



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINE DA ROCHA TONETTI

OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO FRUTO JAMBOLÃO

(*Syzygium cumini*):

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS,
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA

CAROLINE DA ROCHA TONETTI

OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO FRUTO JAMBOLÃO

(*Syzygium cumini*):

**IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS,
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa.
Coorientador: Profa. Dra. Sandra Regina Georgetti.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Tonetti, Caroline da Rocha.

OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO FRUTO JAMBOLÃO (*Syzygium cumini*): IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS, AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA / Caroline da Rocha Tonetti. - Londrina, 2017.
90 f.: il.

Orientador: Nilton Syogo Arakawa.

Coorientador: Sandra Regina Georgetti.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Inclui bibliografia.

1. *Syzygium cumini* - Tese. 2. Antioxidante - Tese. 3. Antimicrobiana - Tese. 4. ESI-MS-MS - Tese. I. Syogo Arakawa, Nilton. II. Regina Georgetti, Sandra. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CAROLINE DA ROCHA TONETTI

**OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO FRUTO JAMBOLÃO
(*Syzygium cumini*):**

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS, AVALIAÇÃO DA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Departamento de Química da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Orientador: Profa. Dra. Sandra R. Georgetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcelle de Lima Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 11 de Agosto de 2017.

Dedico este trabalho aos meus amados pais Almir e Elaine.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder uma vida repleta de bênçãos, oportunidades e por toda ajuda para chegar até aqui, sem ele nada disso seria possível.

Aos meus pais Elaine e Almir (*In memoriam*) que durante esse período partiu, mas deixou-me um exemplo de vida e superação. Obrigada por todo amor, dedicação, incentivo, suporte e por acreditarem em mim!

Ao meu querido irmão Pedro pelo carinho, companheirismo e amor incondicional.

Ao Raoni meu namorado, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos durante toda minha caminhada, pelo carinho, amizade, força e seus conselhos para nunca desistir dos meus sonhos.

Agradeço ao meu orientador, professor Nilton Syogo Arakawa, por todos ensinamentos, apoio, disposição em me orientar e incentivo. Obrigada pela confiança depositada em mim. Valeu a experiência, foi bom trabalhar com você!

À professora Sandra Georgetti que colaborou no desenvolvimento desta dissertação, pelos ensinamentos transmitidos e por ter disponibilizado o seu laboratório para que as análises fossem realizadas.

Ao professor Gerson Nakazato que sempre esteve disposto a me ajudar com muita dedicação e por ter me acolhido em seu laboratório.

À Érica Pelegrin e Sara Scandorieiro por toda dedicação, tempo disponibilizado, auxílio no laboratório e ensinamentos.

À Cristiana Gonzaga, pela amizade, risadas, choros, broncas, convívio e aprendizado. Obrigada!

Aos meus colegas da turma de mestrado em Química, Cristiana Melo, Simone Birkheur, Ingrid Barbosa, Paula Rivero, Leandro Marcondes e Galileu Malta pela troca de conhecimento, risos e auxílio nos momentos de dificuldades.

À Universidade Estadual de Londrina por me acolheu e ceder o espaço para que esta pesquisa fosse realizada.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada!

**“O êxito da vida não se mede pelo caminho
que você conquistou, mas sim pelas
dificuldades que superou no caminho.”
(Abraham Lincoln)**

TONETTI, Caroline da Rocha. **Obtenção do extrato bruto do fruto jambolão (*Syzygium cumini*):** identificação dos compostos bioativos, avaliação da capacidade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica. 2017. 90 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O fruto *Syzygium cumini* conhecido popularmente como Jambolão apresenta propriedades medicinais devido à presença de metabólitos secundários, dentre os quais se destacam os compostos fenólicos, que possuem atividade farmacológica como antioxidante e antimicrobiana. O presente trabalho teve como objetivo investigar os compostos químicos do fruto Jambolão, avaliar seu potencial antioxidante, citotóxico e sua atividade antimicrobiana frente a células sésseis e planctônicas. Foram obtidos cinco extratos (EBE100, EBE70, EBE50, EBE30, EBA100) da polpa e casca do fruto. Os extratos foram submetidos às análises para quantificar compostos fenólicos, flavonoides totais e avaliar sua atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS, FRAP e quelação de íon ferro, visando determinar o melhor solvente que extraísse metabólitos secundários com potencial antioxidante. O extrato EBE100 apresentou os melhores resultados nas análises realizadas demonstrando um teor de compostos fenólicos de 10,92 mgGAE.g⁻¹; Flavonoides totais de 4,02 mgRTE.g⁻¹, e valores de IC₅₀ de 111,99 µg.mL⁻¹, 83,55 µg.mL⁻¹ e 300,22µg.mL⁻¹ para DPPH, ABTS e Batofenantrolina e para FRAP 98,97 µmol/L eq. trolox/µg.mL⁻¹. Os principais compostos do extrato EBE100 foram identificados por ESI-MS/MS pela técnica de MRM nos modos positivos e negativos, indicando a presença de Ácido gálico, Ácido *p*-hidroxibenzóico, Malvidina-3-Oglicosídeo, Petunidina-3-O-glicosídeo, Delfinidina-3-O-glicosídeo, Cianidina-3-Oglicosídeo, Malvidina-3,5-O-diglicosídeo e Petunidina-3,5-O-diglicosídeo. Os resultados de citotoxicidade para eritrócitos humanos tratados com extrato EBE100 apresentou atividade hemolítica baixa mesmo na mais alta concentração testada de 10000 µg.mL⁻¹ com 3,97% de hemólise. O extrato EBE100 não apresentou atividade antimicrobiana no teste por difusão em ágar e o ensaio de microdiluição seriada determinou uma concentração inibitória mínima (CIM) acima de 2000 µg.mL⁻¹ frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. A avaliação para biofilme de *E.coli* em formação mostrou que o extrato EBE100 nas concentrações de 500, 1000 e 2000 µg/mL apresentaram redução de biomassa em 48,18%, 64,14% e 80,09% e para células viáveis uma redução de 17,51%, 25,08% e 37,59%, respectivamente. Para biofilme formado os resultados obtidos nos tratamentos com o extrato EBE100 em 24 e 48 horas foram de 1,56% e 2,43% (250 µg/mL), 2,49% e 2,95% (500 µg/mL), 2,47% e 4,14% (1000 µg/mL), 3,83% e 4,19% (2000 µg/mL) e de 4,46% e 6,21% (4000 µg/mL), respectivamente. Portanto, os resultados sugerem que o extrato EBE100 do fruto jambolão apresenta compostos bioativos que podem ser atribuídos a atividade antioxidante e antibiofilme.

Palavras-chave: *Syzygium cumini*. Antioxidante. Antimicrobiana. Biofilme. ESI-MSMS.

TONETTI, Caroline da Rocha. **Obtation the crude extract of the fruit jambolão (*Syzygium cumini*):** identification of bioactive compounds, evaluation of antioxidant, antimicrobial and cytotoxic capacity. 2017. 90 p. Dissertation (Master's degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The fruit *Syzygium cumini* popularly known as Jambolão presents medicinal properties due to the presence of secondary metabolites. Among them, the phenolic compounds stand out because they are responsible for the pharmacological activity as antioxidant and antimicrobial. The present work aimed to investigate the chemical compounds of the Jambolão fruit, to evaluate its antioxidant potential, cytotoxicity and its antimicrobial activity against sessile and planktonic cells. Five extracts (EBE100, EBE70, EBE50, EBE30, EBA100) were obtained from fruit pulp and peel. The extracts were submitted to the assays to quantify phenolic compounds, total flavonoids and to evaluate their antioxidant activity by the methods of DPPH, ABTS, FRAP and iron ion chelation, in order to determine the best solvent that extracts secondary metabolites with antioxidant potential. The EBE100 extract showed the best results in the analyzes performed demonstrating a phenolic compound content of 10.92 mgGAE.g⁻¹; Total flavonoids of 4.02 mgRTE.g⁻¹, and IC₅₀ values of 111.99 µg.mL⁻¹, 83.55 µg.mL⁻¹, 98.97 µmol/L eq. Trolox/µg.mL⁻¹ and 300.22 µg.mL⁻¹ for DPPH, ABTS, FRAP and Bataphenanthroline, respectively. The major compounds of the EBE100 extract were identified by ESI-MS / MS by the MRM technique in positive and negative modes, indicating the presence of Gallic Acid, p-hydroxybenzoic Acid, Malvidine-3-O-glycoside, Petunidin-3-O- Glycoside, Delfinidine-3-O-glycoside, Cyanidin-3-O-glycoside, Malvidine-3,5-O-diglycoside and Petunidine-3,5-Odiglycoside. The cytotoxicity results for human erythrocytes treated with EBE100 extract showed low hemolytic activity even at the highest tested concentration of 10000 µg.mL⁻¹ with 3.97% hemolysis. The EBE100 extract did not show antimicrobial activity in the agar diffusion test and the serial microdilution assay determined a minimum inhibitory concentration (MIC) above 2000 µg.mL⁻¹ against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. The evaluation of the *E.coli* biofilm in formation showed that the EBE100 extract at the concentrations of 500, 1000 and 2000 µg/mL had a biomass reduction of 48.18%, 64.14% and 80.09% and for viable cells one Reduction of 17.51%, 25.08% and 37.59%, respectively. For the obtained biofilm, the results in the treatments with the extract EBE100 in 24 and 48 hours were of 1.56% and 2.43% (250 µg/mL), 2.49% and 2.95% (500 µg/mL), 2.47% and 4.14% (1000 µg/mL), 3.83% and 4.19% (2000 µg/mL) and 4.46% and 6.21% (4000 µg/mL), respectively. Therefore, the results suggest that the EBE100 extract of the jambolão fruit presents bioactive compounds that can be attributed to antioxidant and anti-biofilm activity.

Keywords: *Syzygium cumini*. Antioxidant. Antimicrobial. Biofilm. ESI-MS-MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Árvore, flor, fruto maduro e aparência interna do Jambolão (<i>S. cumini</i>) | 19 |
| Figura 2 - Estruturas químicas dos ácidos fenólicos: a) ácido benzóico e b) ácidos cinâmico | 21 |
| Figura 3 - Estrutura de proantocianidina epicatequina, 4,8-catequina | 22 |
| Figura 4 - Estrutura do tanino hidrolisáveis 1,2,3,4,6-pentagalactose | 23 |
| Figura 5 - Estrutura básica dos flavonoides | 24 |
| Figura 6 - Estruturas das principais classes de flavonoides..... | 24 |
| Figura 7 - Estrutura antocianina cianidina 3-glucosídeo | 25 |
| Figura 8 - Estrutura molecular da quercetina | 29 |
| Figura 9 - Etapas de desenvolvimento do biofilme, 1) Adesão inicial; 2) Crescimento; 3) Estruturação; 4) Biofilme maduro; 5) Dispersão | 32 |
| Figura 10 - Reação do ácido gálico com molibdênio | 33 |
| Figura 11 - Reação do radical DPPH com antioxidante | 34 |
| Figura 12 - Redução do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio | 35 |
| Figura 13 - Formação do complexo $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ a partir do complexo $[\text{Fe}(\text{III})(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ por um antioxidante..... | 36 |
| Figura 14 - Quelação do íon ferro com a quercetina..... | 37 |
| Figura 15 - Componentes principais do espectrômetro de massas | 38 |
| Figura 16 - Analisador de massa quadrupolo | 40 |
| Figura 17 - Esquema de funcionamento de múltiplas reações monitoradas em um espectrômetro de massa triplo-quadrupolo..... | 40 |
| Figura 18 - Estrutura do corante cristal violeta..... | 41 |
| Figura 19 - Estrutura de MTT reduzido a formazan | 42 |
| Figura 20 - Teores de compostos fenólicos para os cinco extratos brutos do fruto <i>S. cumini</i> | 55 |
| Figura 21 - Teores de flavonoides para os cinco extratos brutos do fruto <i>S. cumini</i> | 56 |
| Figura 22 - MRM do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (<i>S. cumini</i>) para ácido gálico (169 m/z) e Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (137 m/z) para o modo negativo | 62 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 23 - MRM do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (<i>S. cumini</i>) para malvidina-3-O-glicosídeo (493 <i>m/z</i>), petunidina-3-O-glicosídeo (479 <i>m/z</i>), delphinidina-3-O-glicosídeo (465 <i>m/z</i>) e cianidina-3-O-glicosídeo (449 <i>m/z</i>) para o modo positivo..... | 63 |
| Figura 24 - MRM do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (<i>S. cumini</i>) para malvidina-3,5-O-diglicosídeo (655 <i>m/z</i>) e petunidina-3,5-Odiglicosídeo (641 <i>m/z</i>) para o modo positivo..... | 64 |
| Figura 25 - Atividade hemolítica do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (<i>S.cumini</i>)..... | 65 |
| Figura 26 - Redução de biomassa total do biofilme de <i>E.coli</i> na presença do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (<i>S. cumini</i>) | 69 |
| Figura 27 - Redução de células viáveis sésseis do biofilme de <i>E.coli</i> na presença do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (<i>S. cumini</i>) | 70 |
| Figura 28 - Redução de células viáveis sésseis do biofilme formado de <i>E.coli</i> na presença do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (<i>S. cumini</i>) | 72 |

