



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Leda Atílio Pita

**Matrizes vegetais como fonte de atividade antimicrobiana: métodos
de extração e ação frente a microrganismos de importância em
alimentos**

São José do Rio Preto
2024

Leda Atílio Pita

Matrizes vegetais como fonte de atividade antimicrobiana: métodos de extração e ação frente a microrganismos de importância em alimentos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Maurício Bonatto Machado de Castilhos

Coorientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

São José do Rio Preto
2024

P681m	Pita, Leda Atílio Matrizes vegetais como fonte de atividade antimicrobiana: métodos de extração e ação frente a microrganismos de importância em alimentos / Leda Atílio Pita. -- São José do Rio Preto, 2024 89 p. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Maurício Bonatto Machado de Castilhos Coorientador: Vanildo Luiz Del Bianchi 1. Cerrado. 2. Extratos. 3. Compostos bioativos. 4. Atividade antioxidante. 5. Compostos fenólicos. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Leda Atílio Pita

**Matrizes vegetais como fonte de atividade antimicrobiana:
métodos de extração e ação frente a microrganismos de
importância em alimentos**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Maurício Bonatto Machado de Castilhos
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto/SP
Orientador

Profa. Dra. Márcia Luzia Rizzatto
IFSP – Câmpus de Matão/SP

Dra. Nathalie Almeida Lopes
Amylum – São José do Rio Preto/SP

São José do Rio Preto
27 de maio de 2024

Dedico este trabalho aos meus pais, como formas de reconhecimento e agradecimento por tanto apoio.

Em especial, ao meu pai, por ter escalado árvores de jenipapo, recolhido sucupiras, colhido pés de picão e de melão-de-São-Caetano – na maior boa vontade e no maior bom humor.

AGRADECIMENTOS

Por algum motivo, o tema escolhido para este trabalho não está relacionado com a linha principal de pesquisa dos meus orientadores (vinificação/bebidas fermentadas). Diante disso, não tínhamos um roteiro pré-pronto, comum de ser seguido no laboratório, e o projeto foi todo montado “pecinha por pecinha”: escolhemos as matérias-primas, as metodologias, compramos reagentes... isso implicou em (muitos) testes e erros que, é claro, ficam de fora dessa dissertação - mas eu quero deixar isso lembrado aqui! E também implicou em um punhado de gente legal que eu conheci porque precisei tirar muitas dúvidas sobre as metodologias. Então, esse projeto foi sendo construído aos pouquinhos e se tornou um trabalho de duas mãos - e algumas cabeças.

Começo agradecendo a Deus e ao meu anjo da guarda, pela vida cheia de possibilidades que tenho e porque sei e sinto que me acompanham a todo momento.

Agradeço aos meus pais, Saulo e Eugênia (Geninha), pelo incentivo em diversas formas (financeiro, psicológico, logístico) e pelo amor que recebo desde que me entendo por gente. Vocês são os amores da minha vida e meus exemplos em diversas virtudes.

À minha prima-irmã Laísa, por estar sempre me ouvindo e aconselhando.

Ao meu orientador, prof. Dr. Maurício Bonatto, por topar um projeto nas adversidades que tem a microbiologia. Por compartilhar muito conhecimento, sempre em uma didática impecável (o que é admirável, especialmente na parte de estatística). Por sustentar essa parceria caótica que fizemos dar certo. Ao meu co-orientador, prof. Dr. Vanildo Del Bianchi, por todo o suporte (incluindo o emocional) que me oferece desde a graduação, quando foi meu orientador de iniciação científica. Por ser essa inspiração como ser humano e como pesquisador. O senhor é um dos motivos que me fizeram querer entrar na pós e ser docente.

Às professoras doutoras Marcia Rizzato e Nathalie Lopes, pelas considerações importantes e norte durante o exame de qualificação.

À técnica do laboratório de microbiologia, Tânia Vinturim, pela admirável competência, pela doçura na forma de explicar e por me ensinar a ver “o copo meio cheio”. Tânia é fora da curva, a pessoa rara que une pessoal e profissional exemplares e me faz escrever aqui com um sorriso no rosto. A parte boa da reforma do laboratório foi poder trabalhar ao seu lado.

Ao Rafael Fulindi, que me ajudou muito na parte de microbiologia com mensagens, áudios, fotos, vídeos, material, sempre com muita paciência. Foi praticamente uma co-orientação, mesmo sem ter nenhum compromisso formal para isso. MUITÍSSIMO obrigada, amiguinho!

À Aline Oliveira, que me fez compreender melhor o que acontecia dentro das microplacas com inóculo e resazurina. À Nayara Rezende, que também me ajudou muito com a resazurina e análise de varredura. Vocês duas nem me conheciam e foram muito solícitas na extensa troca de mensagens, verdadeiros anjos. MUITÍSSIMO obrigada!

À Juliana Santos, pelo auxílio em ensaios nas microplacas.

À Daiane, pela parceria que se iniciou na organização do I Simpósio de Microbiologia, Ciência de Alimentos e Nutrição (SECAN) e se estendeu como ouvido e ombro amigos para diversas ocasiões, mesmo estando do outro lado do Atlântico.

Para Renata, Oneide e Carol, por desbravarem Rio Preto junto comigo. E ainda faltaram muitos lugares para conhecermos, que pena...

Ao Bruno, por tornar meus dias mais bonitos e alegres (e a grama mais verdinha...). Por ser compreensivo com essa etapa final do mestrado.

Às professoras Vânia, Cida e Neuza, pelo empréstimo de equipamentos para o projeto.

Aos técnicos Luiz Carlos e Alana, pelo auxílio em dúvidas e análises.

Aos professores do Departamento de Engenharia e Ciência de Alimentos que atuaram na minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

“O que toca a alma indica o caminho.”

Desconhecido

RESUMO

O ser humano utiliza plantas para cura e tratamento de enfermidades desde tempos remotos. O emprego, iniciado e mantido empiricamente, hoje é justificado com as análises de caracterização destas matrizes; no entanto, ainda há muitas fontes vegetais com pouco estudo a respeito, especialmente as contidas no extenso solo do Brasil. O Cerrado brasileiro ainda é pouco explorado para busca, identificação e extração de compostos e moléculas interessantes para aplicação em alimentos, cosméticos e fármacos. Somando-se o atual movimento de consumidores que buscam por produtos ditos naturais, com reduzida ou nula composição de aditivos sintéticos, este trabalho se justifica e tem por objetivo avaliar a ação antibacteriana, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante de extratos aquosos de três vegetais encontrados no bioma Cerrado: barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) – uso de cascas; jenipapo – polpa e sementes (*Genipa americana*); e frutos de sucupira (*Pterodon spp.*). Cinco bactérias de interesse sanitário em alimentos foram testadas frente o uso dos extratos, sendo elas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O projeto se divide em 3 fases: 1) escolha do melhor método extrativo, comparando-se agitação em shaker por 5 horas a 120 rpm; infusão por 5 minutos; decocção por 5 minutos; banho de ultrassom a 40 kHz por 60 minutos; 2) determinação das concentrações inibitória e bactericida mínimas (CIM e CBM), com o extrato produzido com o método definido anteriormente; 3) avaliação da atividade antibacteriana, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos nos dias 1, 7 e 14 dias a partir da sua produção, armazenados a 20 °C e a 5 °C. Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de *Tukey* ($p < 0,05$), ou ao teste *t* de Student quando aplicável. Na concentração de 20% e via decocção (o método com melhores resultados), barbatimão se mostrou uma poderosa fonte de compostos fenólicos (21500 ± 4212 mg/L) e atividade antioxidante (272 ± 93 mM). Para *S. aureus*, a CBM foi de apenas 0,3125%, para *B. cereus*, 0,625%, e as demais bactérias, 2,5%. O extrato não suporta mais que uma semana em temperatura de 20 °C devido crescimento fúngico, devendo ser armazenado em geladeira. Nessa condição, houve elevação da atividade antioxidante no período de armazenamento por 21 dias. Os extratos de jenipapo e sucupira não puderam ser corretamente avaliados, pois se mostraram inadequados ao protocolo com resazurina. Também não se formou halo de inibição para nenhum método de extração. Decocção se mostrou o melhor método (maior teor de fenólicos totais) para polpa de jenipapo e frutos de sucupira, enquanto shaker foi melhor para sementes de jenipapo.

Palavras-chave: Cerrado. Extratos. Compostos bioativos. Atividade antioxidante. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

Human beings have used plants to cure and treat diseases since ancient times. The use, started empirically, today is justified with the characterization analyzes of these matrices; however, there are few studies about some plants, especially those contained in the extensive soil of Brazil. The Brazilian Cerrado is still bit explored for research and identification of important compounds and molecules for application in foods, cosmetics and pharmaceuticals. Adding to the trend of consumers looking for natural products, with reduced or no composition of synthetic additives, this work is justified and aims to evaluate the antibacterial action, total phenolic content and antioxidant activity of aqueous extracts of three plants found in the Cerrado: barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) – using barks, genipap (*Genipa americana*) – pulp and seeds; and sucupira fruits (*Pterodon spp.*). Five bacterias of food interest were tested: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The project is divided into 3 phases: 1) choosing the best extraction method, comparing shaking in a shaker for 5 hours at 120 rpm; infuse for 5 minutes; decoction for 5 minutes; ultrasound bath at 40 kHz for 60 minutes; 2) determination of the minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC), with the extract produced with the previously defined method; 3) evaluation of the antibacterial activity, total phenolic content and antioxidant activity of the extracts on days 1, 7 and 14 after their production, stored at 20 °C and 5 °C. The results were submitted to one-way Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey's test ($p < 0.05$), or Student's t-test when applicable. At a concentration of 20% and via decoction (the method with the best results), barbatimão proved to be a powerful source of phenolic compounds (21500 ± 4212 mg/L) and antioxidant activity (272 ± 93 mM). For *S. aureus*, the MBC was only 0.3125%, for *B. cereus*, 0.625%, and the others, 2.5%. The extract cannot withstand more than a week at a temperature of 20 °C due fungal growth and must be stored in the refrigerator. In this condition, there was an increase in antioxidant activity during the 21-day storage period. Genipap and sucupira extracts could not be correctly evaluated, as they proved to be unsuitable for the resazurin protocol. There was also no inhibition halo for any extraction method. Decoction proved to be the best method (higher total phenolic content) for genipap pulp and sucupira fruits, while shaker was better for genipap seeds.

Keywords: Brazilian Cerrado. Extracts. Bioactive compounds. Antioxidant activity. Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de um hidroxibenzeno, também chamado de fenol.	29
Figura 2. Classificação dos compostos fenólicos e alguns exemplos.	30
Figura 3. Estrutura de alguns taninos.	31
Figura 4. Biomas brasileiros.	34
Figura 5. A: árvore de <i>Stryphnodendron adstringens</i> ; B: destaque para seu tronco de casca fendida; C: folhas e inflorescência.	38
Figura 6. Jenipapos maduros.	39
Figura 7. Árvore de <i>Pterodon spp.</i> utilizada no projeto e suas flores.	41
Figura 8. Fruto de sucupira rodeado por sua ala (a esquerda) e sua semente (a direita).	42
Figura 9. Cascas de barbatimão.	46
Figura 10. Polpa de jenipapo cortada em cubos e suas sementes.	47
Figura 11. Montagem para infusão e decocção, agitação por shaker e banho de ultrassom.	48
Figura 12. Curva de calibração para atividade antioxidante pelo método de redução do radical DPPH.	50
Figura 13. Curva de calibração para teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.	51
Figura 14. Esquema de placa utilizada para determinar a concentração bactericida mínima	57
Figura 15. Extratos aquosos de barbatimão a 20% elaborados com os métodos: agitação em shaker, infusão, decocção e ultrassom (em ordem, da esquerda para a direita).	59
Figura 16. Extratos aquosos de polpa de jenipapo a 45% elaborados com os métodos: infusão, decocção, ultrassom e agitação em shaker (em ordem, da esquerda para a direita).	62
Figura 17. Extratos aquosos de semente de jenipapo a 50% elaborados com os métodos: infusão, decocção, ultrassom e agitação em shaker (em ordem, da esquerda para a direita).	62

Figura 18. Extratos aquosos de frutos de sucupira a 40% elaborados com os métodos: infusão, decocção, ultrassom e agitação em shaker (em ordem, da esquerda para a direita).	64
Figura 19. Placas inoculadas com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i> (acima), <i>P. aeruginosa</i> e <i>B. cereus</i> (embaixo) e a inibição proporcionada pelos extratos de <i>S. adstringens</i> produzidos em shaker e em ultrassom.	66
Figura 20. Destaque para as colônias jovens formadas no período de incubação. Em vermelho, o halo inicial, e em azul, o halo final, considerado na medição. 67	
Figura 21. Microplaca com resazurina em testes para extratos de polpa e semente de jenipapo e sucupira. Suas laterais contêm indicações das amostras testadas, em que “ultr.” = ultrassom, “shak.” = shaker e “inf.” = infusão.....	69
Figura 22. Gráficos de varredura para extratos de polpa de jenipapo sem (A) e com (B) adição de resazurina.....	70
Figura 23. Gráficos de varredura para extratos de semente de jenipapo sem (A) e com (B) adição de resazurina.....	71
Figura 24. Análise de varredura para extratos de sucupira com resazurina. ...	73
Figura 25. Leitura de placa para concentração bactericida mínima.	75
Figura 26. Contaminação fúngica observada nos extratos armazenados a 20 °C e confirmação da presença de fungos, com inoculação em ágar Mueller-Hinton	77
Figura 27. Atividade antioxidante (a esquerda) e teor de fenólicos totais (a direita) dos extratos produzidos na CBM e armazenados a 5 °C.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de resultados apontados em duas importantes bases de dados.	36
Tabela 2. Resultados de pH, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais (média ± desvio padrão) dos extratos de barbatimão a 20%.	59
Tabela 3. Resultados de pH, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais (média ± desvio padrão) dos extratos de polpa de jenipapo.	62
Tabela 4. Resultados de pH, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais (média ± desvio padrão) dos extratos de semente de jenipapo.	63
Tabela 5. Comparação entre os melhores métodos de obtenção dos extratos de jenipapo – polpa e semente.	63
Tabela 6. Resultados de pH, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais (média ± desvio padrão) dos extratos de sucupira a 40%.	65
Tabela 7. Halos de inibição (mm) proporcionados pelos diferentes métodos de obtenção do extrato aquoso de <i>S. adstringens</i> contra as bactérias testadas. .	66
Tabela 8. Concentrações bactericidas mínimas dos extratos aquosos de <i>S. adstringens</i> contra as bactérias testadas.	76
Tabela 9. Atividade antioxidante e compostos fenólicos totais dos extratos produzidos na CBM e armazenados a 5 °C por 21 dias.	77
Tabela 10. Atividade antioxidante e compostos fenólicos totais dos extratos produzidos na CBM e armazenados a 20 °C por 7 dias.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CBM	Concentração bactericida mínima
CFT	Compostos fenólicos totais
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DTA	Doença transmitida por alimento
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MM	Massa molar
OMS	Organização Mundial da Saúde
PANC	Plantas alimentícias não convencionais
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UV-VIS	Ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
cm	Centímetro
kHz	KiloHertz
mg/L	Miligramma/litro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
p/p	Relação peso/peso
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia/mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1.	Objetivo geral	19
2.2.	Objetivos específicos.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1.	Considerações gerais	20
3.2.	Microrganismos e segurança do alimento	21
3.2.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	22
3.2.2.	<i>Escherichia coli</i>	23
3.2.3.	<i>Salmonella enteritidis</i>	24
3.2.4.	<i>Bacillus cereus</i>	25
3.2.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
3.3.	Ação antimicrobiana de matrizes vegetais	26
3.4.	Compostos fenólicos	28
3.4.1.	Atividade antioxidante.....	32
3.5.	O Cerrado.....	33
3.5.1.	Frutos do Cerrado e sua ação antimicrobiana	35
3.5.1.1.	Barbatimão	37
3.5.1.2.	Jenipapo	39
3.5.1.3.	Sucupira	40
3.6.	Extratos	42
3.6.1.	Infusão.....	43
3.6.2.	Decocção.....	43
3.6.3.	Maceração dinâmica.....	44
3.6.4.	Extração assistida por ultrassom	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1.	Matrizes vegetais e seus derivados.....	45
4.1.1.	Obtenção das matrizes vegetais.....	45
4.1.1.	Preparo dos extratos	46
4.2.	Análises de caracterização	48
4.2.1.	Umidade	48
4.2.2.	pH.....	49

4.2.3.	Atividade antioxidante.....	49
4.2.4.	Compostos fenólicos totais.....	50
4.3.	Atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	51
4.3.1.	Inóculos bacterianos.....	51
4.3.2.	Padronização dos inóculos bacterianos	51
4.3.3.	Esterilização dos extratos.....	52
4.3.4.	Avaliação de sensibilidade das bactérias aos extratos.....	53
4.4.	Avaliação do extrato pelo período de 21 dias.....	57
4.5.	Análise de varredura.....	57
4.6.	Análise dos dados	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1.	Caracterização dos extratos	59
5.1.1.	Barbatimão	59
5.1.2.	Jenipapo – polpa e semente.....	61
5.1.1.	Sucupira	64
5.2.	Atividade antibacteriana	65
5.2.1.	Barbatimão	65
5.2.2.	Jenipapo – polpa e semente.....	68
5.2.3.	Sucupira	72
5.3.	Concentração bactericida mínima	74
5.4.	Avaliação temporal do extrato	76
6	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos a humanidade emprega o que encontra na natureza para tratar enfermidades, sendo essa, ainda, a única opção em algumas comunidades. Os vegetais utilizados na cura e/ou prevenção de doenças ganharam a designação de “plantas medicinais” e ainda são manipulados de diversas formas, com uso em chás, emplastros, compressas, inalações, xaropes e outros. Essa aplicação teve início e se manteve de maneira empírica, uma vez que, obtido o resultado procurado (por exemplo, um efeito calmante, diminuição da temperatura corporal, melhora de dor de garganta), o tratamento era consolidado como eficiente, sem que se soubesse o porquê do efeito observado.

Hoje, as metodologias científicas permitem que estas plantas sejam vastamente estudadas, de modo a comprovar sua eficiência e caracterizar os componentes que possuem. Inclusive, os compostos de interesse podem ser extraídos e aplicados em outros produtos, como medicamentos, alimentos e cosméticos, e até em embalagens inteligentes. De encontro a essa aplicação, tem-se a atual preferência da sociedade ocidental pelo “natural”, em contraposição ao artificial e industrializado. Desta forma, os compostos extraídos de plantas ganham espaço para serem empregados como substitutos dos aditivos sintéticos, podendo ser utilizados como corantes, conservantes, antioxidantes e antimicrobianos naturais.

Há uma vasta quantidade de espécies vegetais no Brasil, com estimativas de que o país abrigue cerca de 20% da flora mundial (Carvalho; Conte Junior, 2021). Por consequência, um potencial grandioso de fitoquímicos com bioatividade e uma gama de aplicações escondem-se nestas terras. Este trabalho de mestrado lança o olhar sobre o Cerrado, segundo maior bioma brasileiro (IBGE, 2023), amplamente desmatado e ainda pouco explorado em suas potencialidades.

A ação contra bactérias, fungos e vírus é uma atividade procurada em plantas medicinais e em vegetais no geral. Uma vez que os microrganismos podem desenvolver resistência aos antimicrobianos já utilizados (e esta é a realidade impulsionada pelo uso indevido de antibióticos), encontrar compostos

com capacidade de inibir o crescimento dos microrganismos ou de matá-los é um esforço atual e importante.

Importante lembrar que a potência dos microrganismos e a fragilidade do ser humano em combatê-los foi escancarada ao mundo pela recente pandemia de SARS-CoV-2 (Covid-19). Em contrapartida, colocou em evidência a importância da pesquisa científica realizada por pesquisadores competentes e com uso de metodologias adequadas.

Existem muitos motivos para se estudar matrizes vegetais, uma vez que elas abrigam substâncias que possuem atividades diversas (antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva e outros “antis”) e podem ser aplicadas a interesses variados. Este trabalho almeja colaborar na construção do conhecimento na área e tem como força motriz a curiosidade da aluna-pesquisadora em formação e seu desejo de contribuir com o mundo (o caminho é longo, sabemos...).

Àqueles que passarem por estas páginas: boa leitura!

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Selecionar o melhor método de extração de compostos bioativos de três plantas nativas do Cerrado brasileiro e avaliar a atividade antibacteriana, teor de fenólicos totais e ação antioxidante *in vitro* dos extratos.

2.2. Objetivos específicos

- Produzir extratos aquosos de cascas de barbatimão (*Stripnodentron adstringens*), frutos de sucupira (*Pterodon spp.*) e sementes e polpa de jenipapo (*Genipa americana*).
- Caracterizar os extratos quanto capacidade antioxidante, concentração de fenólicos totais e atividade antibacteriana contra bactérias de interesse sanitário em alimentos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.
- Eleger o melhor método de extração, com base na concentração de compostos fenólicos totais do extrato obtido.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos produzidos com os métodos considerados melhores.
- Avaliar a estabilidade desses extratos durante 21 dias de armazenamento e submetidos a duas temperaturas diferenciadas, 5° C e 20° C.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4 Considerações gerais

O Brasil possui mais de 40 mil espécies vegetais ricas em fitoquímicos, representando cerca de 20% da flora mundial. Este grandioso número expõe o potencial de novos conhecimentos contidos nas plantas nativas dos biomas brasileiros, que podem ser empregadas para benefício em diversos setores, como prevenção e tratamento de doenças, elaboração de cosméticos, uso como antimicrobianos e em suplementos alimentares (Carvalho; Conte Junior, 2021).

