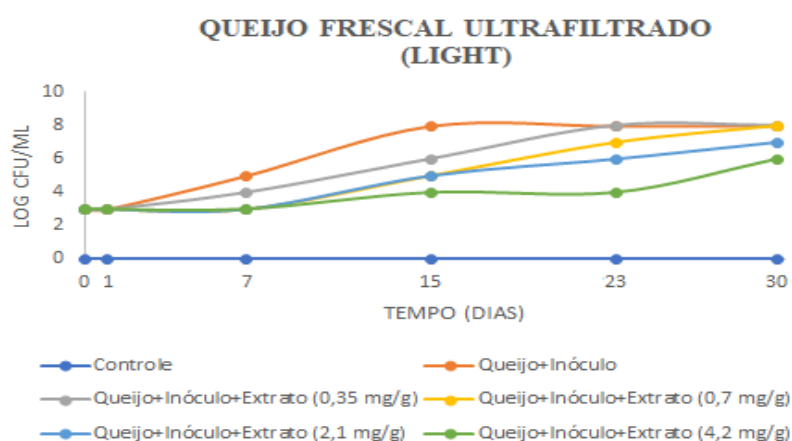
Figura 2 - Comportamento de *S. aureus* em queijo fresco ultrafiltrado com teor normal de gordura incubado a 9 °C por 30 dias com extrato aquoso de aroeira-do-sertão.



Fonte: Próprio autor.

UC2 adicionado de diferentes concentrações de FSMAC, apresentou no tempo inicial e após 1º dia, contagens iguais de *S. aureus*, assim como a amostra C2. No decorrer do experimento, as amostras que continham FSMAC inibiram o crescimento da bactéria até o 23º dia, com exceção da amostra de menor concentração (C3). Ao término do experimento, as amostras (C5 e C6) reduziram as contagens de *S. aureus* em 1 e 2 ciclos logarítmicos respectivamente. Constatou-se através da amostra controle inocuidade do material utilizado, mesmo após realizar seu fracionamento (Figura 3).

Figura 3 - Comportamento de *S. aureus* em queijo fresco ultrafiltrado light incubado a 9 °C por 30 dias com extrato de aroeira-do-sertão.



Fonte: Próprio autor.

A diferença de atividade antimicrobiana de FSMAC nos queijos testados pode ser atribuído a parâmetros intrínsecos, como atividade de água, gordura e proteína. De forma geral, a atividade de água elevada aumenta a ação antimicrobiana porque facilita o transporte de agentes antibacterianos para o local alvo na célula. Caso o produto possua pouca água a

recuperação de células danificadas por antimicrobianos naturais ocorrerá de forma mais rápida (SMITH-PALMER, STEWART e FYFE, 2004). Souza et al. (2017) em seus estudos com queijo minas frescal, constataram que as amostras apresentaram atividade de água de 0,96.

Através dos testes foi possível comprovar a eficiência de FSMAC em controlar o *S. aureus* em amostras de UC1 e UC2, obtendo maior eficiência no UC2, tendo em vista que a gordura influi consideravelmente na sobrevivência da bactéria conforme observado nos resultados. Outros autores sugeriram que a gordura nos alimentos pode formar um camada protetora em torno das células bacterianas, protegendo-as de agentes antimicrobianos (MEJLHOLM e DALGAARD, 2002). Quanto mais disponibilidade de nutrientes no queijo mais rápida a reparação de células bacterianas danificadas (BURT, 2004; NAZER et al., 2005), conforme foi observado no UC1, as contagens de *S. aureus* aumentaram mais rapidamente que UC2.

Proteínas e gorduras se ligam e/ou dissolvem compostos ativos reduzindo sua disponibilidade para atividade antimicrobiana. As proteínas podem formar complexos com constituintes fenólicos presentes no extrato, tornando esses compostos indisponíveis para atacar as células bacterianas (BURT, 2004).

No que diz respeito a influência do teor de gordura na atividade antimicrobiana, Cava et al. (2007) demonstraram em suas pesquisas com óleo essencial de cravo e canela adicionado em leite integral, semidesnatado e desnatado, que o efeito antimicrobiano dos compostos naturais diminuiu com o aumento do teor de gordura do leite. Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008) avaliaram a interferência dos lipídios na eficácia da atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano e tomilho, relataram que adição de altas concentrações de lipídios reduziu a atividade inibitória contra *L. monocytogenes*. Corroborando com os resultados encontrados na presente pesquisa.

A estrutura física do alimento também pode prejudicar a dispersão uniforme do extrato no sistema, tornando difícil o contato com células microbianas em algumas áreas específicas (GUTIERREZ, BARRY-RYAN e BOURKE, 2008, 2009). Durante o preparo das amostras foi realizado a homogeneização tanto do extrato aplicado como do inóculo com intuito de absorção completa pela massa do queijo. Sugerem-se testes de aplicação de FSMAC diretamente na massa dos queijos durante sua produção garantido uma melhor uniformidade e absorção do extrato.

Devido a composição do queijo, as concentrações de extratos a serem adicionados para alcançar uma determinada inibição microbiológica deve possivelmente ser maior que os testes *in vitro* (MORO et al., 2015). A concentração de extratos de plantas a serem determinados

para incorporação no queijo deve suprir as possíveis perdas durante a produção, além da interação com alimentos, a fim de fornecer inibição microbiológica adequada (HASSANIEN, MAHGOUD e EL-ZAHAN, 2014; MORO et al., 2015). Concordando com os autores foi possível verificar que as concentrações mais efetivas após término dos experimentos realmente foram maiores do que a concentração bactericida mínima encontrada nos testes *in vitro*, concluindo que a matriz alimentar interfere na ação antimicrobiana do extrato aplicado.

Outros fatores, como embalagem, temperatura de armazenamento, concentração do inóculo e tipo de microrganismo pode interferir na eficiência antimicrobiana natural (BURT, 2004). Um fator importante que foi controlado durante os trinta dias de análise foi a temperatura (9 °C) de armazenamento das amostras, pois variações nesse parâmetro poderia ocasionar um aumento do número viável de bactérias. Bahk, Yousef e Marth (1990) e Beuchat et al. (1994) também relataram que baixas temperaturas aumentaram a atividade inibitória de extratos vegetais.

Shan et al. (2011) relataram que a concentração inibitória mínima do óleo essencial de romã contra *S. aureus* ( $10^5$  UFC/mL), foi 2,5 mg/mL no meio de cultura, enquanto a concentração de 40 mg/mL em queijo cheddar não conseguiu inibir a mesma população dessa bactéria. Resultados semelhantes foram obtidos por Hassanien, Mahgoud e El-Zahan. (2014) onde a concentração de 0,1% de óleo essencial de cominho preto resultaram na redução do crescimento de *S. aureus* em meio de cultura enquanto em queijos, tal concentração não foi eficaz.

O mecanismo de ação de FSMAC foi baseado nos danos causados na membrana celular conforme ficou comprovado através da microscopia confocal (item 3.3). Estudos indicam que diferentes grupos químicos são capazes de agir em mais de um alvo na célula, tais como, na permeabilização ou ruptura da membrana citoplasmática, permitindo a passagem de compostos inespecíficos ou liberação de conteúdo citoplasmático, respectivamente (GILL e HOLLEY, 2006; ZHANG et al., 2016). Zhang et al. (2016) observaram vazamento do conteúdo citoplasmático de *S. aureus* após o aumento da concentração de óleo essencial de canela.

Yuste e Fung (2002) em seus experimentos com suco de maçã observaram redução da contagem total da bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes* em relação ao controle, com adição de canela em pó ao suco nas concentrações de 0,1, 0,2 e 0,3% peso/volume. No entanto os autores tiveram que regular o pH da amostra para favorecer o crescimento do microrganismo descaracterizando o produto conforme é vendido comercialmente.

Carvalho et al. (2015) pesquisaram a adição *S. aureus* e óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. em um caldo à base de queijo e um queijo coalho semi-sólido. Como resultado os



autores obtiveram inibição da bactéria no caldo à base queijo e no queijo coalho semi-sólido nas concentrações a partir de 2,5 µL/mL obtendo redução de 0,9 e 1 ciclo logarítmico respectivamente.

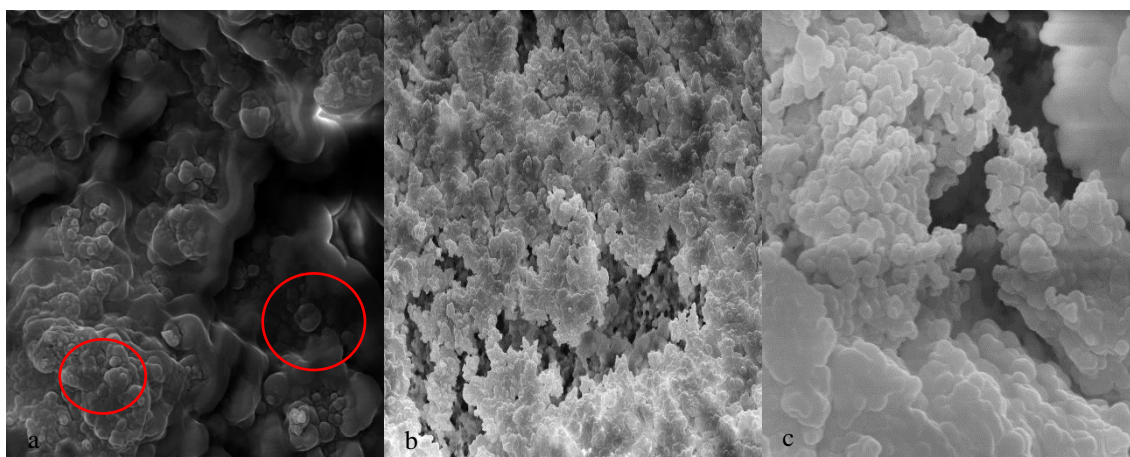
Os ensaios mostraram que as concentrações de FSMAC utilizadas foram consideradas baixas e efetivas para controlar o *S. aureus* na matriz alimentar, indicando grande potencial de uso como antimicrobiano para aumentar a segurança durante a vida de prateleira do produto.

### 27.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Confocal em UC1

As imagens de microscopia eletrônica de varredura evidenciaram vários componentes estruturais do queijo, matriz proteica contendo glóbulos de gordura intercalada com áreas escuras. Essas áreas correspondem a bolsas de ar ou a fase aquosa que evaporou durante a preparação das amostras (Figura 4) conforme descrito por Ong et al. (2012). Segundo Han et al. (2011), queijos com polifenóis podem induzir a estruturas intercaladas e heterogêneas devido às interações dos polifenóis com a gordura e proteínas.

Devido o queijo ser obtido pelo processo de ultrafiltração, não foi visualizado nenhuma bactéria láctica nas amostras (CARVALHO, VIOTTO e KUAYE, 2007). É possível diferenciar a amostra controle (C1) da amostra contendo o *S. aureus* (C2) (Figura 4). A matriz alimentar tem em sua composição diversos nutrientes, principalmente proteínas e gorduras, não sendo possível visualizar o dano celular ocasionado na bactéria por FSMAC na amostra (C4) em que o extrato foi aplicado.

Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura do queijo fresco ultrafiltrado com *S. aureus* e extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*.



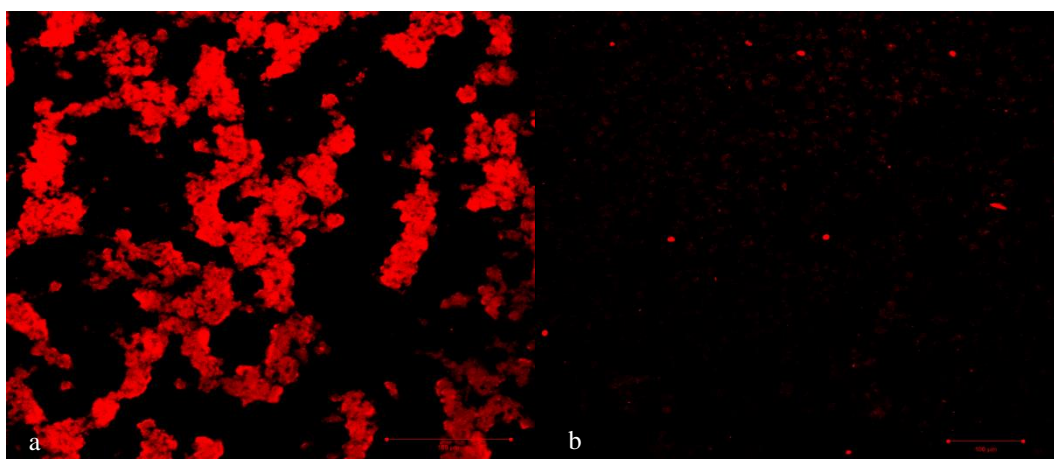
Fonte: Próprio autor. Queijo (a); Queijo+bactéria (b); Queijo+bactéria+extrato (c); Matriz proteica contendo glóbulos de gordura intercalada com áreas escuras (destaque em vermelho);

Como citado anteriormente no item 3.2, houve uma redução logarítmica na amostra que recebeu o extrato, então no intuito de diferenciar as amostras (C2 e C4) foi realizado a microscopia confocal. Ensaios realizados mostraram que parte das células apresentaram coloração com iodeto de propídio, molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. O iodeto de propídio é de elevado peso molecular, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais da apoptose. Desse modo, permite a discriminação de células intactas com as que apresentam permeabilidade na membrana (TROMBETTA et al., 2005).