LISTA DE TABELA

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Estrutura das antocianidinas mais comuns | 25 |
| Tabela 2 - Capacidade antioxidante dos extratos brutos do fruto Jambolão (<i>S.cumini</i>) por diferentes métodos..... | 57 |
| Tabela 3 - Dados de MRM para o extrato EBE100 do fruto Jambolão (<i>S.cumini</i>) | 61 |
| Tabela 4 - Atividade antimicrobiana do extrato EBE100 do fruto Jambolão (<i>S. cumini</i>)..... | 66 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| ABTS | 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazoleína)-6-ácido sulfônico |
| AN | Ágar Nutriente |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BPS | Batofenantrolina |
| CC ₅₀ | Concentração Citolóxica a 50% |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CV | Cristal Violeta |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picril-hidrazil |
| DMEM | Meio Eagle Modificado de Dulbecco |
| EBE100 | Extrato Bruto etanólico 100% |
| EBE70 | Extrato Bruto etanólico 70% |
| EBE50 | Extrato Bruto etanólico 50% |
| EBE30 | Extrato Bruto etanólico 30% |
| EBA100 | Extrato Bruto aquoso 100% |
| EROs | Espécies Reativas de Oxigênio |
| ERNs | Espécies Reativas de Nitrogênio |
| ESI | Eletrospray |
| ESI-tandem-MS | Espectrometria de Massas por Ionização Eletrospray em Modo Sequencial |
| EPS | Exopolissacarídica |
| FRAP | Ferric Reducing Antioxidant Power |
| g | Grama |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| HNO ₂ | Ácido Nitroso |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| IC ₅₀ | Concentração Inibitória em 50% |
| LB | Luria Bertani |
| <i>m/z</i> | Razão Massa Carga |
| mgGAE | Miligramas Equivalentes De Ácido Gálico |
| mgRTE | Miligramas Equivalentes De Rutina |

| | |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------|
| MH | Mueller Hinton |
| MRM | Múltiplas Reações Monitoradas |
| MS | Espectrometria de Massa |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio |
| nm | Nanômetro |
| N_2O_3 | Óxido Nitroso |
| $\cdot NO$ | Óxido Nítrico |
| NO_3^- | Nitritos |
| NO_3^- | Nitratos |
| $O_2^{\cdot -}$ | Ânion Superóxido |
| OH^{\cdot} | Radical Hidroxil |
| 1O_2 | Oxigênio Singlete |
| $ONOO^-$ | Peroxinitritos |
| PBS | Tampão Fosfato-Salina |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| QS | <i>Quorum Sensing</i> |
| RO_2^{\cdot} | Radical Peroxil |
| PR | Paraná |
| rpm | Rotação por Minuto |
| TPTZ | 2,4,6 tripiridil-S-triazina |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| UEL | Universidade Estadual de Londrina |
| v/v | Volume/Volume |
| $\mu g \cdot mL^{-1}$ | Microgramas por Mililitros |
| μL | Microlitros |
| μm | Micrometro |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 18 |
| 2.1 | JAMBOLÃO | 18 |
| 2.2 | COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO FRUTO JAMBOLÃO (<i>S. cumini</i>) | 20 |
| 2.2.1 | Compostos Fenólicos | 20 |
| 2.2.1.1 | Ácidos fenólicos..... | 21 |
| 2.2.1.2 | Taninos..... | 22 |
| 2.2.1.3 | Flavonoides | 23 |
| 2.2.1.4 | Antocianinas | 24 |
| 2.3 | ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 26 |
| 2.4 | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 30 |
| 2.4.1 | Biofilme..... | 31 |
| 2.5 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DOS MÉTODOS | 33 |
| 2.5.1 | Capacidade de Redução do Folin-Ciocalteu | 33 |
| 2.5.2 | Determinação da Atividade Doadora de Átomos de Hidrogênio ao Radical DPPH' | 34 |
| 2.5.3 | Determinação da Atividade Doadora de Elétrons ao Radical ABTS..... | 35 |
| 2.5.4 | Determinação do Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP) | 36 |
| 2.5.5 | Determinação da Atividade Queladora do Fe ²⁺ | 37 |
| 2.5.6 | Espectrometria de Massas | 37 |
| 2.5.7 | Atividade Antimicrobiana Frente a Biofilme | 41 |
| 3 | OBJETIVOS | 43 |
| 3.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 43 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 44 |
| 4.1 | MATERIAL VEGETAL | 44 |
| 4.2 | OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS..... | 44 |
| 4.2.1 | Determinação do Conteúdo de Polifenóis Totais..... | 44 |
| 4.2.2 | Determinação do Conteúdo de Flavonoides Totais..... | 45 |
| 4.2.3 | Determinação da Atividade Doadora de Átomos de Hidrogênio ao Radical DPPH' | 45 |

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.4 | Determinação da Atividade Doadora de Elétrons ao Radical ABTS..... | 46 |
| 4.2.5 | Determinação do Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP) | 47 |
| 4.2.6 | Determinação da Atividade Queladora do Fe ₂₊ | 47 |
| 4.3 | IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA..... | 48 |
| 4.3.1 | Instrumental..... | 48 |
| 4.3.2 | Preparo do Extrato para Análise em ESI/MS..... | 48 |
| 4.3.3 | Condições de Múltiplas Reações Monitoras (MRM)..... | 49 |
| 4.4 | CITOTOXICIDADE | 49 |
| 4.5 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 49 |
| 4.5.1 | Cepas Bacterianas | 49 |
| 4.5.2 | Disco-Difusão em Ágar..... | 50 |
| 4.5.3 | Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)..... | 50 |
| 4.5.4 | Atividade Antimicrobiana Frente a Biofilme | 51 |
| 4.5.4.1 | Ensaio de cristal violeta para análise de biofilme em formação | 51 |
| 4.5.4.2 | Ensaio de MTT para análise de biofilme em formação..... | 51 |
| 4.5.4.3 | Ensaio de MTT para análise de biofilme formado | 52 |
| 4.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 53 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 54 |
| 5.1 | ENSAIOS PRÉVIOS DOS EXTRATOS..... | 54 |
| 5.2 | AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS BRUTOS DE <i>S. cumini</i> | 57 |
| 5.3 | IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA..... | 60 |
| 5.4 | CITOTOXICIDADE | 64 |
| 5.5 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 66 |
| 5.5.1 | Disco-Difusão em Ágar e Concentração Inibitória Mínima (CIM) | 66 |
| 5.5.2 | Atividade Antimicrobiana Frente a Biofilme | 68 |
| 5.5.2.1 | Ação sobre biofilme em formação pelos métodos colorimétricos utilizando cristal violeta e MTT | 68 |
| 5.5.2.2 | Ensaio de MTT para análise da atividade antimicrobiana sobre biofilme formado | 71 |
| 6 | CONCLUSÃO | 74 |
| | REFERÊNCIAS..... | 75 |

1 INTRODUÇÃO

Há tempos os produtos naturais são utilizados pela humanidade, sendo a única fonte terapêutica para os povos primitivos. Desde então, por apresentar propriedades medicinais as plantas são usadas na medicina popular para a prevenção e cura de doenças (CARTAXO, 2014). No início do século XIX, com o desenvolvimento da química, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos, visando a obtenção de novos compostos com atividades terapêuticas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

As propriedades medicinais das frutas são atribuídas à presença de metabólitos secundários, dentre os quais se destacam os compostos fenólicos que atribuem atividades farmacológicas como antioxidante e antimicrobiana (MELO et al., 2008). As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos estão associadas à sua estrutura química e seu poder redutor, bem como a quelação de metais, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na de propagação do processo oxidativo, formando intermediários estáveis por ressonância (SOUSA, et al., 2007).

Em adição, uma área que está em evidência é o estudo da atividade antimicrobiana de compostos secundários de plantas, para possível introdução de novos ativos como alternativa aos antibióticos sintéticos. Tratando-se de antimicrobiano, tal necessidade torna-se mais evidente ao considerar o aparecimento de formas bacterianas resistentes frente aos fármacos (OLIVEIRA et al., 2006; CARTAXO, 2014), decorrentes principalmente do uso indiscriminado e mal orientado deste tipo de produto (PANCHAVARNAKILI et al., 2012).

A flora brasileira possui inúmeras espécies vegetais, muitas consideradas importantes matérias-primas, outras já incorporadas ao hábito alimentar e algumas pouco conhecidas e que poderiam ser incorporadas à dieta, como o fruto *Syzygium cumini* conhecido popularmente como jabolão. A utilização do fruto Jabolão na dieta e na fabricação de produtos industrializados ainda é bastante restrita, indicando a necessidade de pesquisas com intuito de trazer informação sobre seus benefícios à saúde humana (PEREIRA, 2011).

A presença de ácidos fenólicos, antocianinas e taninos têm sido relatada em *S. cumini*, mostrando uma relação com a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, o que justifica o seu uso na medicina popular (LIMA et

al., 2007; BRITO et al., 2007).

Considerando o valor farmacológico e o uso popular do fruto jambolão, o presente trabalho teve como objetivo investigar os principais compostos químicos do extrato bruto do fruto, avaliar seu potencial antioxidante, antimicrobiano e citotóxico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 JAMBOLÃO

A espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels apresenta várias sinonímias científicas, como *Eugenia jambolana* Lam., *Syzygium jambolanum* D.C., *S. caryophyllifolium* D.C., *Eugenia cortisona* Lour., *E. frondosa* Wall., *E. caryophyllifolia* Lam., *E. jambolifera* Roxb., *E. moorei* Muell., *E. obtusifolia* Roxb., *E. cumini* Druce, *Jambolifera pedunculata* Gaertn, *E. glomerata* Sieber, *Calyptantes caryophyllifolia* Willd, *C. jambolana* Willd, *C. cumini* Pers. e *Myrtus cumini* L. (MIGLIATO, 2005).

O jambolão (*S. cumini*) pertence à família Myrtaceae nativa da Ásia tropical, particularmente da Índia. A planta foi introduzida em muitos países tropicais da África e da América Latina. No Brasil, é encontrada em diversos estados das regiões Sudeste, Nordeste e Norte. A árvore é bem adaptada às condições climáticas brasileiras, pois cresce muito bem em diferentes tipos de solo. É popularmente conhecida como jambolão, jamelão, cereja, jambol, jalão, oliveira, ameixa de java e ameixa roxa (AGOSTINI-COSTA; SILVA, 2016; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012; BRITO et al., 2007; SÁ, 2008).

A árvore da espécie é de grande porte, com até 10 metros de altura, com folhas simples e frutos. Os frutos são pequenos, de 2 a 3 centímetros de tamanho, com uma forma oval, que se torna roxa escura quando completamente madura. Sua pele é fina, lustrosa, aderente com polpa também roxa, carnosa e envolve um caroço único e grande (Figura 1). O sabor, apesar de um pouco adstringente, é agradável ao paladar e a cor apresenta grande impacto visual (BALIGA et al., 2011; LAGO; GOMES; SILVA, 2006).

Figura 1 – Árvore, flor, fruto maduro e aparência interna do Jambolão (*S. cumini*).



Fonte: IPE (2016); Bezerra (2015)

Grande parte dos frutos do jambolão é desperdiçada na época da safra, que ocorre de dezembro a fevereiro, em virtude da alta produção das árvores em um curto período de tempo, além da vida útil *in natura* muito curta e da falta de conhecimento da viabilidade tecnológica para a sua industrialização (BARCIA et al., 2012). Apesar dessa abundância, esses frutos, não são tradicionalmente consumidos. Na Índia, o jambolão além de ser consumido *in natura*, é processado na forma de compotas, licores, vinhos, vinagre, geléias, tortas e doces, como forma de agregar valor á fruta, enquanto no Brasil, o jambolão é cultivado como planta ornamental (BENHERLAL; ARUMUGHAN, 2007; VIZZOTTO; FETTER, 2016).

Há relatos do uso do fruto de jambolão na medicina popular, pois apresenta atividades farmacológicas como antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana e hipoglicemiante (MARGARET; SHAILAJA; RAO, 2015). De maneira geral, essas propriedades estão relacionadas à presença de compostos bioativos na planta, principalmente compostos fenólicos sendo estes ácidos fenólicos como o ácido gálico, flavonoides como a quercetina e a rutina, e

antocianinas, como a delfinidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo (REYNERTSON et al., 2008; VEIGAS et al., 2007).

2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO FRUTO JAMBOLÃO (*S. cumini*)

2.2.1 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são uma vasta classe de substâncias orgânicas, podendo ser classificados como ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. Estas substâncias são sintetizadas pelo metabolismo secundário dos vegetais, através de duas rotas metabólicas básicas, a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico. Quimicamente, os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura um anel aromático, com um ou mais substituintes hidroxila (CROZIER, 2003).

Em todas as partes dos vegetais é possível encontrar os compostos fenólicos, porém estes se apresentam distribuídos em quantidades diferentes em cada uma delas, variando em diferentes populações de uma mesma espécie. Essa variação e o tipo encontrado estão associados ao desenvolvimento da planta, a sua maturação, à composição do solo, ao manejo e às condições ambientais (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os compostos fenólicos possuem funções diversas nas plantas, exercendo importante papel no seu crescimento e na sua reprodução. A formação dessas substâncias ocorre como resposta às reações de estresse da planta contra radiação, danos mecânicos, combate a herbívoros e patógenos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; FERGUSON; HARRIS, 1999).

Diversos estudos afirmam que a presença de compostos fenólicos conferem as frutas propriedades que trazem benefícios ao organismo humano, pois possuem ações antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, as quais estão relacionadas, principalmente, ao combate à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que contribui de forma significativa para a redução do estresse oxidativo, que podem favorecer o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (CONTRERAS-CALDERÓN et al., 2011; INFANTE, 2013; SANTOS et al., 2011).

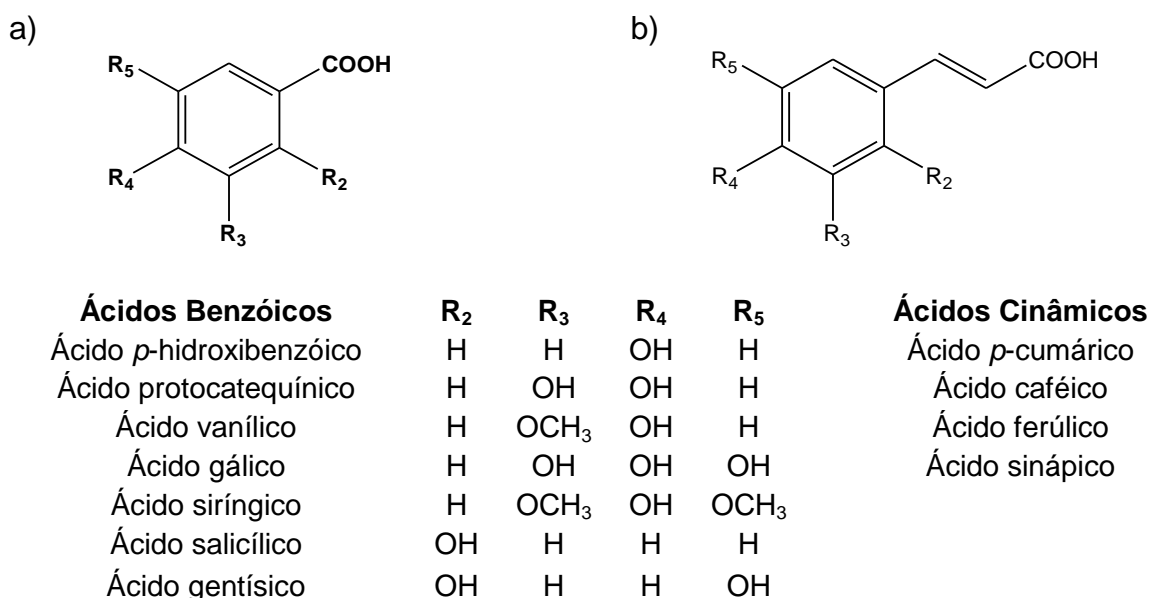
2.2.1.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos apresentam um anel benzênico, no qual estão ligados um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila (ANGELO; JORGE, 2007). São divididos em dois grupos principais: ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos.

Os ácidos benzóicos abrangem ácido gálico (Figura 2a), protocatequina, protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico e ácido siríngicos; possuem estrutura comum C₆-C₁. A diferença dentre os ácidos benzóicos são suas substituições em seus anéis e podem ser encontrados na forma livre, monoglicosilada ou na forma de ésteres (OLDONI, 2010; OLIVEIRA, 2010; SILVA, 2013).