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e a Savana com mais biodiversidade do mundo (IBGE, 2023). Os vegetais nativos dessa região se desenvolveram para sobreviver em situações extremas de um solo desprovido de nutrientes, recebimento de forte radiação ultravioleta, altas temperaturas, incêndios recorrentes e meses de estiagem alternados com alta precipitação (Reis; Schmiele, 2019). Todos estes fatores são promotores de estresse oxidativo e, assim, a vegetação endêmica desenvolveu mecanismos de defesa que envolvem a presença de compostos bioativos, com destaque a compostos fenólicos, e maior atividade de enzimas antioxidantes (Arruda; Araújo; Maróstica Junior, 2022).

Essas características tornam o Cerrado um dos principais biomas com potencial para oferecer recursos que podem ser aplicados em medicamentos, alimentos e cosméticos, além de fornecer matrizes complexas interessantes para pesquisas que buscam caracterizar e quantificar os componentes ativos dessas matrizes (Arruda; Araújo; Maróstica Junior, 2022).

Reforçando a tendência de descobrimento de novos recursos está a necessidade de se encontrar/desenvolver novos antimicrobianos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a resistência a antimicrobianos um problema de saúde pública global (OMS, 2020). Este problema surge de forma espontânea nos microrganismos, que devido a alterações genéticas acabam por criar mecanismos de resistência às drogas antimicrobianas. Contudo, algumas situações colaboram para o aparecimento de resistência, como o uso excessivo de antimicrobianos (OMS, 2021).

Ainda, existe uma tendência em curso de consumidores priorizando a substituição de aditivos sintéticos por naturais, considerados mais saudáveis.

Assim, diversas pesquisas científicas vêm atuando sobre plantas medicinais e seus princípios ativos para o desenvolvimento de futuros fármacos (Pisoschi *et al.*, 2018). Este trabalho busca colaborar para o conhecimento de compostos antimicrobianos em frutos nativos do Cerrado brasileiro e sua atividade *in vitro* contra bactérias de interesse na tecnologia de alimentos.

4.1. Microrganismos e segurança do alimento

A presença não intencional de fungos (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e outros), bactérias (*E. coli*, *Salmonella* spp., *C. botulinum* e muitas outras) e/ou suas toxinas em alimentos é uma preocupação que aflige toda a cadeia alimentícia, uma vez que estes microrganismos podem provocar desde alterações sensoriais indesejáveis no produto, deteriorando-o, a doenças nos consumidores. Estas, chamadas “doenças transmitidas por alimentos” (DTA), podem evoluir para formas graves e letais (Brasil, 2010; Machado; Bruno, 2022). Assim, estes microrganismos acabam por colaborar para o desperdício de alimentos e ocorrência de graves problemas sanitários (Machado; Bruno, 2022).

As DTAs englobam enfermidades causadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados por bactérias, toxinas produzidas por bactérias, fungos, parasitas (protozoários e helmintos), vírus, ou, ainda, por substâncias tóxicas, como agrotóxicos, metais pesados, plantas e animais tóxicos. Trata-se de um nome genérico para patologias com este modo de transmissão, podendo se manifestarem em diferentes órgãos e sistemas, com sintomas que vão muito além de desconfortos gastrointestinais – a depender do agente etiológico envolvido, podem manifestar-se nos rins, fígado, sistema nervoso central, meninge, entre outros, além dos tradicionais vômito e diarreia (Brasil, 2010). Desta forma, a segurança do alimento deve ser uma preocupação permanente.

Apesar da recorrência e gravidade das DTA, seu perfil epidemiológico ainda é pouco conhecido no Brasil. Estudos apontam que poucos municípios fazem a correta notificação e investigação de casos ou surtos desse tipo de doença, resultando em poucos dados compilados a nível nacional (Brasil, 2010). Com as estatísticas disponíveis, sabe-se que alimentos de origem animal e os preparados para consumo coletivo são os grandes responsáveis por surtos de DTA no país. Os agentes etiológicos mais frequentes são bactérias, sendo *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp, *Bacillus*

cereus e *Clostridium perfringens* os mais recorrentes. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 724 de 1º de julho de 2022 (Brasil, 2022) dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos.

4.1.1. *Staphylococcus aureus*

Pertencente à família *Staphylococcaceae*, *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos e que se apresenta na forma de cocos agrupados em pares, cadeias ou no formato de cacho de uva. Sua patogenicidade e virulência pode se dar por diversos fatores, como a presença de enzimas coagulases, hemolisinas e fosfatases (Forsythe, 2013).

Pode fazer parte da microbiota natural de indivíduos saudáveis, sendo encontrado na pele, trato respiratório superior (cavidades oral e nasal, laringe e faringe) e trato gastrointestinal. Conforme explicado por Madigan *et al.* (2016), a convivência com esse patógeno ocorre sem o desenvolvimento de enfermidades, provavelmente devido às competições por nutrientes e metabólitos que ocorrem com outros microrganismos presentes, em que estes são mais bem sucedidos.

Patógeno oportunista é responsável por pneumonias, infecções sanguíneas, infecções hospitalares, feridas com pus e furúnculos. Presente em alimentos, pode causar poderosa intoxicação alimentar nos consumidores, uma vez que é produtor de toxinas (Madigan *et al.*, 2016).

Estas são produzidas quando a bactéria está em contagem suficiente (a partir de 10^5 microrganismos/grama de alimento). As toxinas são resistentes ao calor (portanto, ao cozimento realizado no preparo dos alimentos) e à ação de proteólises no trato intestinal. O indivíduo com intoxicação por *S. aureus* apresentará os sintomas pouquíssimo tempo após a ingestão do alimento contaminado (1 a 7 horas), com sintomas de náuseas, vômitos e cólicas abdominais e diarreia. Já suas células vegetativas são eliminadas com tratamento térmico de poucos minutos; a bactéria não é boa competidora contra outras bactérias, é tolerante ao sal (halotolerante) e a secagem (Forsythe, 2013).

Além de ser encontrado no homem e em animais, também é proveniente do solo, água, plantas e superfícies, e ar. A maioria dos microrganismos dificilmente sobrevive suspenso no ar, devido sua condição seca; porém, a

parede celular mais espessa e rígida das bactérias Gram-positivas (como *S. aureus*) o protege do dessecação, permanecendo vivo na poeira (Madigan *et al.*, 2016).

Uma vez que seres humanos saudáveis podem ser reservatórios de *S. aureus*, esta bactéria cresce de forma aeróbia ou anaeróbia nos alimentos e produz toxinas termoestáveis, é essencial boas práticas de fabricação e correto armazenamento dos alimentos para evitar contaminação (Forsythe, 2013).

4.1.2. *Escherichia coli*

Tendo como habitat o intestino de animais de sangue quente, incluindo o ser humano, *Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* (Doyle; Buchanan, 2013) e ao grupo dos coliformes. Este é um termo geral para designar bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, no formato de bastonetes e fermentadoras de lactose com produção de ácido e gás quando incubadas a 35 °C por 48 horas (Forsythe, 2013).

Nem todos os coliformes são de origem intestinal (origem entérica), uma vez que algumas espécies têm como habitat o ambiente (exemplo: *Serratia* spp, *Aeromonas* spp.). A presença de *E. coli*, no entanto, aponta para contaminação com conteúdo intestinal, sendo um indicador das condições higiênico-sanitárias a que o alimento foi submetido. Ainda, é um ponto de atenção, pois representa possível presença de outros patógenos entéricos (e que não são coliformes), como *V. cholera*, *Salmonella*, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter jejuni* e o protozoário *Giardia lamblia* (Forsythe, 2013).

A maioria das linhagens de *E. coli* é inofensiva, porém muitas são patogênicas (Doyle; Buchanan, 2013). Algumas também produzem potentes enterotoxinas, como a *E. coli* O157:H7, produtora de toxina Shiga. Os sintomas de *E. coli* patogênica são muito graves, oferecendo risco de vida (Madigan *et al.*, 2016). Os sintomas dependem do fator de virulência da linhagem, mas comumente necessitam hospitalização, e incluem diarreia sanguinolenta ou não-sanguinolenta, insuficiência renal, sepse neonatal, meningite e até evoluir para morte (Doyle; Buchanan, 2013, Madigan *et al.*, 2016).

Em 1993, nos Estados Unidos, mais de 700 pessoas se contaminaram com *E. coli* O157:H7 advinda de hambúrgueres de uma rede de *fast food*, cozidos a apenas 60 °C. Quatro pessoas morreram, todas crianças. Este

episódio fez com que as medidas para controle microbiológico em alimentos fossem revistas e reforçadas não só neste país, mas no mundo todo (Soares, 2013).

Sensíveis ao calor, o cozimento superior a 70 °C é suficiente para prevenir *E. coli* patogênica de qualquer tipo, além de ser necessário higienizar alimentos crus e ingerir apenas água tratada (Madigan *et al.*, 2016).

4.1.3. *Salmonella enteritidis*

O gênero *Salmonella* corresponde a bastonetes Gram-negativos, com motilidade, aeróbios facultativos. Habitam o intestino de animais homeotérmicos e heterotérmicos. Também integra a família *Enterobacteriaceae* e é de origem entérica, porém não participa do grupo dos coliformes, uma vez que não fermenta lactose. Em oposição a *E. coli*, quase todas as espécies de *Salmonella* são patogênicas (Forsythe, 2013; Madigan *et al.*, 2013).

Carne de aves e seus ovos são reservatórios mais importantes de *Salmonella* do que outras carnes (Doyle; Buchanan, 2013). No entanto, o hospedeiro e as enfermidades causadas diferem de acordo com a espécie e os sorovares (variantes sorológicas) de *Salmonella* (Forsythe, 2013). Conforme Doyle; Buchanan (2013), *Salmonella enteritidis* é um sorovar primariamente relacionado a ovos de frango. Esta bactéria, habitante entérica, consegue migrar e colonizar o ovário de galinhas (infecção transovariana), infectando os ovos antes mesmo da formação da casca protetora; o ovo passar a estar contaminado, e se fecundado, originará uma carcaça também contaminada.

Os sintomas de salmoneloses, como demais gastroenterites incluem diarreia, dor abdominal, náuseas e febre branda (Madigan *et al.*, 2016). Já a febre tifoide, causada pela *Salmonella enterica sorotipo typhi*, induz a febre alta, diarreia, mal-estar geral, tosse, aumento do baço, tosse, conforme indicação do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, s.d.).

A pessoa infectada excretará a bactéria pelas fezes mesmo após o período de manifestação da doença, e por este motivo, deve se manter afastada da manipulação de alimentos, sob risco de contaminação. Algumas pessoas podem ser portadores crônicos de *Salmonella*, sem manifestarem sintomas, mas eliminando a bactéria continuamente em suas fezes (Madigan *et al.*, 2016).

4.1.4. *Bacillus cereus*

Bactéria Gram-positiva, em forma de bastonete, aeróbia facultativa (Forsythe, 2013). Anatomicamente, *Bacillus cereus* se apresenta como colônias grandes, brancas e difusas (Madigan *et al.*, 2016).

Esta bactéria é capaz de formar esporos, que produzem toxinas após germinados. Assim como ocorre com *S. aureus*, a cocção mata as células vegetativas, mas é inofensiva sobre a toxina, termoestável. O endósporo, também estável, pode sobreviver ao tratamento térmico (Madigan *et al.*, 2016).

Na síndrome emética - uma intoxicação alimentar - a toxina está preformada no alimento e é ingerida pelo consumidor, que terá como principal sintoma o vômito, podendo ou não ocorrer diarreia aquosa. Já na toxinfecção, o alimento é consumido com elevada população da bactéria, que produzirá a toxina no intestino delgado da pessoa, causando a chamada síndrome diarreica. A principal enfermidade se manifestará como diarreia aquosa e dores abdominais. Esta toxina já é mais sensível ao tratamento térmico (Forsythe, 2013) – embora isto pouco importe, uma vez que sua produção ocorre *in vivo*.

Além disso, os esporos se aderem a superfícies, resistindo a limpeza e desinfecção, o que dificulta a eliminação dessa bactéria dos equipamentos, com consequente contaminação cruzada dos alimentos em contato (Doyle; Buchanan, 2013).

B. cereus faz parte das bactérias saprófitas encontradas no solo e por isso é facilmente encontrado em alimentos vegetais ou originários destes, mas também frequentemente são apontados em carnes, ovos e lácteos (Doyle; Buchanan, 2013). Possui preferência por alimentos ricos em amido (como o arroz) e ricos em açúcares (Madigan *et al.*, 2016), como também por alimentos cozidos e resfriados em temperatura ambiente. Isto ocorre uma vez que a microbiota natural (e competidora) é eliminada pelo calor, o que não ocorre com os esporos de *B. cereus* (Forsythe, 2013).

4.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Alimentos deteriorados tornam-se inaceitáveis para o consumo humano, uma vez que seu sabor, odor e aroma são desagradáveis. Diversos fatores podem estar relacionados com o efeito da deterioração, como a atividade de enzimas da própria matriz, ação de insetos, crescimento de microrganismos,

entre outros. Alguns microrganismos (fungos e bactérias) são apenas deteriorantes, sem causar doenças nos consumidores, como ocorre com *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acetobacter* e *Pediococcus* (Forsythe, 2013).

No entanto, apesar de inofensiva quando consumida, o gênero *Pseudomonas* é considerado oportunista, podendo causar diversas enfermidades, como infecções pulmonares graves, septicemia, pneumonia nosocomial e infecções hospitalares (Madigan *et al.*, 2016).

Assim como define Madigan *et al.* (2016), *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bacilo, com flagelo motor único, aeróbio obrigatório. Diferentemente das quatro bactérias deste estudo, todas mesófilas, *Pseudomonas* tem seu desenvolvimento ótimo em temperatura de refrigeração, sendo, portanto, psicotrófica.

Presente no solo, faz parte das bactérias desnitrificantes - benéficas para as lavouras - que produzem N_2O , mas também se encontra em água (Madigan *et al.*, 2016). É responsável pela deterioração de carne fresca de bovinos, peixes e aves, vegetais, leite e produtos lácteos (Doyle; Buchanan, 2013). Por este motivo, garante importantes perdas econômicas com o descarte de alimentos deteriorados.

4.2. Ação antimicrobiana de matrizes vegetais

De acordo com a Instrução Normativa nº 211 (BRASIL, 2023), conservante (ou conservador) está no grupo de aditivos alimentares e é definido como “substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas”. Embora a mesma legislação estabeleça limites máximos de uso e tipos autorizados de aditivo para que o consumo seja seguro, conservantes sintéticos são associados com efeitos colaterais indesejáveis, como reações alérgicas (sulfitos) e efeito carcinogênico (antioxidantes fenólicos sintéticos, como BHA e BHT) (Pisoschi *et al.*, 2018). Estes fatos corroboram para a tendência atual e crescente dos consumidores buscarem alimentos e produtos ditos naturais, com reduzida ou nula composição de aditivos sintéticos. Antimicrobianos naturais podem ser derivados do metabolismo de microrganismos (bacteriocinas), proteínas e enzimas animais (lisozima) ou plantas (diversos metabólitos secundários) (Carocho; Morales; Ferreira, 2015)

Vale ressaltar que o reino vegetal é empregado há milênios com finalidade de estabilidade microbiológica. Conforme ressaltou Kinupp, biólogo criador da sigla “PANC” (Plantas Alimentícias Não Convencionais), os vegetais possuem um amplo potencial de aplicação não somente para fins alimentícios, mas também com finalidade técnica. Por toda sua extensão, como raízes, caules, folhas, frutos, sementes e flores, existe uma variedade de compostos biologicamente ativos que podem ser de interesse aos seres humanos, como substâncias com ação inibitória sobre fungos e bactérias, além de muitos outros, como ação antioxidante, antiinflamatória e anestésica (Kinupp, 2007). Desta forma, as matrizes naturais tornam-se uma rica fonte de pesquisa para potenciais aplicações em diversos ramos como no desenvolvimento de cosméticos, defensivos agrícolas e alimentos (Vizzoto; Krolow; Weber, 2010). Além de eficientes contra microrganismos patogênicos, os compostos fitoquímicos também costumam se mostrar menos tóxicos do que os antibióticos existentes (Tsamo *et al.*, 2021).

As substâncias químicas utilizadas nessas indústrias e pesquisas normalmente correspondem a componentes orgânicos isolados do metabolismo secundário da matriz vegetal (Vizzoto; Krolow; Weber, 2010), a saber: compostos fenólicos, como taninos, flavonoides e cumarinas (Lima Neto *et al.*, 2015); compostos contendo nitrogênio, exemplo alcaloides, glicosídeos cianogênicos; e terpenos, como isoprenoides. O reino vegetal conta com cerca de 100 mil metabólitos secundários (Li *et al.*, 2020).

Estes metabólitos participam do grande grupo de compostos bioativos, que desempenham funções biológicas nos organismos vivos, mas sem a função de nutrir. Estes compostos podem exercer atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, inseticida, hepatoprotetora (Nieto; Ros; Castillo, 2018), anticâncer, antidiabetes, proteção cardiovascular (Carvalho; Conti Junior, 2021), entre outras.

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*, L.) é uma erva utilizada como tempero e também com propriedades medicinais. Nieto, Ros, Castillo (2018) reportam atividade do seu óleo essencial contra *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesuis*. Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pelas propriedades bioativas do alecrim.

A família *Alliaceae* reúne vegetais com conhecida atividade antimicrobiana: alho (*Allium cepa*), cebola (*Allium sativum*), alho-poró (*Allium porrum*) e cebolinha (*Allium schoenoprasum*). Os compostos organossulfurados, como dialil sulfito, dialil trissulfito, alicina, ajoene, entre outros, são os principais responsáveis por essa capacidade, em que o maior número de átomos de enxofre confere maior capacidade antimicrobiana (Bastaki *et al.*, 2021).

Conhecendo a atividade dos compostos, as pesquisas podem se desdobrar em aplicações com promissores resultados. Farag *et al.* (2022) ministraram cápsulas de alho em pó para tratar coelhos infectados com *Escherichia coli* sorotipo O55:H77 e concluíram que o tratamento foi tão efetivo quanto o promovido pelo antibiótico florfenicol. Cruz *et al.* (2016) estudaram o efeito de extratos metanólico e hexânico de folhas frescas de cebolas contra *S. aureus* e *E. coli*, além de testarem a combinação dos extratos com os antibióticos comerciais amicacina e gentamicina. A associação do extrato metanólico de cebola com os antibióticos resultou em uma concentração inibitória mínima (CIM) maior do que a observada com os compostos isolados, constatando a perda de eficácia das soluções contra os microrganismos. Os autores esclareceram que, em combinações, os princípios ativos podem se potencializar, criando um efeito sinérgico com melhora no tratamento, mas também se cria um efeito antagonista, em que um antimicrobiano tem sua ação diminuída devido à ação do outro; esse resultado pode ser explicado pela ação quelante promovida pelos compostos presentes, que acaba por diminuir o efeito de um sobre o outro.

Os compostos antimicrobianos podem também ser empregados em matrizes alimentícias. Atrib (2021) aplicou óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) a uma cobertura comestível de amido sobre filés de peixe a fim de avaliar a atividade contra *Vibrio parahaemolyticus*. A cobertura incorporada do óleo essencial mostrou efeito inibitório contra a bactéria, melhorando a segurança do alimento e sua vida de prateleira.

4.3. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos formam uma classe de metabólitos secundários com mais de 50.000 moléculas identificadas (Ávila-Roman *et al.*, 2021). São encontrados em algas, plantas (raízes, sementes, frutas, castanhas, folhas, legumes) e derivados, como vinhos e chás. Fazem parte do sistema de defesa

dos vegetais contra radiação ultravioleta, patógenos e predadores, e também contribuem para suas propriedades sensoriais, como coloração e sabor (Alara; Abdurahman; Ukaegbu, 2021).

São importantes para a dieta humana, em que está comprovado o consumo de alimentos ricos em polifenóis ao menor risco de se desenvolver doenças crônicas. Possuem ação antioxidante, anticâncer, antidiabetes, antitrombótica, proteção cardiovascular, neurodegenerativa e outros benefícios (Cardona *et al.*, 2013). Os compostos fenólicos também são um bom ingrediente em produtos alimentícios, especialmente por sua atividade antioxidante e antimicrobiana (Alara; Abdurahman; Ukaegbu, 2021). Desta forma, a soma de suas propriedades tecnológicas ao benefício promovido na saúde dos consumidores faz destes compostos bioativos importantes ingredientes para a indústria alimentícia moderna (Delfanian; Sahari, 2020).

A estrutura química de qualquer composto fenólico deve conter pelo menos uma porção fenólica, em que um “fenol” se trata de um hidroxibenzeno - anel benzeno ligado a uma hidroxila (Figura 1). Eles podem ser classificados como simples ou como polifenóis, sendo os “simples” apresentando uma única unidade de fenol (Mamari, 2021).