Tanto na amostra (C2) como na (C4) houve a presença da coloração vermelha (Figura 5), ou seja, presença de células inviáveis, porém com maior percentual na amostra que o extrato foi adicionado, refletindo no potencial antimicrobiano de FSMAC, que reduziu a contagem da bactéria conforme visto no item 3.2. Bampi (2014) observou que houve morte celular no controle de *S. aureus* por citometria de fluxo, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Os produtos com atividade antimicrobiana que atuam inibindo a síntese da parede celular, geralmente, estão relacionados com a inibição da síntese de peptidoglicano em algum dos seus níveis, esta é a camada essencial para a sobrevivência das bactérias (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2011; TORTORA, FUNKE e CASE, 2015). Assim uma desestabilização promove o aumento da permeabilidade e liberação dos componentes celulares, levando a morte celular bacteriana (KAYE et al., 2016; MENDES e BURDMANN, 2009; GIRARDELLO e GALES, 2012).

Figura 5 - Avaliação de permeabilidade de membrana celular por microscopia confocal de *S. aureus* com extrato aquoso das folhas secas de *Myracrodruon urundeuva* em amostra de queijo fresco ultrafiltrado.



Fonte: Próprio autor. Queijo+bactéria+extrato (a); Queijo+bactéria (b)

## 27.4 Bioacessibilidade de compostos bioativos de FSMAC em UC1

Tanto os compostos fenólicos quanto os taninos tiveram um aumento na fase gástrica (Tabela 1), sugerindo uma liberação desses compostos e logo após redução dos valores mostrando que foram parcialmente degradados na fase final da digestão quando expostos a pH elevado (6-8) (SONG et al., 2015), corroborando com os resultados de Helal et al. (2015) que obtiveram liberação de polifenóis após a simulação gástrica, resultando em 69% (ácido tânico) e 90% (ácido gálico) em relação aos compostos iniciais.

Em análise com FSMAC foi identificado através da ressonância magnética nuclear o ácido gálico e taninos (encontrada anteriormente). Helal et al. (2015) demonstraram que a retenção de polifenóis adicionados em queijo pode variar em função da hidrofiliabilidade, o ácido gálico é mais hidrofílico enquanto o ácido tânico apresentou maior coeficiente de retenção. Fator que contribuiu para os resultados apresentados no presente trabalho, pois, o percentual bioacessível para taninos foi maior nos dois tempos em relação aos compostos fenólicos.

**Tabela 1.** Bioacessibilidade de compostos bioativos presentes no extrato de aroeira-do-sertão aplicado no queijo fresco ultrafiltrado com teor normal de gordura.

Índice de Bioacessibilidade T0					
Amostra	CF (mg EAG/100g)	ABTS (µg Trolox/g)	CE <sub>50%</sub> (mg/L)	Taninos (mg/100g)	Flavonóides (mg EQ/100g)
Extrato	39,19±4,5 <sup>a</sup>	11,61±0,40 <sup>a</sup>	127,92±0,61 <sup>b</sup>	105,94±16,42 <sup>a</sup>	22,80±2,02 <sup>b</sup>
Fase Gástrica	155,22±5,57 <sup>b</sup>	49,84±2,91 <sup>b</sup>	101,38±1,00 <sup>a</sup>	901,70±27,91 <sup>b</sup>	13,49±0,09 <sup>a</sup>
Fase Intestinal (não dialisado)	93,42±7,55 <sup>b</sup>	40,19±2,82 <sup>b</sup>	95,26±3,63 <sup>a</sup>	457,69±35,17 <sup>a</sup>	22,84±1,45 <sup>a</sup>
Fase Intestinal (dialisado)	26,90±1,27 <sup>a</sup>	4,41±0,00 <sup>a</sup>	578,90±2,51 <sup>b</sup>	189,41±14,21 <sup>a</sup>	15,47±0,32 <sup>a</sup>
Índice de Bioacessibilidade %	68,64	38,01	452,54	178,79	67,86
Índice de Bioacessibilidade T30					
Extrato	45,04±1,41 <sup>a</sup>	11,17±0,82 <sup>a</sup>	116,97±1,40 <sup>a</sup>	619,83±54,89 <sup>b</sup>	16,28±0,14 <sup>a</sup>
Fase Gástrica	90,13±2,93 <sup>a</sup>	4,52±0,10 <sup>a</sup>	855,62±23,50 <sup>b</sup>	756,13±59,37 <sup>a</sup>	14,96±0,37 <sup>b</sup>
Fase Intestinal (não dialisado)	66,42±1,61 <sup>a</sup>	5,51±0,09 <sup>a</sup>	196,93±12,00 <sup>b</sup>	784,95±33,38 <sup>b</sup>	35,53±0,65 <sup>b</sup>
Fase Intestinal (dialisado)	28,54±0,57 <sup>a</sup>	8,05±0,13 <sup>b</sup>	369,08±9,43 <sup>a</sup>	591,61±35,76 <sup>b</sup>	16,81±1,35 <sup>a</sup>
Índice de Bioacessibilidade %	63,37	72,07	315,53	95,45	103,26

Fonte: Próprio autor. Mesma letra indica que não houve diferença estatística (p<0,05) entre as amostras em cada análise; Letras diferentes houve diferença estatística (p<0,05) entre as amostras em cada análise.

Estudos relatam alta estabilidade de polifenóis em ambiente gástrico (LAMOTHE et al., 2014; XIE et al., 2013). Tenore et al. (2015) relataram que a epigallocatequina e galato de epigallocatequina foram mais sensíveis à degradação, com perdas de mais de 80% após simulação gastrointestinal *in vitro* da infusão do chá verde. Com base nisso é possível concluir que as perdas também vão depender de quais compostos fenólicos o extrato da planta é composto. Lamothe et al. (2016) concluíram com seus estudos que a aplicação de compostos fenólicos isolados em uma matriz de proteína sólida (queijo) resultou em um aumento na bioacessibilidade em comparação com a aplicação do extrato.

Após simulação gastrointestinal foi possível obter 68,64% e 63,37% de compostos fenólicos, corroborando com a pesquisa de Helal et al. (2015) que recuperaram 70% de catequinas após simulação gastropancreática de queijo enriquecido de polifenóis. O percentual bioacessível dos compostos fenólicos após trinta dias de análise diminuiu levemente, isso pode ser atribuído à transformação dos compostos fenólicos que são instáveis e sofre numerosas reações enzimáticas e químicas durante o armazenamento de alimentos conforme declarado por Poncet-Legrand et al. (2006). El-Din et al. (2010) também obtiveram redução dos compostos fenólicos após trinta dias de análise do queijo adicionado de extrato de alecrim em todas as concentrações testadas.

Os produtos de queijo formulados com alguns compostos fenólicos melhoraram a propriedade antioxidante e uma alta taxa de recuperação de compostos polifenólicos em queijos foi observada (HAN et al., 2011). Os polifenóis também podem formar complexos com minerais derivados do leite (cálcio e magnésio) e melhorar sua bioacessibilidade (MOSER et al., 2014).

O percentual bioacessível para flavonóides no tempo inicial ficou próximo ao encontrado para fenólicos e no tempo final o valor ficou bem superior (67,86 e 103,26% respectivamente). Compostos fenólicos e flavonóides são considerados classes secundárias de metabólitos responsáveis por diversas atividades farmacológicas de extratos vegetais, destacando-se o antioxidante, antinociceptivo e anti-inflamatório (MAGALHÃES et al., 2018; ASHAFA, OREKOYA e YAKUBU, 2012). Suhaj et al. (2006) relataram que os flavonóides encontrados em plantas apresenta atividade antioxidante.

Compostos fenólicos podem se associar a componentes alimentares, como proteínas, causando agregação e precipitação significativas, e em última análise, quantidade e/ou perda funcional dos polifenóis (BARTOLOME, ESTRELLA e HERNANDEZ, 2000; XIAO et al., 2011).

A presença de compostos fenólicos favoreceu a atividade antioxidante encontrada através das metodologias ABTS e DPPH, podendo ser observado que a capacidade antioxidante se estendeu durante os trinta dias de análise deixando inclusive o produto com maior valor nutritivo. A incubação de polifenóis com proteínas do leite mostrou melhorar a estabilidade contra a degradação oxidativa durante a digestão *in vitro*, resultando em atividade antioxidante aumentada (LAMOTHE et al., 2014; XIE et al., 2013; TAGLIAZUCCHI et al., 2012).

Na avaliação da capacidade antioxidante pelas metodologias ABTS e DPPH, constatarem-se resultados coerentes com relação ao percentual bioacessível, pois, no tempo inicial os índices mostraram 38,01% e 452,54% e após trinta dias de armazenamento houve um

aumento na atividade antioxidante chegando a 72,07% e 315,53% respectivamente. Levando em consideração que os resultados dessas metodologias são inversamente proporcionais, enquanto ABTS dá um valor elevado, o DPPH deve dar baixo para mostrar que a atividade antioxidante foi positiva. Carochio et al. (2017) avaliaram a atividade antioxidante de extratos e plantas desidratadas aplicadas em queijo e observaram que houve diferença nos resultados, pois foi utilizadas três metodologias (poder redutor,  $\beta$ -caroteno e ácido tiobarbitúrico).

O percentual bioacessível da atividade antioxidante quase que dobrou após 30 dias de análise em relação ao tempo inicial, Giroux et al. (2013) também obtiveram aumento da atividade antioxidante após 29 dias de armazenamento do queijo cheddar adicionado do extrato de chá verde.

## 28. CONCLUSÃO

O extrato aquoso da aroeira-do-sertão mostrou-se seguro para aplicação no queijo não apresentando toxicidade nas concentrações utilizadas e apresentou potencial para uso como antimicrobiano sobre *S. aureus* em queijo fresco ultrafiltrado com teor normal de gordura e light em baixas concentrações. Imagens de microscopia confirmaram a ação do extrato sobre a bactéria inoculada no queijo, mostrando que o extrato age na membrana plasmática. A adição do extrato ao queijo fresco ultrafiltrado com teor normal de gordura proporcionou ação antioxidante durante o armazenamento.

## 29. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os oito extratos avaliados nesta pesquisa apresentaram importantes atividades biológicas, se destacando os extratos das folhas secas obtidas por maceração e decocção. As frações obtidas do extrato aquoso das folhas frescas por decocção mostraram considerável atividade antimicrobiana sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

Os extratos das folhas secas e frescas apresentaram em sua composição galotaninos, ácido gálico, flavonóides, derivado da prolina (*N*-Metil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina) e ácido quínico, dentre outros compostos, mostrando atividade antimicrobiana sobre todas as bactérias estudadas e potencial antioxidante.

As micrografias mostraram os danos estruturais ocasionado pelos extratos aquosos das folhas secas obtidos por maceração e decocção, tais como, rugosidade, perda de parede celular, extravasamento celular e mudança para L-forma.

Após simulação gastrointestinal *in vitro* foram quantificados quantidades significativas de compostos fenólicos, taninos, flavonóides e atividade antioxidante, indicando que os extratos aquosos das folhas secas obtidos por maceração e decocção podem ser utilizados como fonte de compostos bioativos pela indústria de alimentos.

Nenhum dos extratos testados apresentaram toxicidade frente *Artemia salina* e Zebrafish. O extrato aquoso das folhas secas obtidos por maceração apresentou potencial para uso como antimicrobiano sobre *S. aureus* em queijo fresco ultrafiltrado com teor normal de gordura e light em baixas concentrações, as microscopias mostraram que o extrato age na membrana plasmática. A adição do extrato ao queijo fresco ultrafiltrado com teor normal de gordura proporcionou ação antioxidante durante o armazenamento.

## REFERÊNCIAS

- ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Consumo per capita de queijos no Brasil. Disponível em: <https://www.abiq.com.br/index.asp>. Acessado em: 20 mai. 2021.
- ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M.; JAMOUS, R. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chem.**, Bruxelas, v. 166, p. 179–191, jan. 2015.
- AGUILAR-ORTIGOZA, C. J.; SOSA, V.; AGUILAR-ORTIGOZA, M. Toxic phenols in various Anacardiaceae species. **Econ Bot.**, Fllerton, v. 57, n. 3, p. 354 – 364, sep. 2003.
- AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: Impact of environmental complexity. **Behav Processes**, Utrecht, v. 92, p.88-98, jan. 2013.
- AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; TAKASHI, O.; IWATSUKI, K. (2001) Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother.**, Birmingham, v. 48, n. 4, p. 487-491, oct. 2001.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharma J.**, Riyadh, v. 21, n. 2, p. 143-152, apr. 2013.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Acta Bot Bras.**, Brasília, v. 16, n. 3, p. 273-285, jul/sep. 2002.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. F. L.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 114, n. 3, p. 325–354, dec. 2007.
- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **J Agric Food Chem.**, Washington, v. 49, n. 4, p. 4168-4170, sep. 2001.
- ALMEIDA, Semíramis Pedrosa de; PROENÇA, Carolyn Elinore Barnes; SANO, Sueli Matiko; RIBEIRO, José Felipe. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998.
- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos e ciência – Revista da rede ensino FTC**, Pituaçu, v. 5, n. 12, p. 7-8, dec. 2007.
- ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. DO S. V. *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 222-224, mar/apr. 2009.