Já os ácidos cinâmicos são compostos aromáticos e uma cadeia lateral na forma C₆-C₃ (Figura 2b). Além de se apresentarem na sua forma livre, podem estar ligados entre si. Os ácidos cinâmicos são a segunda classe mais abundante dos ácidos fenólicos, dentre os quais se pode citar o ácido caféico, ferúlico e *p*-cumárico (BRAVO, 1998; ROCKENBACH, 2008; SILVA, 2013).

Figura 2 - Estruturas químicas dos ácidos fenólicos: a) ácido benzóico e b) ácido cinâmico



Fonte: Balasundram et al. (2006); Silva (2013)

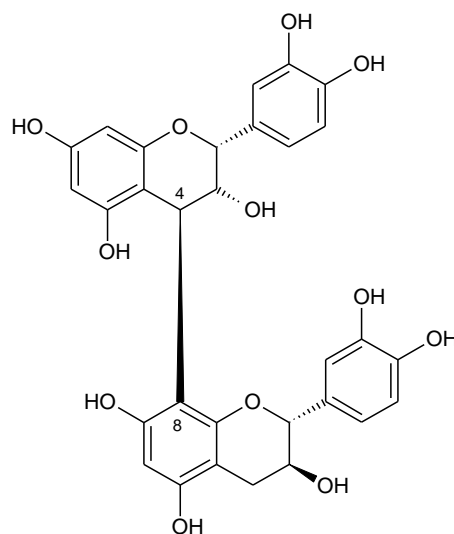
2.2.1.2 Taninos

Os taninos são uma classe formada por polifenóis simples e complexos, de alto peso molecular entre 500 e 3000 Dalton e altamente hidroxilados, sendo encontrados em alta concentração em frutos imaturos e folhas (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Tais compostos atribuem aos frutos a característica de adstringência (BERGAMASCHI, 2010).

Propõe-se prováveis mecanismos de ação dos taninos no organismo, dentre elas está a complexação com íons metálicos como ferro e cobre e a habilidade de complexar com macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos (NIEMETZ; GROSS, 2005; SIMÕES et al., 2010). Os taninos são divididos em dois grupos baseados em seu tipo estrutural: taninos condensados e taninos hidrolisáveis (BERGAMASCHI, 2010).

Os taninos condensados ou proantocianidinas (Figura 3) constituem a classe mais importante de taninos. Estão associados aos seus precursores flavan-3-ols (catequina e epicatequina) ou flavan 3,4-diols (leucoantocianinas) que são produtos do metabolismo do fenilpropanol (ANGELO; JORGE, 2007), que quando polimerizados levam à formação dos taninos condensados. (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

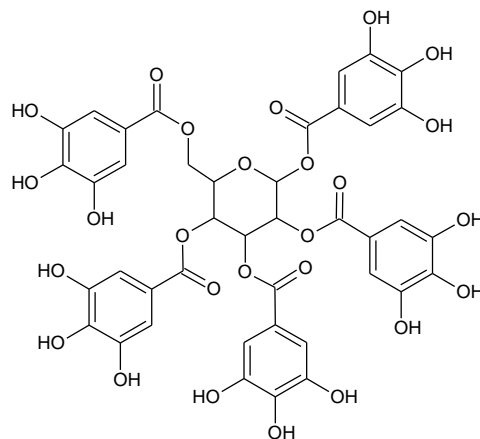
Figura 3 - Estrutura de uma proantocianidina epicatequina: 4,8-catequina



Fonte: Simões et al. (2010)

Os taninos hidrolisáveis consistem em ésteres derivados de ácidos gálicos (galotaninos) e ácidos elágicos (elagitaninos) glicosilados, formado a partir da via do chiquimato, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (Figura 4) (BRAVO, 1998; BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

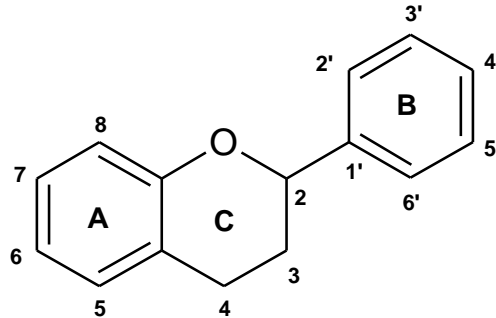
Figura 4 - Estrutura do tanino hidrolisáveis 1,2,3,4,6-pentagaloi-glicose



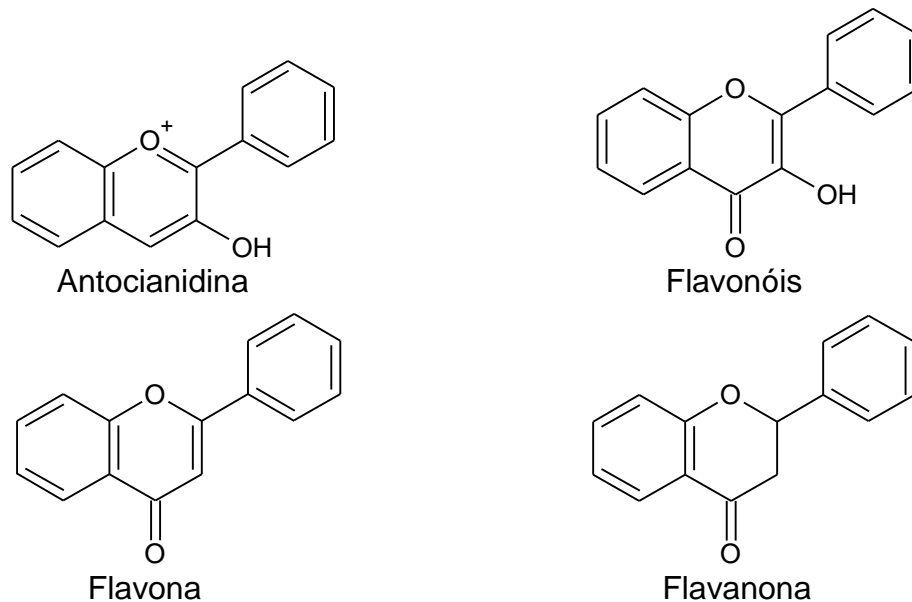
Fonte: Bravo (1998)

2.2.1.3 Flavonoides

Os compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides caracterizam-se por possuir 15 átomos de carbono organizados em dois anéis aromáticos, A e B, ligados por um anel pirano C₆-C₃-C₆ (Figura 5) (CROZIER, 2003). De acordo com a variação de substituição do anel C, temos diferentes classes de flavonoides, sendo elas antocianidinas, flavonóis, flavonas e flavanonas (Figura 6) (ROCKENBACH, 2008; OLIVEIRA, 2010; BOVOLENTA, 2015).

Figura 5- Estrutura básica dos flavonoides

Fonte: Bravo (1998)

Figura 6 - Estruturas das principais classes de flavonoides

Fonte: Bravo (1998)

Os flavonoides são responsáveis pela coloração das flores e frutos; além de apresentar diversos efeitos biológicos, estando associados a redução de incidência de doenças cardiovasculares e longevidade (PEREIRA, 2011). Uma importante característica dos flavonoides é a capacidade sofrerem polimerização com açúcares, não flavonoides e até mesmo com outros flavonoides (CABRITA, RICARDO-DA-SILVA e LAUREANO, 2004).

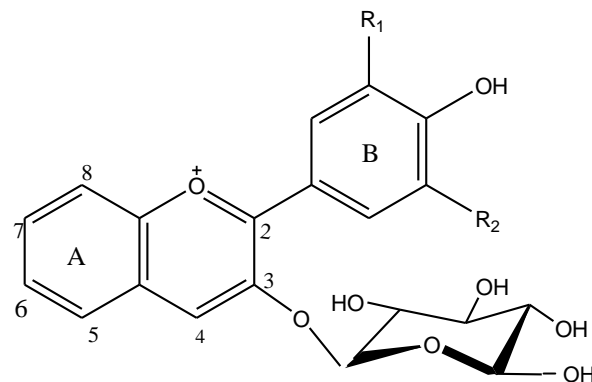
2.2.1.4 Antocianinas

As antocianinas são metabólitos secundários que pertencem à classe de compostos flavonoides, encontrados normalmente glicosilados. As

unidades glicosídicas mais comuns são a glicose, xilose, arabionose, ramnose e galactose; que normalmente estão ligadas na antocianidina na posição 3 do anel C, também pode haver mais de um glicosídeo, que pode estar ligado na posição 5 no anel A (PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, 2007).

Em alimentos, as antocianidinas mais comuns são cianidina, peonidina, delphinidina, pelargonidina, malvidina e petunidina (Figura 7) (MERCADANTE; BOBBIO, 2008). Elas diferem entre si devido ao número de grupos hidroxilas e/ou metoxilas presentes, aos tipos, números e sítios de ligação dos açúcares na molécula e também com relação ao tipo e número de ácidos alifáticos ou aromáticos que estão ligados aos açúcares da molécula (DAMODARAN; PARKIN; R.FENNEMA, 2010; SCHWARTZ et al., 2010; SOUZA, 2013).

Figura 7 - Estrutura antocianina cianidina 3-glicosídeo



Fonte: Março; Poppi; Scarminio (2008)

Tabela 1 - Estrutura das antocianinas mais comuns.

| R ₁ | R ₂ | Antocianina |
|------------------|------------------|---------------|
| H | H | Pelargonidina |
| OH | H | Cianidina |
| OH | OH | Delfinidina |
| OCH ₃ | H | Peonidina |
| OCH ₃ | OH | Petunidina |
| OCH ₃ | OCH ₃ | Malvidina |

Fonte: Machado (2009)

As antocianinas constituem o maior grupo de pigmentos hidrossolúveis do reino vegetal, sendo estes responsáveis pelas cores vermelha, azul e roxa de frutos e vegetais (BRITO et al., 2007). Nas plantas, servem como atrativos para pássaros e insetos (DAMETTO, 2010). Veigas et al. (2007) relataram

a presença de elevados teores de antocianinas no fruto jambolão. Estudos realizados com estes pigmentos demonstram sua capacidade de eliminar radicais livres e seus efeitos na prevenção de doenças cardiovasculares, circulatórias e cancerígenas (PEREIRA e CARDOSO, 2012; SOARES, 2015).

A baixa estabilidade das antocianinas é uma dificuldade encontrada na sua caracterização e utilização (FERREIRA, 2013). Os fatores que influenciam principalmente na estabilidade dessas moléculas são a estrutura química (carga formal de +1 na carbonila do C₂), o pH do meio, temperatura, a exposição à luz e a presença de oxigênio. (CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011; SCHWARTZ et al, 2010; SHIPP; ABDEL-AAL, 2010;).

2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O oxigênio é essencial na cadeia respiratória, no entanto, em determinados momentos pode ocasionar efeitos prejudiciais à saúde, pois é o principal produtor de radicais livres. Radicais livres referem-se a espécies altamente reativas que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, que devido aos elétrons desemparelhados é responsável aumenta a reatividade química, pois tendem a emparelhar este elétron com outro presente na molécula próxima, comportando-se como agentes oxidantes (HALLIWELL, 1992).

Durante esse processo são formados intermediários reativos denominados radicais livres. Os radicais livres são denominados espécies reativas de oxigênio EROs ou espécies reativas de nitrogênio ERNs. As principais EROs distribuem-se em dois grupos, sendo os radicalares ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}), o radical peroxil (RO_2^{\cdot}) e algumas espécies não radicalares, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2), que mesmo não apresentando elétron livre, reagem facilmente formando radicais livres (GÜLÇİN et al., 2009). Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico ($^{\cdot}NO$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_3^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^{\cdot}$) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; BARREIROS, 2006). Em baixas concentrações, as EROs são importantes nos processos biológicos uma vez que traz benefícios à células, produzindo energia, regulação do crescimento celular,

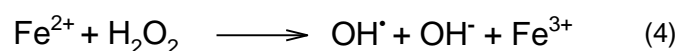
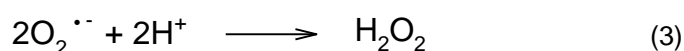
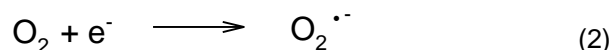
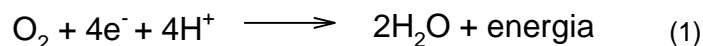
fagocitose e síntese de substâncias importantes, como hormônios e enzimas (MARTINDALE; HOLBROOK, 2002).

Contudo, se a formação de radicais livres for superior à ação do sistema antioxidante protetor ocorrerá um desequilíbrio, caracterizando o estresse oxidativo. Desta maneira, o somatório das reações oxidativa de forma desequilibrada causam diversos danos celulares, alterando proteínas, lipídios e DNA (MADAMANCHI, 2004), reduzindo a capacidade funcional e aumento de riscos de doenças, por exemplo, o câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas (ALVES et al., 2010).

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Tais mecanismos podem ser favorecidos pelos íons ferro e cobre. Na mitocôndria, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. Em virtude dessa redução, são gerados os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}) e ainda, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARBOSA et al., 2010; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Os íons ferro são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacitam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. A participação desse metal se dá, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. A primeira diz respeito à geração do radical OH^{\cdot} , através da reação do H_2O_2 com os íons em questão, ao passo que, na segunda, estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o radical $O_2^{\cdot-}$, a fim de gerar, da mesma forma, o radical OH^{\cdot} (Reação 1-5) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005; BARBOSA et al., 2010).

Reações 1-5 - Formação mitocondrial de radicais livres via cadeia transportadora de elétrons.



Fonte: Barbosa et al., (2010) com modificações.

O excesso desses radicais é combatido por substâncias antioxidantes produzidas pelo organismo ou ingerido na dieta. Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, tem capacidade de inibir ou retardar a oxidação biomoléculas através da inibição ou propagação da reação oxidativa (HALLIWELL, 2000; VELIOGLU et al., 1998). Essas defesas antioxidantes produzidas pelo corpo podem agir enzimaticamente, a exemplo das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), ou não enzimaticamente, como por exemplo: a glutathiona reduzida (GSH), o ascorbato (ASC), os peptídeos de histidina e as proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina). Já os antioxidantes provenientes da dieta, os quais o organismo utiliza de forma intermediária são: o α -tocoferol (vitamina-E), o β -caroteno (provitamina-A), o ácido ascórbico (vitamina C), e os compostos fenólicos, dentre os quais se destacam os flavonoides (quercentina) e taninos (ácido elágico) (HUSAIN e CILLARD, 1987; HALLIWELL et al., 1992; HALLIWELL et al., 1995; PIETA, 2000).

Os antioxidantes podem atuar de diferentes maneiras, como doares elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, através de complexação de metais, como eliminadores de oxigênio, promovendo a decomposição de hidroperóxidos, por meio da absorção da radiação ultravioleta ou da desativação de oxigênio singlete (ANGELO; JORGE, 2007; CAMPBELL; FARRELL, 2000).