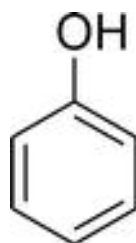


Figura 1. Estrutura química de um hidroxibenzeno, também chamado de fenol.
Fonte: Mamari, 2021.

Já os polifenóis são divididos em flavonoides e não-flavonoides, com base no número de anéis fenólicos e tipo de grupos substituídos de sua estrutura. A diferenciação estrutural se aprofunda e são criadas outras subclasses dentro destas (flavanonas, flavonas, flavonóis e outras) (Cardona, 2013).

A Figura 2 apresenta a divisão de grupos, subgrupos e exemplos de compostos fenólicos.

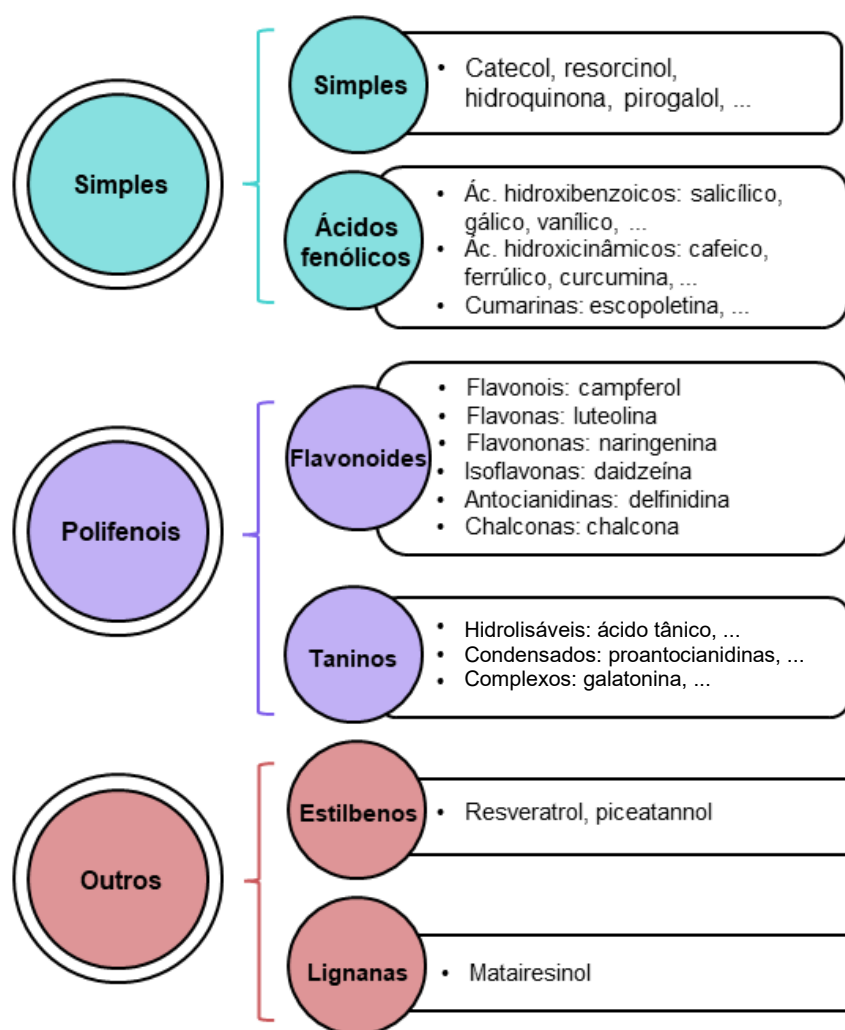


Figura 2. Classificação dos compostos fenólicos e alguns exemplos.
Fonte: Adaptado de Mamari, 2021.

Este trabalho discutirá, principalmente, o efeito antibacteriano promovido por taninos encontrados nas cascas de barbatimão.

Taninos são polifenóis. Os hidrolisáveis podem sofrer lise (como o nome sugere) por ácido, álcali ou enzima, retornando em monômeros de éster de ácido fenólico e polióis. Já os condensados se formam por ligações de carbono entre flavan-3-óis, o que os tornam resistentes a hidrólise ácida; são mais abundantes na natureza do que o primeiro grupo (Farha *et al.*, 2020). Os complexos são formados por ligações entre hidrolisáveis e condensados (Molino; Francino; Henares, 2023).

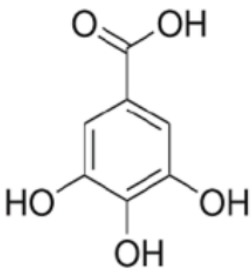
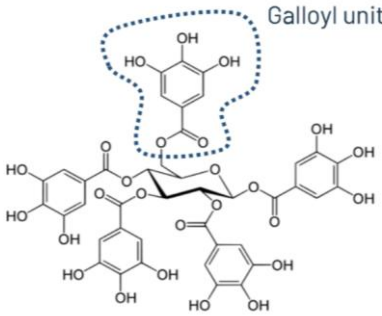
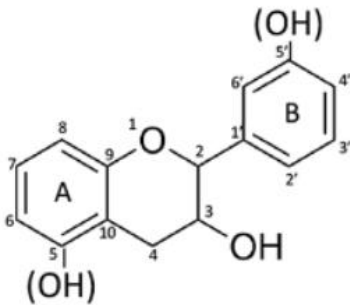
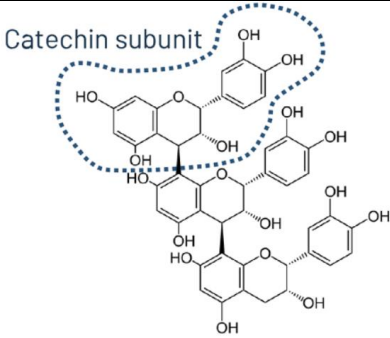
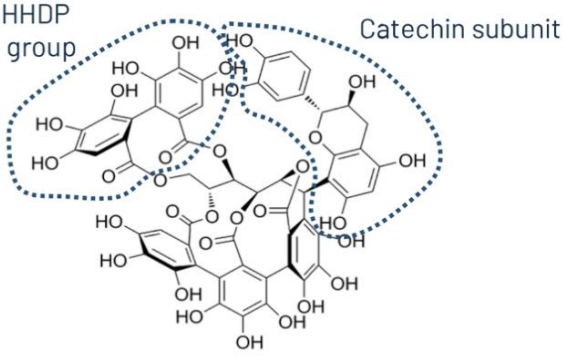
Grupo	Estrutura básica	Exemplo
Hidrolisável	 Ácido gálico	 Pentagaloil glicose
Condensado	 Monoflavonoide	 Procianidina
Complexo	(União de hidrolisáveis e condensados)	 Acutissimina A

Figura 3. Estrutura de alguns taninos.
 Fonte: Molino; Francino; Henares, 2023.

A composição química dos taninos lhes confere atividade bactericida e/ou bacteriostática sobre fungos e bactérias. Farha *et al.* (2020), em uma excelente revisão sobre o efeito antibacteriano de taninos, apontam que o grupo pode agir por diversos mecanismos de ação, demonstrando efeito antibacteriano e antivirulento.

Nos microrganismos, estes polifenóis desempenham papel sobre: quelação de ferro, inibição da síntese da parede celular, danos a membrana

celular e parede externa e inibição da síntese de ácidos graxos; podem também atenuar a expressão de genes responsáveis por fatores de virulência, inibindo a formação de biofilmes, enzimas, adesinas, toxinas e estruturas de motilidade. Assim, os taninos se tornam uma alternativa para antibióticos convencionais aplicados em indústrias (como alimentícia). Ao seu favor, também estão os fatos de serem provenientes de fontes vegetais, com disponibilidade farta, facilmente extraídos, de baixo custo e baixa toxicidade em humanos (Farha *et al.*, 2020).

4.3.1. Atividade antioxidante

Espécies reativas ao oxigênio, também chamadas de radicais livres, são formadas naturalmente durante reações metabólicas de organismos aeróbios – por exemplo, durante a cadeia de transporte de elétrons para a produção de energia nas mitocôndrias, e por inflamações – e também produzidas por estímulos exógenos, como exposição à radiação ultravioleta, uso de medicamentos, cigarro e tipo de dieta (Constantinescu; Mihis, 2023; Bianchi; Antunes, 1999). Tratam-se de moléculas com um par de elétrons desemparelhado e por isso energeticamente instáveis e muito reativa (Bianchi; Antunes, 1999).

Uma quantidade balanceada de radicais livres é essencial para o correto funcionamento do organismo. Seu desequilíbrio provoca o chamado estresse oxidativo, que a longo prazo provoca danos graves às células (levando-as até a morte) e moléculas de DNA, hormônios e macronutrientes, com consequente prejuízo para tecidos e órgãos (Singh, 2024). Isso pode desencadear doenças crônicas como diabetes, problemas renais, de pulmões e cardiovasculares. Antioxidantes tem, portanto, o efeito de prevenir os efeitos dos radicais livres (Constantinescu; Mihis, 2023)

Além do efeito fisiológico, antioxidantes têm funções técnicas nas indústrias de alimentos e farmacêutica, pois previnem ou retardam a oxidação dos lipídeos (indesejável pelas alterações sensoriais negativas). Sua adição vem sendo especialmente necessária devido à tendência de se substituir gorduras hidrogenadas por poliinsaturadas (mais saudáveis e mais instáveis) (Baines; Seal, 2012).

Entre os antioxidantes encontrados na natureza, listam-se 4 grandes grupos: polifenóis (taninos, flavonoides, outros), vitaminas (C e E), carotenoides

e tocoferóis (Carocho; Morales; Ferreira, 2015), agindo isoladamente ou em sinergismo.

Os compostos fenólicos são os principais agentes antioxidantes encontrados nos vegetais. Sua atividade antioxidante ocorre devido às propriedades redox, fazendo com que estes elementos funcionem como agentes redutores, doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio singlete, além de quelante de metais (Dutra; Leite; Barbosa, 2008).

A atividade antioxidante por ocorrer por 5 mecanismos de ação, conforme detalhado por Jorge (2009) e Baines, Seal (2012):

1) Primários: se ligam aos radicais livres, doando hidrogênio ou elétron, formando moléculas estáveis e impedindo a reação em cadeia de formação de mais radicais. Compostos fenólicos exercem essa ação.

2) Agentes quelantes: metais são catalisadores da oxidação lipídica. Os antioxidantes desse grupo se complexam com metais (cobre e ferro), impedindo-os de iniciar a formação de radicais. Ácido cítrico e fosfórico são agentes quelantes.

3) Supressores: tornam inativas espécies oxidantes, como oxigênio singlete. Carotenoides e fenólicos são exemplos de supressores.

4) Sequestradores de oxigênio: capturam o oxigênio do meio, por meio de ligações químicas, tornando-o indisponível para iniciar a oxidação. Ácido ascórbico possui essa função.

5) Regeneradores de antioxidantes primários: regeneram os antioxidantes primários que formaram radicais ao doar hidrogênio ou elétron, reduzindo-os. Exemplo: ácido ascórbico.

A maioria dos antioxidantes trabalha pela via de transferência de átomo de hidrogênio ou de doação de elétron e como agente quelante (Neri-Neruma *et al.*, 2020).

4.4. O Cerrado

Um bioma se caracteriza por um espaço que sofreu o mesmo processo de formação de sua paisagem, e por isso possui flora, fauna, clima e geologia semelhantes. O Brasil possui seis biomas: Amazônia, Pantanal, Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado e Pampa (IBGE, 2023), distribuídos conforme a Figura 4.

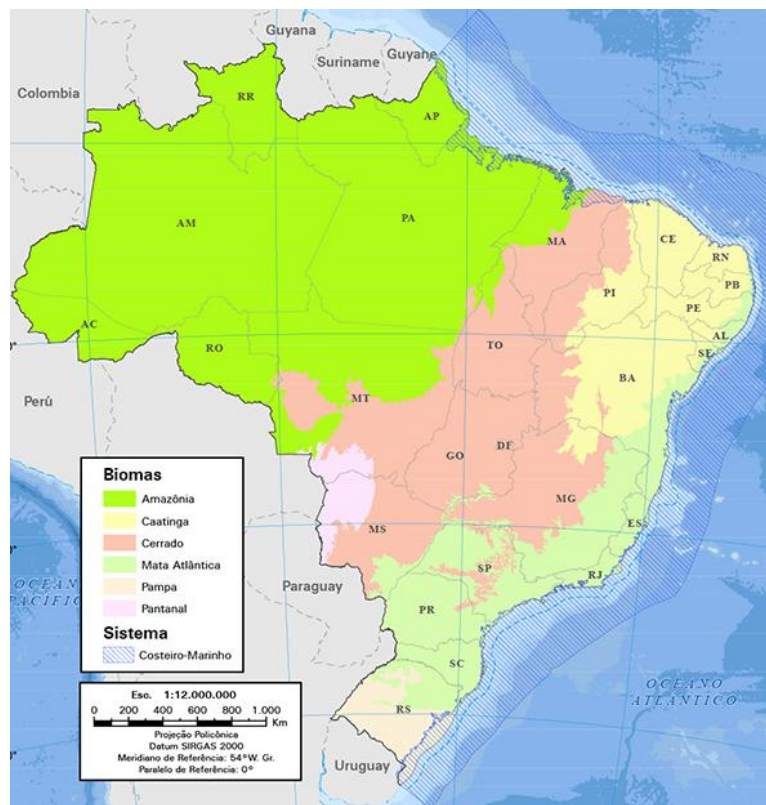


Figura 4. Biomas brasileiros.
Fonte: IBGE, 2023.

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil (e também da América do Sul), perdendo em tamanho apenas para a Amazônia. Ele se estende principalmente pelo Planalto Central Brasileiro, ocupando próximo de 25% do país nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Distrito Federal, Maranhão, Piauí, e ainda, estado de São Paulo (ICMBio, s.d.). Este bioma, também chamado de Savana brasileira, é tido como a Savana mais rica do planeta em biodiversidade. Porém, com a mudança da nova Capital Federal para a região central do Brasil e pela importância que o local adquiriu a partir da década de 1960, o Cerrado foi brutalmente devastado, devido ao garimpo e, principalmente, atividades da agricultura e pecuária, que se tornaram uma ameaça à biodiversidade do ecossistema (IBGE, 2023).

Sua vida animal e vegetal nativa foram substituídas pelas monoculturas, campos de pecuária, estradas e cidades, tornando a região uma grande produtora de carne e grãos. Cerca de 66% do bioma está comprometido com essas atividades econômicas (Campos, 2020). O grave impacto ambiental

promovido por essas atividades tornam o Cerrado o segundo bioma brasileiro mais devastado, atrás da Mata Atlântica (IBGE, 2023).

A vegetação do Cerrado não é caracterizada por uma única fisionomia: é composta por árvores baixas e tortuosas e grande quantidade de gramíneas, mas também possui plantas rasteiras, arbustos pequenos e árvores maiores (Guarlado, 2023).

Sua vegetação endêmica evoluiu para suportar um ambiente ríspido, representado por um solo escasso em nutrientes, forte incidência de radiação ultravioleta, altas temperaturas, períodos prolongados de seca durante o ano, alternando com períodos de alta precipitação, além de episódios recorrentes de incêndios (Reis; Schmiele, 2019). Devido a essas condições extremas, somado à necessidade de defesa de insetos e microrganismos patogênicos, as plantas nativas desenvolveram mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo causado pelas condições do bioma. As adaptações desenvolvidas envolvem a presença de compostos bioativos, com destaque para os compostos fenólicos, e maior atividade de enzimas antioxidantes (Arruda; Araújo; Maróstica Junior, 2022).

Assim, essas características tornam a vegetação endêmica do Cerrado com potencial para aplicação em medicamentos, alimentos e cosméticos, além de interessante para pesquisas que buscam caracterizar e quantificar os componentes ativos dessas matrizes.

4.4.1. Frutos do Cerrado e sua ação antimicrobiana

Em janeiro de 2024, fez-se uma busca nas bases de dados *Science Direct* e *Web of Science* sobre os frutos nativos do Cerrado utilizados neste projeto: barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), jenipapo (*Genipa americana*) e sucupira (*Pterodon*). Para fins de comparação, também se fez a pesquisa sobre as especiarias orégano (*Origanum vulgare*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*). O resultado é apontado na Tabela 1; trata-se do número total de trabalhos retornados, sem qualquer refinamento.

Para tornar as buscas mais exatas, foram utilizados os termos entre aspas e o operador booleano “and”.

Tabela 1. Número de resultados apontados em duas importantes bases de dados.

Termo pesquisado	Base de dados	
	<i>Web of Science</i>	<i>ScienceDirect</i>
<i>"Stryphnodendron adstringens"</i>	167	193
<i>"Stryphnodendron adstringens"</i> and <i>"antimicrobial"</i>	32	76
<i>"Genipa americana"</i>	187	444
<i>"Genipa americana"</i> and <i>"antimicrobial"</i>	3	93
<i>"Pterodon"</i>	199	283
<i>"Pterodon"</i> and <i>"antimicrobial"</i>	17	80
<i>"Origanum vulgare"</i>	2151	3535
<i>"Origanum vulgare"</i> and <i>"antimicrobial"</i>	701	2045
<i>"Rosmarinus officinalis"</i>	3632	6067
<i>"Rosmarinus officinalis"</i> and <i>"antimicrobial"</i>	752	2465

Estes resultados expõe a escassez de pesquisas sobre as matrizes vegetais adotadas, uma vez que foram reportadas poucas centenas de trabalhos considerando o tema, ao passo que são encontrados milhares de trabalhos sobre outras matrizes, como orégano e alecrim. Sabe-se que estas especiarias são consumidas mundialmente, o que naturalmente alavanca as pesquisas científicas sobre elas, enquanto barbatimão, jenipapo e sucupira estão restritos a América do Sul. No entanto, pesquisas que apontem propriedades interessantes das três matrizes selecionadas e aplicações pode incentivar novos trabalhos, na intenção de corroborar ou acrescentar aos (poucos) existentes.

Deste modo, a indagação “por que este projeto com plantas do Cerrado é importante?” recebe as seguintes respostas:

- Valoriza vegetais nativos de um bioma explorado negativamente (por desmatamento), evidenciando a potência de recursos contidos em sua flora.
- Averigua algumas propriedades atribuídas pelo conhecimento popular.
- Existem poucos estudos sobre os vegetais escolhidos.
- Está em alta a procura de compostos bioativos, assim como por novos antimicrobianos.

4.4.1.1. Barbatimão

O gênero de plantas “*Stryphnodendron*” é nativo do Cerrado brasileiro (Souza; Mello; Lopes, 2011). Um de seus representantes, a espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville é conhecida popularmente como barbatimão, barba-de-timão, casca-da-virgindade ou faveira (Sistema de Informação Sobre a Biodiversidade Brasileira, s.d.).

Trata-se de uma árvore pequena, com 4 a 5 metros de altura, de tronco grosso e casca espessa e com fenda. Possui inflorescência cilíndrica e axilar, do tipo espiga, com aproximadamente 100 flores de corola creme-esverdeada. Conta com fruto em formato de vagem e sementes castanho avermelhadas (Sistema de Informação Sobre a Biodiversidade Brasileira, s.d) consideradas tóxicas (Lameira *et al.*, 2022).

Seu uso na medicina tradicional tem por fonte os indígenas, que utilizavam o vegetal principalmente como cicatrizante e anti-inflamatório (Souza; Mello; Lopes, 2011). Suas cascas (do caule e ramos) são as partes aproveitadas, geralmente na produção de extrato por decocção; este pode ser utilizado desta forma ou para produção de pomadas, conforme instruído pela Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2021).

Ao barbatimão são atribuídas funções de cicatrizante, anti-inflamatório, antisséptico, tratamento de doenças de pele, infecções em geral, melhora de diarreia e dor de barriga. O extrato obtido por decocção é utilizado em banhos de assento para problemas ginecológicos, como ferimentos, inflamações e corrimentos (Lameira *et al.*, 2022). Também é empregado no tratamento de infecções cutâneas por fungo, úlceras e frieiras. É coagulante, adstringente, diurético. (Souza; Mello; Lopes, 2011). Não pode ser utilizada junto com plantas ricas em alcaloides (exemplo, boldo - *Peumus boldus* Molina - e quebra-pedra -

Phyllanthus niruri L.) pois são incompatíveis, formando sais insolúveis (Brasil, 2021).

A Figura 5 apresenta partes do barbatimão.