AMADUCI, M. R. L. **Effects of electromagnetic field on cells and bacteria**. 2007. Dissertation (Master's degree in Electrical Engineering) – Engineering College Electrical, State University of Campinas, Campinas, 2007.

AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amaz.**, Manaus, v. 41, n. 3, p. 431-434, jul/sep. 2011.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da Aroeira- Preta (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciênc Agrotec.**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J Vasc Br.**, Jaraguá do Sul, v. 3, n. 2, p.145-154, apr/jun. 2004.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CÂMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Antimicrobial activity "*in vitro*" and determination of the minimal inhibitory concentration (CIM) of phytoconstituents and synthetic products on bacteria and leveduri form fungi. **Rev Bras Farmacogn.**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 517-524, oct/dec. 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

APEA-BAH, F. B.; MINNAAR, A.; BESTER, M. J.; DUODU, K. G. Sorghum-cowpea composite porridge as a functional food, Part II: Antioxidant properties as affected by simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chem.**, Washington, v. 197, p. 307–315, apr. 2016.

AQUINO, P. E. A.; MAGALHÃES, T. R.; NICOLAU, L. A. D.; LEAL, L. K. A. M.; AQUINO, N. C.; SANTOS, S. M.; NEVES, K. R. T.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, G. S. B. The anti-inflammatory effects of N-methyl-(2S, 4R)-trans-4-hydroxy-L-proline from *Syderoxylon obtusifolium* are related to its inhibition of TNT- $\alpha$  and inflammatory enzymes. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 24, p. 14-23, jan. 2017.

AQUINO, N. C.; QUEIROZ, E. F.; MARCOURT, L.; FREITAS, L. B. N.; ARAÚJO, E. V. O.; LEAL, L. K. A. M.; BEZERRA, A. M. E.; BOCCARD, J.; WOLFENDER, J.-L.; SILVEIRA, E. R. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the decoction from leaves of a cultivated specimen of *Myracrodruon urundeuva*. **J Braz Chem Soc.**, Campinas, v. 30, n. 8, p. 1616-1623, aug. 2019.

ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. “A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge”. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 120, n. 1, p. 72–80, oct. 2008.

ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de



*Solanum lycocarpum* A. ST.-Hill (Solanaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, Araraquara, v. 31, n. 2, p. 205-209, may. 2010.

ASENSIO, C. M.; GROSSO, N. R.; JULIANI, H. R. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. **Food Sci Technol.**, Campinas, v. 60, n. 2, p. 664-671, mar. 2015.

ASHAFA, A. O. T.; OREKOYA, L. O.; YAKUBU, M. T. Toxicity profile of ethanolic extract of *Azadirachta indica* stem bark in male Wistar rats. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.**, Haikou, v. 2, n. 10, p. 811-817, oct. 2012.

ASKARI, G. A.; KAHOUADJI, A.; KHEDID, K.; MOUSADDAK, M.; OUAFFAK, L.; CHAROF, R.; MENNANE, Z. Evaluation of antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts of leaves of *Vitis vinifera* collected from different regions in Morocco. **American-Eurasian J Agric & Environ Sci.**, Cairo, v. 12, n. 1, p. 85-90, fev. 2012.

AZEVEDO, Celma Domingos de; MOURA, Maria Aparecida de. **Cultivation of medicinal plants: practical guide**. Niterói: Rio Rural Program, 2010.

AZIZAH, A. H.; RUSLAWATTI, N. M.; TEE, T. S. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. **Food Chem.**, London, v. 64, n. 2, p. 199-202, feb. 1999.

BAGNIEWSKA-ZADWORNA, A.; BYCZYK, J.; EISSENSTANT, D.M.; OLEKSYN, J.; ZADWORNÝ, M. Avoiding transport bottlenecks in an expanding root system: *Xylem vessel* development in fibrous and pioneer roots under field conditions. **Am J Bot.**, Baltimore, v. 99, n. 9, p. 1417-26, sep. 2012.

BAHK, J.; YOUSEF, A. E.; MARTH, E. H. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of selected spices. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, Athens, v. 23, n. 1, p. 66-69, jan. 1990.

BAMPI, G. M. **Ação bactericida (*in vitro*) de gerador de alta frequência sobre culturas bacterianas comumente encontradas em feridas crônicas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2014.

BANDYOPADHYAY, M.; CHAKRABORTY, R.; RAYCHAUDHURI, U. Antioxidant activity of natural plant sources in dairy dessert (Sandesh) under thermal treatment. **Food Sci Technol.**, Campinas, v. 41, n. 5, p. 816-825, jun. 2008.

BANSO, A.; ADEYEMO, S. O. Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from *Dichrostachys cinerea*. **Afr J Biotechnol.**, Nairobi, v. 6, n. 15, p. 1785-1787, aug. 2007.

BARTOLOME, B.; ESTRELLA, I.; HERNANDEZ, M. T. Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). **J Food Sci.**, Madison, v. 65, n. 4, p. 617-621, may. 2000.

BAUBLIS, A.; DECKER, E. A.; CLYDESDALE, F. M. Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals. **Food Chem.**, Bruxelas, v. 68, n. 1, p. 1-6, jan. 2000.

BERGER, A. P. A.; RANAL, M.; LOPES, S. W.; DORNELES, M. C.; SANTANA, D. G.; PEREIRA, R. S. Emergência de plântulas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) do vale do Rio Araguari, MG. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1029-1031, jul. 2007.

BERMÚDEZ-SOTO, M. A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-CONESA, M. T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. **Food Chem.**, Bruxelas, v. 102, n. 3, p. 865-874, sep. 2007.

BEUCHAT, L. R.; BRACKETT, R. E.; DOYLE, M. P. Lethality of carrot juice to *Listeria monocytogenes* as affected by pH, sodium chloride and temperature. **J Food Prot.**, Des Moines, v. 57, n. 6, p. 470-474, jun. 1994.

BEVILAQUA, Gilberto Antônio Peripolli; SCHIEDECK, Gustavo; SCHWENGBER, José Ernani. **Identification and technology of medicinal plants of temperate climate flora**. Pelotas: Embrapa, 2007.

BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microb Drug Resist.**, Larchmont, v. 19, n. 4, p. 256-65, aug. 2013.

BORUT, P.; RAJA, D. Free radicals and extrinsic skin aging. **Dermatol Res Pract.**, London, v. 2012, p. 1-4, feb. 2012.

BRANDT, A. L.; CASTILLO, A.; HARRIS, K. B.; KEETON, J. T.; HARDIN, M. D.; TAYLOR, T. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. **J Food Sci.**, Chicargo, v. 75, n. 9, p. M557-563, nov-dec. 2010.

BRANEN, J. K.; DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **Int J Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 90, p. 63-74, jan. 2004.

BRAUNBECK, T.; KAIS, B.; LAMMER, E.; OTTE, J.; SCHNEIDER, K.; STENGEL, D.; STRECKER, R. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environ Sci Pollut Res.**, Bordéus, v. 22, n. 21, p. 16247-16261, nov. 2015.

BRUNTON, Laurence; CHABNER, Bruce; KNOLLMANN, Björn. **Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12 ed. New York: McGraw-Hill, 2011.

BUGGLE, V.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M.; FURTADO, E.; ROCHA, S.F.R. Influence of different drying-temperatures on the amount of essential oils and citral content in *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. – POACEAE. **Acta Hort.**, Mendoza, n. 500, p. 71-74, aug. 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods- a review. **Int J Food Microbiol.**, Grugliasco, v. 94, n. 3, p. 223-253, aug. 2004.

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products – Future scaffolding for new antibiotics?. **Biochem Pharmacol.**, Kansas, v. 71, n. 7, p. 919-929, mar. 2006.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quím Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, jul. 2009.

CALOU, I.; BANDEIRA, M. A.; AGULAR-GALVÃO, W.; CERQUEIRA, G.; SIQUEIRA, R.; NEVES, K. R.; BRITO, G. A.; VIANA, G. "Neuroprotective properties of a standardized extract from *Myracrodruon urundeuva* fr. all. (aroeira-do-sertão), as evaluated by a parkinson's disease model in rats." **Parkinson's Dis.**, London, v. 2014, p: 1-11, jun. 2014.

CALEJA, C.; BARROS, L.; ANTONIO, A. L.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C. F. R. *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. **J Funct Foods**, Wageningen, v. 12, p. 428-438, jan. 2015.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: Sociedade, Saberes e Práticas Educacionais**, Iporá, v. 3, n. 2, p. 44–75, jul/dec. 2014.

CAROCHO, M.; BENTO, A.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Utilização de plantas como ingredientes bioativos e aditivos naturais em queijo de ovelha. **Rev Cienc Agrar.**, Lisboa, v. 40, n. sp, p. 321-328, mar. 2017.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 131, n. 2, p. 326–342, sep. 2010.

CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa, 2003.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by diferente technological processes. **Food Control**, Vurrey, v. 18, n. 3, p. 262-267, mar. 2007.

CARVALHO, M. S.; OLIVEIRA, D. A. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão. **Revista Eletrônica de Biologia**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 1-7, oct/dec. 2012.

CARVALHO, R. J.; SOUZA, G. T.; HONÓRIO, V. G.; SOUSA, J. P.; CONCEIÇÃO, M. L.; MAGANANI, M.; SOUZA, E. L. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil Against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiol.**, Avignon, v. 52, p. 59-65, dec. 2015.

CARVALHO, M. W. **Propriedades e simulação gastrointestinal *in vitro* de iogurte adicionado de extrato de *Stevia Rebaudiana* (Bert.) em pó**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

CASTRO, H. G.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. Initial growth and harvest times in six accessions of *Baccharis myriocephala* D.C. **Rev Bras Plantas Med.**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 1-6, jan. 1999.

CASTRO, Henrique Gullon de; FERREIRA, Francisco Affonso; SILVA, Derly José Henriques da; MOSQUIM, Paulo Roberto. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2. ed. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora, 2004.

CASTRO, C.; LUZ, L.; GUEDES, J. A. C.; PORTO, D.; SILVA, M. F. S.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, P.; CANUTO, K.; BRITO, E. S.; ZAMPIERI, D.; PESSOA, C.; ZOCCOLO, G. Metabolomics-Based Discovery of Biomarkers with Cytotoxic Potential in Extracts of *Myracrodruon urundeuva*. **J Braz Chem Soc.**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 1–13, 2019, apr. 2020.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; SILVA, M. A. R.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras Anal Clin.**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 9-14, jan. 2010.

CAVA, R.; NOWAK, E.; TABOADA, U.; MARIN-INIESTA, F. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. **J Food Prot.**, Des Moines, v. 70, n. 12, p. 2708-2934, dec. 2007.

CAVALCANTE, Y. T. D.; OLIVEIRA, J. M. G.; PEREIRA, L. J. C.; BEZERRA, P. A.; MOURA, E. R.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, A. P. R. Pesquisa de toxicidade do extrato etanólico das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Allem. frente à *Artemia salina*. **Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde**, Teresina, v. 3, n. 2, p. 148-150, jun. 2016.

CECÍLIO, A. B.; DE FARIA, D. B.; OLIVEIRA, P. DE C.; CALDAS, S.; DE OLIVEIRA, D. A.; SOBRAL, M. E.; DUARTE, M. G.; MOREIRA, C. P.; SILVA, C. G.; DE ALMEIDA, V. L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 141, n. 3, p. 975-981, jun. 2012.

CECÍLIO, A. B.; OLIVEIRA, P. C.; CALDAS, S.; CAMPANA, P. R. V.; FRANCISCO, F. L.; DUARTE, M. G. R.; MENDONÇA, L. A. M.; ALMEIDA, V. L. Antiviral activity of *Myracrodruon urundeuva* against rotavírus. **Braz J Pharmacog.**, Curitiba, v. 26, p. 197-202, dec. 2016.

CELEP, E.; İNAN, Y.; AKYÜZ, S.; YESILADA, E. The bioaccessible phenolic profile and antioxidant potential of *Hypericum perforatum* L. after simulated human digestion. **Ind Crops Prod.**, Fargo, v. 109, p. 717-723, dec. 2017.

CHAVES, M. C.; SANTOS, F. A.; MENEZES, A. M. S.; RAO, V. S. N. Experimental evaluation of *Myracrodruon urundeuva* bark extract for antidiarrheal activity. **Phytother Res.**, London, v. 12, n. 1, p. 549-552, dec. 1998.

CHAVES, M. H.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D.; COSTA, D. A.; OLIVEIRA, C. A. A.; COSTA, A. F.; BRITO JÚNIOR, F. E. M. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L. Anacardiaceae. **Rev Bras Farmacogn.**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 106-112, jan/mar. 2010.