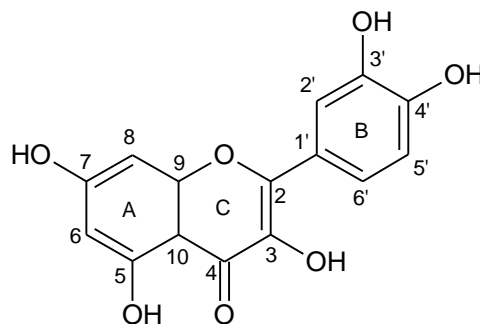
Produtos naturais com atividades antioxidantes são importantes para diminuir o dano oxidativo, portanto e assim o seu uso se torna uma abordagem promissora no combate de doenças e o conhecimento químico desses produtos é fundamental para compreensão da sua ação complementando as defesas do organismo frente às espécies reativas. O interesse pelos efeitos antioxidantes dos produtos naturais vem crescendo, assim, os compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam, sendo estes considerados os antioxidantes mais comuns de fontes naturais (BARREIROS, 2006; BROINIZI et al., 2007).

Muitos fatores influenciam a atividade antioxidante dos compostos de natureza fenólica, um deles é a polaridade do solvente utilizado na extração, que está relacionada à solubilidade da substância e conseqüentemente, no tipo, no teor e na capacidade antioxidante dos compostos. Outro fator importante são as características estruturais dos compostos fenólicos, como a posição dos

substituintes, o número de grupos hidroxila (OH), as propriedades dos outros grupos substituintes e a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; ROCKENBACH, 2008).

A quercetina apresenta na molécula requisitos estruturais importantes para a atividade antioxidante. Apresentando-se como um flavonoide de alta atividade antioxidante encontramos: (1) dihidroxila no anel B que confere alta estabilidade ao radical e participa do deslocamento eletrônico; (2) dupla ligação C2-C3, conjugada ao grupo 4-oxo (C4) no anel C responsável pelo deslocamento eletrônico no anel B, o que permite que os radicais fenoxilos formados sejam estabilizados pelo efeito de ressonância do núcleo aromático; (3) presença de grupos OH no C-3 e C-5, e a função carbonila no C-4 são requisitos para o máximo potencial antioxidante (Figura 8) (ALVES, 2009; SCOTTI et al. 2007).

Figura 8 - Estrutura molecular da quercetina



Fonte: Alves (2009)

Diversos estudos demonstraram a capacidade antioxidante do fruto jambolão. Kuskoski et al. (2006) avaliaram polpas congeladas de diversos frutos, dentre eles, o jambolão. Os resultados apontaram uma correlação positiva entre os valores de atividade antioxidante e concentração de polifenóis e antocianinas. Rufino et al. (2010) quantificou consideráveis teores de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas dos extratos de frutas frescas e secas de jambolão, indicando-os como uma boa fonte antioxidante. Mubassara et al. (2015) estudaram diferentes partes do fruto jambolão, tais como, a polpa, sementes, cascas e folhas, concluíram que o extrato da polpa apresentou a mais alta atividade antioxidante refletida pelo seu conteúdo total de compostos fenólicos.

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A indústria farmacêutica tem buscado desenvolver novos antimicrobianos, pois, a resistência antimicrobiana a fármacos aumentou. Os problemas relacionados à resistência aos antibióticos, é um obstáculo para o tratamento com antimicrobianos convencionais (HOLETZ et al., 2002). Assim, torna-se necessário desenvolver novos antimicrobianos naturais, controlar o uso de antibióticos e ampliar pesquisas sobre o mecanismo genético de resistência (PEREIRA et al., 2009).

Os produtos naturais representam uma alternativa econômica, de fácil obtenção e aplicabilidade para diversas doenças, e por isso se tornam fontes promissoras de novas substâncias (AKHAVAN; JAHANGIRI; SHAFAGHAT, 2015; SHAN et al., 2007). De acordo com Cragg e Newman (2013) aproximadamente metade dos medicamentos antimicrobianos aprovados entre 1981 e 2010 são derivados de compostos naturais, mostrando a influência marcante destes produtos.

Os agentes antimicrobianos derivados de plantas são metabólitos secundários, sendo as principais classes com ação antimicrobiana: os compostos fenólicos, que incluem os flavonoides, e os taninos (MEDINA et al., 2011; UPADHYAY et al., 2014). O mecanismo de ação antimicrobiana pode ser explicado por três hipóteses: a primeira pressupõe que os compostos fenólicos inibem enzimas bacterianas ao se complexar a seus substratos (SCALBERT, 1991); a segunda inclui a interação com proteínas de membrana celular dos microrganismos, por meio de ligação de hidrogênio, modificando sua estrutura e funcionalidade (BEZERRA, 2015), e a terceira fundamenta-se na complexação com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (LÓPEZ, 2010).

Estudos mostram a atividade antimicrobiana dos frutos de jambolão. Chandrasekaran e Venkatesalu (2004) relatam a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da casca de jambolão frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Migliato et al. (2010) verificaram que extratos etanólicos preparados a partir do fruto jambolão apresentam atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Candida albicans* e *Staphylococcus epidermidis*. Singh et al. (2016) relataram que o extrato etanólico do fruto jambolão afetou o crescimento de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *C.*

albicans.

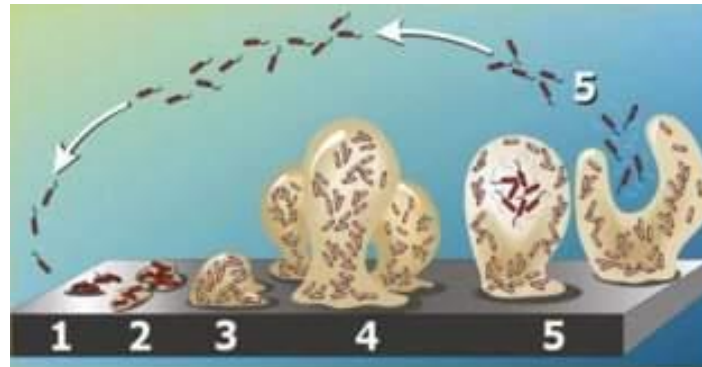
2.4.1 Biofilme

Os microrganismos existem como células individuais ou agregadas umas às outras, sendo esse comportamento de agregação é chamado de biofilme. Os biofilmes são conceituados como uma complexa comunidade microbiana, estabelecida em uma superfície sólida, envolvida por uma matriz polimérica constituída por polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular, lipídeos e água (VASCONCELOS, 2013). Segundo Flemming e Wingender (2010), a matriz extracelular desempenha importantes funções no biofilme microbiano, pois atua como barreira protetora contra antimicrobianos, permiti a difusão de nutrientes, além de manter a atividade de enzimas que degradam nutrientes ou compostos tóxicos que afetam a integridade celular.

De acordo com o órgão norte-americano “National Institutes of Health”, os biofilmes estão associados a aproximadamente 80% de todas as infecções médicas no mundo, incluindo conjuntivites, vaginites e otites além de serem importantes colonizadores de implantes médicos, tais como cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos, lentes de contato e próteses (DONLAN e COSTERTON et al., 2002; FALAGAS et al., 2009; HOIBY et al., 2011).

O processo de formação de biofilme ocorre em cinco estágios (Figura 9), que compreendem: 1- as bactérias livres, dispersas no meio, começam a se aproximar de superfícies sólidas e realizam a adesão celular inicial; 2- aderência a partir da produção de polímeros extracelulares que interagem com a superfície, permitindo crescimento bacteriano na superfície de contato, resultando na formação de uma monocamada celular; 3- desenvolvimento da arquitetura do biofilme; 4- nesta etapa as bactérias começam a formar agrupamentos, tornando o biofilme maduro. Neste estágio, a comunidade estruturada de microrganismos inclusos na matriz polimérica permite a entrada de proteínas, nutrientes e oxigênio no sistema; 5- no último estágio, ocorre a dispersão das bactérias do biofilme para o ambiente ao seu redor e o ciclo se reinicia (CULLER, 2010; LEITE, 2013).

Figura 9 - Etapas de desenvolvimento do biofilme, 1) Adesão inicial 2) Crescimento 3) Estruturação 4) Biofilme maduro 5) Dispersão



Fonte: Stoodley et al. (2002)

As células que se encontram aderidas à superfície, formando o biofilme, são designadas de sésseis, enquanto as livres e dispersas são denominadas planctônicas. A transição dos microorganismos da sua forma planctônica para forma sésseis durante a formação do biofilme ocorre em resposta a diversos fatores, como as características físico-químicas da superfície e do microorganismos, a expressão de proteínas (adesinas), a sinalização celular e a produção de polissacarídeos pelos microorganismos (LENZ et al., 2008; MONDS, O'TOOLE, 2009; PARSEK, SINGH, 2003; SIMÕES et al., 2010).

Os mecanismos envolvidos na inibição ou erradicação de biofilmes por compostos que não atuam sobre o crescimento microbiano propriamente dito, podem estar envolvidos nos mecanismos de degradação dos componentes da matriz polimérica, alteração da interação das células com a superfície, inibindo a comunicação bacteriana e afetando a síntese de pili e adesinas (RENDUELES & GHIGO, 2012).

As bactérias se comunicam através de um mecanismo chamado *quorum sensing* (QS). Esse mecanismo é um sistema de comunicação célula-célula que permite às bactérias coordenarem suas atividades e se agruparem em comunidades (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Os microorganismos, neste sistema, sintetizam moléculas sinalizadoras, conhecidas como autoindutores, que são excretadas no ambiente e detectadas por moléculas receptoras provenientes de outras células microbianas, desencadeando a agregação celular importante para processo de formação do biofilme (RUMJANEK et al., 2004; PAIVA, 2011). No estudo realizado por Cushnie e Lamb (2011), os compostos fenólicos apresentaram

capacidade de inibir moléculas sinalizadoras bloqueando a interação com seus receptores, resultando na redução da adesão bactéria e na formação de biofilmes.

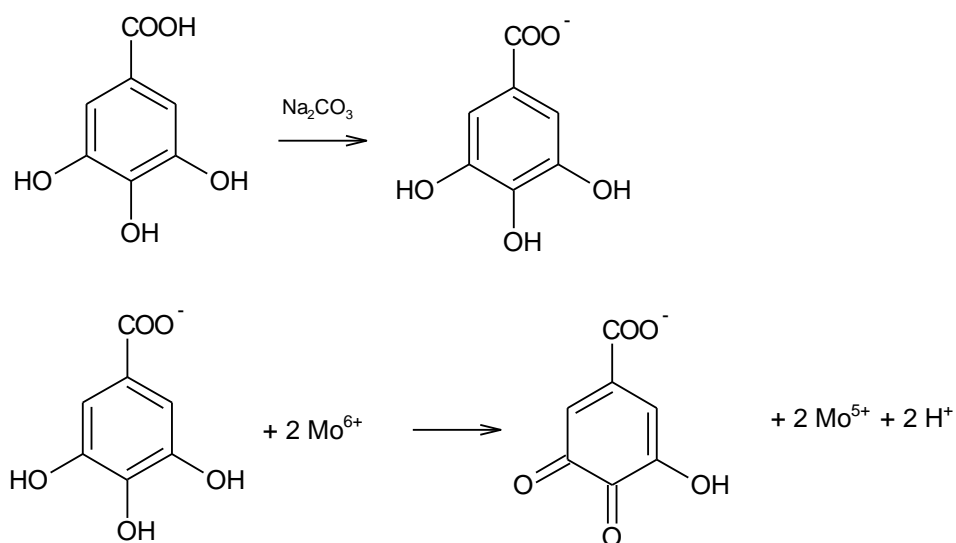
2.5 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DOS MÉTODOS

2.5.1 Capacidade de Redução do Folin-Ciocalteu

Neste método, é avaliada a capacidade da amostra em promover a redução do reagente Folin-Ciocalteu, que consiste na mistura dos ácidos fosfomolibídico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$), onde se encontram no estado de oxidação VI e, na presença de agente redutores, como os compostos fenólicos, recebem um elétron formando complexos azuis (óxidos de tungstênio (W_8O_{23}) e de molibdênio (Mo_8O_{23})), em decorrência da mudança do seu estado de oxidação para V (Figura 10) (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

De acordo com Oliveira et al. (2009) para redução do molibdênio pelos compostos fenólicos é necessário que estes estejam na sua forma desprotonada, ou seja, como ânions fenolatos, o que é favorecido sob condições alcalinas.

Figura 10 - Reação do ácido gálico com molibdênio



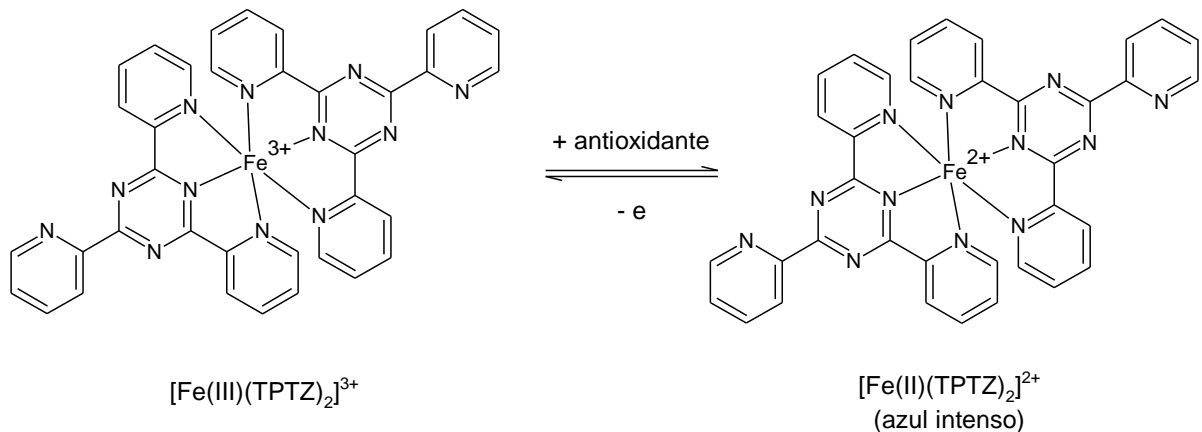
Fonte: Oliveira et al. (2009)

compostos puros e extratos vegetais (KUSKOSKI et al., 2005).

2.5.4 Determinação do Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP)

O ensaio do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) é baseado na capacidade de um antioxidante reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} . A reação ocorre pela formação de um complexo TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) com o Fe^{3+} , de cor amarelada. Na presença de um antioxidante, o ferro presente é reduzido, dando origem ao $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ (Figura 13) (FRANKEL; MEYER, 2000, ROGINSKY;LISSI, 2005). O trolox é utilizado para a curva padrão e a reação acontece em pH de 3,6 apresentando absorvância máxima em 593 nm. Os valores de pH tem efeito importante na redução da capacidade de antioxidantes. Em condições ácidas, a redução da capacidade pode ser suprimida devido à protonação com compostos antioxidantes, enquanto que em meio básico, ocorre a dissociação de prótons de compostos fenólicos que pode aumentar a capacidade de reduzir uma amostra. (HUANG; OU; PRIOR; 2005).