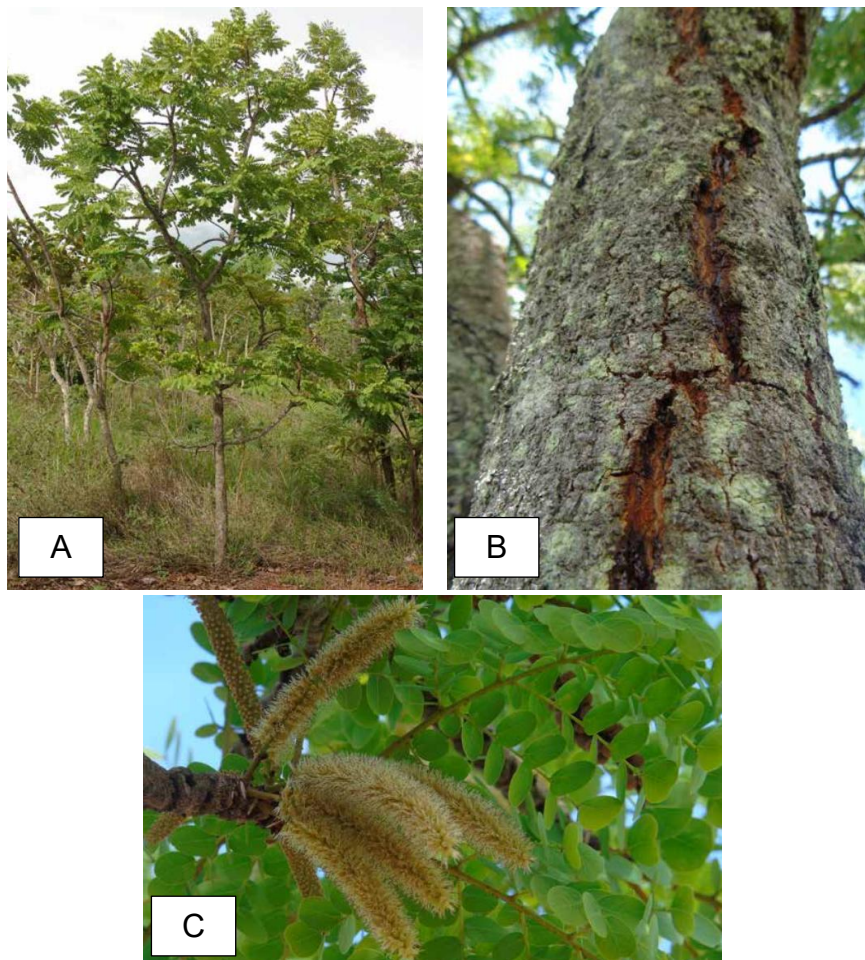


Figura 5. A: árvore de *Stryphnodendron adstringens*; B: destaque para seu tronco de casca fendida; C: folhas e inflorescência.

Fonte: Julceia Camillo, citado por Lameira et al., 2022.

Seu metabólito secundário mais abundante pertence à classe de taninos, com sua casca sendo formada em 20 a 30% por este composto e o principal responsável pelas propriedades farmacológicas da droga vegetal (Lameira et al., 2022). Ácidos fenólicos e flavonoides fecham o grupo dos constituintes mais identificados em extratos de *S. adstringens* (Ribeiro et al., 2022). Amido, matérias resinosas, mucilaginosas, corante vermelho e ácido tânico também compõe a casca (Lameira et al., 2022). Galactomananas, saponinas e proantocianidinas também são encontrados (Souza; Mello; Lopes, 2011).

As cascas são obtidas de forma extrativista. Sua retirada deve respeitar condições adequadas para não agredir a planta, como correta distância do solo, espessura, por períodos de tempo espaçado (extrativismo sustentável) (Lameira *et al.*, 2022).

O barbatimão é importante na indústria cosmética, de corantes e taninos. É utilizado na produção de fitocosméticos, como adstringente para peles oleosas. De sua casca também se aproveita tinta vermelha e de seus frutos, também ricos em taninos, insumo para a indústria de curtume. Sua madeira é resistente e por isso é utilizada na construção civil, com indicação para locais expostos e úmidos (Lameira *et al.*, 2022).

4.4.1.2. Jenipapo

Genipa americana, nome científico do jenipapeiro, é uma planta encontrada do México até o sul da América do Sul e presente em todos os biomas brasileiros, com exceção dos Pampas (Muniz; Silva Júnior, 2009), por se adaptar melhor nas regiões de clima quente. A árvore atinge de 6 a 25 metros de altura, com tronco de casca lisa e coloração cinza-esverdeada. Os frutos, chamados jenipapo (Figura 6), são bagas pardas de 10 a 15 cm de comprimento por 7 a 9 cm de diâmetro, com polpa abundante (Sistema de informação da biodiversidade brasileira, s.d.).



Figura 6. Jenipapos maduros.

Fonte: a autora.

Seu fruto possui polpa macia, de gosto um pouco ácido e sabor marcante e é consumido *in natura* em todo o país, especialmente no Nordeste (Muniz; Silva Júnior, 2009). No entanto, o principal consumo se dá pela produção de bebidas e doces, como licores, compotas e geleias. O fruto verde é utilizado pelos indígenas para extração de um corante azul-escuro para pintura de seus corpos. Sua madeira é tida como de primeira qualidade, elástica e flexível, utilizada na construção civil e naval, marcenaria e outros. Espécie rústica, pouco exigente quanto a qualidade do solo (Carvalho, 2003). Suporta terras alagadas e por esse motivo é utilizada em matas ciliares (Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira, s.d.). Alguns pés frutificam o ano todo, porém, na região de Cerrado é comum frutos de setembro a dezembro (Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira, s.d.) e no estado de São Paulo, de janeiro a março (Carvalho, 2003).

Carvalho (2003) ainda cita que polpa, semente, casca, folhas, caule e raiz são utilizados na medicina popular com alegações variadas de propriedades afrodisíacas, purgativas, antidiarreica, antissifilis, curativo de úlceras e outras.

O estágio de maturação é um fator importante para a composição de compostos bioativos. O fruto verde apresenta os iridoides genipina e geniposídeo, em contrapartida dos frutos maduros, que perdem estes compostos bioativos durante o processo de maturação. Genipina é apresentada com efeito antimicrobiano, anti-inflamatório e anticâncer, e geniposídeo é um regulador de insulina (Náthia-Neves *et al.*, 2017). Estudo aponta a possibilidade de isolar compostos bioativos com propriedade antimicrobiana e aplicá-lo em sanitizantes (Santos; Ramos; Miyagusku, 2017),

4.4.1.3. Sucupira

Sucupira é um nome vulgar para diferentes espécies de árvores da família *Fabaceae*, dos gêneros *Pterodon* e *Bowdichia* (Horto, 2020). A depender da região, a planta pode ser chamada de sucupira, faveiro, sucupira-branca, sucupira-preta, sucupira-roxa, sucupira-verdadeira, sucupira-do-cerrado (Carvalho, 2006) e outros nomes, sem clareza de distinção dos indivíduos.

De acordo com a base de dados *International Plant Names Index*, existem seis espécies de *Pterodon*, enquanto a base “W3 Tropicos” reduz o gênero para três espécies: *P. abruptus*, *P. apparicioi* e *P. emarginatus*, colocando como

sinônimos desta última *P. pubescens* e *P. polygalaeflorus*, enquanto exclui *P. macrophyllus*. Por conseguinte, essa falta de concordância na identificação das plantas gera dúvida na interpretação dos trabalhos, uma vez que não se tem certeza qual a interpretação adotada pelos autores e espécies diferentes podem, na verdade, serem uma única (Rocha, 2006).

Rocha (2006) cita que a espécie *P. emarginatus* pode ter produção de flores roxas e de flores róseas. Já Camillo et al. (2016) atribuíram flores roxas a *P. emarginatus*, esta sendo sinônimo de *P. polygalaeflorus*, e *P. pubescens* com o tipo morfológico róseo. Ambas são denominadas sucupira-branca.

A árvore de sucupira utilizada neste trabalho produz flores rosa claro (Figura 7). Contudo, uma vez que a própria literatura deixa claro sobre a falta de consenso para classificação de *Pterodon* e a matriz vegetal utilizada não foi identificada por um botânico, esta será chamada apenas de *Pterodon spp.*



Figura 7. Árvore de *Pterodon spp.* utilizada no projeto e suas flores.
Fonte: a autora.

Camillo et al. (2016) adotaram *P. emarginatus* e *P. pubescens* como espécies distintas. Para os autores, a segunda é encontrada exclusivamente no Cerrado, enquanto a primeira ocorre neste bioma e suas áreas de transição, em terrenos secos e arenosos. São, portanto, nativas, mas não endêmicas do Brasil, e típicas do bioma Cerrado.

As árvores de sucupira atingem até 15 metros de altura, com tronco de coloração cinza a parda, flores pequenas de 1 cm de diâmetro e 5 pétalas. Os

frutos produzem uma única semente e são secos, achatados, cor bege-marrom, em média com 5 cm e rodeados por uma ala para facilitar sua dispersão com o vento (Figura 8). Possuem um óleo aromático e amargo, aproveitado na medicina popular por suas propriedades farmacológicas (Camillo *et al.*, 2016).



Figura 8. Fruto de sucupira rodeado por sua ala (a esquerda) e sua semente (a direita).

Fonte: a autora.

A planta é utilizada para fins paisagísticos, para produção de mel, e sua madeira, densa e de alta qualidade, é empregada na construção civil e confecção de móveis. A população brasileira aproveita principalmente seus frutos para fins terapêuticos (Carvalho, 2006). O chá dos frutos é utilizado para alívio da dor em reumatismo e artrite. Este efeito antinociceptivo é confirmado cientificamente devido a presença de terpenos (Dutra *et al.*, 2016). Gargarejos são empregados para infecção de garganta (Carvalho, 2006). O óleo é utilizado no tratamento de diabetes e para proteção/profilaxia contra *Schistosoma mansoni* (Camillo *et al.*, 2016). A atividade farmacológica, de forma geral, é atribuída a compostos alcaloides, diterpenos e isoflavonas (Santos *et al.*, 2023). Suas folhas contêm compostos fenólicos (flavonoides, taninos, cumarinas), glicosídeos, saponinas e cardiotônicos. Já o óleo de suas sementes contém, principalmente, diterpetoides, sesquiterpenos e isoflavonas (Mendes *et al.*, 2017).

4.5. Extratos

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2021), extratos são definidos como o preparado obtido de drogas vegetais com o uso de solventes e métodos de extração adequados. Eles podem ter consistência líquida, semissólida ou

sólida e as drogas podem ou não sofrer tratamento prévio, como moagem, desengorduramento e inativação de enzimas.

O processo extrativo consiste em uma operação de transferência de massa dos compostos de interesse de uma matriz para outra (por exemplo, do vegetal para o solvente). A qualidade final do extrato, ou seja, seu rendimento e concentração dos compostos-alvos, é influenciada por muitos parâmetros, como área da amostra (granulometria), polaridade do solvente, temperatura, agitação, tempo de contato, pH da solução (Nascimento *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2022). Ainda, pode-se empregar diferentes métodos extrativos, os quais têm impacto fundamental na extração de compostos bioativos, como infusão, decocção, maceração, digestão, percolação, Soxhlet, uso de ultrassom, uso de fluido supercrítico (Souza; Mello; Lopes, 2011).

Neste trabalho foi utilizada apenas água como solvente extrator. A água é um solvente vantajoso por ser econômico, de fácil acesso, não apresenta problemas ecológicos e não representa problema para consumo humano, como acetona e etanol (Assis *et al.*, 2023).

Ainda, Dutra, Leite e Barbosa (2008) apontam que compostos fenólicos são solúveis em água, uma vez que o líquido e o constituinte são polares. Ainda, os autores prepararam extratos de sucupira com água e com etanol/água em três diferentes proporções (30:70, 50:50 e 70:30, v/v) e constataram que a concentração de flavonoides foi maior no extrato produzido apenas com água.

4.5.1. Infusão

Água em ebulição é adicionada à droga vegetal por um tempo determinado. A fonte de calor é cessada e o recipiente pode ou não ser abafado. Este método é indicado para partes da planta de consistência não tão rígidas, como folhas, flores e frutos, ou quando há interesse em substâncias voláteis (Brasil, 2021).

4.5.2. Decocção

Diferentemente da infusão, neste método a água e a droga vegetal permanecem em ebulição por tempo determinado, sem cessar a fonte de calor. É indicado para as partes mais rígidas da planta, como cascas, caules, raízes, sementes e folhas coriáceas (Brasil, 2021). Esse processo não é indicado

quando se tem interesse em compostos voláteis ou termolábeis. Juntamente com compostos bioativos, acaba por extrair impurezas (Zhang; Lin; Ye, 2018).

4.5.3. Maceração dinâmica

Na maceração, a planta é colocada em contato com o líquido extrator por tempo determinado, sem uso de temperatura (Brasil, 2021). Trata-se de um processo simples, porém mais demorado em relação a infusão e decocção e é indicado para extrair compostos termolábeis (Zhang; Lin; Ye, 2018). Uma variação desta técnica estática é a chamada maceração dinâmica, que inclui agitação do recipiente que contém o extrato em produção (Ribeiro *et al.*, 2022).

4.5.4. Extração assistida por ultrassom

Este método exige o banho de ultrassom ou probe (sonda) como equipamentos específicos. Neste projeto foi utilizado o banho.

No banho de ultrassom, um recipiente (vidraria) contendo a droga vegetal e o solvente é adicionado ao equipamento, que consiste em um pequeno tanque com água. As ondas ultrassônicas se movimentam pela água e não têm contato direto com o sistema planta-solvente (Ribeiro *et al.*, 2022). É indicado para extração de compostos termolábeis (Zhang; Lin; Ye, 2018).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenhado para ser desenvolvido em três etapas distintas e dependentes, a saber:

- 1) Escolha do melhor método de extração.
- 2) Determinação das concentrações inibitória e bactericida mínima.
- 3) Acompanhamento do extrato pelo período de 21 dias.

Os procedimentos para cada situação são apresentados nas seções seguintes.

5.1. Matrizes vegetais e seus derivados

5.1.1. Obtenção das matrizes vegetais

O Quadro 1 sintetiza as formas de coleta e as partes empregadas nos estudos das 3 espécies utilizadas. Para o barbatimão, utilizaram-se as cascas compradas. Os jenipapos foram colhidos e aproveitaram-se polpa e semente. O fruto da sucupira (popularmente confundido com sua semente) foi empregado. Estes foram recolhidos após queda espontânea da árvore.

Quadro 1. Dados sobre coleta e forma de uso das espécies estudadas.

Material vegetal	Local da coleta	Período de coleta	Partes utilizadas	Concentração de extrato preparado
Barbatimão	Casas de produtos naturais em São José do Rio Preto - SP	Setembro, outubro e novembro de 2023	Casca	20%
Jenipapo	Zonas rural e urbana de Pitangueiras - SP	Fevereiro e março de 2024	Polpa e semente	Polpa: 45% Semente: 50%
Sucupira	Zona rural de Pitangueiras - SP	Julho de 2023	Fruto	40%

Importante esclarecer que objetivou-se manter o local de coleta dos materiais vegetais, mas em função da sua sazonalidade, foi necessário se adequar à disponibilidade. Dessa maneira, os jenipapos foram colhidos em três

lugares distintos e as cascas de barbatimão compradas em lojas diferentes. As sucupiras são provenientes da mesma árvore.

5.1.1. Preparo dos extratos

A concentração dos extratos foi inicialmente padronizada em 20% para todas as matrizes, mas após se constatar falta de atividade antibacteriana para os extratos de jenipapo e sucupira, as concentrações foram ajustadas, conforme detalhamento posterior. Cada material vegetal foi manipulado de uma maneira, conforme apresentado.

As cascas de barbatimão (Figura 9) permaneceram armazenadas em embalagem original (plástica) e em temperatura ambiente após sua compra. Foram reduzidas com tesoura de poda e trituradas em liquidificador. Vinte gramas do material triturado foram adicionados em 80 mL de água destilada, resultando na concentração de 20% (p/p).



Figura 9. Cascas de barbatimão.
Fonte: a autora.

Os jenipapos foram colhidos maduros e armazenados em geladeira até o momento de uso. Casca, polpa e semente foram retiradas manualmente com auxílio de uma faca e as cascas foram descartadas.

A polpa foi cortada em cubos padronizados de aproximadamente 5 mm e o excesso de mucilagem aderida a semente foi retirado (Figura 10). Os extratos também foram preparados em água, sendo polpa a 45% e semente, 50%. Estes valores foram definidos por corresponderem ao máximo da proporção “material vegetal:água” capaz de ser acomodado no recipiente (béquer ou Erlenmeyer) utilizado para extração.



Figura 10. Polpa de jenipapo cortada em cubos e suas sementes.
Fonte: a autora.

Já os frutos de sucupira foram mantidos acondicionados em sacos plásticos a temperatura ambiente. As alas foram removidas e os frutos foram divididos em 4 porções com tesoura de poda, sendo um corte ao centro, latitudinal, e outro também ao meio, longitudinal. Utilizou-se o preparo de 40% em água.

Em comum, todos os vegetais foram submetidos a quatro diferentes métodos de extração, sempre em água destilada esterilizada em autoclave:

- a) Infusão por 5 minutos: com uma montagem de tripé e tela de amianto acima de um bico de Bunsen, água (no volume necessário para completar a concentração estipulada) foi aquecida até ebulição. Imediatamente após o início do processo, a chama foi desligada e o material vegetal adicionado. O recipiente (béquer) permaneceu tampado. O tempo foi cronometrado por 5 minutos;
- b) Decocção por 5 minutos: processo semelhante ao de infusão. Difere pelo fato de a chama permanecer acesa durante os 5 minutos após a ebulição;
- c) Maceração dinâmica: com procedimento adaptado de Rakholiya *et al.* (2014), em uma mesa agitadora de movimento orbital - conhecida popularmente por “shaker” – o material vegetal em contato com água permaneceu em agitação por 5 horas a 120 rpm, em temperatura ambiente. Em razão do tempo prolongado, o recipiente (Erlenmeyer) foi coberto com tampão de algodão para evitar contato com sujidades e envolto em papel alumínio, na finalidade de proteção aos compostos sensíveis à luz, como os fenólicos;

- d) Banho de ultrassom a 40 kHz por 60 minutos: o béquer contendo o vegetal e água permaneceu 1 hora em banho de ultrassom, em temperatura ambiente.

A Figura 11 apresenta os processos adotados.



Figura 11. Montagem para infusão e decocção, agitação por shaker e banho de ultrassom.

Fonte: a autora.

Em seguida, os extratos foram filtrados e centrifugados a 5.000 rpm por 12 minutos (Rakholiya *et al.*, 2014). O sobrenadante foi recolhido e armazenado em frascos âmbar, em geladeira, até a realização das análises; estas ocorreram em no máximo 1 dia após a fabricação do extrato.

5.2. Análises de caracterização

5.2.1. Umidade

A umidade das fontes vegetais foi obtida pelo método gravimétrico de secagem em estufa, conforme instruído por Cecchi (2003). Utilizou-se pesa-filtro de vidro (previamente seco em estufa a 105 °C por pelo menos 1 hora e pesado)

para depositar cerca de 3 gramas de matéria-prima triturada, que permaneceu em estufa a 105 °C *overnight*. A umidade, em base úmida, pode ser obtida pela Equação (1).

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{\text{massa de amostra antes da estufa} - \text{massa de amostra após a estufa}}{\text{massa de amostra antes da estufa}} \times 100 \quad (1)$$

5.2.2. pH

Os valores de pH foram obtidos com um pHmetro portátil.

5.2.3. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada por meio do método espectrofotométrico de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995).

A solução de DPPH (MM = 394,32 g/mol) foi preparada em metanol, a $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. O protocolo demanda que em 2,9 mL desta solução metanólica, 100 µL de amostra sejam adicionados e, após 25 minutos de repouso em ambiente escuro, deve-se fazer a leitura da absorbância no comprimento de onda de 515 nm. O espectrofotômetro é padronizado com metanol e a quantificação da atividade antioxidante é possível por meio de uma curva de calibração confeccionada com padrões de solução metanólica de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, MM = 250,32 g/mol). A absorbância das amostras é comparada a absorbância da mistura de 2,9 mL solução de DPPH com 100 µL de metanol, após 25 minutos de incubação (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995).

Obteve-se uma curva expressa como: $y = -1,1977x + 0,9851$ (Figura 12), em que y representa, em porcentagem, a absorbância da solução DPPH e amostra ou DPPH e padrão de calibração, após os 25 minutos, considerando-se por base a solução de DPPH e metanol; x é igual a atividade antioxidante, em mM de Trolox; o R^2 correspondente foi de 0,9928.

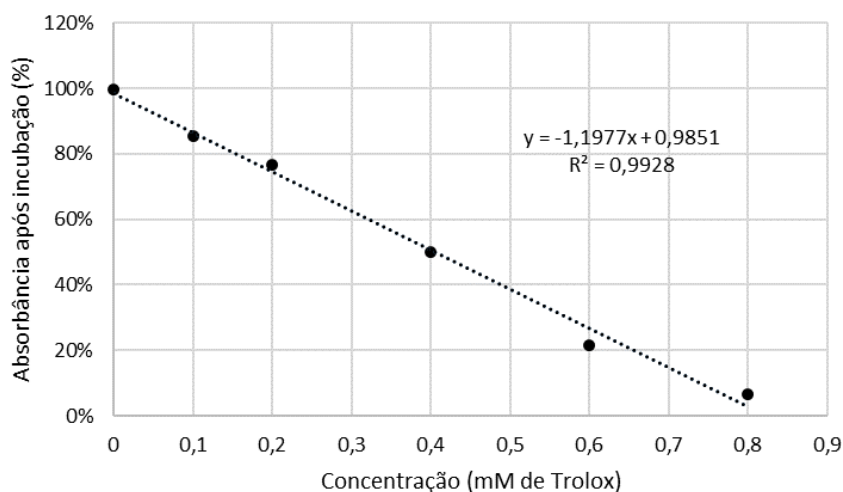


Figura 12. Curva de calibração para atividade antioxidante pelo método de redução do radical DPPH.