CLAEYS, W. L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; BLOCK, J.; DEWETTINCK, K.; DIERICK, K.; ZUTTER, L.; HUYGHEBAERT, A.; IMBERECHTS, H.; THIANGE, P.; VANDENPLAS, Y.; HERMAN, L. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. **Food Control**, Vurrey, v. 31, n. 1, p. 251-262, may. 2013.

CLIFFORD, M. N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 70, n. 12, p. 1103-1114, dec. 2004.

COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Hortic Bras.**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 956-959, oct/dec. 2005.

COSTA, C. O. D'S. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão e *Schinus terebinthifolius* Raddi**. 2011. Dissertação (Mestrado em Processos interativos dos órgãos e sistemas) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

COSTA, D. C.; COSTA, H. S.; ALBUQUERQUE, T. G.; RAMOS, F.; CASTILHO, M. C.; SANCHES-SILVA, A. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. **Trends Food Sci Technol.**, Cambrige, v. 45, n. 2, p. 336-354, oct. 2015.

CRISTOFOLI, N. L.; LIMA, C. A. R.; VIEIRA, M. M. C.; ANDRADE, K. S.; FERREIRA, SANDRA, R. S. Antioxidant and antimicrobial potencial of cajazeira leaves (*Spondias mombin*) extracts. **Sep Sci Technol.**, Fayetteville, v. 54, n. 4, p. 580-590, ago. 2018.

CROTEAU, Rodney; KUTCHAN, Toni; LEWIS, Norman. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, Bob; GRUISSEM, Wilhelm; JONES, Russell. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat Prod Rep.**, Dresden, v. 26, n. 8, p. 1001-1043, aug. 2009.

CRUZ, R. A. S.; ALMEIDA, H.; FERNANDES, C. P.; JOSEPH -NATHAN, P.; ROCHA, L.; LEITÃO, G. G. A new tropane alkaloid from the leaves of *Erythroxylum subsessile* isolated by pH-zone-refining counter-current chromatography. **J Sep Sci.**, Hradec Kralove, v. 39, n. 7, p. 1273-1277, apr. 2016.

CUNHA, Proença; BATISTA, Maria Teresa. Taninos. In: CUNHA, Proença; GRAÇA, João Adriano Borralho da. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.

CUNHA, S.; COSTA, O. B. S.; SANTANA, L. L. B.; LOPES, W. A. Acetanilida: green synthesis without solvent. **Quím Nova**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 874-876, may. 2015.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 26, n. 5, p. 343-356, nov. 2005.

DAS, K.; TIWARI, R. K. S.; SHRIVASTAVA, D. K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **J Med Plants Res.**, v. 4, n. 2, p. 104-111, jan. 2010.

DASH, B. K.; SULTANA, S.; SULTANA, N. Antibacterial activities of methanol and acetone extracts of Fenugreek (*Trigonella foenum*) and Coriander (*Coriandrum sativum*). **Life Sci Med Res.**, Bruxelas, v. 2011, n. 27, p. 1-8, jun. 2011.

DAVID, J. R. D.; STEENSON, L. R.; DAVIDSON, P. M. Expectations and applications of natural antimicrobials to foods: A guidance document for users, suppliers, research and development, and regulatory agencies. **Food Prot Trends**, Des Moines, v. 33, n. 4, p. 241-250, apr. 2013.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chem.**, Washington, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, apr. 2011.

DIAS, R. A. L.; SOUZA, P. S.; ALSINA, O. L. S. Drying and total tannins extraction of *Spearmint* (*Mentha x vilosa Hudson*). **Revista Agrarian**, Dourados, v. 4, n. 12, p. 123-133, apr/jun. 2011.

DJIPA, C. D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L) Alston (Myrtaceae). **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 71, n. 1-2, p. 307-313, jul. 2000.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-CORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo, **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 28, n. 3, p. 241- 249, sep/dec. 2007.

DORNELES, M. C.; RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. Germinação de diásporos recém-colhidos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) ocorrente no cerrado do Brasil Central. **Rev Bras Bot.**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 399-408, apr/jun. 2005.

DORTA, E.; GONZÁLEZ, M.; LOBO, M. G.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; ANCOS, B. Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. **Food Res Int.**, Essex, v. 57, p. 51–60, mar. 2014.

DOSS, V. A.; THANGAVEL, K. P. Antioxidant and antimicrobial activity using different extracts of *Anacardium occidentale* L. **Int J Appl Biol Pharm Technology**, Hyderabad, v. 2, n. 3, p. 436-443, jul/set. 2011.

DUARTE, M. R.; SCHRODER, L. M.; TOLEDO, M. G.; YANO, M.; MACHADO, A. A.; MODOLO, A. K. Anatomia foliar comparada de espécies de aroeira: *Myracrodruon urundeuva* Allemão e *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Visão Acad.**, v. 10, n. 1, p. 18–28. (2009).

EGAN, R. J.; BERGNER, C. L.; HART, P. C.; CACHAT, J. M.; CANAVELLO, P. R.; ELEGANT, M. F.; ELLKHAYAT, S. I.; BARTELS, B. K.; TIEN, A. K.; TIEN, D. H.; MOHNOT, S.; BEESON, E.; GLASGOW, E.; AMRI, H.; ZUKOWSKA, Z.; KALUEFF, A. V. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav Brain Res.**, College Station, v. 205, n. 1, p. 38-44, dec. 2009.

EKAMBARAM, S. P.; PERUMAL, S. S.; PAVADAI, S. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. **Inflammopharmacol.**, Sheffield, v. 25, n. 1, p. 147-158, jan. 2017.

EL-DIN, H. M. F.; GHITA, E. I.; BRADAN, S. M. A.; GAD, A. S.; EL-SAID, M. M. Manufacture of low fat UF-Soft cheese supplemented with Rosemary extract (as natural antioxidante). **J Am Sci.**, Nova York, v. 6, n. 10, p. 570-579, jan. 2010.

ELLER, S. C. W. S.; FEITOSA, V. A.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R. Antimicrobial evaluation of plant extracts and possible pharmacological interaction *in vitro*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, Araraquara, v. 36, n. 1, p. 131-136, 2015.

ERŞAN, S.; ÜSTÜNDAG, Ö. G.; CARLE, R.; SCWEIGGERT, R. M. Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls (exo- and mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MSn. **J Agric Food Chem.**, Washington, v. 64, n. 26, p. 5334–5344, jul. 2016.

FAION, A. M.; BEAL, P.; RIL, F. T.; CICHOSKI, A. J.; CANSIAN, R. L.; VALDUGA, A. T.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E. Influence of the addition of natural antioxidant from mate leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hill) on the chemical, microbiological and sensory characteristics of different formulations of Prato cheese. **J Food Sci Technol.**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 1516–1524, mar. 2015.

Farmacopéia Brasileira. **Generalidades e Métodos de Análise**. Parte I. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

Farmacopéia Brasileira. **Generalidades e Métodos de Análise**. Parte II. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FAWAD, A. A.; MYADDAD-UR-REHAMN, N. K.; KHAN, S. A. Antimicrobial activity of *Eucalyptus tereticornis* and comparison with daily life antibiotics. **Int J Pharm Sci Rev Res.**, Panchkula, v. 12, n. 1, p. 21-29, jan/feb. 2012.

FERREIRA, S. B.; PALMEIRA, J. D.; SOUZA, J. H.; ALMEIDA, J. M.; FIGUEIREDO, M. C.; PEQUENO, A. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R. Evaluation of antimicrobial activity *in vitro* of hydroalcoholic extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville on ambulatory isolates of *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras Anal Clin.**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 27-31, jan. 2010.

FERREIRA, M. J. G. **Antimicrobial activity of aqueous extracts of medicinal plants on bacteria causing diseases of food origin**. 2017. Dissertation (Master's degree in Food Science and Technology) – Food Engineering, Federal University of Ceará, Fortaleza, 2017.

FIGUEREDO, F. G.; FERREIRA, E. O.; LUCENA, B. F. F.; TORRES, C. M. G.; LUCETTI, D. L.; LUCETTI, C. E. P.; SILVA, J. M. F. L.; SANTOS, F. A. V.; MEDEIROS, C. R.; OLIVEIRA, G. M. M.; COLARES, A. V.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; SILVA, J. C. F.; KERNTOPF, M. R.; FIGUEIREDO, P. R. L.; MATIAS, E. F. F. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* AC Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Mr. Brenan. **Biomed Res Int.**, London, v. 2013, n. 2013, p. 1–5, dec. 2013.

FIGUEREDO, F. G.; LUCENA, B. F. F.; TINTINO, S. R.; MATIAS, E. F. F.; LEITE, N. F.; ANDRADE, J. C.; NOGUEIRA, L. F.; MORAIS, E. C.; COSTA, J. G.; COUTINHO, H. D.; RODRIGUES, F. F. Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of *Myracrodruon urundeuva*. **Pharm Biol.**, Lisse, v. 52, n. 5, p. 560–565, may. 2014.

FRANCESCATO, L. N.; DEUSCHLE, R. A. N.; MALLMANN, C. A.; ALVES, S. H.; HEINZMANN, B. M. Antimicrobial activity of *Senecio heterotrichius* DC. (Asteraceae). **Rev Bras Cienc Farm.**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 239-245, apr/jun. 2007.

FRANCO, Bernadette D. Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

FREITAS, R. F.; LIMA, P. R. A.; PIMENTEL, M. A.; QUEIROZ, P. R. Perfil fitoquímico, ensaio microbiológico e toxicidade frente a *Artemia salina* do extrato da entrecasca da *Myracrodruon urundeuva* A. **Biota Amazôn.**, Macapá, v. 8, n. 3, p. 24-27, jul/sep. 2018.

FULLER, T. N. **Caracterização fenotípica, fitoquímica e molecular de populações de *Elionurus* sp. Humb. & Bompl ex Willd (capimlimão)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GALLETI, S. R. Introduction to electron microscopy. **Biológico**, v. 65, n. 1/2, p. 33-35, jan/dec. 2003.

GALO, G. T.; LIMA, A. C. S.; MACGHADO, K. M.; VIEIRA, L. B.; MARTINS, V. C.; FERREIRA, N. L.; LUCARINE, A. C. Estudo da extração da quercetina a partir da cebola (*Allium Ceppa* L.) e seu uso como conservante natural alimentar. **J Eng Exact Sci.**, Viçosa, v. 4, n. 1, mar. 2018.

GALVÃO, W. R. A.; FILHO, R. B.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; CAMPOS, A. R.; MOREIRA, A. C. O. M.; SILVA, S. O.; FILHO, F. A. M.; SANTOS, S. A. A. R.; JUNIOR, J. M. A. M.; GONÇALVES, N. G. G.; FONSECA, S. G. C.; BANDEIRA, M. A. M. Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* Allemão - a conservationist proposal for the species. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 222, p. 177-189, aug. 2018.

GAMMARIELLO, D.; DI GIULIO, S.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Effects of natural compounds on microbial safety and sensory quality of Fior di Latte cheese, a typical Italian cheese. **J Dairy Sci.**, Berlim, v. 91, n. 11, p. 4138- 4146, nov. 2008.



GAWLIK-DZIKI, U. Changes in the antioxiadant activities o vegetables as a consequence of interactions between active compounds. **J Funct Foods**, Wageningen, v. 4, n. 4, p. 872-882, oct. 2012.

GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **Int J Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 1-9, apr. 2006.

GIMENEZ, D. F. J.; DEDEMO, G. C.; VANTINI, J. S.; SILVA, A. C. B.; TEZZA, R. I. D.; DABBAS, K. M.; MUTTON, M. A.; FERRO, M. I. T. Análise dos parâmetros biométricos, acúmulo de prolina e identificação de genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico em cana-de-açúcar por cDNA-AFLP. **Científica**, Jaboticabal, v. 41, n. 2, p. 209-225, 2013.

GIRARDELLO, R.; GALES, A. C. Resistência às polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. **Rev Epidemiol Controle Infecç.**, Santa Cruz do Sul, v. 2, n. 2, p. 66-69, dec. 2012.

GIROUX, H. J.; GRANDPRÉ, G.; FUSTIER, P.; CHAMPAGNE, C. P.; ST-GELAIS, D.; LACROIX, M.; BRITTEN, M. Production and characterizations of Cheddar-type cheese enriched with green tea extract. **Dairy Sci Technol.**, Jouy-en-Josas, v. 93, p. 241-254, mar. 2013.

GODINHO, C. S.; SILVA, C. M.; MENDES, C. S. O.; FERREIRA, P. R. B.; OLIVEIRA, D. A. Estudo fitoquímico de espécies arbóreas do cerrado. **Revista Multitexto**, v. 3, n. 2, jul/dec. 2015.

GOMES, Andre Marco de Oliveira; SOUZA JR, Ivanildo Pedro de. Microscopia Confocal e Multifotônica – Princípios e Aplicações. In: SOUZA, Wanderley de. **Microscopia Óptica: fundamentos e aplicações às Ciências Biomédicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, p. 113-128, 2010.