Figura 13 - Formação do complexo $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ a partir do complexo $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ por um antioxidante.



Fonte: Huang; Ou; Prior (2005)

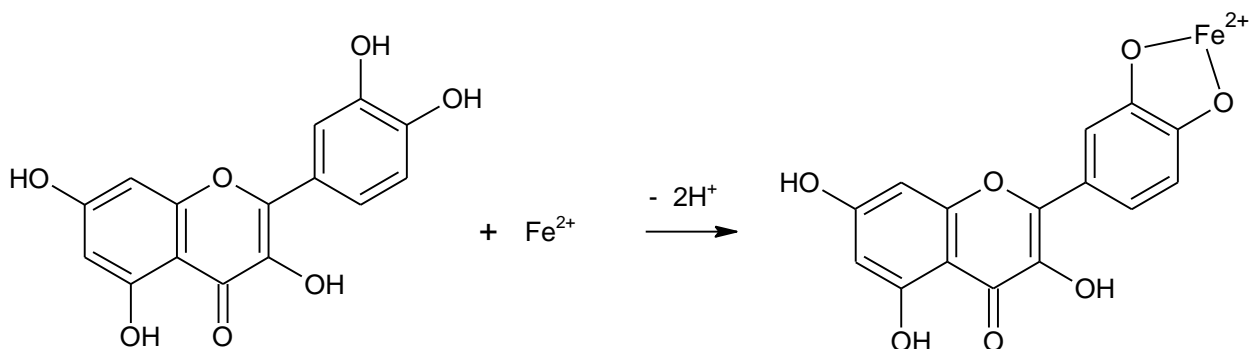
As limitações do método consiste no fato de que a capacidade de redução obtida não reflete necessariamente na atividade antioxidante da amostra (FRANKEL; MEYER, 2000, ROGINSKY;LISSI, 2005), pois nem todo redutor que é hábil para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} é antioxidante; nem todo antioxidante tem a habilidade específica para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Portanto, o método pode não ser capaz de medir

todos os antioxidantes presentes em uma matriz complexa. No entanto, muitos estudos sobre plantas e alimentos utilizam esse método em conjunto com outros ensaios (APAK et al., 2004). O resultado final é fornecido em $\mu\text{mol/L}$ equivalente de trolox / $\mu\text{g/mL}$ de amostra.

2.5.5 Determinação da Atividade Queladora do Fe^{2+}

O método para determinação da atividade queladora de íon ferro pelo antioxidante, utiliza um forte quelante do íon ferro denominado batofenantrolina (BPS), que forma um complexo ($\text{Fe}_2(\text{BPS})_3$) de coloração vermelha, cuja intensidade é proporcional à quantidade de íon complexado existente no meio, o qual pode sofrer alteração na sua formação por causa da afinidade do antioxidante pelo ferro. Portanto, na presença de uma substância antioxidante ocorre a quelação com íon ferro e o complexo com a batofenantrolina não é formado (Figura 14) (FORTE, 2012; MARTINEZ et al., 2012).

Figura 14 - Quelação do íon ferro com a quercetina.



Fonte: Souza; Sussuchi; Giovani (2003)

A quelação do íon ferro é determinada pela mudança colorimétrica medida em 530 nm e os resultados da atividade antioxidante são expressos como concentração inibitória em 50% (IC_{50}).

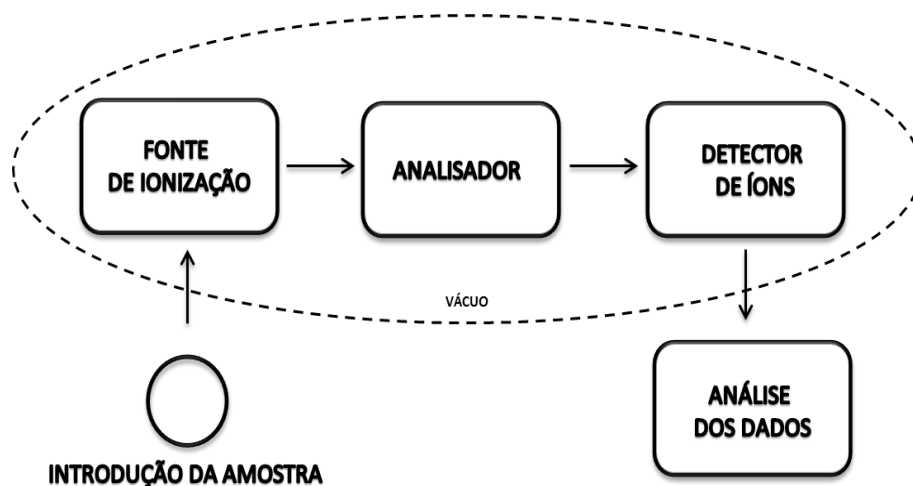
2.5.6 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massa (MS) é uma das mais importantes ferramentas analíticas disponíveis na atualidade, com ampla aplicação em várias

áreas da ciência, como na física, química, ciências biológicas e medicina. É uma técnica utilizada para identificar, quantificar, obter informação do peso molecular e características estruturais de compostos conhecidos e desconhecidos, de isolados ou provenientes de misturas complexas, que podem ser detectados com quantidades mínimas de amostra (PAVIA et al., 2010; CROTTI et al., 2006).

O espectrômetro de massas é constituído de unidade de entrada da amostra, uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector de íons (Figura 15). A unidade de entrada tem o papel de levar a amostra até a fonte de íons. Como um dos componentes fundamentais de um espectrômetro de massa, a fonte de íons tem como objetivo ionizar moléculas neutras ou transferir íons de solução para fase gasosa. No final, os íons formados são direcionados através de diferenças de potencial até o analisador de massas. Em seguida, o analisador de massa separa os íons da amostra baseado em sua razão massa/carga (m/z). Os íons são então contados pelo detector que transforma a corrente de íons em sinais elétricos e o sinal é registrado e processado pelo sistema de dados (PAVIA et al., 2010; HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

Figura 15- Componentes principais do espectrômetro de massas



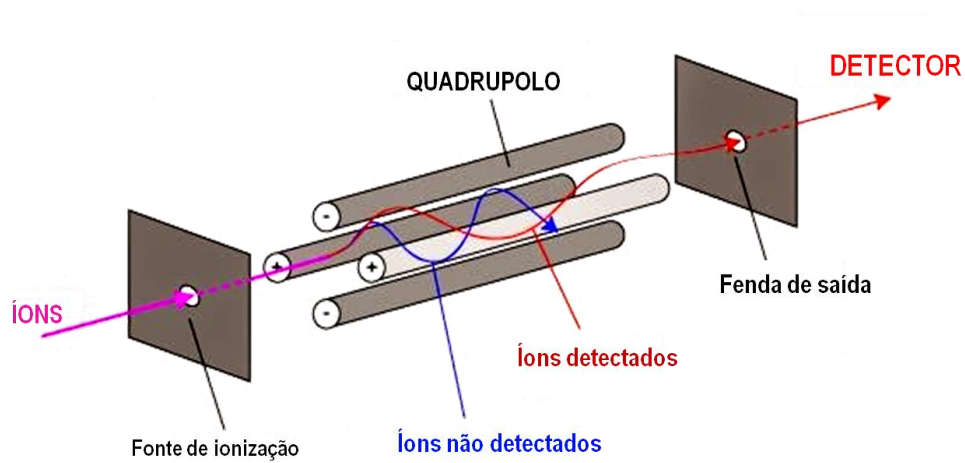
Fonte: O autor

Na espectrometria de massas o que define o tipo de equipamento é a forma como a molécula pode ser ionizada e o analisador. Uma variedade de técnicas de ionização é utilizada, ionização por impacto de elétrons (EI), eletrospray (ESI), ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), ionização química

a pressão atmosférica (APCI) e dentre outras (WATSON e SPARKMAN, 2008). Na técnica ESI, a ionização se inicia em uma solução do composto orgânico a ser analisado com adição de modificadores orgânicos ácidos ou básicos (ácido fórmico ou acetato de amônio) que promovem reações ácido-base. Assim, a solução contendo as moléculas da amostra é borrifada na ponta de um tubo capilar fino para dentro da câmara aquecida. O tubo capilar por onde a amostra passa tem um alto potencial em sua superfície, promovendo reações de oxidação e redução, com o objetivo de separar as cargas dos orgânicos formados (cátions e ânions) e assim as pequenas gotículas carregadas são expulsas para dentro da câmara de ionização. As gotículas carregadas enfrentam um contra fluxo de um gás de secagem que evapora os solventes das gotículas (PAVIA et al., 2010; GROSS, 2004; HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

Após a amostra ser ionizada, o feixe de íons é acelerado por um campo elétrico e, então, entra no analisador de massa, que é a região do espectrômetro de massa onde os íons são separados de acordo com suas razões massa/carga (m/z). Há diferentes tipos de analisadores de massa, tais como de setor magnético, o de foco duplo, o de tempo de voo e o quadrupolar. Dentre eles, o quadrupolar é normalmente encontrado nos laboratórios de pesquisa (Figura 23). Os analisadores quadrupolares são compostos de quatro barras sólidas paralelas dispostas na direção do feixe de íons, onde se aplicam potenciais elétricos que permitem a passagem seletiva de íons entre as barras (PAVIA et al., 2010). O princípio do analisador quadrupolar é medir a razão m/z por meio da estabilidade e instabilidade dos íons que passam por um campo elétrico tridimensional. Os íons são atraídos e repelidos durante a trajetória do campo elétrico ao mesmo tempo em que são focalizados no espaço entre as barras paralelas, uma vez que os polos das barras se alternarem durante o caminho do feixe de íons (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

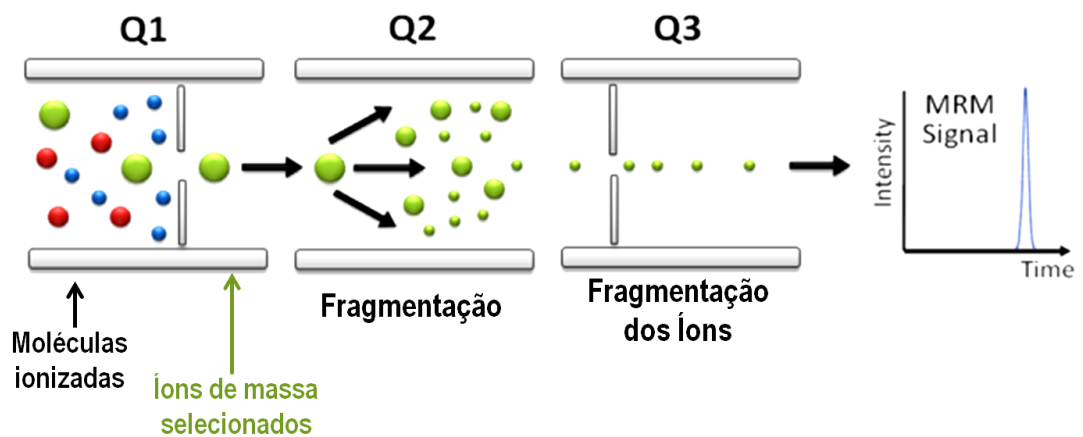
Figura 16- Analisador de massa quadrupolo



Fonte: Adaptação de Danum (2017).

A técnica de monitoramento de reações múltiplas (MRM) é um modo de aquisição para a análise das fragmentações, no qual os estágios de “filtragem” dos íons são empregados no espectrômetro de massas triplo-quadrupolares (QqQ) (Figura 17) (GROSS, 2004; HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

Figura 17- Esquema de funcionamento de múltiplas reações monitoradas em um espectrômetro de massa triplo-quadrupolo



Fonte: Adaptado de Schmidt (2014)

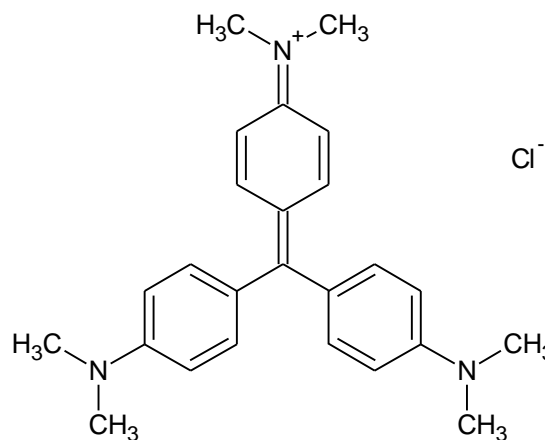
Durante a aquisição do modo MRM, moléculas ionizadas são introduzidas no primeiro quadrupolo, Q₁, onde ocorre a seleção do íon de interesse. Posteriormente, os íons são induzidos para a câmara de colisão com um gás neutro em uma célula de colisão pressurizada (Q₂). Ao invés de obter o MS/MS de todos os possíveis íons de fragmentação, um pequeno número de íons específicos

fragmentados é analisado no Q₃. As vantagens da utilização dessa técnica é a alta seletividade, especificidade, quantificação, rapidez e sensibilidade da análise sem a necessidade de isolar compostos (SCHMIDT et al., 2014; GILLETE e CARR, 2013).

2.5.7 Atividade Antimicrobiana Frente a Biofilme

Existem diversas técnicas para o estudo de biofilme *in vitro*, dentre elas está a quantificação de biomassa microbiana total (matriz exopolissacarídica associada a células viáveis e não viáveis) e a quantificação de células viáveis (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). A técnica que utiliza o cristal violeta (CV - cloreto de hexametilpararosnilina) (Figura 25) é um dos primeiros métodos e o mais utilizado para quantificação da biomassa total de biofilme, devido à facilidade de sua execução e aos baixo custo. O CV é um corante básico que se liga às moléculas negativamente carregadas presentes na superfície da célula e nos polissacarídeos da matriz (Li et al., 2003, PANTANELLA; VALENTI; NATALIZI, 2013). As limitações desse método estão relacionadas à baixa reprodutibilidade, isto é, tanto as células viáveis e não viáveis, bem como a matriz de biofilme são coradas por CV, portanto, é adequado apenas para quantificar a biomassa total do biofilme, e não para avaliar sua atividade metabólica, em razão disso, é em geral associado a outras metodologias (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008; PITTS et al., 2003).