Fonte: a autora.

5.2.4. Compostos fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi mensurado pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme Slinkard, Singleton (1977). Em 6 mL de água são adicionados 100 μ L de amostra e 500 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 4 minutos de repouso no escuro, acrescenta-se 1,5 mL de carbonato de sódio 20% em água, seguidos de 1,9 mL de água. A mistura permanece por 20 minutos em incubação em ambiente escuro, quando é lida em espectrofotômetro a 765 nm. Para zerar o equipamento, o mesmo protocolo é seguido, apenas substituindo-se a amostra por 100 μ L de água.

A curva de calibração foi desenvolvida com padrões de ácido gálico e é representada pela equação: $y = 0,0013x + 0,0138$ (Figura 13), em que x é o teor de compostos fenólicos totais, em mg/L de ácido gálico, e y corresponde a absorbância obtida. O R^2 refere-se a 0,995.

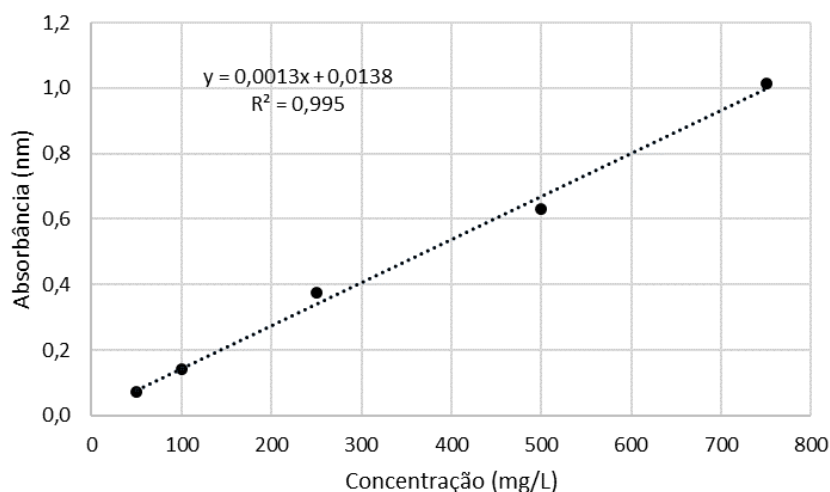


Figura 13. Curva de calibração para teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

Fonte: a autora.

5.3. Atividade antibacteriana *in vitro*

Por meio das metodologias de gota e microdiluição, testou-se a sensibilidade dos extratos produzidos contra as bactérias na concentração de 10^5 UFC/mL.

5.3.1. Inóculos bacterianos

Foram escolhidas bactérias importantes para o controle de qualidade sanitária em alimentos, uma vez que são responsáveis por DTAs e pela deterioração de alimentos. As culturas são oriundas da *American Type Cultura Collection* (ATCC) e do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e foram obtidas da coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Unesp de São José do Rio Preto – SP.

Bactérias Gram-positivas:

- *Bacillus cereus* ATCC 11773;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Bactérias Gram-negativas:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027;
- *Escherichia coli* ATCC 8739;
- *Salmonella enteritidis* IAL.

5.3.2. Padronização dos inóculos bacterianos

Os ensaios de sensibilidade dos microrganismos aos extratos foram realizados conforme orientação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

As bactérias foram reativadas com repique da cultura mãe para placas com ágar Mueller-Hinton e incubadas a 35 °C em estufa bacteriológica, de 18 a 24 horas antes da execução dos testes.

Uma pequena massa da bactéria de interesse foi então retirada com auxílio de uma alça de platina e adicionada em solução salina 0,9% estéril, utilizando-se vórtex para homogeneizar a suspensão. A turbidez resultante deve corresponder a escala 0,5 de McFarland, o que equivale a aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL. A confirmação da turbidez é feita em um espectrofotômetro com comprimento de onda igual a 625 nm, em que a absorbância pode variar de 0,08 a 0,13 (CLSI, 2012; Brasil, 2020).

Em seguida, procederam-se diluições decimais seriadas em caldo Mueller-Hinton até que os ensaios possuíssem a contagem almejada de unidades formadoras de colônias, aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Neste ponto, o procedimento se diferencia, pois foram adotadas duas metodologias de avaliação da atividade antibacteriana: teste da gota, com leitura dos halos de inibição formados, e microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços.

Para os testes em microplaca, partindo-se da contagem $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (escala 0,5 de McFarland), uma diluição 1:100 (30 µL inóculo em 2.970 µL de caldo) proporciona 10^6 UFC/mL. Esta suspensão bacteriana sofre diluição 1:2 com a adição do extrato ao poço, alcançando, por fim, a contagem almejada na quinta potência. Já para o teste da gota, uma vez que o ensaio é feito em placas com meio de cultura sólido (ágar Muller-Hinton), o preparo do inóculo é feito diretamente até 10^5 UFC/mL, por meio de uma diluição 1:100 seguida de um 1:10 (esta com 100 µL em 900 µL) e então semeada por espalhamento em superfície.

Conforme orientação da CLSI (2012), ressalta-se que a suspensão bacteriana deve ser inoculada em até 15 minutos após preparo, em razão do tempo de geração dos microrganismos.

5.3.3. Esterilização dos extratos

Todos os testes foram realizados com os extratos esterilizados por membrana filtrante de 22 µm de poro (microfiltro Millipore®).

Uma alíquota do extrato foi retirada com uma seringa de 3 mL. O microfiltro foi acoplado na seringa, o êmbolo forçado para a passagem do extrato pelo filtro e o material esterilizado foi recolhido em microtubo também estéril.

5.3.4. Avaliação de sensibilidade das bactérias aos extratos

O planejamento inicial deste projeto abrangia avaliar os quatro métodos de extração (infusão, decocção, banho de ultrassom e shaker) por meio dos halos de inibição e prosseguir, apenas com o melhor extrato, para determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. No entanto, verificou-se a necessidade de alterar a metodologia em função da matriz e os resultados encontrados, conforme detalhado nas seções seguintes.

5.3.4.1. Teste da gota

Esta metodologia foi escolhida para avaliar o efeito dos métodos de extração de todas as matrizes contra as bactérias alvo. No entanto, o efeito dos extratos de jenipapo e sucupira não puderam ser mensurados por esta técnica, uma vez que não proporcionaram halos de inibição, e por isso foi decidido testá-los com uma segunda metodologia, de microdiluição com leitura por resazurina. Deste modo, o teste da gota forneceu resultados apenas para avaliação do melhor método de obtenção de extratos de barbatimão.

Em cada placa de Petri contendo de 20 a 30 mL de ágar Mueller-Hinton, adicionou-se 0,1 mL do inóculo (padronizado em 10^5 UFC/mL), que foi espalhado sobre o meio de cultura com auxílio de uma alça de Drigalski (semeadura por espalhamento ou *spread-plate*) (Madigan *et al.*, 2016.).

Após secagem do inóculo e com auxílio de uma micropipeta, depositou-se 10 µL de extrato (Pateran *et al.*, 2018; Brasil, 2020). É necessário esperar até que o material seja absorvido pelo ágar (cerca de 15 minutos), para então inverter e incubar as placas em estufa a 35 °C por 24 horas. Após esse período, se a bactéria for sensível ao extrato, forma-se um halo sem crescimento bacteriano ao redor da gota com extrato. Estes halos de inibição foram mensurados em milímetros com auxílio de régua.

Utilizou-se água estéril como controle negativo.

5.3.4.2. Microdiluição em caldo

Este método é desenvolvido em microplacas estéreis de 96 poços de fundo em “U”, onde se coloca em contato a suspensão bacteriana padronizada, o agente antimicrobiano (extrato) e o meio de cultura em caldo para diluir o antimicrobiano. Após o período de incubação requerido, avalia-se ausência ou presença de turvação nos poços como um indício do crescimento bacteriano. Pode-se utilizar corantes para auxiliar na interpretação do teor de células viáveis, como resazurina ou sais de tetrazólio, que mudarão sua coloração em resposta a respiração celular. A leitura e interpretação dos resultados pode ser feita de forma visual ou com análise em espectrofotômetro (Promega, 2022).

A microdiluição foi utilizada como uma das etapas para determinação da CIM e CBM.

5.3.4.3. Determinação da concentração inibitória mínima

O CLSI define a concentração inibitória mínima (CIM), como “a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo nos tubos ou poços de microdiluição conforme detectado a olho nu” (CLSI, 2003a, p. 18). Pode-se complementar a análise com corantes que auxiliam na leitura dos resultados, como resazurina e sais de tetrazólio.

Em microplaca estéril de 96 poços, foram depositados 50 µL de extrato (na concentração máxima preparada) e 50 µL do inóculo padronizado, conforme descrito na seção 4.3.2. Consequentemente, ocorreu uma diluição 1:2 de ambos, resultando em suspensão bacteriana na concentração final de 10^5 UFC/mL e os extratos (preparados por infusão, decocção, banho de ultrassom e shaker) nas seguintes concentrações: semente de jenipapo a 25%, polpa de jenipapo a 22,5% e sucupira a 20%.

Também foi feito controle positivo, com 50 µL de inóculo de 50 µL de caldo, controle negativo com 50 µL de água e 50 µL de caldo, controle de esterilidade do extrato (100 µL extrato), além de controle do meio de cultura e do solvente em que as amostras foram preparadas (água). O Quadro 2 sintetiza a composição e volumes empregados.

Quadro 2. Análises realizadas na microplaca.

Tipo de controle ou teste	Composição e quantidades
Controle de esterilidade do meio de cultura	100 µL caldo MH
Controle com solvente das amostras	50 µL caldo MH e 50 µL água
Controle de esterilidade dos extratos	50 µL caldo MH e 50 µL extrato
Controle de crescimento das bactérias	50 µL caldo MH e 50 µL inóculo
Teste com amostra em concentração fixa	50 µL extrato e 50 µL inóculo bacteriano padronizado
Teste com amostra em concentração diluída seriamente	50 µL caldo MH e amostra e 50 µL inóculo bacteriano padronizado

As microplacas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas. Após, adicionou-se 30 µL de solução aquosa de resazurina 0,01% preparada em água destilada estéril, em seguida o material retornou para incubação por 2 horas (Palomino *et al.*, 2002) e então foi lido em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 570 nm e 600 nm.

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é um indicador redox, inicialmente de cor azul, que responde à atividade metabólica de células vivas, tornando-se a molécula resofurina, que emite cor rosa fluorescente. A fluorescência produzida é proporcional ao número de células viáveis existentes. O cálculo da viabilidade é feito subtraindo-se a média do valor de absorbância em 570 nm da média do valor em 600 nm; o controle de crescimento bacteriano é tido como 100% de viabilidade e os demais poços seguem sua proporção direta (Promega, 2022).

5.3.4.4. Determinação da concentração bactericida mínima

Este procedimento foi realizado apenas com o extrato obtido com o método de extração previamente avaliado como o melhor, dentre os quatro métodos avaliados. Ele combina a ação do extrato em microplaca estéril de 96 poços com leitura do crescimento bacteriano em placas de Petri com ágar MH.

Na microplaca, o extrato sofre diluições seriadas de base dois com uso do caldo Mueller-Hinton como solvente, ao longo de toda a coluna (8 poços subsequentes) e em triplicata (portanto, em 3 colunas inteiras).

O ensaio principiou com a adição de 50 µL de caldo Mueller-Hinton na microplaca. O primeiro poço da coluna não recebeu caldo, pois nele se adicionou 100 µL de extrato preparado a 20%. Em seguida, retiraram-se 50 µL deste extrato, que foram adicionados no poço inferior, onde já havia caldo; desta forma, fez-se uma diluição 1:2 do extrato. A mistura foi homogeneizada com o movimento de “sugar e soltar” da pipeta e 50 µL foram dispensados no poço vizinho. O processo de diluição seriada de base 2 seguiu em toda a coluna da placa e após o último poço os 50 µL excedentes foram descartados. Ao final, o primeiro poço permaneceu apenas com extrato (50 µL) e os demais finalizaram com 50 µL da mistura caldo e extrato, em concentrações variadas e regressivas (Brasil, 2020).

Então, fez-se a padronização das suspensões bacterianas a 10^6 UFC/mL e 50 µL foram adicionados em todos os poços da coluna. Deste modo, uma nova diluição ocorreu, finalizando o inóculo em 10^5 UFC/mL em toda a microplaca, e o extrato, que iniciou em 20% no primeiro poço, foi transformado em 10% (linha A da microplaca). O último poço terminou em 0,078125% (linha H) (Brasil, 2020).

Para o controle negativo, utilizou-se água esterilizada. Controle positivo, apenas caldo e inóculo (50 µL de cada). Também foi feito controle de esterilidade do caldo e dos extratos, conforme já apresentado no Quadro 2.

A microplaca foi incubada por 24 horas em estufa a 35 °C. Após este período, palitos de madeira foram utilizados para repicar o conteúdo do poço em placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, de forma a tocar um poço e em seguida tocar a superfície do ágar. Para cada poço foi utilizada a ponta de um palito estéril (Sposito, 2017).

As placas de Petri foram incubadas também a 35 °C por 24 horas. A CBM foi determinada como a menor concentração em que não se observou crescimento de colônia após o cultivo em placa (Figura 14).

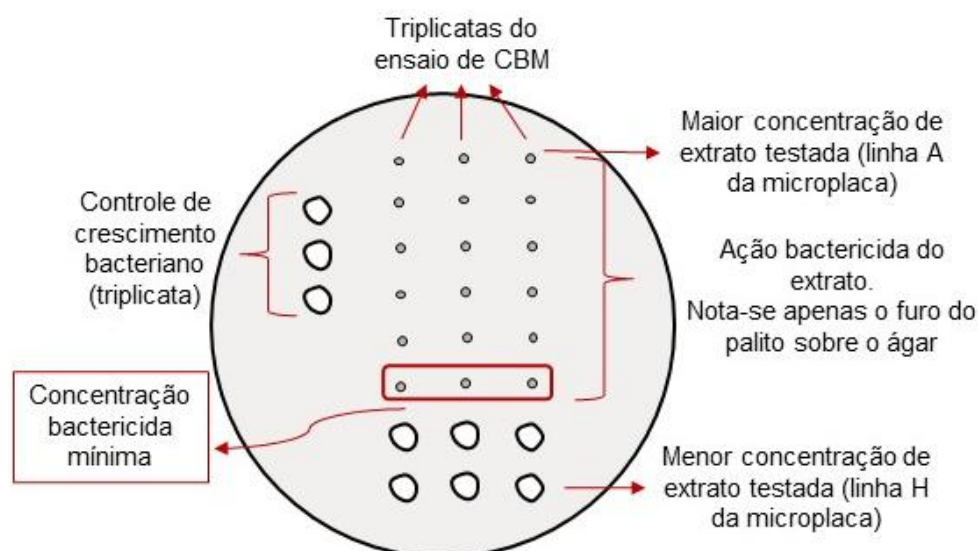


Figura 14. Esquema de placa utilizada para determinar a concentração bactericida mínima.

Fonte: a autora.

5.4. Avaliação do extrato pelo período de 21 dias

Prepararam-se os extratos na concentração bactericida mínima requerida para cada bactéria e a mesma repetição foi dividida em dois frascos, sendo um armazenado a 20 °C (em incubadora BOD) e outro a 5 °C (em geladeira). Foi feita avaliação da atividade antibacteriana, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos nos dias 1, 7 e 14 a partir da produção.

5.5. Análise de varredura

Adicionaram-se partes iguais de extrato e solução de resazurina em microtubo estéril, que foi deixado em incubação a 35 °C por 2 horas, simulando o protocolo adotado para resazurina. A solução foi então colocada em cubetas e lida em espectrofotômetro UV-VIS no modo “scan”, de 300 a 800 nm. Também foi feita leitura apenas do extrato. Água foi utilizada como branco.

5.6. Análise dos dados

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados experimentais submetidos à Análise de Variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de Tukey para comparação das médias, com nível de significância igual a 5%. Além disso, foi aplicado o teste t de Student para amostras independentes a fim de se comparar as médias de teor de fenólicos totais e atividade antioxidante das

amostras expostas a 7 dias em temperatura de refrigeração (5 °C) e temperatura controlada de 20 °C em BOD.

Os testes estatísticos foram realizados no software Minitab® 17. Os dados foram tabulados no Excel®.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização dos extratos

6.1.1. Barbatimão

A umidade das cascas de *S. adstringens* utilizadas na produção dos extratos foi de $10,47 \pm 0,24\%$. Os extratos aquosos a 20% resultaram em líquidos com coloração vermelha intensa e odor amadeirado, conforme apresentado na Figura 15.



Figura 15. Extratos aquosos de barbatimão a 20% elaborados com os métodos: agitação em shaker, infusão, decocção e ultrassom (em ordem, da esquerda para a direita).

Fonte: a autora.

Já a caracterização de cada extrato está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados de pH, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais (média $\pm$ desvio padrão) dos extratos de barbatimão a 20%.

Análises	Método de extração				Valor P ²
	Decocção	Infusão	Shaker	Ultrassom	
pH	$4,62 \pm 0,16$	$4,56 \pm 0,32$	$4,58 \pm 0,32$	$4,63 \pm 0,08$	0,989
Atividade antioxidante (mM)	272 ± 93^a	233 ± 3^{ab}	174 ± 28^{bc}	129 ± 25^c	<0,001
CFT ¹ (mg/L)	21500 ± 4212^a	18867 ± 5607^a	16905 ± 1721^{ab}	11051 ± 2174^b	<0,001

¹CFT: compostos fenólicos totais. ²Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de comparação múltipla *post-hoc* de Tukey.

Os valores de pH variaram de 4,56 a 4,63 e não apresentaram diferença estatística conforme o método de extração utilizado. Esta faixa caracteriza os extratos como ácidos, o que é vantajoso na inibição de bactérias. O potencial

hidrogeniônico (pH) de uma matriz é um dos fatores que influencia o tipo de microrganismo capaz de crescer naquele meio. A natureza ácida dificulta o crescimento da maioria das bactérias, mas não é tão efetivo no controle de fungos (Forsythe, 2013). De fato, este ponto será observado no acompanhamento do extrato ao longo dos 21 dias.

Já para atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, o método extrativo causou diferença. A atividade antioxidante, quantificada em mM equivalente de Trolox, foi maior no extrato produzido por decocção (272 ± 93 mmol equivalente de Trolox) e menor em ultrassom (129 ± 25 mmol equivalente de Trolox). Sabendo-se que as características da matéria-prima devem ser consideradas para se escolher o método de extração e a decocção é recomendada para as partes rígidas das plantas, como raízes e cascas (Farmacopeia Brasileira, 2021), a maior atividade antioxidante no método de decocção era, de certo modo, esperada. Ainda, este resultado pode ser atribuído aos compostos fenólicos encontrados na casca (e por consequência, no extrato): a casca de barbatimão contém elevada concentração de taninos condensados (proantocianidinas) e monômeros de flavan-3-ol, moléculas que conferem atividade antioxidante (Baldivia *et al.*, 2018).

A análise de compostos fenólicos totais permite classificar os extratos como uma fonte significativa destes compostos, até mesmo para o que, entre os métodos propostos, foi considerado o menos eficiente (ultrassom). Novamente, o método de decocção foi o mais bem avaliado.

O decocto de cascas de barbatimão pode ser classificado, portanto, como uma potente fonte de fenólicos e antioxidantes. Estes resultados têm a magnitude explicitada quando comparados com análises em vinho tinto – matriz reconhecida por suas propriedades antioxidantes e alto teor de fenólicos: De Castilhos (2012) e De Castilhos *et al.* (2015), reportaram concentrações de compostos fenólicos totais igual a 983,96 mg/L em vinho de uva bordô e 737,9 mg/L em vinho de uva BRS Rúbea; este último com atividade antioxidante igual a 7,68 mM. Estes valores são inferiores aos alcançados pelos quatro extratos produzidos.

A alta temperatura utilizada na decocção reduz a constante dielétrica e a polaridade da água, facilitando a solubilização dos compostos no fluido em ebulição (Magalhães; Santos, 2021). Estima-se que os taninos constituam 20 a

30% da casca do barbatimão, sendo o metabólito secundário mais abundante. Eles são os principais responsáveis pelas propriedades de interesse de *S. adstringens*, conferindo-lhe atividade antioxidante, antimicrobiana e adstringente (Lameira *et al.*, 2022). Este fato será observado em estudo posterior em que aplicará métodos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas para identificar e quantificar esses compostos.

Segundo pontuaram Ribeiro *et al.* (2022) em uma revisão sobre técnicas de extração de compostos fenólicos de barbatimão, apesar da decocção ser o método usual em preparações caseiras para o vegetal, faltam estudos acadêmicos utilizando esta técnica. Os autores relataram a maioria dos trabalhos feitos com turbo extração e maceração

Dos Santos Filho (2011) obtiveram extratos não das cascas, mas das folhas de barbatimão, na concentração de 1:10 (m/v) e compararam decocção com água a 90°C por 10 minutos e maceração com etanol 70% (tempo não informado). Para eles, decocção e maceração não obtiveram diferença significativa no teor de compostos fenólicos e da atividade antioxidante por redução do radical DPPH. Soong e Barlow (2004) apontaram que o aquecimento instiga a formação de compostos fenólicos por aumentar a disponibilidade de precursores de moléculas fenólicas. Contudo, os autores enfatizaram que são necessárias mais investigações para esclarecer este fenômeno

6.1.2. Jenipapo – polpa e semente

É importante considerar que a polpa cortada sofre ação das enzimas polifenoloxidase, demonstrada pelo escurecimento do material. A enzima atua em substratos fenólicos, que são convertidos em quinonas reativas e finalizam na formação de polímeros enegrecidos (melaninas) (Tilley *et al.*, 2023). Assim, o teor de fenólicos do material é reduzido, com consequente impacto no extrato formado. Por isso, o intervalo entre o corte do fruto e produção do extrato não deve ser demorado, para minimizar a perda fenólica.