GOUVEA, F. S.; ROSENTHAL, A.; FERREIRA, E. H. R. Plant extract and essencial oils added as antimicrobials to cheeses: a review. **Cienc Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 8, jun. p. 1-9, aug. 2017.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; GONÇALVES, E. P.; COLARES, P. N. Q.; MEDEIROS, M. S.; VIANA, J. S. Germination and vigor of *Myracrodruon urundeuva* Allemão seeds in different substrates and temperatures. **Rev Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 975-982, may. 2011.

GUERRA, C. R. S. B. **Conservação genética ex situ de populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. em sistema silvipastoril**. 2008. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2008.

GUERRA, A.; ETIENNE-MESMIN, L.; LIVRELLI, V.; DENIS, S.; BLANQUET-DIOT, S.; ALRIC, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnol.**, Cambridge, v. 30, n. 11, p. 591-600, nov. 2012.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **Int J Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 91-97, may. 2008.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiol.**, Avignon, v. 26, p. 142-150, apr. 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HAN, J.; BRITTEN, M.; ST-GELAIS, D.; CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese. **Food Chem.**, Barking, v. 124, n. 4, p. 1589–1594, feb. 2011.

HANDA, Sukhdev Swami; KHANUJA, Suman Preet Singh; LONGO, Gennaro; RAKESH, Dev Dutt. **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. Trieste: ICS Unido, 2008.

HASSANIEN, M. F. R.; MAHGOUB, S. A.; EL-ZAHAR, K. M. Soft cheese supplemented with black cumin oil: impact on foodborne pathogens and quality during storage. **Saudi J Biol Sci.**, Riyadh, v. 21, n. 3, p. 280-288, jul. 2014.

HATAMNIA, A. A.; ABBASPOUR, N.; DARVISHZADEH, R. Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* Subsp. *Kurdica*) fruits. **Food Chem.**, Washington, v. 145, p. 306- 311, feb. 2014.

HEALTH CANADA. *Listeria monocytogenes* Challenge Testing of Refrigerated Ready-to-Eat Foods. **Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate, Health Products and Food Branch**. 2012. Disponível em: [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt\\_formats/pdf/legislation/pol/listeria\\_monocytogenes-test-eng.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/legislation/pol/listeria_monocytogenes-test-eng.pdf). Acesso em: 02 ago. 2020.

HELAL, A.; TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; CONTE, A. Gastro-pancreatic release of phenolic compounds incorporated in a polyphenols-enriched cheese-curd. **Food Sci Technol.**, Campinas, v. 60, n. 2, p. 957-963, mar. 2015.

HELAL, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Impact of *in-vitro* gastro-pancreatic digestion on polyphenols and cinnamaldehyde bioaccessibility and antioxidant activity in stirred cinnamon-fortified yogurt. **Food Sci Technol.**, Campinas, v. 89, p. 164-170, mar. 2018.

HELENO, S. A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; MORALES, P.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition, antioxidant activity and bioaccessibility studies in phenolic extracts of two *Hericium* wild edible species. **Food Sci Technol.**, Athens, v. 63, n. 1, p. 475–481, sep. 2015.

HIDALGO, A.; FERRARETTO, A.; DE NONI, I.; BOTTANI, M.; CATTANEO, S.; GALLI, S.; BRANDOLINI, A. Bioactive compounds and antioxidant properties of pseudocereals-enriched water biscuits and their *in vitro* digestates. **Food Chem.**, Barking, v. 240, p. 799-807, feb. 2018.

HOCHLOWSKI, J. E.; PAN, J. Y.; SEARLE, P. A.; BUCK, W. R.; SPANTON, S. G. Purification of drugs from biological fluids by counter-current chromatography. **J Chromatogr A**, Ames, v. 1216, n. 34, p. 6162-6169, aug. 2009.

HOLANDA, A. C.; FREIRE, L. S.; ALENCAR, G. R. R.; MOURA, R. C.; TORRES, E. A. F. S.; LIMA, A. Bioacessibilidade dos polifenóis presentes no mesocarpo e na amêndoa do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.). **Braz J Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 4, p. 19237-19247, apr. 2020.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiol.**, Avignon, v. 22, n. 4, p: 273–292, aug. 2005.

HOSTETTMAN, Kurt; VIEIRA, Paulo Cezar; QUEIROZ, Emerson Ferreira. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EDUFSCAR, 2003.

HUANG, X-Y.; IGNATOVA, S.; HEWITSON, P.; DI, D-L. An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography. **TrAC Trends Anal. Chem.**, Waterloo, v. 77, p. 214-225, mar. 2016.

HUNG, M. W.; ZHANG, Z. J.; LI, S.; LEI, B.; YUAN, S.; CUI, G. Z.; HOI, P. M.; CHAN, K.; LEE, S. M. Y. From Omics to drug metabolism and high content screen of natural product in Zebrafish: a new model for discovery of neuroactive compound. **Evid Based Complement Alternat Med.**, Oxford, v. 2012, p. 1–20, aug. 2012.

IFESAN, B. O. T.; FASHAKIN, J. F.; EBOSELE, F.; OYERINDE, A. S. Antioxidant and antimicrobial properties of selected plant leaves. **Eur J Med Plants**, Rome, v. 3, n. 3, p. 465-473, jul/sep. 2013.

Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ITO, Y.; BOWMAN, R. L. Countercurrent chromatography: liquid-liquid partition chromatography without solid support. **Science**, Washington, v. 167, n. 3916, p. 281-283, jan. 1970.

JANDÚ, J. J. B.; DA SILVA, L. C. N.; PEREIRA, A. DE P. C.; DE SOUZA, R. M.; DA SILVA JUNIOR, C. A.; DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; DE ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. DOS S.; DA SILVA, M. V. *Myracrodruon urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agent. **J Med Plants Res.**, Lagos, v. 7, n. 8, p. 413–418, feb. 2013.

JAVANMARDI, J.; STUSHNOFF, C.; LOCKE, E.; VIVANCO, J. M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Iranian Ocimum* accessions. **Food Chem.**, Barking, v. 83, n. 4, p. 547–550, dec. 2003.

JOHNSON, A; HAMILTON, TJ. Modafinil decreases anxiety-like behaviour in zebrafish. **PeerJ**, Corte Madera, v. 5, n. e2994, p. 1-15, feb. 2017.

- JUNIOR, E. G. J.; LANDUCCI, L. F.; JARDIM, E. C. G.; SANGALLI, J.; SOUSA, F. R. N. Inhibitory activity of extracts from the Brazilian cerrado on anaerobic microorganisms associated with nosocomy infections. **Rev Bras Ciên Saúde**, João Pessoa, v. 13, n. 2, p. 43–52, may/aug. 2009.
- JÚNIOR, E. G-J.; LANDUCCI, L. F.; ARAFAT, O. K. K.; RANIERI, R. V.; RAMOS, M. M. B.; CIESIELSKI, F. I. N.; SCHWEITZER, C. M.; OKAMOTO, A. C. Antimicrobial activity of six plant extracts from the Brazilian savanna on periodontal pathogens. **Int J Odontostomat.**, Temuco, v. 5, n. 3, p. 249–256, dec. 2011.
- JUNIOR, S. Q.; OLIVEIRA, R. L.; MARQUES, M. M. M.; SILVA, A. R. A.; GUEDES, M. I. F. Free radical scavenging activity of ethanol leaves extracts of *Anacardiaceae*. **Semina Cienc biol Saúde**, Londrina, v. 38, n. 1, p. 99-104, jan/jun. 2017.
- KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Anal Methods**, Burgos, v. 2, n. 1, p. 41-60, mar. 2009.
- KARCHESY, Y. M.; KELSEY, R. G.; CONSTANTINE, G.; KARCHESY, J. J. Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. **SpringerPlus**, Nova York, v. 5, n. 510, p. 1-9, apr. 2016.
- KARNOVSKY, M. J. A. Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. **J Cell Biol.**, Nova York, v. 27, n. 2, p. 137-138, nov. 1965.
- KATO, E. T. M.; AKISUE, G. Estudo farmacognóstico de cascas *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 20, n. 1, p. 69-76, jan/jun. 2002.
- KAYE, K. S.; POGUE, J. M.; TRAN, T. B.; NATION, R. L.; LI, J. Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. **Infect Dis Clin North Am.**, Boston, v. 30, n. 2, p. 391-414, jun. 2016.
- KELLEY, C. J.; HARRUFF, R. C.; CARMACK, M. The Polyphenolic Acids of *Lithospermum ruderale*. II. Carbon- 13 Nuclear Magnetic Resonance of Lithospermic and Rosmarinic Acids. **J Org Chem.**, Washington, v. 41, n. 3, p. 449–455, feb. 1976.
- KESTENBACH, Hans-Jürgen.; BOTTA FILHO, Walter José. **Electron microscopy: transmission and scanning**. São Paulo: Brazilian Metal Association, 1989.
- KHAN, H.; ALI, J. UHPLC/Q-TOF-MS Technique: introduction and applications. **Lett Org Chem.**, Montpellier, v. 12, n. 6, jun. 2015.
- KHAN, B. M.; BAKHT, J. Antifungal, anti-yeast, anti-oxidant and HPLC analysis of different solvent extracted samples from *Calamus aromaticus* leaves. **Bangladesh J Pharmacol.**, Bangladesh, v. 11, n. 1, p. 91-100, jan. 2016.
- KHOUZAM, R. B.; POHL, P.; LOBINSKI, R. Bioaccessibility of essential elements from White cheese, bread, fruit and vegetables. **Talanta**, London, v. 86, p. 425–428, oct. 2011.
- KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: Where do we stand, Where do we go?. **Trends Biotechnol.**, Cambridge, v. 29, n. 6, p. 267-275, jun. 2011.

- KUKARNI, S. D.; ACHARYA, R.; RAJURKAR, N. S.; REDDY, A. V. R. Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by *in vitro* digestion method. **Food Chem.**, Washington, v. 103, n. 2, p. 681-688, jul. 2007.
- KULKARNI, A.; SUZUKI, S.; ETOH, H. Antioxidant compounds from *Eucalyptus grandis* biomass by subcritical liquid water extraction. **J Wood Sci.**, Pelotas, v. 54, p. 153-157, 2008.
- KUMAR, S.; CHANDRA, P.; BAJPAI, V.; SINGH, A.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, D. K.; KUMAR, B. Rapid qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds from *Phyllanthus amarus* using LC/MS/MS techniques. **Ind Crops Prod.**, Fargo, v. 69, p. 143-152, jul. 2015.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciênc Tecnol Aliment.**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 726-732, oct/dec. 2005.
- LACERDA, A. M.; MODOLO, A. K.; MATIAS, R. C.; PISTORI, H.; YANO, M.; ROEL, A. R.; PORTO, K. R. A. *Screening* de plantas com potencial fitotóxico. **Rev Bras Farm.**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4, p. 352-355, nov. 2011.
- LACHMAN, J.; ORSAK, M.; HEJTMANKOVA, A.; KOVAROVA, E. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected *Czech honeys*. **Food Sci Technol.**, Campinas, v. 43, n. 1, p. 52-58, jan. 2010.
- LAMOTHE, S.; AZIMY, N.; BAZINET, L.; COUILLARD, C.; BRITTEN, M. Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. **Food Funct.**, Cambridge, v. 5, n. 10, p. 2621-2631, oct. 2014.
- LAMOTHE, S.; LANGLOIS, A.; BAZINET, L.; COUILLARD, C.; BRITTEN, M. Antioxidant activity and nutrient release from polyphenol-enriched cheese in a simulated gastrointestinal environment. **Food Funct.**, Cambridge, v. 7, n. 3, p. 1634-1644, mar. 2016.
- LANGHEINRICH, U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. **Bioassays**, Cambridge, v. 25, n. 9, p. 904-912, sep. 2003.
- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **J Agric Food Chem.**, Washington, v. 45, n. 4, p. 209-215, apr. 1997.
- LIBRÁN, C. M.; MORO, A.; ZALACAIN, A.; MOLINA, A.; CARMONA, M.; BERRUGA, M. I. Potential application of aromatic plant extracts to prevent cheese blowing. **World J Microbiol Biotechnol.**, Valência, v. 29, n. 7, p. 1179-1188, jul. 2013.
- LIMA, E. O.; PEREIRA, F. O.; LIMA, I. O.; TRAJANO, V. N.; SOUZA, E. L. *Schinus terebenthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 83-85, jul/aug. 2004.
- LIN, S.; ZHAO, Y.; NEL, A. E.; LIN, S. Zebrafish: an *in vivo* model for nano EHS studies. **Small**, Weinheim an der Bergstrasse, v. 9, n. 9-10, p. 1608-1618, may. 2013.

LIYANA-PATHIRANA, C. M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. **J Agric Food Chem.**, Washington, v. 53, n. 7, p. 2433-2440, apr. 2005.