Figura 18 - Estrutura do corante cristal violeta

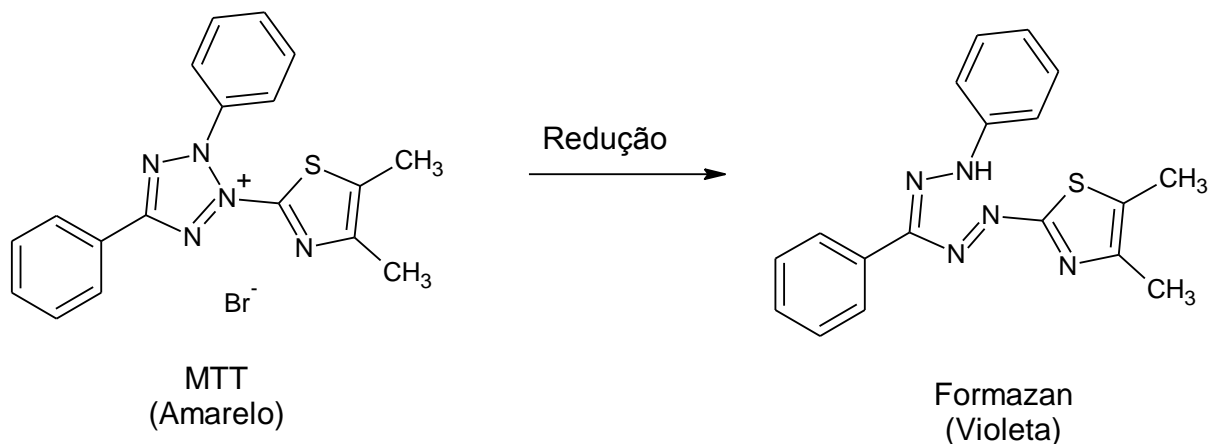


Fonte: Santos et al. (2005)

Após a coloração, o CV aderido é diluído utilizando um solvente, por exemplo, o etanol. A quantidade de corante solubilizado é medido por absorvância a 570 nm e os resultados são diretamente proporcionais a biomassa total do biofilme (PANTANELLA; VALENTI; NATALIZI, 2013).

Dentre os ensaios para a quantificação da viabilidade celular nos estudos de biofilme, a redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) em formazan foi o primeiro teste desenvolvido, sendo amplamente utilizado e de alta eficiência. Este método envolve a reação com NADH ou moléculas redutoras semelhantes, que transferem elétrons para MTT resultando no produto formazan (Figura 26), que se acumula como um precipitado insolúvel dentro das células, na superfície celular e no meio de cultura (BERRIDGE; TAN, 1993; FREIMOSER et al., 1999; RISS et al., 2016).

Figura 19 – Estrutura de MTT reduzido a formazan.



Fonte: Riss et al. (2016)

A solução é quantificada empregando um espectrofotômetro a 570 nm, sendo que a quantidade de células viáveis (metabolicamente ativas) é diretamente proporcional à quantidade do produto formazan (RISS et al., 2016).

3 OBJETIVOS

Investigar os principais compostos químicos presentes no fruto Jambolão (*Syzygium cumini*), avaliar seu potencial antioxidante, antimicrobiano e citotóxico.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos a partir do fruto Jambolão (*S. cumini*);
- Determinar o extrato com maior potencial antioxidante e quantificação de compostos fenólicos e flavonoides;
- Identificar os compostos bioativos presentes no extrato por espectrometria de massas;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato em eritrócitos humanos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato frente a células sésseis e planctônicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Os frutos jambolão (*S. cumini*) foram coletados em janeiro de 2016, no campus da Universidade Estadual de Londrina, localizada no município de Londrina, Paraná (23°22'S, 51°10'W). A espécie *S. cumini* foi depositada no herbário FUEL do departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina sob nº 54.666. Após a coleta, os frutos foram selecionados, lavados em água corrente e as cascas e polpas foram separadas das sementes. O material foi congelado e armazenado a -4°C.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Para obtenção dos extratos do fruto jambolão foram utilizadas as partes polpa e casca, obtidos na proporção de 1:2 (m/v) empregando como solventes extratores, as soluções hidroetanólica: 0, 30, 50, 70 e 100% (v/v). Em seguida, foi submetida a turbo extração por 1 minuto. Posteriormente, realizou-se a filtração e os filtrados foram armazenados em congelador (-4°C). A remoção do solvente foi feita por meio de um evaporador rotativo a 27°C e os cinco extratos secos obtidos foram acondicionados em congelador (-4°C), protegidos da luz até a realização de todas as análises. Todos os extratos foram analisados quanto seu teor de polifenóis e flavonoides totais, como também, sua capacidade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS, FRAP e quelação de íon ferro. Posteriormente, o extrato que apresentou melhor resposta seguiu para a identificação química, teste de citotoxicidade e antimicrobiana.

4.2.1 Determinação do Conteúdo de Polifenóis Totais

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado por método colorimétrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e como padrão o ácido gálico (KUMATZAWA et al., 2004; GEORGETTI et al., 2008). Pesou-se 24 mg de cada extrato seco obtido de *S. cumini* e foram diluídos em 10 mL, conforme mistura

etanol:água inicial da extração. Alíquotas de 0,5 mL das amostras dos extratos foram misturados com 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de Na_2CO_3 (10%). O branco foi preparado com 0,5 mL do solvente utilizado para diluir os extratos, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de Na_2CO_3 (10%). Para o controle de cor utilizou-se 0,5 mL dos extratos diluídos, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de água deionizada. Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, a absorbância foi determinada a 760 nm (Perkin Elmer Spectrometer Lambda 25). As amostras foram analisadas em triplicata e o conteúdo total de polifenóis foram expressos em equivalentes de ácido gálico.

4.2.2 Determinação do Conteúdo de Flavonoides Totais

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado pelo método descrito por Rolim et al., (2005), utilizando rutina como padrão. Em tubos de ensaio, foram adicionados 2 mL dos extratos secos diluídos em solução de metanol:ácido:acético 0,02 M (99:1). Para o branco utilizou-se 2 mL da solução metanol:ácido:acético 0,02 M (99:1). Em seguida, a absorbância foi determinada a 361 nm (Perkin Elmer Spectrometer Lambda 25). O ensaio foi realizado em triplicata e o conteúdo de flavonoides totais foi expresso em equivalente de rutina.

4.2.3 Determinação da Atividade Doadora de Átomos de Hidrogênio ao Radical DPPH'

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pela sua capacidade de doar átomos de hidrogênio ao radical estável DPPH', segundo Blois (1958). O extrato foi preparado por meio de diluições em solventes etanol e água, onde obteve-se concentrações de 318,52; 159,25; 79,63; 39,81; 19,90; 9,95 e 4,98 $\mu\text{g/mL}$ no meio reacional. Alíquotas de 200 μL das amostras foram adicionadas ao meio reacional contendo 1 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 5,5), 1 mL de etanol e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH' (250 μM). A mudança na absorbância foi medida a 517 nm em espectrofotômetro (Perkin Elmer Spectrometer Lambda 25) após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo de luz.

O branco foi constituído de 1 mL de tampão acetato 0,1 (pH 5,5) e

1,7 mL de etanol. O controle positivo foi preparado com 1,2 mL de etanol, 0,5 mL de solução etanólica de DPPH^{*}, 1 mL de tampão acetato. Para o controle de cor foi adicionado 200 µL das amostras dos extratos, 1 mL de tampão acetato 0,1 (pH 5,5) e 1,5 mL de etanol. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. A atividade doadora de átomos de hidrogênio dos extratos foi calculada por meio da seguinte equação I:

$$\% \text{ Atividade} = [(1 - (\text{absorbância da amostra} / \text{absorbância do controle})) \times 100.]$$

4.2.4 Determinação da Atividade Doadora de Elétrons ao Radical ABTS

A capacidade antioxidante do extrato frente ao radical ABTS foi realizada de acordo com Sánchez-Gonzalez et al. (2005). A solução ABTS foi preparada em meio aquoso e o cátion ABTS obtido após a reação de 7mM da solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio, incubada em frasco âmbar e mantido em refrigeração por 16 horas antes do uso. Posteriormente, diluiu-se a solução ABTS em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) até atingir a absorvância de 0,7 a 0,8 em 730 nm. Os extratos foram preparados por meio de diluições em solventes etanol/água, onde obteve-se concentrações de 290,95; 242,36; 193,92; 145,47; 96,89; 48,44; 24,14; 4,80 e 2,41 µg/mL no meio reacional. Alíquotas de 200 µL dos extratos nas diferentes concentrações foram adicionadas a 4 mL da solução de ABTS diluída. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Perkin Elmer Spectrometer Lambda 25) a 730 nm após 6 minutos de reação.

O controle positivo foi preparado com 4 mL da solução de ABTS diluída e 200 µL de etanol. Para o branco utilizou-se 60 µL da solução de persulfato de potássio diluída (2,45 mM) e 5 mL de tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) e no controle de cor foi adicionado 200 µL de amostras dos extratos, 60 µL de solução de persulfato de potássio diluída (2,45 mM) e 4 mL tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). O ensaio foi realizado em triplicata. A avaliação da atividade doadora de elétrons ao radical ABTS foi calculada pela equação I.

4.2.5 Determinação do Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP)

O potencial antioxidante de redução do ferro foi avaliado segundo Sánchez-Gonzalez et al. (2005). O reagente FRAP foi preparado com 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM em HCl 40 mM com 2,5 mL de $\text{FeCl}_3(6\text{H}_2\text{O})$ 20 mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3,6). Em seguida, a solução foi incubada por 30 minutos a 37 °C. Para avaliação da capacidade antioxidante, 900 μL do reagente FRAP preparado previamente foram adicionados a 50 μL de água deionizada e 50 μL da amostra do extrato, obtendo-se no meio reacional concentração de 159,47 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras foram incubadas a 37°C durante 30 minutos e a leitura realizada em espectrofotômetro (Perkin Elmer Spectrometer Lambda 25) a 595 nm.

O branco foi preparado a partir de 900 μL de reagente FRAP, 50 μL de água deionizada e 50 μL do solvente utilizado para diluir a amostra. Para o controle de cor 900 μL de reagente FRAP sem TPTZ foram adicionados a 50 μL de água deionizada e 50 μL das amostras dos extratos. O ensaio foi realizado em triplicata. Para comparação do poder redutor do extrato uma curva analítica com diferentes concentrações de trolox foi utilizada como padrão (4,0; 8,0; 10,0; 12,5 e 20,0 $\mu\text{mol}/\text{L}$) e os resultados expressos em $\mu\text{mol}/\text{L}$ equivalente de trolox / $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amostra.

4.2.6 Determinação da Atividade Queladora do Fe^{2+}

A atividade queladora do Fe^{2+} foi determinada segundo Casagrande et al. (2006), utilizando batofenantrolina (BPS) um forte quelador de íon ferro. Os extratos foram preparados por meio de diluições em solventes etanol:água, onde obteve-se concentrações de 1015,10; 888,20; 761,32; 634,43; 507,55; 380,66; 253,77 e 126,89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no meio reacional. No meio reacional contendo 2 mL de KCl/Tris 130 mM e 10 mM respectivamente, foram adicionados 10 μL de sulfato ferroso amoniacal (10 mM) e 100 μL de amostras dos extratos nas diferentes concentrações. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente adicionou-se 10 μL de BPS (40 mM). Em seguida, a reação foi incubada novamente por 15 minutos à temperatura ambiente e realizada a leitura em espectrofotômetro (Perkin Elmer Spectrometer Lambda 25) a 530 nm.

O controle positivo foi preparado com 2 mL do meio reacional de KCl/ Tris, 10 µL sulfato ferroso amoniacal (10 mM) e 10 µL de BPS (40 mM). Para o branco utilizou-se 2 mL meio reacional de KCl/Tris e 10 µL sulfato ferroso; e para o controle de cor adicionou 1 mL de meio reacional de KCl/ Tris, 10 µL sulfato ferroso (10 mM) e 100 µL de amostra dos extratos. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. A atividade queladora de íons Fe^{2+} foi calculada pela equação I.

4.3 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA

4.3.1 Instrumental

A identificação dos compostos fenólicos presente no extrato do fruto jambolão foi realizada em espectrômetro de massas triplo-quadrupolo (QqQ) com ionização por eletrospray (ESI) em modo sequencial (ESI-tandem-MS) – Waters® e2795 Separations Modules no laboratório Fenn de Espectrometria de massas na UFPR- Campus Jandaia do Sul.

4.3.2 Preparo do Extrato para Análise em ESI/MS

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Ácido trifluoroacético (TFA), hidróxido de amônio (NH_4OH) e álcool metílico (Vetec, 99,9% a nível UV/HPLC), foram utilizados para preparo das soluções.

Uma alíquota de 4,5 mg do extrato de maior potencial bioativo, determinado através da itens 5.2.1 a 5.2.6, foram dissolvidas em 1 mL de álcool metílico, sonicadas durante 10 minutos, centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos e filtradas com microfiltro de 0,22 µm. Posteriormente, esse extrato foi diluído de acordo com a fase móvel, ou seja, adição de modificador orgânico: TFA 0,1% e NH_4OH 0,1%, para o modo positivo e negativo, respectivamente e injetadas no equipamento de ESI/MS.

4.3.3 Condições de Múltiplas Reações Monitoras (MRM)

Os parâmetros de análises para MRM-ESI-MS para ionização no modo positivo foram: vazão de gás, Argônio, 0,14 mL.min⁻¹, temperatura da desolvatação, 250°C; capilar, 3500 V; cone, 30 V; energia de colisão, 30 V, vazão da seringa, 50 µL.min⁻¹, tempo de ciclo, 2 s; número de canais, 30. Para o modo negativo de ionização ocorreram: vazão de gás, Argônio, 0,14 mL.min⁻¹, temperatura da desolvatação, 250°C; capilar, 2500 V; cone, 40 V; energia de colisão, 30 V, vazão da seringa, 50 µL.min⁻¹, tempo de ciclo, 2,7s; número de canais, 26.

4.4 CITOTOXICIDADE

A atividade hemolítica do extrato foi determinada de acordo com Izumi et al. (2012), com adaptações. Para essa avaliação, utilizou-se uma amostra de sangue de um doador humano saudável, com aprovação do comitê de ética humano (CAAE 47661115.0.0000.5231, Nº 1.268.019 – UEL). Os eritrócitos foram separados do sangue por centrifugação a 5000 rpm, por 5 minutos a 4°C, em seguida, diluídos a 6% em solução tampão fosfato-salina (PBS) (pH 7,2). Em microplacas de 96 poços, 100 µL de eritrócitos a 6% foram adicionados a 100 µL de PBS contendo diferentes concentrações do extrato (19,53; 39,06; 78,12; 156,5; 312,5; 625; 1.250; 2.500; 5.000; 10.000 µg/mL). Após 3 horas de incubação a 37°C, foi realizada leitura do sobrenadante a 550 nm para verificar a liberação de hemoglobina resultante da hemólise. Para o controle positivo foi utilizado triton X-100 (1%). As medidas foram realizadas em triplicata e para o cálculo de porcentagem de hemólise empregou-se a equação II:

$$\% \text{ Hemólise} = [(\text{absorbância da amostra} \times 100) / \text{absorbância do controle positivo}]$$

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.5.1 Cepas Bacterianas

Para os ensaios realizados foram utilizadas cepas bacterianas de

referência (ATCC, American Type Culture Collection), tais como *S.aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* T3EPM e *K. pneumoniae* ATCC 10031, depositadas na coleção do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da Universidade Estadual de Londrina.