A polpa de jenipapo foi caracterizada com umidade igual a $72,88 \pm 0,18\%$. Os extratos aquosos a 45%, de coloração amarela e límpida, são apresentados na Figura 16 e as características dos extratos se apresentam na Tabela 3.



Figura 16. Extratos aquosos de polpa de jenipapo a 45% elaborados com os métodos: infusão, decocção, ultrassom e agitação em shaker (em ordem, da esquerda para a direita).

Fonte: a autora.

Tabela 3. Resultados de pH, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais (média $\pm$ desvio padrão) dos extratos de polpa de jenipapo.

Análises	Método de extração				Valor P ²
	Decocção	Infusão	Shaker	Ultrassom	
pH	4,04 $\pm$ 0,06	4,07 $\pm$ 0,09	3,97 $\pm$ 0,06	4,07 $\pm$ 0,11	0,624
Atividade antioxidante (mM)	0,22 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,20 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,27 $\pm$ 0,07 ^a	0,19 $\pm$ 0,15 ^b	0,05
CFT ¹ (mg/L)	601,2 $\pm$ 68,2 ^a	407,5 $\pm$ 40,6 ^b	535,3 $\pm$ 36,1 ^a	549,1 $\pm$ 50,5 ^a	<0,001

¹CFT: compostos fenólicos totais. ²Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de comparação múltipla *post-hoc* de Tukey.

Já as sementes de jenipapo (com mucilagem) foram caracterizadas com umidade igual a $66,41 \pm 1,44\%$. Os extratos a 50%, de coloração amarela e límpida, são apresentados na Figura 17; suas características estão na Tabela 4.

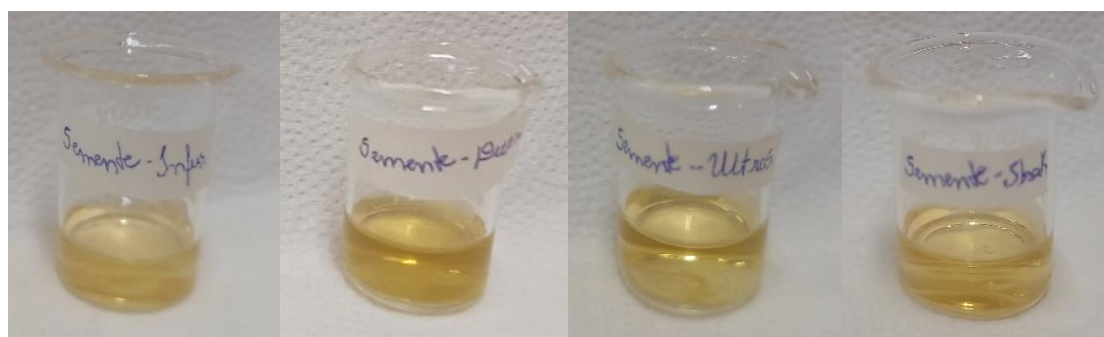


Figura 17. Extratos aquosos de semente de jenipapo a 50% elaborados com os métodos: infusão, decocção, ultrassom e agitação em shaker (em ordem, da esquerda para a direita).

Fonte: a autora.

Tabela 4. Resultados de pH, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais (média $\pm$ desvio padrão) dos extratos de semente de jenipapo.

Análises	Método de extração				Valor P ²
	Decocção	Infusão	Shaker	Ultrassom	
pH	4,04 $\pm$ 0,07	4,19 $\pm$ 0,06	4,03 $\pm$ 0,11	4,09 $\pm$ 0,11	0,205
Atividade antioxidante (mM)	0,3 $\pm$ 0,08 ^a	0,21 $\pm$ 0,05 ^b	0,27 $\pm$ 0,09 ^{ab}	0,23 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,047
CFT ¹ (mg/L)	423,0 $\pm$ 97,5 ^{ab}	307,4 $\pm$ 47,3 ^{bc}	442,9 $\pm$ 126,7 ^a	269,6 $\pm$ 92,1 ^c	0,001

¹CFT: compostos fenólicos totais. ²Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05) pelo teste de comparação múltipla *post-hoc* de Tukey.

Entre as 3 matrizes testadas (barbatimão, jenipapo e sucupira), jenipapo demonstrou os menores valores para atividade antioxidante e teor de fenólicos. De fato, com cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas, Omena *et al.* (2012) fizeram análises em extratos obtidos da polpa e das sementes do fruto. As análises na polpa não foram realizadas devido à formação de precipitados. Nos extratos das sementes, não foi revelada a presença de muitos fenólicos, como taninos, antocianinas, flavonoides, flavonol, flavanona, mas houve catequinas e cumarinas. Os autores também relataram baixa concentração de compostos fenólicos totais nos extratos e assumiram a atividade antioxidante dos extratos a outras substâncias (não nomeadas), de natureza não fenólica.

Também foi feita comparação entre polpa e semente, com os melhores métodos para cada matriz.

Tabela 5. Comparação entre os melhores métodos de obtenção dos extratos de jenipapo – polpa e semente.

Análises	Matriz e método de extração		Valor P ²
	Polpa - decocção	Semente - shaker	
Atividade antioxidante (mM)	0,22 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,09	0,285
CFT ¹ (mg/L)	601,2 $\pm$ 68,2 ^a	442,9 $\pm$ 126,7 ^b	0,018

¹CFT: compostos fenólicos totais. ²Valor P referente ao teste t de Student. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

Diferentemente do observado neste trabalho, os extratos de polpa e semente de jenipapo obtidos por Omena *et al.* (2012) exerceram boa atividade antioxidante, ao ponto de os autores recomendarem o uso do extrato nas indústrias de alimentos e farmacêutica. No entanto, Omena *et al.* (2012) realizaram secagem a 35 - 40 °C e extração com etanol 95%, o que favoreceu a extração de outros compostos, não retirados com o solvente água.

A ação antioxidante do jenipapo é atribuída principalmente a iridoides, compostos secundários a classe dos monoterpenos. Ainda, o estágio de maturação é importante para a concentração do composto no fruto, sendo mais presente em frutos verdes - esses, portanto, tendem a ter maior atividade antioxidante (Neri-Neruma *et al.*, 2020).

6.1.1. Sucupira

Os frutos de sucupira utilizados na produção do extrato tinham umidade igual a $6,48 \pm 0,23\%$. A coloração dos extratos respondeu ao método de produção (Figura 18), variando de amarelo claro a amarelo com tons de marrom. O decocto o mais escurecido e o banho de ultrassom promoveu efeito de turbidez ao líquido. A Tabela 5 mostra alguns parâmetros importantes dos extratos de acordo com o método de extração.

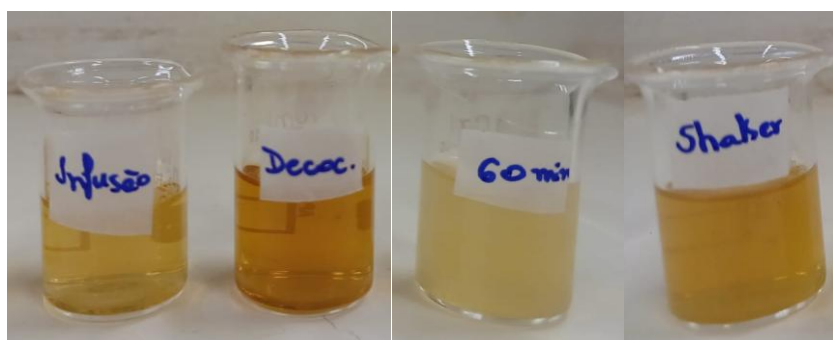


Figura 18. Extratos aquosos de frutos de sucupira a 40% elaborados com os métodos: infusão, decocção, ultrassom e agitação em shaker (em ordem, da esquerda para a direita).

Fonte: a autora.

Tabela 6. Resultados de pH, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais (média $\pm$ desvio padrão) dos extratos de sucupira a 40%.

Análises	Método de extração				Valor P ²
	Decocção	Infusão	Shaker	Ultrassom	
pH	5,36 $\pm$ 0,07 ^{ab}	5,75 $\pm$ 0,26 ^a	5,55 $\pm$ 0,09 ^{ab}	4,94 $\pm$ 0,12 ^b	0,025
Atividade antioxidante (mM)	8,56 $\pm$ 0,49 ^a	6,53 $\pm$ 1,95 ^a	3,32 $\pm$ 1,22 ^b	2,68 $\pm$ 1,36 ^b	<0,001
CFT ¹ (mg/L)	845,9 $\pm$ 35,3 ^a	552,5 $\pm$ 39,4 ^b	300,3 $\pm$ 56,4 ^c	266,2 $\pm$ 26,5 ^c	<0,001

¹CFT: compostos fenólicos totais. ²Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de comparação múltipla *post-hoc* de Tukey.

Decocção foi considerado o melhor método entre os avaliados, retornando em maiores valores de atividade antioxidante e concentração de compostos fenólicos. Para a atividade antioxidante foi possível observar ausência de diferenças significativas entre os métodos de decocção e infusão, entretanto, os valores de atividade antioxidante para o extrato obtido via decocção foram superiores em relação aos valores encontrados para o extrato obtido via infusão. Os frutos de sucupira são rígidos e por isso tratamentos brandos não seriam indicados para o propósito extrativo.

6.2. Atividade antibacteriana

6.2.1. Barbatimão

Para avaliar qual extrato seria mais eficiente contra as bactérias testadas, tomou-se as medidas dos diâmetros de inibição, que são apresentados na Tabela 6. Já a Figura 19 é um recurso visual para acompanhar a forma com que os extratos produzidos por agitação em shaker e por banho de ultrassom agiram nas diferentes bactérias.

Tabela 7. Halos de inibição (mm) proporcionados pelos diferentes métodos de obtenção do extrato aquoso de *S. adstringens* contra as bactérias testadas.

Bactérias	Método de extração				Valor P ¹
	Decocção	Infusão	Shaker	Ultrassom	
<i>S. aureus</i>	16,9 ± 2,1 ^a	17,1 ± 1,83 ^a	15,0 ± 0,9 ^{ab}	12,8 ± 1,0 ^b	<0,001
<i>E. coli</i>	6,7 ± 1,8	7,6 ± 1,02	7,0 ± 0,0	6,0 ± -	0,624
<i>S. enteritidis</i>	8,3 ± 1,5	6,9 ± 1,0	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,6	0,185
<i>P. aeruginosa</i>	7,1 ± 0,8	6,2 ± 1,9	6,5 ± 1,6	Sem inibição	0,508
<i>B. cereus</i>	15,7 ± 2,3	15,2 ± 1,6	14,2 ± 1,0	12,3 ± 0,8	0,006

¹ Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05) pelo teste de comparação múltipla *post-hoc* de Tukey.

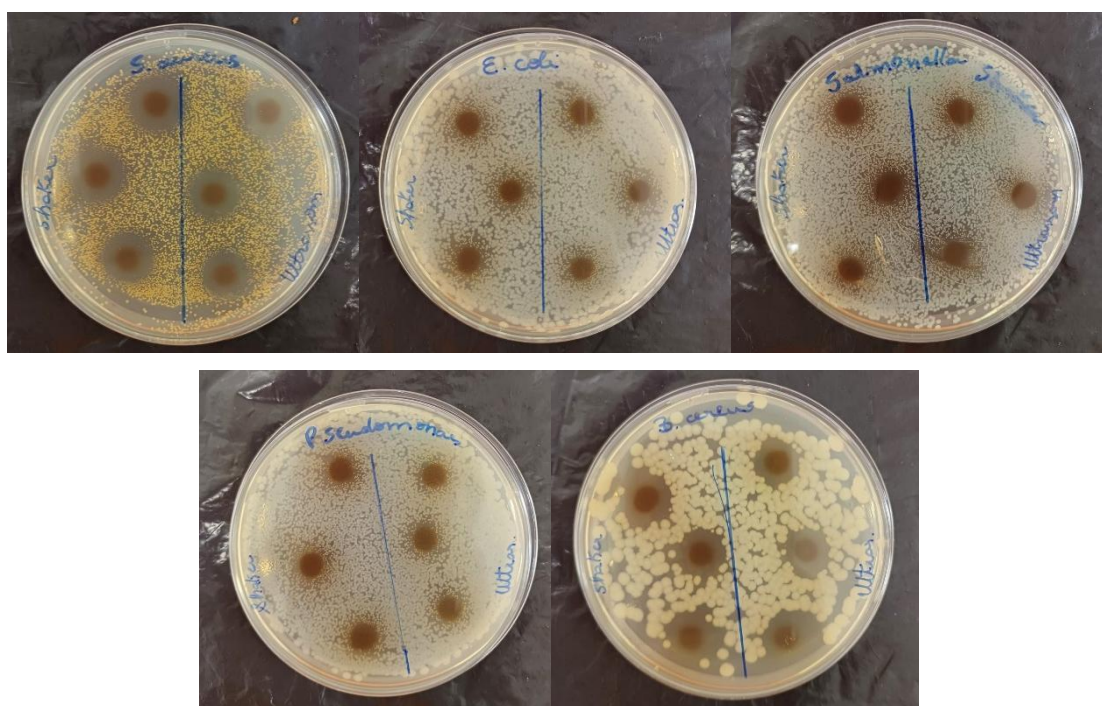


Figura 19. Placas inoculadas com *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* (acima), *P. aeruginosa* e *B. cereus* (embaixo) e a inibição proporcionada pelos extratos de *S. adstringens* produzidos em shaker e em ultrassom.

Fonte: a autora.

Para a leitura dos resultados, é importante pontuar que se notou a existência de halos invadidos pelas colônias de *E. coli*, *S. enteritidis* e *P. aeruginosa* em alguns tratamentos, caracterizados por colônias menores (mais jovens). Isso mostra que durante as 24 horas de incubação o extrato produziu um efeito inicial de combater a bactéria, mas esta ação foi interrompida e a

colônia conseguiu se multiplicar e adentrar o espaço. A Figura 20 auxilia na compreensão desse resultado.

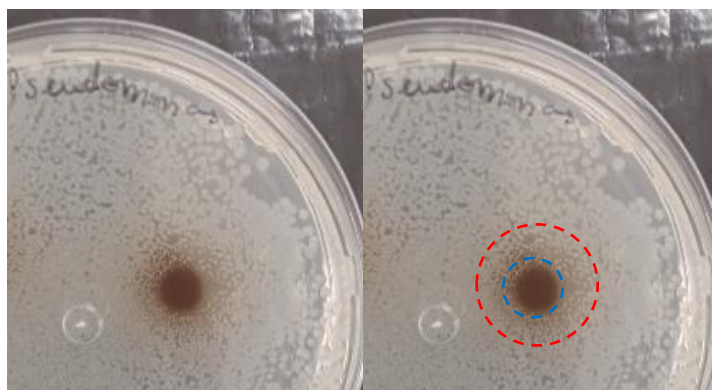


Figura 20. Destaque para as colônias jovens formadas no período de incubação. Em vermelho, o halo inicial, e em azul, o halo final, considerado na medição.

Fonte: a autora.

Os métodos de extração produziram efeito significativo apenas contra *S. aureus*, em que decocção e infusão foram responsáveis pelos maiores halos, à medida que o obtido por ultrassom foi o menos eficiente. Para as demais bactérias, o método extrativo não foi estatisticamente significativo.

Numericamente, os diâmetros para *S. aureus* e *B. cereus* são similares, maiores do que os obtidos para os outros três microrganismos testados. Em comum, as duas bactérias citadas são Gram-positivas, ao passo que as demais são Gram-negativas, conforme o método de coloração bacteriana desenvolvido em 1884 por Hans Christian Joachim Gram.

Esta distinção se deve a diferenças na estrutura da parede celular: as células Gram-negativas possuem uma membrana externa cobrindo sua camada de peptidoglicano, estrutura que as Gram-positivas não possuem. Essa membrana torna a célula mais complexa, uma vez que funciona como uma barreira seletiva capaz de controlar a entrada e saída de determinadas substâncias na célula - como antibióticos. As Gram-positivas, por sua vez, não possuem essa barreira, tornando-as mais suscetíveis aos tratamentos com antibióticos. (Tortora *et al.*, 2016). Ainda, a matriz periplasmática de bactérias Gram-negativas contém enzimas que atuam sobre moléculas estranhas, protegendo a célula (Holetz *et al.*, 2002). Por isso, os recursos eficazes contra

as Gram-positivas podem ter pouco ou nenhum efeito sobre as Gram-Negativas (Tortora *et al.*, 2016).

Para *P. aeruginosa* (bactéria Gram-negativa), o extrato preparado com ultrassom não produziu ação. Gonçalves (2007) preparou extrato hidroalcólico (etanol 70%) de cascas de barbatimão a 10%, pelo método de maceração por 25 dias. Também houve ausência de halo de inibição do produto sobre *P. aeruginosa*. No entanto, os resultados para *E. coli* e *S. aureus* foram considerados “excepcionais”, com halos entre 9 e 12 mm e igual a 20 mm, respectivamente – maiores dos que os medidos neste trabalho.

A atividade antibacteriana de *S. adstringens* está relacionada ao seu alto teor de taninos. O mecanismo de ação dos taninos é justificado pela formação de complexos com proteínas celulares bacterianas, inativação de enzimas e de adesinas (componente que facilita a adesão celular das bactérias às superfícies de interesse) (Souza *et al.*, 2007).

Trevisan *et al.* (2020) relataram publicar o primeiro estudo sobre o provável alvo de ação de *S. adstringens* sobre *S. aureus*. O extrato vegetal inibe três enzimas (FabG, FabZ e FabI) envolvidas na síntese de ácidos graxos, interrompendo a via metabólica dos ácidos graxos saturados e insaturados. Portanto, toda a rede metabólica celular da bactéria fica comprometida.

É importante pontuar que o extrato de barbatimão possui um amplo espectro de ação, combatendo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e também fungos, como demonstrou Oliveira *et al.* (2013), com ação efetiva do extrato contra o gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

6.2.2. Jenipapo – polpa e semente

Nenhum dos extratos testados apresentou halo de inibição.

Mendes *et al.* (2017) esclareceram que o método empregado para avaliar a atividade antimicrobiana pode impactar no resultado, de modo que ausência de diâmetros de inibição nem sempre indicam ausência de atividade do extrato contra o microrganismo testado. Isso se aplica para extratos com compostos pouco polares, pois sua difusão será lenta e não tão eficaz pelo meio de cultura.

Silva *et al.* (2005) adicionaram a viscosidade do antibiótico para o sucesso do método: viscosidade elevada atrapalha a dispersão do extrato no meio de cultura, comprometendo o efeito inibitório.

Para os ensaios conduzidos em microplaca, notou-se que os tratamentos promoveram redução da turbidez, quando comparados com o controle positivo. No entanto, a avaliação visual não permitia uma conclusão exata sobre qual método seria o mais eficiente e a adição de resazurina 0,01% foi feita para auxiliar a leitura.

Contudo, um fato curioso foi observado: a coloração dos poços com extrato estéril tornou-se a mesma dos poços com extrato e bactéria: vermelho com tons de marrom, conforme ilustrado pela Figura 21. Para avaliar a suspeita do extrato estar contaminado, o mesmo foi plaqueado em ágar Mueller-Hinton, em que não se observou crescimento de colônias. Por pelo menos 3 vezes a mesma situação ocorreu: extratos estéreis com coloração característica de presença de células viáveis, segundo a metodologia por resazurina.

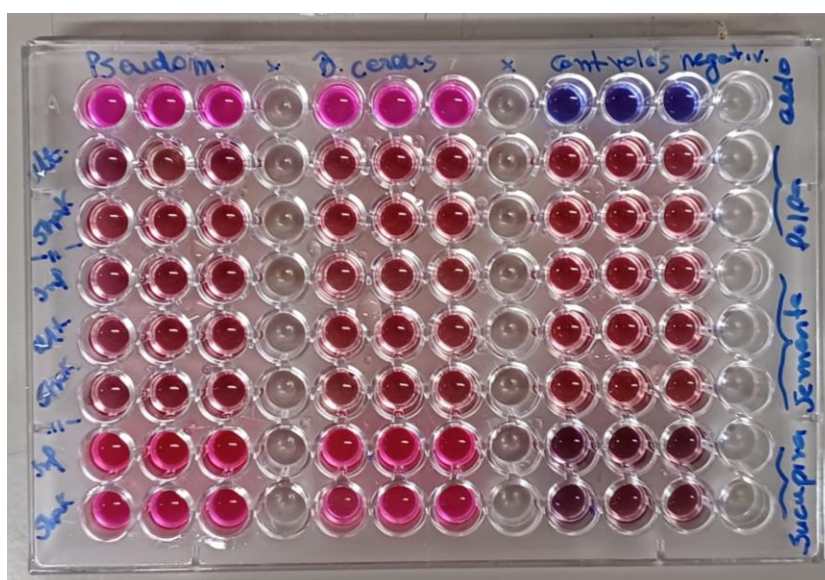


Figura 21. Microplaca com resazurina em testes para extratos de polpa e semente de jenipapo e sucupira. Suas laterais contêm indicações das amostras testadas, em que “ultr.” = ultrassom, “shak.” = shaker e “inf.” = infusão.