LOPES, J. C.; SANTOS, J. D. P.; CAVALCANTE, P. M.; CAVALCANTE, M. R.; SANTOS, F. A. V.; AGUIAR, J. J. S.; MATIAS, E. F. F.; CUNHA, F. A. B.; COUTINHO, H. D. M.; FIGUEREDO, F. G. Chemical and evaluation antifungal activity and antioxidante extract of ethanolic *Myracrodruon urundeuva* All. **Rev Interfaces: saúde, hum e tecnol.**, Juazeiro do Norte, v. 6, n. 17, p. 111-118, jul. 2018.

LORENZI, Harri. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: **Plantarum**, 1992.

LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998.

MACHADO, A. C. **Caracterização do extrato de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e seu efeito sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos**. 2013. Tese (Doutorado em Biologia Oral) – Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.

MACHADO, A. C.; SOUZA, L. P.; SALDANHA, L. L.; PIERONI, L. G.; MATOS, A. A.; OLIVEIRA, F. A.; VILEGAS, W.; DAMANTE, C. A.; DOKKEDAL, A. L.; OLIVEIRA, R. C. “Aroeira” (*Myracrodruon urundeuva*) metanol extract: the relationship between chemical compounds and cellular effects. **Pharm Biol.**, Lisse, v. 54, n. 11, p. 2737-2741, nov. 2016.

MAGALHÃES, F. E. A.; SOUSA, C. A. P. B.; SANTOS, S. A. A. R.; MENESES, R. B.; BATISTA, F. L. A.; ABREU, A. O.; OLIVEIRA, M. V.; MOURA, L. F. W. G.; RAPOUSO, R. S.; CAMPOS, A. R. Adult zebrafish (*Danio rerio*): na alternative behavioral modelo f formalina-induced nociception. **Zebrafish**, New Rochelle, v. 14, n. 5, p. 422-429, oct. 2017.

MAGALHÃES, F. E. A.; BATISTA, F. L. A.; SERPA, O. F.; MOURA, L. F. W. G.; LIMA, M. C. L.; SILVA, A. R. A.; GUEDES, M. I. F.; SANTOS, S. A. A. R.; OLIVEIRA, B. A.; NOGUEIRA, A. B.; BARBOSA, T. M.; HOLANDA, D. K.; DAMASCENO, M. B. M. V.; JÚNIOR, J. M. A. M.; BARROSO, L. K. V.; CAMPOS, A. R. Orofacial antinociceptive effect of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. **Biomed Pharmacother.**, Columbia, v. 97, p. 1575–1585, jan. 2018.

MAHESWARAPPA, N. B.; SUBBAIAH, V.; MUTHUPALANI, M.; YAMAGANI, P. K.; MOHAN, K.; KESHAPAGA, U. R.; ASOKAN, S. V.; KALAPPURAKKAL, R. C. Antioxidant activity of carnosic acid and rosmarinic acid in raw and cooked ground chicken patties. **J Sci Food Agric.**, Davis, v. 94, n. 2, p. 273-279, jan. 2014.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quím Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, jan. 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC - Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 4, n. 3, p. 197-207, abr/jun. 2012.

MANNHEIMER, Walter. **Microscopia dos Materiais**. 1. ed. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2002.

MARCONDES, J.; GARCIA, A. B. Aspectos citomorfológicos do estresse salino em plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.). **Arq Inst Biol.**, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 187-94, apr/jun. 2009.

MARINHO, M. T.; BERSOT, L. S.; NOGUEIRA, A.; COLMAN, T. A. D.; SCHNITZLER, E. Antioxidant effect of dehydrated rosemary leaves in ripened semi-hard cheese: A study using coupled TG–DSC–FTIR (EGA). **Food Sci Technol.**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 1023–1028, apr. 2015.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentício. **Braz J Food Technol.**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 96-103, apr/jun. 2007.

MARKLEY, J. L.; BRÜSCHWEILER, R.; EDISON, A. S.; EGHBALNIA, H. R.; POWERS, R.; RAFTERY, D.; WISHART, D. S. The future of NMR-based metabolomics. **Curr Opin Biotechnol.**, Cambridge, v. 43, p. 34-40, feb. 2017.

MARTÍNEZ, Migdalia Miranda; CUÉLLAR, Armando Cuéllar. **Farmacognosia y Productos Naturales**. 1ª ed. Cuba: La Habana, Editorial Félix Varela, 2001.

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Enhancement of antibiotic activity by *Cordia verbenacea* DC. **Lat Am J Pharm.**, Buenos Aires, v. 29, n. 6, p. 1049–1052, jan. 2010.

MATSUNAMI, K.; HIDEAKI, O.; TAKEDA, Y. Structural Revisions of Blumenol C Glucoside and Byzantionoside B. **Chem Pharm Bull.**, Tóquio, v. 58, n. 3, p. 438–441, mar. 2010.

MEDSEN, H. L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends Food Sci. Technol.**, Cambridge, v. 6, n. 8, p. 271-277, aug. 1995.

MEJLHOLM, O.; DALGAARD, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. **Lett Appl. Microbiol.**, Cardívia, v. 34, n. 1, p. 27–31, jan. 2002.

MELO, J.; ANDREW, P.W.; FALEIRO, M. L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. **Food Res Int.**, Essex, v. 67, p. 75–90, jan. 2015.

MENDES, C. A. C.; BURDMANN, E. A. Polimixinas - Revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Rev Ass Med Bras.**, São Paulo, v. 55, n. 6, p. 752-59, dec. 2009.

MENEZES, T. E. C.; DELBEM, A. C. B.; BRIGHENTI, F. L.; OKAMOTO, A. C.; GAETTI-JARDIM, J. R. E. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. **Pharm Biol.**, Lisse, v. 48, n. 3, p. 300–305, mar. 2010.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **J Med Plants Res.**, Nsukka, v. 45, n. 5, p. 31-34, may. 1982.

MICKIEWICZ, K. M.; KAWAI, Y.; DRAGE, L.; GOMES, M. C.; DAVISON, F.; PICKARD, R.; SALÃO, J.; MOSTOWY, S.; ALDRIDGE, P. D.; ERRINGTON, J. Possible role of L-form switching in recurrent urinary tract infection. **Nat Commun.**, Londres, v. 10, n. 4379. sep. 2019.

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **Rev Ciênc Agron.**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 213–220, jan/mar. 2016.

MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. F. L.; AMORIM, E. L. C.; STRATTMANN, R. R.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U. P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpáticas da caatinga. **Rev Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 999-1005, 2005.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 105, n. 1-2, p. 173-186, apr. 2006a.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M. F. L.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; AMORIM E. L. C. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Braz J Pharmacog.**, Curitiba, v. 16, n. 3, p. 338-344, jul/sep. 2006b.

MOON, J. H.; TSUSHIDA, T.; NAKAHARA, K.; TERAOKA, J. Identification of quercetin 3-O-b-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. **Free Radic Biol Med.**, New York, v. 30, n. 11, p. 1274–1285, jun. 2001.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **J Agric Food Chem.**, Washington, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, jan. 2009.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; QUEIROZ, C. R. A. A. Studies on polyphenols and lignin of *Astronium urundeuva* wood. **J Braz Chem Soc.**, São Paulo, v. 10, n. 6, p. 447-452, nov/dec. 1999.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Rev Bras Farmacogn.**, Curitiba, v. 19, n. 1b, p. 315-320, jan/mar. 2009.

MORO, A.; LIBRÁN, C. M.; BERRUGA, M. I.; ZALACAIN, A.; CARMONA, M. Mycotoxigenic fungal inhibition by innovative cheese cover with aromatic plants. **J Sci Food Agric.**, Davis, v. 93, n. 5, p.1112-1118, mar. 2013.



- MORO, A.; LIBRÁN, C. M.; BERRUGA, M. I.; CARMONA, M.; ZALACAIN, A. Dairy matrix effect on the transference of rosemary essential oil compounds during cheese making. **J Sci Food Agric.**, Davis, v. 95, n. 7, p. 1507-1513, may. 2015.
- MOSER, S.; CHEGENI, M.; JONES, O. G.; LICEAGA, A.; FERRUZZI, M. G. The effect of milk proteins on the bioaccessibility of green tea flavan-3-ols. **Food Res Int.**, Essex, v. 66, p. 297-305, dec. 2014.
- MOURA, A. C. S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Quím Nova**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 1136-1140, apr. 2011.
- MUKNE, A. P.; VISWANATHAN, V.; PHADATARE, A. G. Structure prerequisites for isoflavones as effective antibacterial agentes. **Pharmacogn Rev.**, Bangalore, v. 5, n. 9, p. 13-18, jan. 2011.
- NADA, S.; ILIJA, D.; IGOR, T.; JELENA, M.; RUZICA, G. Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. **Food Control**, Vurrey, v. 25, n. 2, p. 728-731, jun. 2012.
- NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; DE ALBUQUERQUE, L. T.; DE LIMA, S. N. D.; SÁ, R. A.; COELHO, L. C. B. B.; DO AMARAL, F. N. D. M.; PAIVA, P. M. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitol Res.**, Berlin, v. 110, n. 2, p. 609-616, feb. 2012.
- NARUZAWA, E. S.; PAPA, M. F. S. Antifungal activity of extracts from Brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassiicola*. **Rev Bras Plantas Med.**, Botucatu, v. 13, n. 4, p. 408-412, jun. 2011.
- NAZER, A. I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J. L.; DUBOIS-BRISSENET, F. Combination of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv, *typhimurium*: a synergistic effect. **Food Microbiol.**, Avignon, v. 22, n. 5, p. 391-398, oct. 2005.
- NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **Afr J Biotechnol.**, Nairobi, v.7, n. 12, p. 1797-1806, jun. 2008.
- NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Braz J Food Technol.**, Campinas, v. 2, n. 15, p. 107-110, jun. 2009.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod.**, Washington, v. 79, n. 3, p. 629-661, feb. 2016.
- NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. Biological screening of kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **PharmacologyOnline**, Fisciano, v. 2, p. 458-78, may-aug. 2011.

NITIEMA, W. L.; SAVADOGO, A.; SIMPORE, J.; DIANOU, D.; TRAORE, A. S. *In vitro* Antimicrobial Activity of Some Phenolic Compounds (Coumarin and Quercetin) Against Gastroenteritis Bacterial Strains. **Intl J Microbiol Res.**, Aleppo, v. 3, n. 3, p. 183-187, 2012.

NORTH, A. Seeing is believing? A beginners' guide to practical pitfalls in image acquisition. **J Cell Biol.**, New York, v. 172, n. 1, p. 9-18, jan. 2006.

OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: effects on biotic systems. Test nº 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development, 2013.

OH, J.; JO, H.; CHO, A. R.; KIM, S-J.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, Verrey, v. 31, n. 2, p. 403-409, jun. 2013.

OLIVEIRA, V. B. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie vegetal *Dicksonia sellowiana* (DICKSONIACEAE)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

OLIVEIRA, L. M.; CARDOSO, N. S. N.; FERNANDEZ, L. G.; ROQUE, M. R. A.; SANTANA, J. R. F.; PELACANI, C. R.; CASTRO, R. D. The effect of growing conditions on phenolic compounds and antimicrobial activity of *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão. **Afr J Biotechnol.**, Nairobi, v. 11, n. 41, p. 9770-9775, may. 2012.

OLIVEIRA, D. A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S. R. S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **J Supercrit Fluids**, Amsterdam, v. 111, p. 55–62, may. 2016a.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. F. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Rev Bras Plantas Med.**, Campinas, v. 18, n. 1, supl. I, p. 230-239, jan. 2016b.

OLIVI, P.; COSTA, C. R.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e método de avaliação. **Quím Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, jul. 2008.

ONG, L.; DAGASTINE, R. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. The effect of pH at renneting on the microstructure, composition and texture of Cheddar cheese. **Food Res Int.**, Essex, v. 48, n. 1, p. 119–130, aug. 2012.

OKUDA, T.; ITO, H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants: Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. **Molecules**, Basiléia, v. 16, n. 3, p. 2191-2217, mar. 2011.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of stadardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **J Pharmacogn Phytochem.**, New Delhi, v. 2, n. 5, p. 115-9, jan/feb. 2014.

PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 79, n. 2, p. 165-168, feb. 2002.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acutotoxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 8, n. 5, p. 395-400, sep. 2001.

PEREIRA, A. V.; ALMEIDA, T. C.; BELTRAME, F. L.; COSTA, M. E.; GARRIDO, L. H. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Acta Sci Health Sci.**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 119-124, apr. 2009.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **J Biotechnol Biodivers.**, Gurupí, v. 3, n. 4, p. 146-52, nov. 2012.

PETRAT-MELIN, B.; KRISTIANSEN, G. H.; LE, T. T.; POULSEN, N. A.; LARSEN, L. B.; YOUNG, J. F. *In vitro* gastrointestinal digestion of purified bovine kappa-casein variants A, B, and E: effects on antioxidant and angiotensin 1-converting enzyme inhibitory capacity. **Int Dairy J.**, v. 57, p. 44–51, jun. 2016.

PILON, A. C.; SELEGATO, D. M.; FERNANDES, R. P.; BUENO, P. C. P.; PINHO, D. R.; NETO, F. C.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; NORBERTO, P. L. Metabolômica de palntas: métodos e desafios. **Quím Nova**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 329-354, mar. 2020.

PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 326-331, feb. 2012.