4.5.2 Disco-Difusão em Ágar

O teste de disco-difusão em ágar foi descrito por Bauer et al. (1966). A bactéria foi cultivada em ágar Mueller-Hinton (MH) a 37°C por 24 h. Em seguida, foi preparada uma suspensão bacteriana a 0.5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), adicionando colônias bacterianas à solução salina (NaCl 0,85%). O inóculo microbiano foi semeado uniformemente, com auxílio de haste flexível com extremidade de algodão (*swab*), em placas de Petri contendo MH. Posteriormente, discos de papel estéreis de diâmetro igual a 11 mm, contendo 10 µL de extrato diluído em água foram distribuídos pela placa contendo o inóculo. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor dos discos foi medido em milímetros. O ensaio foi realizado em duplicata.

4.5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM do extrato foi determinada pelo método de microdiluição seriada em caldo, conforme o protocolo descrito pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2016). Colônias bacterianas foram adicionadas a salina (NaCl 0,85%), até atingir a turbidez referente a escala 0.5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). O inóculo bacteriano foi diluído em MH para 10^5 UFC/mL, e desse adicionou-se 50 µL a outros 50 µL de MH contendo extrato (7,81 µg/mL a 2000 µg/mL). O ensaio foi realizado utilizando microplacas de 96 poços. Após 18 horas de incubação a 37°C, o crescimento bacteriano foi avaliado por meio de observação de turbidez.

Foram utilizados dois controles negativos, caldo MH suplementado com extrato e apenas MH. Foi realizado controle positivo, contendo bactéria e caldo MH, para confirmar a viabilidade celular. O teste foi realizado em triplicata.

4.5.4 Atividade Antimicrobiana Frente a Biofilme

4.5.4.1 Ensaio de cristal violeta para análise de biofilme em formação

A ação do extrato frente à formação de biofilme foi avaliada segundo a metodologia descrita por Wakimoto et al. (2004), com adaptações. A cepa de *E. coli* (T3EPM), forte formadora de biofilme, foi cultivada com 10 µL da cepa em 900µL de caldo Luria-Bertani (LB) 37°C por 24 horas. Em seguida, em microplaca de 96 poços inoculou-se 5 µL de cultura bacteriana em 195 µL de meio de cultura Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado com 0,45% de glicose e extrato em diferentes concentrações (31,25 µg/mL a 2.000 µg/mL). A microplaca foi incubada por 24 horas a 37°C. Posteriormente, os poços da microplaca foram lavados quatro vezes com PBS 0,01 M (pH 7,4) e logo após, a coloração foi realizada utilizando cristal violeta a 0,5% durante 5 minutos. Após esse período, o corante ligado as células aderentes foi solubilizado com 200 µL de etanol 95% (v/v). O biofilme foi quantificado a 570 nm utilizando um espectrofotômetro.

Para o controle positivo foi utilizado à cepa T3EPM em DMEM e como controle negativo o extrato em DMEM. O ensaio foi realizado em triplicata e para o cálculo de porcentagem de redução de biomassa empregou-se a equação III.

$$\% \text{ Redução de biomassa} = [(100) - (\text{OD antimicrobiano} \times 100) / (\text{OD controle})]$$

4.5.4.2 Ensaio de MTT para análise de biofilme em formação

A atividade antimicrobiana do extrato de jambolão sobre o biofilme em formação foi avaliada segundo Cady et al. (2012), com adaptações baseadas em Riss et. al., (2016). A bactéria *E. coli* T3EPM foi cultivada em placa de Petri contendo meio ágar nutriente (AN) por 24 horas a 37 °C. Em seguida, para preparo do inóculo, colônias bacterianas crescidas no AN foram suspendidas em PBS até chegar na turbidez compatível com a escala 0.5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em microplaca de poliestireno com 96 poços, foram adicionados 20 µL do inóculo bacteriano ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e 180 µL de DMEM glicosado (0,45% de glicose) contendo diferentes concentrações do extrato (250 µg/mL a 4.000 µg/mL). Foi

realizada incubação por 24 horas a 37°C, para então, o meio de cultura em suspensão ser retirado dos poços para serem lavados, por duas vezes, com 200 µL de PBS a 0,01 M (pH 7,4). Em seguida, 100 µL de MTT a 0,25 mg/mL, preparado em meio DMEM, foram adicionados a cada poço e a microplaca incubada a 37 °C, por 2 horas e ao abrigo de luz. Posteriormente, o MTT em suspensão foi removido de todos os poços e 100 µL de solubilizante (solução de álcool isopropílico contendo triton x-100 a 1% v/v e HCl a 0,00365 N) foi adicionado por poço. Após agitação por 15 minutos, foi realizada a leitura a 570 nm utilizando espectrofotômetro.

Para o controle positivo adicionou-se 180 µL de meio DMEM glicosado e 20 µL de bactéria e como controles 200 µL do extrato em meio DMEM. O ensaio foi realizado em triplicata e para o cálculo de porcentagem de redução de biomassa empregou-se a equação III.

4.5.4.3 Ensaio de MTT para análise de biofilme formado

A atividade antibacteriana frente a biofilme formado foi avaliada segundo Cady et al. (2012), com adaptações baseadas em Riss et. al. (2016). As células bacterianas de *E. coli* T3EPM foram cultivadas em placa de Petri contendo meio AN, por 24 horas e a 37°C. Em seguida, preparou-se o inóculo bacteriano adicionando colônias bacterianas crescidas no AN à PBS 0,01 M (pH 7,4) até atingir a turbidez referente à escala 0.5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para a formação de biofilme utilizou-se microplaca de poliestireno com 96 poços. A cada poço adicionou-se 20 µL do inóculo bacteriano (1×10^8 UFC/mL) e 180 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 0,45% de glicose, posteriormente a placa foi incubada por 24 horas, a 37°C. Após o tempo de incubação, o meio de cultura em suspensão foi retirado e os poços foram lavados, por duas vezes, com 200 µL de PBS a 0,01 M (pH 7,4). Alíquotas de 200 µL de DMEM (0,45% de glicose) contendo diferentes concentrações do extrato (250 µg/mL a 4000 µg/mL) foram transferidas para os poços, e a placa contendo o biofilme formado com tratamento antimicrobiano foi incubada novamente a 37°C, por 24 e 48 horas. Uma placa de biofilme formado foi preparada para cada período de tratamento, sendo que no ensaio de 48 horas o tratamento foi feito após 24 horas. Após cada tempo de tratamento, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL PBS. Em seguida, 100 µL de MTT a 0,25

mg/mL, preparado em meio DMEM, foram adicionados a cada poço e levados a incubação por 2 horas a 37°C ao abrigo de luz. Posteriormente, o MTT em suspensão foi removido de todos os poços e 100 µL de solubilizante (solução de álcool isopropílico contendo triton x-100 a 1% v/v e HCl a 0,00365 N) foi adicionado por poço. Após agitação por 15 min, foi realizada a leitura a 570 nm utilizando um espectrofotômetro.

Para o controle positivo, adicionou-se 200 µL de meio DMEM glicosado em poços com biofilme formado, e como controles negativos foram utilizados poços livres de biofilme contendo 200 µL do extrato diluído em meio DMEM. O ensaio foi realizado em triplicata e para o cálculo de porcentagem de redução de biomassa empregou-se a equação III.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi determinada pelo software GraphPad Prism®, versão 5.01. As concentrações dos extratos que inibem o processo oxidativo em 50% (IC₅₀) foram estimadas utilizando curva hiperbólica. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas para valores correspondentes a $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

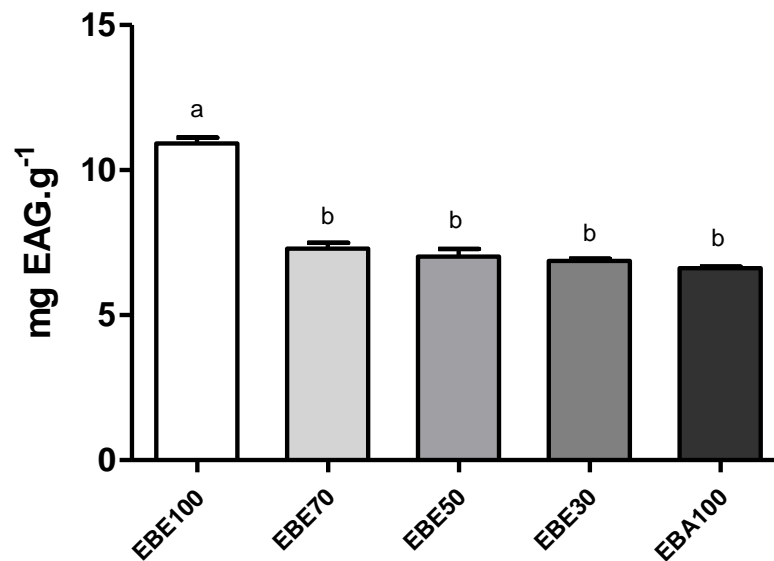
5.1 ENSAIOS PRÉVIOS DOS EXTRATOS

Os resultados de CFT e FT encontrados na literatura para o fruto jambolão são variados, tendo em vista que a concentração desses compostos varia em função do clima, estágio de maturação do fruto, metodologias de extração e compostos utilizados como padrão. Faria et al. (2011) quantificaram CFT em extratos metanol:água (8:2) da polpa e casca do fruto, que apresentaram um teor de 1,48 mg EAG.g⁻¹. Kuskoski et al. (2006) observaram CFT de 1,94 e 2,29 mg EAG.g⁻¹ em extratos metanólico e etanólico da polpa, respectivamente. Já Luximon-Ramma et al. (2003) relataram que obtiveram concentração de 2,35 mg EAG.g⁻¹ em extratos acetona:água (7:3) dos frutos frescos e no trabalho realizado por Reynertson et al., (2008) o extrato metanólico do fruto apresentou um teor de 9,95 mg EAG.g⁻¹. Todos os resultados foram inferiores ao encontrado neste estudo.

O conteúdo de FT encontrado nos extratos do presente trabalho foi cerca de 4 vezes superior ao encontrado por Faria (2011) que obteve 0,912 mg ERT.g⁻¹ para o extrato metanol:água (8:2) do fruto. Na pesquisa conduzida em frutos tropicais exóticos brasileiros por Rufino et al. (2010), os resultados foram inferiores ao presente trabalho com 0,70 mg ERT.g⁻¹ para extrato metanol:água (5:5) da polpa e casca de jambolão.

Os conteúdos de compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais (FT) foram avaliados para os extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso da polpa e casca do fruto jambolão (Figuras 20 e 21).

Figura 20 - Teores de compostos fenólicos para os cinco extratos brutos do fruto *S. cumini*.



Valores representam a média. Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

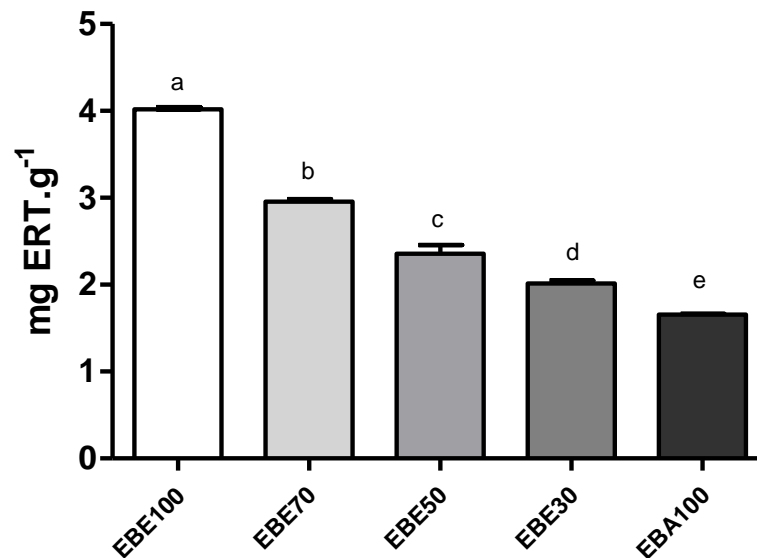
Os resultados demonstram que o extrato EBE100 apresentou o melhor resultado de CFT ($10,92 \pm 0,20$ mg EAG.g⁻¹), sendo então o solvente mais eficaz na extração de compostos fenólicos comparado aos demais extratos hidroetanólicos e aquoso. A concentração de CFT entre os extratos hidroetanólico EBE70 ($7,30 \pm 0,20$ mg EAG.g⁻¹), EBE50 ($7,02 \pm 0,26$ mg EAG.g⁻¹), EBE30 ($6,87 \pm 0,07$ mg EAG.g⁻¹) e EBA100 ($6,62 \pm 0,05$ mg EAG.g⁻¹) apresentaram teores similares não diferindo significativamente entre si ($p < 0,05$).

Rufino et al. (2010) avaliaram 18 frutos do Brasil, dentre eles o Jambolão, classificando-os de acordo com a concentração de compostos fenólicos em três níveis: baixo (inferior a 1 mg EAG.g⁻¹), médio (entre 1 a 5 mg EAG.g⁻¹) e alto (acima de 5 mg EAG.g⁻¹). Com base nesse conceito, os extratos avaliados podem ser considerados como sendo produtos com alta concentração de CFT.

Foi observado que o extrato obtido com etanol puro (EBE100) também apresentou maior conteúdo de FT ($4,02 \pm 0,01$ mg ERT.g⁻¹), seguido do EBE70 ($2,96 \pm 0,03$ mg ERT.g⁻¹), do EBE50 ($2,36 \pm 0,10$ mg ERT.g⁻¹), do EBE30 ($2,02 \pm 0,03$ mg ERT.g⁻¹) e EBA100 ($1,66 \pm 0,01$ mg ERT.g⁻¹) (Figura 21), mostrando relação entre o teor de polifenóis e flavonoides extraídos pelos diferentes solventes. Os diferentes extratos apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$). Em adição, pode-se observar que os teores de CFT são aproximadamente 3 vezes

maior que os de FT, corroborando com outros trabalhos que relatam não só a presença de flavonoides, mas de diferentes substâncias polifenólicas, como os taninos (BRITO et al., 2007; FARIA et al., 2011; ZHANG, LIN, 2009).

Figura 21 - Teores de flavonoides para os cinco extratos brutos do fruto *S. cumini*.



Valores representam a média. Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Devido à diversidade dos compostos bioativos nos frutos com distintas propriedades, sua quantificação é fortemente influenciada pelos solventes utilizados durante a extração (SILVA, 2015). A solubilidade dos compostos fenólicos e flavonoides em um solvente é uma característica que está relacionada ao seu peso molecular (SILVA, 2015), a polaridade, grau de polimerização, sua interação com outros constituintes (APAK et al., 2007) e ao tipo de grupos funcionais como –OH e –COOH presentes, os quais podem ser solvatados eletrofílico e nucleofílicamente por solventes polares próticos.