Nota da Figura 21: A primeira e segunda colunas estão inoculadas com *P. aeruginosa* e *B. cereus*, respectivamente. A terceira coluna corresponde aos controles negativos de caldo e extratos. Esperava-se coloração azul para todos os poços testados.

Fonte: a autora.

De acordo com o protocolo para resazurina, a ausência de células viáveis resulta em solução de cor azul ou púrpura. Contudo, conforme notado pela Figura 21, os poços de extratos de jenipapo, com e sem inóculo, resultaram na

mesma coloração. Isto representa um problema na interpretação de resultados, incorrendo em um falso positivo.

Em pesquisa na literatura para elucidar o tema, foi encontrado que, de fato, alguns compostos podem interagir com resazurina e dificultar a leitura dos resultados (Promega, s.d.). Shenoy et al. (2017) estudaram e comprovaram a interferência de drogas com propriedade antioxidante sobre reagentes que se baseiam nas propriedades redutoras das células – como é a resazurina. Os autores notaram que a resazurina é reduzida diretamente pela substância com atividade antioxidante, o que acabava com retornar em “resultados espúrios” para os testes.

Assim, não foi possível utilizar o corante resazurina e nem leitura de halos de inibição para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos.

Decidiu-se fazer uma análise de varredura em espectrofotômetro para compreender se o comprimento de onda emitido pelas amostras era adequado para o protocolo de leitura da resazurina.

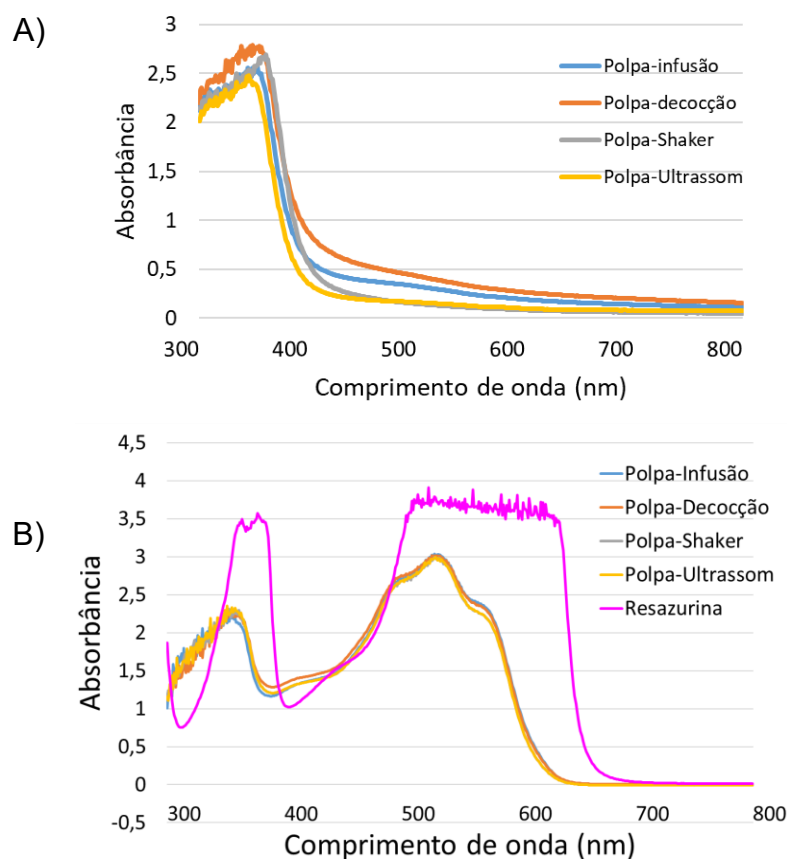


Figura 22. Gráficos de varredura para extratos de polpa de jenipapo sem (A) e com (B) adição de resazurina.

Fonte: a autora.

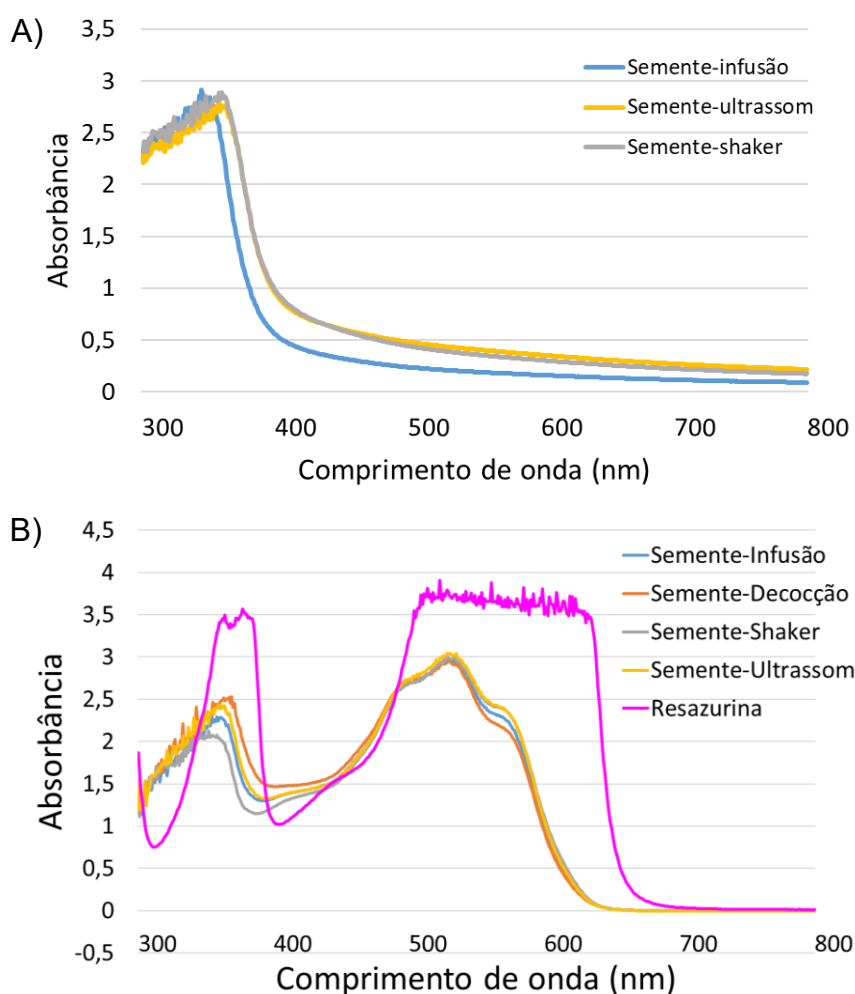


Figura 23. Gráficos de varredura para extratos de semente de jenipapo sem (A) e com (B) adição de resazurina.

Fonte: a autora.

No protocolo, a leitura é feita em dois comprimentos de onda, 570 e 600 nm. Assim, espera-se que nessa faixa haja um pico de absorbância da resazurina e também das amostras. De fato, isso ocorreu, como pode ser visto nas Figuras 22 e 23.

Entretanto, quando o extrato está em contato com o corante, notam-se duas bandas de máxima de absorção da resazurina: entre 350-400nm e entre 500-650 nm. Todas são maiores do que os picos de absorbância para as amostras. Contudo, um pico de absorção da resazurina maior do que o pico das amostras, em uma banda de comprimento de onda diferente da banda em que ocorre as análises pode ter interferido na pesquisa, tornando a resazurina incompatível com as matrizes testadas.

Apesar de não ter sido possível avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de jenipapo, alguns estudos com esse tema são apresentados.

Gonçalves (2007) preparou extrato hidroalcólico (etanol 70%) de polpa de jenipapo a 10%, pelo método de maceração por 25 dias. Avaliou, pelo método de disco-difusão, sua ação contra 10 microrganismos, incluindo *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, e também não constatou halo de inibição.

De Júnior *et al.* (2019) testaram o extrato hidroalcólico da casca do caule de *G. americana* contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Apesar de não ter encontrado efeito satisfatório de inibição do extrato puro, foi reportado que, em sua associação com os antibióticos gentamicina e amicacina, o efeito bactericida destas drogas foi potencializado.

Por meio do método de disco-difusão, Santos; Ramos; Miyagasku (2017), apontaram que o extrato hidroalcólico da polpa foi avaliado como tão eficiente quanto os antibióticos azitromicina e gentamicina contra *S. aureus*. Os extratos obtidos da casca e semente também obtiveram resultados similares para a inibição provocada pelo antibiótico vancomicina. Contudo, as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* não se mostraram satisfatoriamente sensíveis aos extratos quando comparadas aos antibióticos controle, apesar de também apresentarem halos de inibição.

6.2.3. Sucupira

O método da gota também não resultou em halos de inibição para os 4 extratos de sucupira testados.

Testou-se a microdiluição com resazurina, mas o mesmo efeito de coloração dos extratos de jenipapo foi observado. Também foi feita análise de varredura para estes extratos, conforme gráfico na Figura 24.

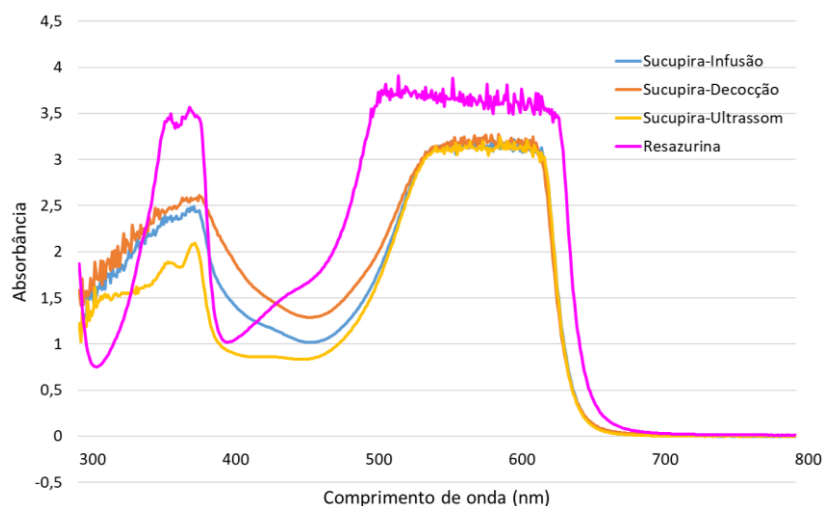


Figura 24. Análise de varredura para extratos de sucupira com resazurina.

Fonte: a autora.

Os motivos que levaram a incompatibilidade de resultado entre os extratos e o protocolo de resazurina já foram discutidos na seção 5.2.2.

Silva *et al.* (2005) relataram encontrar poucos experimentos utilizando extratos de sucupira contra microrganismos. Dutra, Leite e Barbosa (2008) indicaram dificuldade em relacionar a composição do extrato com sua atividade biológica desempenhada. Apesar dos relatores serem antigos, perceberam-se as mesmas dificuldades para a discussão deste projeto.

Mendes *et al.* (2017) produziram extrato aquoso de sucupira a 33%, com uma metodologia mista de maceração estática por 7 dias seguida de infusão por 4 horas. O produto foi testado contra *S. aureus* por disco difusão e difusão em poço e em nenhuma técnica conferiu-se ação contra a bactéria. Em contrapartida, o óleo essencial de sucupira obtido com hexano e o extrato hidroalcolico (etanol 70%) produziram ações inibitória (CIM igual a 2,5% para ambos) e bactericida (CBM igual a 7,5% e 10%, respectivamente).

Para os autores, os resultados sugerem que a atividade antibacteriana é atribuída a substâncias não polares e/ou com intermediária polaridade, com a literatura justificando pela presença de diterpenos e sesquiterpenos. Ainda, Mendes *et al.* (2017) aproveitaram para validar o tratamento popular para dor de garganta feito de gargarejos com extrato alcoólico de sucupira.

Já Gonçalves (2007) não constatou ação antimicrobiana do extrato hidroalcolico (etanol 70%) de sucupira 10%, produzido por maceração por 25

dias, contra 9 das bactérias testadas, o que inclui *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Houve halo de inibição apenas contra *P. mirabilis*, que se mostrou muito sensível com 26 mm de diâmetro de inibição.

Santos et al. (2023) produziram extrato das sementes com hexano em maceração por 15 dias e o testaram contra 13 bactérias, entre fitopatógenos e patógenos humanos. Os autores obtiveram inibição de todas as cepas testadas e atribuem os resultados a E-cariofileno, vouacapano e E-geranilgeraniol e o desidroabietol.

Donati et al. (2015) encontraram alta atividade antioxidante para óleo essencial de *P. emarginatus* extraído por hidrodestilação, mas nenhuma ação contra as bactérias *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* e a levedura *C. parapsilosis*.

Nota-se que uma mesma bactéria (*S. aureus*) pode responder com sensibilidade ou resistência à ação da substância testada. Isso pode ser explicado por fatores já pontuados, como qualidade/composição da matéria-prima, solvente empregado, método, tempo. Também deve-se salientar que a cepa utilizada, embora seja da mesma espécie, possui suas características intrínsecas.

6.3. Concentração bactericida mínima

A avaliação da CIM e CBM não foi possível de ser realizada com os extratos de jenipapo e sucupira.

Analisando todos os resultados apresentados, a decocção por 5 minutos foi considerada a melhor forma de se obter o extrato de *S. adstringens*. Ainda, este é o método usual, segundo a Farmacopeia Brasileira (2021), de se produzir extratos destas cascas. Deste modo, esta etapa foi iniciada com a produção do decocto a 20%.

A concentração inibitória mínima não foi analisada com o barbatimão, pois a coloração do extrato atrapalha a interpretação da turbidez provocada pelo crescimento bacteriano, conforme efeito também relatado por Souza et al. (2007). O uso de resazurina também é impactado por sua forte coloração. Por esse motivo, foi feita apenas a concentração bactericida mínima.

Com o método de microdiluição com posterior leitura em placa (Figura 25), encontrou-se os valores de concentração bactericida mínima: *S. aureus*, 0,15625%; *B. cereus*, 0,3125%; *E. coli*, *S. enteritidis* e *P. aeruginosa*, 1,25%.

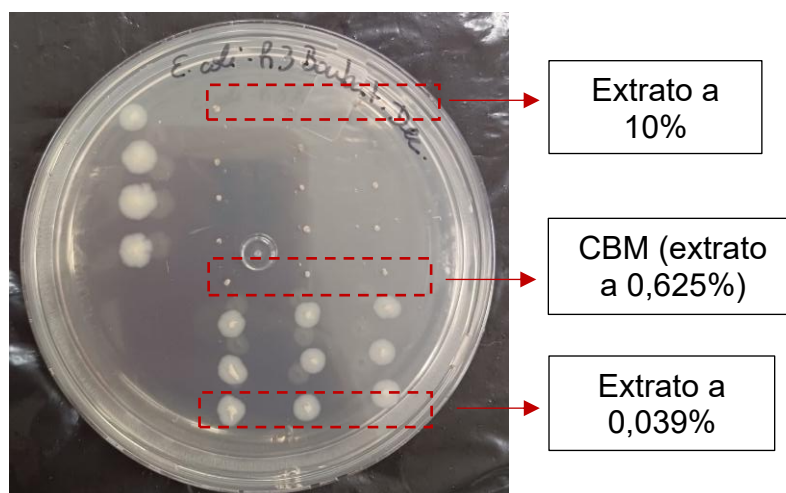


Figura 25. Leitura de placa para concentração bactericida mínima.
Fonte: a autora.

No entanto, ao elaborar os extratos nas concentrações necessárias, a ação bactericida não ocorreu. O teste foi feito em duas repetições, sendo cada uma em triplicata.

A diferença entre o efeito observado com a microdiluição *versus* efeito observado com o extrato preparado na concentração alvo é vista com duas possíveis explicações: 1) a técnica utilizada, que utiliza volumes mínimos, facilitando a ocorrência de erros de pipetagem e, por consequência, diferença na concentração final no poço da microplaca; 2) diferença nas cascas de *S. adstringens* utilizadas. Conforme sinalizado por Souza; Mello; Lopes (2011), trabalhar com produtos naturais incorre em dificuldade de se assegurar sua padronização, uma vez que a constituição de uma matriz depende de diversos fatores, como clima, época de colheita, qualidade do solo, e essa falta de constância refletirá no efeito pretendido do produto. De acordo com estudo de Santos *et al.* (2006), há uma correlação entre condições climáticas com o teor de taninos das cascas de barbatimão. Os autores concluíram que as cascas colhidas no período quente e chuvoso apresentaram maiores concentrações desses compostos fenólicos, em oposição às colhidas nos meses de menor precipitação – provavelmente porque neste período há maior proliferação de insetos e fitopatógenos, o que estimula o aumento de metabólitos secundários, que atuam na defesa das plantas.

Desta forma, optou-se por avaliar as concentrações imediatamente superiores às encontradas anteriormente. Nelas, a morte das bactérias foi constatada. A Tabela 8 exibe as concentrações bactericidas adotadas.

Tabela 8. Concentrações bactericidas mínimas dos extratos aquosos de *S. adstringens* contra as bactérias testadas.

Bactéria	Concentração preparada	Concentração avaliada na microplaca
<i>S. aureus</i>	0,625%	0,3125%
<i>B. cereus</i>	1,25%	0,625%
<i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	5,00%	2,5%

Nota-se que as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) são mais sensíveis ao extrato, o que é evidenciado pela necessidade de concentrações menores para se atingir o efeito bactericida.

Souza *et al.* (2007) produziram o extrato das cascas de barbatimão por percolação em etanol 50% e também relataram efeito bactericida para *S. aureus* e *E. coli*. A CBM de 50 mg/L para *S. aureus* contra 75 mg/L para *E. coli* demonstra maior sensibilidade da bactérias Gram-positiva, o que vai de encontro ao resultado apresentado neste trabalho.

Farha *et al.* (2020) mencionam que de maneira geral, os valores de CIM de taninos são muito mais baixos para bactérias Gram-positivas em oposição às negativas, em razão da estrutura da parede celular bacteriana.

6.4. Avaliação temporal do extrato

Entre a primeira e a segunda semana após a produção dos extratos, foi constatado que aqueles armazenados a 20 °C estavam contaminados por fungo (Figura 26). O fato ocorreu nas 3 repetições produzidas e para as 3 concentrações, sendo que, em uma das repetições para a preparação a 1,25%, já havia fungo em uma semana. Por esse motivo, os extratos foram descartados e só apresentam resultados até o dia sete.



Figura 26. Contaminação fúngica observada nos extratos armazenados a 20 °C e confirmação da presença de fungos, com inoculação em ágar Mueller-Hinton.
Fonte: a autora.

Os resultados para os extratos armazenados em geladeira apresentam-se na Tabela 9.

Tabela 9. Atividade antioxidante e compostos fenólicos totais dos extratos produzidos na CBM e armazenados a 5 °C por 21 dias.

Concentração	Análise	Dia um	Dia sete	Dia quatorze	Dia vinte e um	Valor P
Preparado a 0,625%	Atividade antioxidante (mM)	4,23 ± 0,73 ^b	8,31 ± 1,22 ^a	7,04 ± 0,63 ^a	8,92 ± 2,06 ^a	< 0,001
	CFT (mg/L)	631,7 ± 38,0	621,6 ± 25,0	648,2 ± 12,4	652,3 ± 17,0	0,143
Preparado a 1,25%	Atividade antioxidante (mM)	11,17 ± 3,09 ^b	13,95 ± 3,21 ^{ab}	13,21 ± 0,59 ^{ab}	15,33 ± 1,00 ^a	0,021
	CFT (mg/L)	1041,8 ± 112,8	1056,4 ± 85,0	1092,8 ± 36,7	1143,4 ± 72,0	0,153
Preparado a 5%	Atividade antioxidante (mM)	39,11 ± 9,88 ^c	59,64 ± 5,7 ^{ab}	51,11 ± 3,01 ^b	70,07 ± 5,92 ^a	< 0,001
	CFT (mg/L)	5912 ± 585	5699 ± 570	5929 ± 458	5870,8 ± 151,4	0,802

¹CFT: compostos fenólicos totais. ²Valor P referente ao teste de Análise de Variância (ANOVA). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05) pelo teste de comparação múltipla *post-hoc* de Tukey.

Por meio da Figura 27 é fácil visualizar a tendência de aumento da atividade antioxidante com o passar dos dias. Nota-se também o aumento proporcional da atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em função do escalada da concentração do extrato.