PINTO, C. P. **Atividade antimicrobiana e perfil químico de espécies do gênero *Lippia* do Semi-árido da Bahia**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2008.

PISKULA, M. K. Soy isoflavone conjugation differs in fed and food-deprived rats. **J Nutr.**, London, v. 130, n. 7, p. 1766–1771, jul. 2000.

PISUTTHANAN, S.; PLIANBANGCHANG, P.; PISUTTHANAN, N.; RUANRUAY, S.; MUANRIT, O. Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae. **Naresuan University Journal**, Muang, v. 12, n. 2, p. 13-18, 2004.

PIZZOLITTO, E. L. **Contribuição ao estudo *in vitro* da corrosão induzida por microrganismos sobre liga-metálica a base de cobre, de uso na Odontologia – modelo experimental com as cepas cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus***. 1997. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

POJCHAIJONGDEE, N.; SOTANAPHUN, U.; LIMSIRICHAIKUL, S.; POOBRASERT, O.

Geraniinic acid derivative from the leaves of *Phyllanthus reticulatus*. **Pharm Biol.**, Lisse, v. 48, n. 7, p. 740–744, may. 2010.

PONCET-LEGRAND, C.; EDELMANN, A.; PUTAUX, J-L.; CARTALADE, D.; SARNI-MANCHADO, P.; VERNHET, A. Poly (L-proline) interactions with flavon-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/ protein ratio. **Food Hydrocoll.**, Wrexham, v. 20, n. 5, p. 687-697, jul. 2006.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracodruon urundeuva* Fr. All.). **Rev Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 485-492, jul/aug. 2002.

RATTMANN, Y. D.; MENDEZ-SANCHEZ, S. C.; FURIAN, A. F.; PALUDO, K. S.; SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, E. M.; MIGUEL, O. G.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MELLO, C. F.; FRANCO, C. R.; SANTOS, J. E. S.; CADENA, S. M.; MARQUES, M. C.; SANTOS, A. R. Standardized extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook (Dicksoniaceae) decreases oxidative damage in cultured endothelial cells and in rats. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 133, n. 3, p. 999- 1007, fev. 2011.

ROCHA, J. F.; ROSA, M. M. T.; FRADE, C. C. M.; DIERSMANN, E. M. Estudo Anatômico e Histoquímico em Folhas de *Plantago major* L. e *Plantago australis* Lam. (Plantaginaceae). **Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida**, Água Funda, v. 22, n. 1, p: 33-41, jan. 2002.

RODRIGUES, E. D. **Estratégias de aumento de eficiência da análise de produtos naturais por espectroscopia de ressonância magnética nuclear**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

RODRIGUES, T. S.; GUIMARÃES, S. F.; RODRIGUES-DAS-DÔRES, R. G.; GABRIEL, J. V. Methods estimated drying and percentage of extracts in leaves of *Plectranthus barbatus* (Brazilian bold) and *P. ornatos* (false bold). **Rev Bras Plantas Med.**, Botucatu, v. 13, n. spe, p. 587-590, dec. 2011.

RODRIGUES, C. G.; FERREIRA, P. R. B.; OLIVEIRA, C. S. M.; JÚNIOR, R. R.; VALÉRIO, H. M.; BRAMDI, I. V.; OLIVEIRA, D. A. Antibacterial activity of tannins from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **J Med Plants Res.**, Barcelona, v. 8, n. 35, p. 1095-1100, sep. 2014.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout *in vitro* gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. **J Agric Food Chem.**, Washington, v. 61, n. 8, p. 1859-1867, feb. 2013.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; ELEZ-MARTINEZ, P.; MARTIN-BELLOSO, O. In vitro bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice- and milk-based beverages. **Food Res Int.**, Essex, v. 62, p. 771–778, aug. 2014.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; CANO, M. P.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Impact of food matrix and processing on

the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. **J Funct Foods**, Wageningen, v. 14, p. 33–43, apr. 2015.

ROMANO, B.; PAGANO, E.; MONTANARO, V.; FORTUNATO, A. L.; MILIC, N.; BORRELLI, F. Novel Insights into the Pharmacology of Flavonoids. **Phytother Res.**, London, v. 27, n. 11, p. 1588-1596, nov. 2013.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Scientific Methodology: Determination of total antioxidant activity in fruits by capturing the free radical ABTS<sup>+</sup>**. Fortaleza: Embrapa, 2007a.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Scientific Methodology: Determination of total antioxidant activity in fruits by capturing the free radical DPPH**. Fortaleza: Embrapa, 2007b.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chem.**, Bruxelas, v. 121, n. 4, p. 996-1002, aug. 2010.

SÁ, R. A. **Constituintes químicos da madeira-de-lei *Myracrodruon urundeuva* com propriedades antioxidantes e ação contra fungos, bactérias e insetos**. 2008. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

SÁ, R. A.; ARGOLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Int Biodeterior Biodegradation**, Oxford, v. 63, n. 4, p. 470–477, jun. 2009.

SALESSE, D.; MEDEIROS, F. C.; SILVA, C. C. M.; LOURENÇO, E. L. B.; JACOMASSI, E. Ethnobotany and ethnopharmacology of Amaryllidaceae, anarcardiaceae, amnonaceae and apiaceae species. **Arq Ciênc Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 22, n. 3, p. 205-216, sep/dec. 2018.

SANTOS, R. T.; HIRAMOTO, L. L.; LAGO, J. H. G.; SARTORELLI, P.; TEMPONE, A. G.; PINTO, E. G.; LORENZI, H. Anti-trypanosomal activity of 1,2,3,4,6-penta-o-galloyl-B-d-glucose isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews (Lamiaceae). **Quím Nova**, São Paulo, v. 35, n. 11, p. 2229–2232, nov. 2012.

SANTOS, A. L. L. M.; LIMA, J. D. P.; ANDRADE, C. R.; SANTOS, D. M.; DIAS, A. S.; SANTOS, P. A. L.; NUNES, R. K. V.; FILHO, J. E. R. M.; SANTOS, J. N. A.; VASCONCELLOS, M. L.; SHAN, A. Y. K.; ARAÚJO, B. S.; ESTEVAM, C. S. *Myracrodruon urundeuva* Allemão: Chemical composition, antioxidante activity, antimicrobial activity and inotropic effect. **Afr J Biotechnol.**, Nairobi, v. 16, n. 21, p. 1230-1241, may. 2017.

SANZ, T.; LUYTEN, H. Release, partitioning and stability of isoflavones from enriched custards during mouth, stomach and intestine in vitro simulations. **Food Hydrocoll.**, Wrexham, v. 20, n. 6, p. 892–900, aug. 2006.

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chem.**, Bruxelas, v. 101, n. 2, p. 492–501, feb. 2007.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J Nutr.**, London, v. 130, n. supl 8S, p. 2073S–2085S. aug. 2000.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chem.**, Barking, v. 112, n. 3, p. 654–658, feb. 2009.

SCHOFIEL, D. P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Anim Feed Sci Technol.**, Amsterdam, v. 1, n.1-2, p: 21–40, may. 2001.

SCHOLZ, S.; SELA, E.; BLAHA, L.; BRAUNBECK, T.; GALAY-BURGOS, M.; GARCÍA-FRANCO, M.; GUINEA, J.; KLÜVER, N.; SCHIRMER, K.; TANNEBERGER, K. ... WINTER, M. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. **Regul Toxicol Pharmacol.**, Falls Church, v. 67, n. 3, p.506-530, dec. 2013.

SCHMIDT, D. F. N. **Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico.** 2005. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in plant metabolimics: techniques, problems and prospects. **Phytochem Anal.**, Liverpool, v. 21, n. 1, p. 14–21, jan/feb. 2010.

SEGALA, R.; DUTRA, R. L.; OLIVEIRA, E. N.; ROSSI, L. M.; MATOS, J. R.; PAULA, M. M. S.; FRANCO, C. V. Characterization of poly-{trans-[RuCl<sub>2</sub>(vpy)<sub>4</sub>]-styrene-4-vinylpyridine} impregnated with silver nanoparticles in non aqueous médium. **J Braz Chem Soc.**, São Paulo, v. 17, n. 8, p. 1679-1682, nov/dec. 2006.

SENIGALIA, R. L. C.; FERREIRA, A. L. S.; KRATZ, D.; COELHO, M. F. B.; SANTOS, A. S. R. M.; CASTRO, D. A. Toxicidade de extratos vegetais de plantas do cerrado de uso medicinal. **Braz J Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 8, p. 55308-55317, aug. 2020.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos proteícos: propriedades – degradação modificações. In: SGARBIERI, V. C. **Deterioração e modificações químicas, físicas e enzimáticas de proteínas.** São Paulo: Varela, 1996.

SHAIKH, S.; FATIMA, J.; SHAKIL, S.; DINAMARQUÊS, S. M. R.; KAMAL, M. A. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi J Biol Sci.**, Riade, v. 22, n. 1, p. 90-101, jan. 2015.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. **J Med Food**, Larchmont, v. 14, n. 3, p. 284-290, mar. 2011.

SHIM, S.; FERRUZZI, M.; KIM, Y.; JANLE, E.; SANTERRE, C. Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. **Food Chem.**, Bruxelas, v. 112, n. 1, p. 46-50, jan. 2009.

SHU, X.; DUAN, W.; LIU, F.; SHI, X.; GENG, Y.; WANG, X.; YANG, B. Preparative separation of polyphenols from the flowers of *Paeonia lactiflora* Pall. by high-speed counter current chromatography. **J Chromatogr B**, Lincoln, v. 947-948, p. 62-67, feb. 2014.

SILVA, L. M. M.; RODRIGUES, T. J. D.; AGUIAR, I. B. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Rev Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 691-697, nov/dec. 2002.

SILVA, A. C. O.; ALBUQUERQUE, U. P. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta Bot Bras.**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 17–26, jan/mar. 2005.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medical plants: a review of their antimicrobial activity. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.**, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 402-413, jul/sep. 2010.

SILVA, C. V.; REIS, A. L. V.; FERRER, S. R.; GUERREIRO, H. M. N.; BARROS, T. F.; VELOZO, E. S. Evaluation of antimicrobial activity of two *rutaceae* species in northeastern Brazil. **Rev Bras Farmacogn.**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 355-60, jun/jul. 2010a.

SILVA, Neusely da; JUNQUEIRA, Valéria Christina Amstalden; SILVEIRA, Neliane Ferraz de Arruda; TANIWAKI, Marta Hiromi; SANTOS, Rosana Francisco Siqueira dos; GOMES, Renato Abeilar Romeiro. **Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo: Varela, 2010b.

SILVA, V. C.; NAPOLITANO, A.; ELETTO, D.; RODRIGUES, C. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis- electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of- flight mass spectrometry. **Eur J Mass Spectrom.**, London, v. 17, n. 4, p. 365–375, aug. 2011.

SILVA, M. S. P.; BRANDÃO, D. O.; CHAVES, T. P.; FILHO, A. L. N. F.; COSTA, E. M. M. B.; SANTOS, V. L.; MEDEIROS, A. C. D. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid Northeast: Contribution to the control of oral microorganisms. **Evid Based Complement Alternat Med.**, Oxford, v. 2012, n. 2, p. 1-6, jun. 2012.

SILVA, C. M.; MOTA, F. B. C.; RODRIGUES, M. D.; OLIVEIRA, D. A.; VALÉRIO, H. M. Crude extracts and semi-fractions from *Myracrodruon urundeuva* with antibacterial activity against American Type Culture Collection (ATCC) strains of clinical relevance. **J Med Plants Res.**, Nsukka, v. 7, n. 32, p. 2407-2413, aug. 2013.

SILVA, D. F.; MATUMOTO-PINTRO, P. T.; BAZINET, L.; COUILLARD, C.; BRITTEN, M. Effect of commercial grape extracts on the cheese-making properties of milk. **J Dairy Sci.**, Champaign, v. 98, n. 3, p. 1552–1562, mar. 2015.

SILVA, J. A. G.; LIMA, I. R.; SANTANA, M. A. N.; SILVA, T. M. S.; SILVA, M. I. A. G.; LEITE, S. P. Screening Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente à *Artemia salina* Leach. **Rev Virtual Quim.**, Niterói, v. 9, n. 3, p. 934-941, jun. 2017.

SIMÕES, Claudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace.; MELLO, João Carlos Palazzo de. **Pharmacognosia: from plant to medicine**. 5. ed. Porto Alegre: University/UFRGS, 2003.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010.

SIQUEIRA, V. L. D.; CARDOSO, R. F.; CALEFFI-FERRACIOLI, K. B.; SCODRO, R. B.; FERNANDEZ, M. A.; FIORINI, U. M.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v. 58, n. 7, p. 3957-67, jul. 2014.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and  $\alpha$ -toxin by *Staphylococcus aureus*. **J Med Microbiol.**, v. 53, p. 1023-1027, oct. 2004.

SONG, B. J.; MANGANAIS, C.; FERRUZZI, M. G. Thermal degradation of green tea flavan-3-ols and formation of hetero- and homocatechin dimers in model dairy beverages. **Food Chem.**, Barking, v. 173, p. 305–312, apr. 2015.