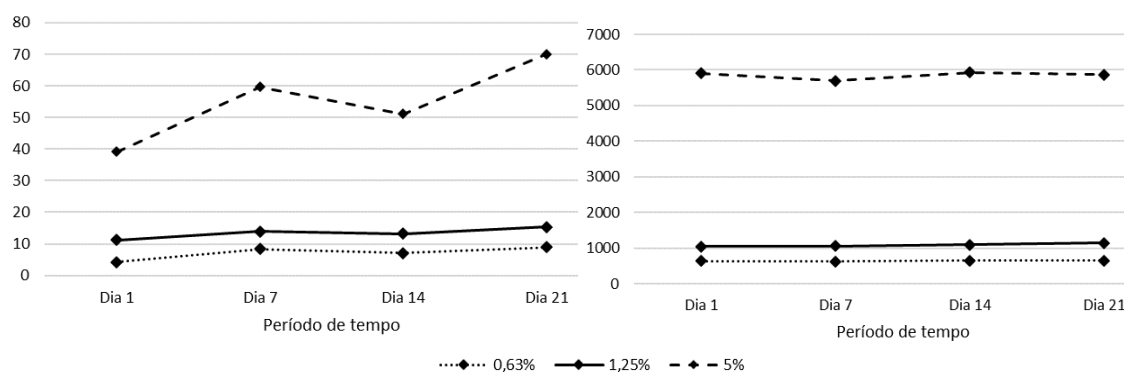


Figura 27. Atividade antioxidante (a esquerda) e teor de fenólicos totais (a direita) dos extratos produzidos na CBM e armazenados a 5 °C.
Fonte: a autora.

O aumento da atividade antioxidante ($P < 0,05$) provavelmente ocorreu como resposta ao aumento da concentração de outros compostos que apresentam função antioxidante, provavelmente de estrutura não fenólica, uma vez que estes mantiveram seu teor. Souza, Mello e Lopes (2011) indicaram que galactomananas e saponinas também são encontrados nas cascas de barbatimão.

Saponinas é o nome comum para glicosídeos que apresentam a molécula constituída de uma cadeia de açúcar ligada a um triterpeno ou a uma aglicona (Jolly; Hour; Lee, 2004). Ocorrem em diversos vegetais e manifestam diversas funções biológicas, como antimicrobiana e antioxidante (Sidana; Singh; Sharma, 2016).

Contudo, é necessário que estas substâncias tenham sido produzidas ao longo do tempo de estocagem e não foram encontrados trabalhos que relatam este efeito.

O fenômeno de incremento da atividade antioxidante em resposta ao tempo foi observado por De Castilhos (2016) em vinhos tintos. A ação é explicada como resultado da “copigmentação”, em que moléculas de pigmentos se associam, formando um novo composto – por exemplo, antocianinas

monoméricas e flavonóis, taninos e outros taninos. Os complexos de copigmentação refletem em acréscimo da concentração de compostos fenólicos totais, com consequente ação antioxidante (Boulton, 2001; De Castilhos, 2016).

Os resultados das análises dos extratos estocados a 20 °C são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Atividade antioxidante e compostos fenólicos totais dos extratos produzidos na CBM e armazenados a 20 °C por 7 dias.

Concentração	Análise	5 °C	20 °C	Valor P ²
Preparado a 0,625%	Atividade antioxidante (mM)	8,31 ± 1,22	8,30 ± 1,49	0,995
	CFT (mg/L)	621,6 ± 25,0	607,4 ± 41,6	0,425
Preparado a 1,25%	Atividade antioxidante (mM)	13,95 ± 3,21	14,93 ± 0,59	0,754
	CFT (mg/L)	1056,4 ± 85,0	1040,9 ± 16,0	0,630
Preparado a 5%	Atividade antioxidante (mM)	59,64 ± 5,7	60,37 ± 4,66	0,831
	CFT (mg/L)	5699 ± 570	5768 ± 203	0,754

¹CFT: compostos fenólicos totais. ²Valor P referente ao teste t para amostras pareadas ($\alpha = 5\%$).

A diferença de temperatura e o período de sete dias não provocaram alterações na composição química do extrato, o que é sinalizado por $P > 0,05$. Foi feita análise antimicrobiana com as amostras após sete dias de produção e elas continuaram apresentando efeito bactericida.

A contaminação com fungos filamentosos entre 7 e 14 de estocagem a 20 °C sugere que o extrato de barbatimão não é tão efetivo no combate a fungos filamentosos.

A temperatura de resfriamento (5 °C) é uma referência para a segurança de alimentos, pois nela o metabolismo da maioria dos microrganismos é reduzido, retardando seu crescimento. Já a 20 °C as reações passam a ser favorecidas. Os microrganismos mesófilos têm a temperatura ideal de crescimento entre 20 e 45 °C (Doyle; Buchanan, 2013).

7 CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu obter as seguintes conclusões:

- Decocção é o método mais adequado para produzir extratos a partir de cascas de barbatimão, polpa de jenipapo e frutos de sucupira.
- Maceração dinâmica via shaker é o melhor processo para sementes de jenipapo.
- Entre as três matrizes estudadas, os extratos de jenipapo retornaram em menor atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, ao passo que os de barbatimão conferiram os melhores resultados.
- Não foi possível avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de jenipapo e sucupira com os métodos adotados.
- O decocto de barbatimão apresentou atividade bactericida, com espectro de atuação contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) e Gram-negativas (*E. coli*, *S. enteritidis* e *P. aeruginosa*).
- Recomenda-se que os extratos de barbatimão sejam armazenados em refrigeração. Ainda, o tempo de armazenamento promove aumento na sua capacidade antioxidante.
- O extrato de barbatimão obtido por decocção em água por 5 minutos é uma fonte potente de compostos fenólicos e de atividade antioxidante, sendo promissor para estudos que almejam aplicação de matéria-prima com essas propriedades.

REFERÊNCIAS

- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current research in food science*, 4, 200–214, 2021.
- ARRUDA, H. S.; ARAÚJO, M. V. L.; MAROSTICA JUNIOR, M. R. Underexploited Brazilian Cerrado fruits as sources of phenolic compounds for diseases management: A review. *Food Chemistry: molecular sciences*. v. 5. p. 1 – 22, 2022.
- ASSIS, R. C; MONTEIRO, G. R.; VALENTIM, A. B.; MAIA, C. S. S. C.; FELIPE, S. M. S.; RABELO, C. A. F.; CECCATTO, V. M.; ALVES, C. R. Biological properties of bioactive compounds from the fruit and leaves of the genipap tree (*Genipa americana* L.): a systematic review. *Food Bioscience*, [S.L.], v. 53, p. 102514. Elsevier BV. 2023.
- ÁVILA-ROMÁN, J; SOLIZ-RUEDA, J. R.; BRAVO, F. I. ARAGONÈS, G.; SUÁREZ, M.; AROLA-ARNAL, A.; MULERO, M.; SALVADÓ, M.; AROLA, L.; TORRES-FUENTES, C. Phenolic compounds and biological rhythms: who takes the lead? *Trends In Food Science & Technology*, [S.L.], v. 113, p. 77-85, Elsevier BV, 2021.
- BAINES, D.; SEAL, R. *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings*. Elsevier, 2012.
- BALDIVIA, D.; LEITE, D.; CASTRO, D.; CAMPOS, J.; SANTOS, U.; PAREDES-GAMERO, E.; CAROLLO, C.; SILVA, D.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. Evaluation of In Vitro Antioxidant and Anticancer Properties of the Aqueous Extract from the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens*. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 2432, 2018.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G.. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 123-130. FapUNIFESP (SciELO). 1999.
- BIOMAS brasileiros. IBGE. Disponível em: <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/territorio/18307-biomas-brasileiros.html>. Acesso em: 02 fev. 2024.
- BOULTON, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v. 52, n. 2, p. 67-87, 2001.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, London, v. 28, p. 25-30, 1995

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: Anvisa, 2020.

BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2 ed., 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 724, de 1 de julho de 2022. Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. Diário oficial da União, Brasília, 6 de julho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. Instrução normativa n° 211, de 1 de março de 2023. Estabelece as funções tecnológicas, os limites máximos e as condições de uso para os aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 8 de março de 2023.

CARDONA, F.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TULIPANI, S.; TINAHONES, F. J.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(8), 1415–1422, 2013

CAROCHO, M; MORALES, P; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: *Quo vadis?* Trends in food Science and technology. V. 45, p. 284-295, 2015.

CARVAHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica ; Colombo, PR : Embrapa Florestas, 2003. 1.039p. v. 1.

CARVAHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica ; Colombo, PR : Embrapa Florestas, 627 p. v. 2, 2006.

CARVALHO, A. P. A. de; CONTE-JUNIOR, C. A. Health benefits of phytochemicals from Brazilian native foods and plants: Antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, and risk factors of metabolic/endocrine disorders control. Trends in Food Science & Technology, [s. l.], v. 111, p. 534–548, 2021.

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2.

Campinas: Editora Unicamp, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M07-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – Wayne, Estados Unidos: NCCLS, 9 ed., v. 32, n.2, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. Wayne, Estados Unidos: NCCLS, 2 ed., v. 23, n. 1, 2003.

DE CARVALHO, A. T.; PAES, M. M.; CUNHA, M. S.; BRANDÃO, G.C.; MAPELI, A. M.; RESCIA, V. C.; OESTERREICH, S. A.; VILLAS-BOAS, G. R. Ethnopharmacology of Fruit Plants: A Literature Review on the Toxicological, Phytochemical, Cultural Aspects, and a Mechanistic Approach to the Pharmacological Effects of Four Widely Used Species. *Molecules* , 25, 3879, 2020.

DE CASTILHOS, M. B. M. Desenvolvimento e caracterização de vinhos tintos a partir de uvas cultivadas no noroeste paulista. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2012.

DE CASTILHOS, M.B.M; CORRÊA, O. L. D. S; ZANUS, M. C, MAIA, J. D. G; GÓMEZ-ALONSO, S; GARCÍA-ROMERO, E; DEL BIANCHI, V. L; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Pre-drying and submerged cap winemaking: Effects on polyphenolic compounds and sensory descriptors. Part I: BRS Rúbea and BRS Cora. *Food Research International*. p. 374-384, 2015.

DE CASTILHOS, M. B. M. Vinificação em tinto de uvas americanas: efeito das técnicas de pré-secagem das uvas e de chapéu submerso nos perfis químico e sensorial. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2016.

DE JÚNIOR, D. L. S.; DA SILVA, Í. M.; BENJAMIM, L. E.; TEOTÔNIO, O.; GONÇALVES, F. J.; TÔRRES, C. M.; SALVIANO, R. C.; LEANDRO; LOPES, M.J.P.; DE AQUINO, P. E. A.; et al. Efeito antimicrobiano e modulador do extrato hidroalcoólico de *Genipa americana* (Jenipapo). *Rev. Saúde (Sta. Maria)* 2019.

DELFANIAN, M.; SAHARI, M. A. Improving functionality, bioavailability, nutraceutical and sensory attributes of fortified foods using phenolics-loaded nanocarriers as natural ingredients. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 137, 109555. 2020.

DONATI, M.; MONDIN, A.; CHEN, Z.; MIRANDA, F. M.; DO NASCIMENTO, B. B.; SCHIRATO, G.; FROLDI, G. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, *trans*-anethole, β -caryophyllene and myrcene. *Natural Product Research*, 29(10), 939–946, 2015

DOS SANTOS J. G.; FERNANDES C. C.; SILVA N. B. S. Volatile compounds of hexane extract from *Pterodon pubescens* Benth seeds and its significant *in vitro* potential against different bacterial strains. *Natural Product Research*, 2023.

DOYLE, M. P; BUCHANAN, R. L. Michael. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 4ed. Whashington: ASM Press, 2013.

DUTA, R. C.; LEITE, M. N.; BARBOSA, N. R. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* vogel seeds. *International journal of molecular sciences*, 9(4), 606–614, 2008.

DUTRA, R. C; CAMPOS M. M; SANTOS A. R.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological research*. 2016; 112:4-29, 2016.

FARHA, A.K., YANG, Q., KIM, G., LI, H., ZHU, F., LIU, H., GAN, R., & CORKE, H. Tannins as an alternative to antibiotics. *Food bioscience*, 38, 100751, 2020.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança dos alimentos. 2. ed. Porto Alegre : Artmed, 2013.

GONÇALVES, A. L. Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais. 209p. Tese (Doutorado em Ciências biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

GUARLADO, L. O que é Cerrado: características e biodiversidade. IPAM Amazônia. Disponível em: https://ipam.org.br/o-que-e-cerrado-caracteristicas-biodiversidade-e-desmatamento/?gad_source=1&gclid=CjwKCAjw5lmwBhBtEiwAFHDZx16BeYjS-Uqj62vUVREuLpQQFBORRnD7GHZYd_N30g0JyBr3nAnRGhoC6VoQAvD_BwE. Acesso em: 10 mar. 2024.

HOLETZ, F. B., PESSINI, G. L., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A., NAKAMURA, C. V., & FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027–1031. 2002.

HORTO Didático de Planta Medicinais do HU/CCS. Sucupira-branca. Florianópolis, 2020. Disponível em: <https://hortodidatico.ufsc.br/sucupira-branca/>. Acesso em: 07 mar. 2024.

JOLLY, A.; HOUR, Y.; LEE, Y. C. An outlook on the versatility of plant saponins: A review. *Fitoterapia*, 174, 105858, 2024.

JORGE, N. Química e tecnologia de óleos vegetais. São Paulo: Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação, 165p, 2009.

KINUPP, V. F. Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS. 2007. 590 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

LAMEIRA, O. A.; SANTOS, M. A. C. dos; PARACAMPO, N. E. N. P.; FERREIRA, M. C. *Stryphnodendron adstringens*: Barbatimão. In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; VIEIRA, I. C. G. (ed.). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Norte. Brasília, DF: MMA, 2022. p. 1088-1094, 2022.

LI, Y.; KONG, D.; FU, Y.; SUSSMAN, M. R.; WU, H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant physiology and biochemistry*. v. 148, p. 80–89, 2020.

LIMA NETO, G. A.; KAFFASHI, S.; LUIZ, W. T.; FERREIRA, W. R.; DIAS DA SILVA, Y. S. A.; PAZIN, G. V.; VIOLANTE, I. M. P. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 17, n. 4, p. 1069–1077, 2015.

MACHADO, T. F.; BRUNO, L. M. Potencial uso de antimicrobianos de plantas na conservação de alimentos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 17 p., 2022.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock*. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAMARI, H. A. Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.98958. 2021.

MENDES, V. S.; SANT'ANNA, J. B.; OLIVEIRA, S. C. C.; MALDONADE, I. R.; MACHADO, E. R.. Inhibitory Effects of *Pterodon emarginatus* Bean Oil and Extract on *Staphylococcus aureus*. *Pharmacognosy research*, 9(4), 348–353. 2017.

MINISTÉRIO da Saúde. Febre tifoide. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-tifoide#:~:text=Nesse%20contexto%2C%20a%20Febre%20Tifoide,nas%20regi%C3%B5es%20Norte%20e%20Nordeste>. Acesso em: 03 mar. 2024.

MOLINO, S., PILAR FRANCINO, M., & ÁNGEL RUFÍAN HENARES, J. Why is it important to understand the nature and chemistry of tannins to exploit their potential as nutraceuticals?. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 173(Pt 2). 2023.

NASCIMENTO, K. M.; SILVA, L. A.; CAVALHEIRO, J. B.; MADRONA, G. S.; SCAPIM, M. R. S.; BERGAMASCO, R. C. Otimização das condições de extração para compostos bioativos em barbatimão (*Stryphnodendron Adstringens* (Mart.) Coville) usando metodologia de superfície de resposta. *Brazilian Journal Of Development*, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 24882-24898, Brazilian Journal of Development, 2020.

NERI-NUMA, I. A., PESSÔA, M. G., ARRUDA, H. S., PEREIRA, G. A., PAULINO, B. N., ANGOLINI, C. F. F., RUIZ, A. L. T. G., & PASTORE, G. M. Genipap (*Genipa americana* L.) fruit extract as a source of antioxidant and antiproliferative iridoids. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 134, 109252. 2020.

NIETO, G.; ROS, G.; CASTILLO, J. Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines (Basel, Switzerland)*, v. 5, n. 3, 2018.

OLIVEIRA, J. R.; DE CASTRO, V. C.; DAS GRAÇAS FIGUEIREDO VILELA, P.; CAMARGO, S. E.; CARVALHO, C. A.; JORGE, A. O.; DE OLIVEIRA, L. D. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 208. 2013.

OMENA, Cristhiane Maria Bazílio; VALENTIM, Iara Barros; GUEDES, Glaucivane da S.; RABELO, Luiza A.; MANO, Camila Marinho; BECHARA, Etelvino José Henriques; SAWAYA, Alexandra C.H.F.; TREVISAN, Maria Teresa Salles; COSTA, João Gomes da; FERREIRA, Roberta Costa Silva. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. *Food Research International*, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 334-344. Elsevier BV. 2012.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PASTERAN, F., et al. Development and validation of simple tests (agar spot, colistin drop, 1ml-broth disk elution MIC and tablet pre-diffusion) as an alternative to improve accuracy in screening chromosomal and plasmid-mediated colistin resistance in Gram-negative bacilli. ECCMID. 2018.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; GEORGESCU, C.; TURCUS, N. K.; OLAH, E. M. An overview of natural antimicrobials role in food. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.11.095.

PROMEGA. CellTiter-Blue® cell viability assay instructions for use of products. 2022. Disponível em: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol.pdf>. Acesso em: 07 mar. 2024.

PROMEGA. Como medir a viabilidade celular? Disponível em: <https://www.promega.com.br/c/blog-jovem-pesquisador/articles/teste-de-viabilidade-celular/>. Acesso em 5 abr. 2024.

RAKHOLIYA, K.; VAGHELA, P.; RATHOD, T.; CHANDA, S. Comparative study of hydroalcoholic extracts of *Momordica charantia* L. against foodborne pathogens. Indian journal of pharmaceutical sciences. v. 76, n. 2, p. 148– 156. 2014.

REIS, A. F.; SCHMIELE, M. Características e potencialidades dos frutos do Cerrado na indústria de alimentos. Brazilian Journal of Food Technology, v. 22, e. 2017150, 2019.

RIBEIRO, M. M. S.; SANTOS, L. C.; NOVAIS, N. S.; VIGANÓ, Juliane; VEGGI, P. C. An evaluative review on *Stryphnodendron adstringens* extract composition: current and future perspectives on extraction and application. Industrial Crops And Products, [S.L.], v. 187, p. 115325, Elsevier BV, 2022.

ROCHA, D. M. S. Aspectos taxonômicos, genéticos e reprodutivos de *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. e *P. emarginatus* Vog. (Leguminosae, Dipteryxaceae). 2006. 117p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP.

SANTOS FILHO, P. R. dos; FERREIRA, L. A; GOUVÊA, C. M. C. Paiva. Protective action against chemical-induced genotoxicity and free radical scavenging activities of *Stryphnodendron adstringens*. Revista Brasileira de Farmacognosia, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 1000-1005, dez. 2011. Springer Science and Business Media LLC, 2011.

SANTOS, Fabíola Brandão dos; RAMOS, Maria Isabel Lima; MIYAGUSKU, Luciana. Antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts from genipap, baru and

taruma. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 47, n. 8, p. 1-6, FapUNIFESP (SciELO), 2017.

SANTOS, Suzana C.; COSTA, Wesley F.; BATISTA, Fernando; SANTOS, Lúcio R.; FERRI, Pedro H.; FERREIRA, Heleno D.; SERAPHIN, José C.. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 552-556, Springer Science and Business Media LLC, 2006.

SHENOY, N.; STENSON, M.; LAWSON, J. *et al.* Drugs with anti-oxidant properties can interfere with cell viability measurements by assays that rely on the reducing property of viable cells. *Lab Invest* 97, 494–497, 2017.

SIDANA, J., SINGH, B., & SHARMA, O. P. Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, 130, 22–46, 2016.

SIDDIQ, M.; DOLAN, K. D. Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food chemistry*, 218, 216–220. 2017.

SILVA, I. D.; TAKATSUKA, F. S.; ROCHA, M. R.; CUNHA, M. G. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 35 (2): 109-115, 2005.

SINGH, S. Antioxidant nanozymes as next-generation therapeutics to free radical-mediated inflammatory diseases: A comprehensive review. *International journal of biological macromolecules*, 260, (Pt 1), 129374, 2024.

Sistema da Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR). Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/291536#names>. Acesso em 12 de mar. de 2024.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v. 28, p. 49-55, 1977.

SOARES, H. Um surto de origem alimentar que ficou na história: Jack in the Box. *Food Safety Brazil*, 2013. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/vinte-anos-surto-alimentar-jack-in-the-box/>. Acesso em: 02 fev. 2024.

SOONG, Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, [S.L.], v. 88, n. 3, p. 411-417, Elsevier BV, 2004.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. *Farmacognosia: coletânea científica*. Ouro Preto: UFOP, 2011. 372 p.

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. Revista Brasileira de Farmacognosia, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 71-75, mar. Springer Science and Business Media LLC, 2007.

SPOSITO, L. Caracterização biológica e prospecção terapêutica de *Casearia sylvestris* Swartz não incorporada e incorporada em sistema nanoestruturado na atividade anti-*Helicobacter pylori*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 96 p., 2017.

TILLEY, A; MCHENRY, M. P; MCHENRY, J. A.; SOLAH, V.; BAYLISS, K. Enzymatic browning: The role of substrates in polyphenol oxidase mediated browning. Current Research in Food Science. v. 7, p. 100623, 2023.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 16 p., 2010.

ZHANG Q. W.; LIN L. G.; YE W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. Chinese Medicine. 2018;13:20, 2018.