SONG, K.; LEE, K. J.; KIM, Y. S. Development of an efficient fractionation method for the preparative separation of sesquiterpenoids from *Tussilago farfara* by counter-current chromatography. **J Chromatogr A**, Ames, v. 1489, p. 107-114, mar. 2017.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, mar/apr. 2007.

SOUZA, L. P. **Padronização de extratos vegetais: *Astronium urundeuva* (Anacardiácea)**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

SOUSA, E. A.; SILVA, A. A. C. A.; CAVALHEIRO, A. J.; LAGO, J. H. G.; CHAVES, M. H. A New Flavonoid Derivative from Leaves of *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries. **J Braz Chem Soc.**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 704–708, jan. 2014.

SOUZA, I. A.; GIOVANNETTI, A. C. S.; SANTOS, L. G. F.; GANDRA, S. O. S.; MARTINS, M. L.; RAMOS, A. L. S. Microbiological quality of Minas frescal cheese traded in Zona da Mata Mineira. **Rev Inst Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 3, p. 152-162, jul/sep. 2017.



SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **J Food Compos Anal.**, San Diego, v. 19, n. 6-7, p. 531-537, set/nov. 2006.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, E.; CONTE, A. In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of grape berries polyphenols. **Food Chem.**, Washington, v. 120, n. 2, p. 599-606, may. 2010.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; CONTE, A. The first tract of alimentary canal as an extractor. Release of phytochemical from solid food matrices during simulated digestion. **J Food Biochem.**, Winnipeg, v. 36, n. 5, p. 555-568, dec. 2012.

TAYLOR, J. C.; DEWBERRY, L. S.; TOTSCH, S. K.; YESSICK, L. R.; DEBERRY, J. J.; WATTS, S. A.; SORGE, R. E. A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiol Behav.**, Zurich, v. 174, p. 83-88, may. 2017.

TENORE, G. C.; CAMPIGLIA, P.; GIANNETTI, D.; NOVELLINO, E. Simulated gastrointestinal digestion, intestinal permeation and plasma protein interaction of White, green, and black tea polyphenols. **Food Chem.**, Barking, v. 169, p. 320-326, feb. 2015.

TINKEL, J.; HASSANAIN, H.; KHOURI, S. J. Cardiovascular antioxidant therapy: a review of supplements, pharmacotherapies, and mechanisms. **Cardiol Rev.**, Valhalla, v. 20, n. 2, p. 77-83, mar/apr. 2012.

TIWARI, P.; KUMAR, B.; KAUR, M.; KAUR, G.; KAUR, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, New Delhi, v. 1, n. 1, p. 98-106, jan/mar. 2011.

TORTORA Gerard J; FUNKE, Berdell R; CASE, Christine L. **Microbiology**. 8. ed. Porto Alegre: Artemed, 2005.

TORTORA, Gerard; FUNKE, Berdell; CASE, Christine. **Microbiology: An Introduction**. 12. ed. New York: Pearson Benjamin Cummings, 2015.

TOYDEMIR, G.; CAPANOGLU, E.; KAMILOGLU, S.; BOYACIOGLU, D.; VOS, R. C. H.; HALL, R. D.; BEEKWILDER, J. Changes in sour cherry (*Prunus cerasus* L.) antioxidants during néctar processing and in vitro gastrointestinal digestion. **J Funct Foods**, Wageningen, v. 5, n. 3, p. 1402-1413, jul. 2013.

TRENTIN, D. S.; SILVA, D. B.; AMARAL, M. W.; ZIMMER, K. R.; SILV, A. M. V.; LOPES, N. P.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 6, jun. 2013.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.; VENUTI, V.; CRISTIANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A. Mechanism of antibacterial actions of three monoterpenes. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, jul. 2005.

TRUGILHO, P. F.; MORI, F. A.; LIMA, J. T.; CARDOSO, D. P. Determinação do teor de taninos na casca de *Eucalyptus* spp. **Cerne**, Lavras, v. 9, n. 2, p. 246-254, jun. 2003.

- VAN, A. H.; VAN, D. P.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 22, n. 6, p. 326–333, jun. 2014.
- VASCONCELOS, M.C.A. et al. Avaliação de atividades biológicas das sementes de *Stryphmodendron obovatum* Benth (Leguminosae). **Rev Bras Farmacogn.**, Curitiba, v. 14, n. 1, p. 121-127, may. 2004.
- VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quím Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 85-94, jan/feb. 2005.
- VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MOURA, L. C.; SOUZA-FILHO, M. V. P.; MATOS, F. J. A.; RIBEIRO, R. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Phytother Res.**, Naples v. 11, p. 118-122, 1997.
- VIANA, G. S.; BANDEIRA, M. A.; MATOS, F. J. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, n. 2-3, p. 189–195, feb/mar. 2003.
- VIEIRA, L. M.; CASTRO, C. F. S.; DIAS, A. L. B.; SILVA, A. R. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **Rev Bras Plantas Med.**, Paulínia, v. 17, n. 4, p. 521-527, oct/dec. 2015.
- VOIGT, Rudolf; BORNSCHEIN, Manfred. **Tratado de tecnologia farmacêutica**. Zaragoza: Acribia, 1982.
- ZON, L. I.; PETERSON, R. T. In vivo drug discovery in the zebrafish. **Nat Rev Drug Discov.**, Londres, v. 4, n. 1, p. 35-44, jan. 2005.
- VONGSAK, B.; SITHISARN, P.; MANGMOOL, S.; THONGPRADITCHOTE, S.; WONGKRAJANG Y.; GRITSANAPAN, W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Ind Crops Prod.**, Fargo, v. 44, p. 566-571, jan. 2013.
- WANG, Y.; YANG, J.; WANG, A.; MA, J.; TAN, J.; JI, T.; SU, Y. Hydrolyzable tannins from *Balanophora polyandra*. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 46–50, feb. 2013.
- WINNING, H.; LARSEN, F. H.; BRO, R.; ENGELSEN, S. B. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. **J Magn Reson.**, Newark, v. 190, n. 1, p. 26-32, jan. 2008.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, New York, v. 64, n. 1, p. 3–19, sep. 2003.
- WINKLER, T. Comments on “Piperidone derivative from *Dalbergia sympathetica*.” **Magn Reson Chem.**, Chichester, v. 44, n. 5, p. 571–572, may. 2006.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J Apic Res.**, Londres, v. 37, n. 2, p. 99-105, jan. 1998.

XIAO, J.; MAO, F.; YANG, F.; ZHAO, Y.; ZHANG, C.; YAMAMOTO, K. Interaction of dietary polyphenols with bovine milk proteins: Molecular structure-affinity relationship and influencing bioactivity aspects. **Mol Nutr Food Res.**, Weinheim, v. 55, n. 11, p. 1637-1645, aug. 2011.

XIE, Y.; KOSINSKA, A.; XU, H.; ANDLAUER, W. Milk enhances intestinal absorption of green tea catechins *in vitro* digestion/Caco-2 cells model. **Food Res Int.**, Essex, v. 53, n. 2, p. 793–800, oct. 2013.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; SAKA, M.; YOSHIZUMI, S.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Medicinal Foodstuffs. V. Moroheiya. (1): Absolute Stereostructures of Corchoionosides A, B, and C, Histamine Release Inhibitors from the Leaves of Vietnamese *Corchorus olitorius* L. (Tiliaceae). **Chem Pharm Bull.**, Tóquio, v. 45, n. 3, p. 464–469, mar. 1997.

YUNES, Rosendo Augusto; CALIXTO, João Batista. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

YUSTE, J.; FUNG, D. Y. C. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A 49594 in Apple Juice Supplemented with Cinnamon. **J Food Prot.**, Des Moines, v. 65, n. 10, p. 1663-1666, oct. 2002.

ZHANG, Y.; LIU, X.; WANG, Y.; JIANG, P.; QUEK, S. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, Vurrey, v. 59, p. 282-289, jan. 2016.

ZORTÉA, K. E. M.; JUNIOR, E. F.; SIMON, S. S.; SIMIONI, P. F.; ROSSI, A. A. B. Rosemary extracts are allelopathic to the germination of *Eruca sativa* L.?. **Biosphere Encyclopedia**, Goiânia, v. 11, n. 22, p. 3710-3718, dec. 2015.

## APÊNDICE A - LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão de Literatura

Figura 1 - Folha frescas e folhas secas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> .....	22
--	----

### Capítulo II

Figura 1 - Ressonância Magnética Nuclear – Folhas secas por infusão - FSINF (a), Folhas secas por turbolização - FSTURB (b), Folhas secas por maceração - FSMAC (c) and Folhas secas por decocção - FSDEC (d) [ <sup>1</sup> H/D <sub>2</sub> O/303K] .....	48
---	----

Figure 2 - Micrografia de <i>L. monocytogenes</i> sob ação dos extratos FSMAC (a;d), FSDEC (b;e) e controle positivo de <i>L. monocytogenes</i> (c;f).....	53
--	----

Figura 3 - Micrografia de <i>S. aureus</i> sob ação dos extratos FSMAC (a;d), FSDEC (b;e) e controle positivo de <i>S. aureus</i> (c;f).....	54
--	----

Figura 4 - Micrografia de <i>S. Enteritidis</i> sob ação dos extratos FSMAC (a;d), FSDEC (b;e) e controle positivo de <i>S. Enteritidis</i> (c;f).....	55
--	----

Figura 5 - Micrografia de <i>E. coli</i> sob ação dos extratos FSMAC (a;d), FSDEC (b;e) e controle positivo de <i>E. coli</i> (c;f).....	55
--	----

Figura 6 - Micrografia de <i>P. aeruginosa</i> sob ação dos extratos FSMAC (a;d), FSDEC (b;e) e controle positivo de <i>P. aeruginosa</i> (c;f).....	56
--	----

### Capítulo III

Figura 1 - Determinação da distribuição granulométrica das folhas secas e trituradas de aroeira-do-sertão.....	65
--	----

Figura 2 - Cromatogramas de extratos aquosos de <i>M. urundeuva</i> FSDEC and FSMAC em modo de ionização negativa.....	69
--	----

### Capítulo IV

Figura 1 - Ressonância magnética nuclear – FFINF (Folhas frescas por infusão/a); FFTURB (Folhas frescas por turbolização/b); FFMAC (Folhas frescas por maceração/c); FFDEC (Folhas frescas por decocção/d) [ <sup>1</sup> H/D <sub>2</sub> O/303K] .....	82
--	----

### Capítulo V

Figura 1 - Atividade locomotora do zebrafish adulto ( <i>Danio rerio</i> ) em Teste de Campo Aberto de FSMAC.....	100
---	-----

Figura 2 - Comportamento de <i>S. aureus</i> em queijo fresco ultrafiltrado com teor normal de gordura incubado a 9 °C por 30 dias com extrato aquoso de aroeira-do-sertão.....	102
---	-----

Figura 3 - Comportamento de <i>S. aureus</i> em queijo fresco ultrafiltrado light incubado a 9 °C por 30 dias com extrato de aroeira-do-sertão.....	102
Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura do queijo fresco ultrafiltrado com <i>S. aureus</i> e extrato aquoso das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> .....	104
Figura 5 - Avaliação de permeabilidade de membrana celular por microscopia confocal de <i>S. aureus</i> com extrato aquoso das folhas secas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> em amostra de queijo fresco ultrafiltrado.....	106

## APÊNDICE B - LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1 - Classe de metabólitos do extrato das folhas de <i>M. urundeuva</i> .....	37
Tabela 2 - Atividade antimicrobiana das frações das folhas de <i>M. urundeuva</i> .....	38
Tabela 3 - Atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de <i>M. urundeuva</i> .....	40

### Capítulo II

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos das folhas de aroeira-do-sertão expressos em mg/mL.....	50
--	----

### Capítulo III

Tabela 1 - Rendimento dos extratos aquosos a partir das folhas de aroeira-do-sertão.....	64
Tabela 2 - Conteúdo de fenólicos totais, taninos, flavonóides e antioxidante dos extratos aquosos das folhas de aroeira-do-sertão.....	66
Tabela 3 - Tentativa de identificar metabólitos secundários presentes em extratos aquosos de folhas de <i>M. urundeuva</i> .....	70
Tabela 4 - Bioacessibilidade de compostos bioativos de extratos aquosos das folhas de aroeira-do-sertão.....	72

### Capítulo IV

Tabela 1 - Rendimentos dos extratos aquosos a partir das folhas frescas de aroeira-do-sertão...	81
Tabela 2 - Conteúdo de fenólicos totais, taninos, flavonóides e antioxidante dos extratos aquosos das folhas frescas de aroeira-do-sertão.....	83
Tabela 3 - Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos das folhas frescas de aroeira-do-sertão.....	86
Tabela 4 - Atividade tóxica dos extratos aquosos das folhas frescas de aroeira-do-sertão sobre <i>Artemia salina</i> .....	87

### Capítulo V

Tabela 1 - Bioacessibilidade de compostos bioativos presentes no extrato de aroeira-do-sertão aplicado no queijo frescal ultrafiltrado com teor normal de gordura.....	107
--	-----