Portanto, os resultados encontrados demonstram que o solvente etanol puro conseguiu extrair do jambolão um maior conteúdo de polifenóis e flavonoides totais que os solventes hidroalcolícos e aquoso.

5.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS BRUTOS DE *S. cumini*.

Devido a sua diversificada composição química, a ação antioxidante de extratos vegetais pode ser atribuída à ação sinérgica de várias substâncias, pertencentes a diferentes grupos químicos (BORA et al., 2005). Contudo, dentre estes compostos, os polifenóis são amplamente reconhecidos por suas propriedades antioxidantes (SOUSA et al., 2007). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos se deve principalmente a sua estrutura química, que desempenha um papel neutralizando ou impedindo a formação dos radicais livres e quelação de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007).

Uma vez que existem diversas maneiras de um extrato exercer sua atividade antioxidante, é importante relacionar diferentes métodos antioxidantes a fim de compreender melhor o potencial antioxidante dos extratos estudados (PIETTA, 2000). Deste modo, os extratos foram avaliados mediante a capacidade de doar átomo de H ao radical aniônico DPPH, doar elétron ao radical catiônico ABTS, pela capacidade redutora (FRAP), como também pela propriedade em quelar íon ferro (Tabela 2).

Tabela 2 - Capacidade antioxidante dos extratos brutos do fruto Jambolão (*S. cumini*) por diferentes métodos.

| Extratos etanólicos (%) | DPPH IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) | ABTS IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) | FRAP (µmol/L eq. trolox/µg.mL ⁻¹) | BATO IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) |
|-------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 100 | 111,99 | 83,55 | 98,97 | 300,22 |
| 70 | 141,38 | 106,11 | 55,61 | 316,11 |
| 50 | 163,56 | 107,85 | 46,53 | 394,10 |
| 30 | 188,44 | 122,57 | 23,81 | 472,96 |
| 0 | 195,17 | 131,31 | 21,02 | 738,45 |
| Quercetina | 0,8 | 0,69 | - | 4,0 |

Os valores de IC₅₀ sugeriram que o extrato EBE100 apresentou maior habilidade em doação de hidrogênio ao radical livre DPPH do que os demais extratos EBE70, EBE50, EBE30 e EBA100. A atividade antioxidante máxima foi de 92% empregando a concentração de 318,51 µg.mL⁻¹ de EBE100. Contudo, podemos verificar que a atividade doadora de hidrogênio ao DPPH dos extratos é inferior

quando comparada com a quercetina (IC_{50} de $0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$), um flavonoide com alto potencial antioxidante (VICENTINI et al., 2007).

Banerjee, Dasgupta e De (2005) avaliaram a atividade antioxidante do extrato aquoso do fruto jambolão empregando o ensaio com radical DPPH, o valor encontrado para o extrato foi IC_{50} igual a $168 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentando, assim uma atividade superior quando comparado ao extrato aquoso EBA100 do estudo com IC_{50} de $195,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Contudo, essa atividade antioxidante foi inferior aquela do extrato etanólico EBE100, que apresentou IC_{50} $111,99 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Plaza (2007) utilizando o método DPPH analisou o extrato metanol:água (50:50) do fruto Jambolão (IC_{50} $65 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo essa uma concentração inibitória menor quando compara a todos extratos do estudo.

Com base nos resultados da tabela 2, podemos verificar que para todos os extratos a ação frente ao radical ABTS foi mais pronunciada do que para o radical DPPH. Os valores obtidos de IC_{50} mostraram o extrato EBE100 com maior atividade, seguido de EBE70, EBE50, EBE30 e EBA100. Na concentração $242,36 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato EBE100 a atividade antioxidante alcançou 100% de inibição do radical.

No estudo realizado por Hossain et al., (2016), o ensaio de doação de elétrons ao radical ABTS foi utilizado na investigação da atividade antioxidante do extrato etanólico da folha de jambolão que apresentou IC_{50} de $57,80 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo sua capacidade superior ao dos extratos desta pesquisa, que variam de $83,55$ a $131,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Aqil et al., (2012) avaliou o extrato etanol:água (75:25) da polpa e casca do fruto jambolão pelo método do ABTS, que apresentou IC_{50} de $17,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, resultado este 4 vezes menor que o encontrado para o extrato EBE100 ($83,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sugerindo maior potencial antioxidante. A atividade antioxidante encontrada por Garcia (2016) para quercetina através do ensaio ABTS foi igual a IC_{50} $0,69 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que se trata de uma capacidade maior de doação comparada ao melhor extrato do estudo EBE100.

Os resultados do poder redutor para os extratos mostram que o extrato EBE100 ($98,97 \mu\text{mol/L eq. trolox}/\mu\text{g.mL}^{-1}$), foi o mais efetivo na capacidade de reduzir Fe^{3+} em Fe^{2+} . Segundo Rockenbach et al., (2008) a eficiência antioxidante determinada pelo método FRAP depende do potencial redox dos compostos analisados, caracterizado pela complexidade de suas moléculas, uma vez que a

redução do complexo férrico se baseia na ação de doação de elétrons por antioxidantes. Sá (2008) obteve para o extrato etanólico do fruto jambolão um poder redutor de $2,62 \mu\text{mol/L eq. trolox}/\mu\text{g.mL}^{-1}$, resultado inferior comparado aos extratos deste estudo. O extrato etanol:água (80:20) das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* da família Myrtaceae foi estudado por Silva (2013), o extrato apresentou um poder de redução igual a $0,046 \mu\text{mol/L eq. trolox}/\mu\text{g. mL}^{-1}$, resultado este menor que do extrato EBE100.

Além disso, os resultados também sugerem que os extratos estudados apresentam a propriedade de quelar íons ferro, com valores de IC_{50} variando de 300,22 a 738,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Forte (2012) analisou o efeito quelante dos extratos metanol:água (80:20) das folhas de *Eugenia biflora* e *Eugenia protenta* da família Myrtaceae que apresentaram IC_{50} de 1,235 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 3,178 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, resultado este menor que o extrato EBE100 indicando maior poder quelante de íons Fe^{2+} . Estudos desenvolvidos por Casagrande (2005) demonstraram o efeito da quercetina em quelar íons Fe^{2+} , que quando empregado a concentração de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a inibição da formação do complexo Fe-BPS é de 60%. Já o extrato EBE100, que neste estudo expôs maior efeito sobre a quelação de íons Fe^{2+} , apresentam inibição máxima igual 78% na concentração de 1015,09 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que o extrato de menor efeito EBA100 apresentou apenas 55% de inibição utilizando uma concentração de 1926,88 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Como esses valores são superiores ao da quercetina, é necessário uma concentração maior de extrato para inibir a formação do complexo Fe-BPS.

Fukumoto e Mazza (2000), analisando a atividade antioxidante de compostos fenólicos, concluíram que esta cresce de acordo com o aumento no número de grupamentos hidroxila e com a diminuição de grupos glicosilados. Apesar disso, se fazem necessárias investigações que identifiquem qual grupamento fenólico é responsável por exercer poder antioxidante em um determinado fruto para que sejam elucidadas de forma precisa estas interações. Rockenbach et al., (2008) presume que a atividade antioxidante pode ser influenciada também por outros fatores, incluindo as condições e etapas de oxidação, bem como a formação e estabilidade dos radicais.

Com base nos resultados, pode-se verificar que existem de compostos que atuam como agentes antioxidantes nos extratos, entretanto, esta

ação foi diferenciada conforme as diferentes proporções de solventes extrator utilizados. Observou-se que o EBE100, apresentou maior conteúdo de polifenóis e flavonoides totais, em consequência maior atividade antioxidante. Desta maneira, pode-se considerar que para o fruto jabolão esta concentração do solvente etanol foi a mais eficiente para a extração de compostos responsáveis por sua ação antioxidante, visto que a adição de água no solvente extrator, solvente de alta polaridade, indicou a redução do potencial antioxidante. Portanto, pode-se então definir a seguinte tendência para a eficiência dos extratos frente a atividade antioxidante: EBE100 > EBE70 > EBE50 > EBE30 > EBA100. Dessa forma, o extrato de jabolão obtido com EtOH 100% (EBE100), que apresentou maior conteúdo de polifenóis e flavonoides totais, assim como também apresentam maior capacidade antioxidante, foi escolhido para ser avaliado quanto a sua identificação química, citotoxicidade e atividade antimicrobiana.

5.3 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA

As plantas representam uma rica fonte de compostos bioativos, por isso as técnicas analíticas são essenciais para a elucidação da complexa composição química dos produtos de origem vegetal. A espectrometria de massa (EM) constitui uma técnica microanalítica utilizada para obter informações sobre o peso molecular e características estruturais da amostra, tornando-se uma das mais importantes ferramentas analíticas na determinação do perfil dos compostos bioativos (HAO; ZHAO; YANG, 2007).

Os compostos presentes no extrato EBE100 foram determinados através de quatro injeções diretas no ESI/MS utilizando a técnica de múltiplas reações monitoradas (MRM) no modo positivo e negativo, de caráter qualitativo com um tempo máximo de análise de 2 minutos para cada injeção. A tabela 3 apresenta os dados de MRM obtidos para o extrato EBE100.

Tabela 3 - Dados de MRM para o extrato EBE100 do fruto Jambolão (*S. cumini*).

| Compostos | [M-H] ⁺ [M-H] ⁻ m/z |
|---------------------------------|-------------------------------------------------|
| | <i>Ácidos fenólicos^a</i> |
| Ácido gálico | 169 |
| Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico | 137 |
| | <i>Antocianinas^b</i> |
| Malvidina-3-O-glicosídeo | 493 |
| Petunidina-3-O-glicosídeo | 479 |
| Delfinidina-3-O-glicosídeo | 465 |
| Cianidina-3-O-glicosídeo | 449 |
| Malvidina-3,5-O-diglicosídeo | 655 |
| Petunidina-3,5-O-diglicosídeo | 641 |

^a Íon modo negativo, ácidos fenólicos e flavonóis ^b Íon modo positivo, antocianinas.

A técnica (MRM) é um método de análise rápido e sensível, pois apenas o íon e seu fragmento pré-selecionado são observados no analisador do espectrômetro de massas (IGLESIAS, 2016). Como os íons identificados apresentaram instabilidade não foi possível obter os espectros de fragmentação dos compostos identificados em MRM.

A análise de EM possibilitou a identificação de 7 compostos, dentre eles um ácido fenólico e antocianinas. As antocianinas encontradas são coerentes com os resultados relatados em estudos anteriores com o fruto jambolão, onde as principais antocianinas identificadas foram 3-glicosídeo de malvidina, petunidina e cianidina (FARIA, 2011) e, ainda, 3,5-diglicosídeos de malvidina e petunidina (BRITO et al., 2007; LI et al., 2009; VEIGAS et al., 2007). O ácido gálico também foi identificado por Faria (2011); nestes trabalhos os dados obtidos foram por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas. De acordo com Infante (2013), o ácido gálico apresenta propriedades terapêuticas como atividade antioxidante, antimicrobiana e antitumoral.

A partir da identificação destes compostos no extrato EBE100 pode-se sugerir que esses são os possíveis responsáveis pela atividade antioxidante, uma vez que são conhecidos por possuírem propriedades antioxidantes (OLIVEIRA et al., 2009). Os perfis obtidos a partir do extrato EBE100 estão apresentados nas figuras 22,23 e 24.

Figura 22- MRM do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (*S. cumini*) para ácido gálico (169 m/z) e Ácido *p*-hidroxibenzoico (137 m/z) para o modo negativo.

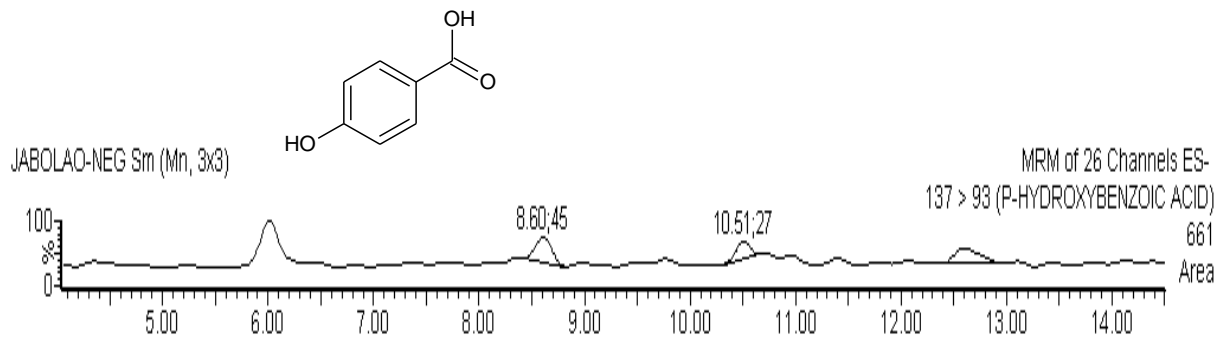
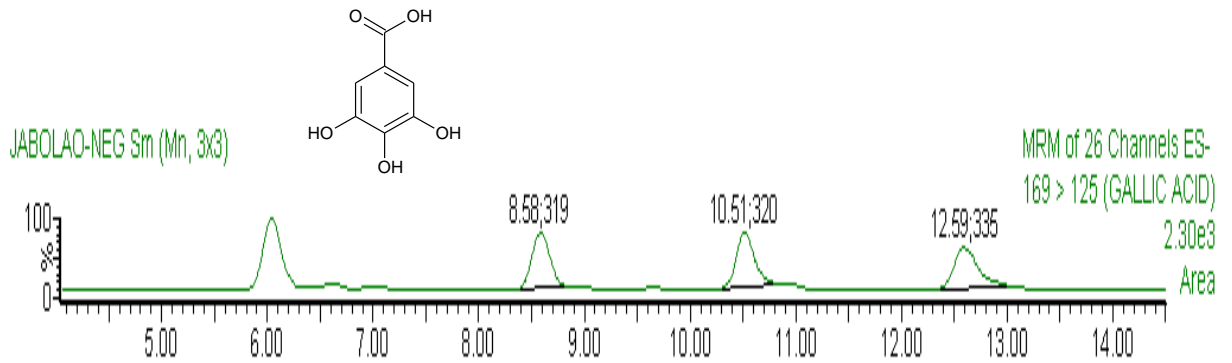


Figura 23- MRM do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (*S. cumini*) para malvidina-3-O-glicosídeo (493 *m/z*), petunidina-3-O-glicosídeo (479 *m/z*), delphinidina-3-O-glicosídeo (465 *m/z*) e cianidina-3-O-glicosídeo (449 *m/z*) para o modo positivo.

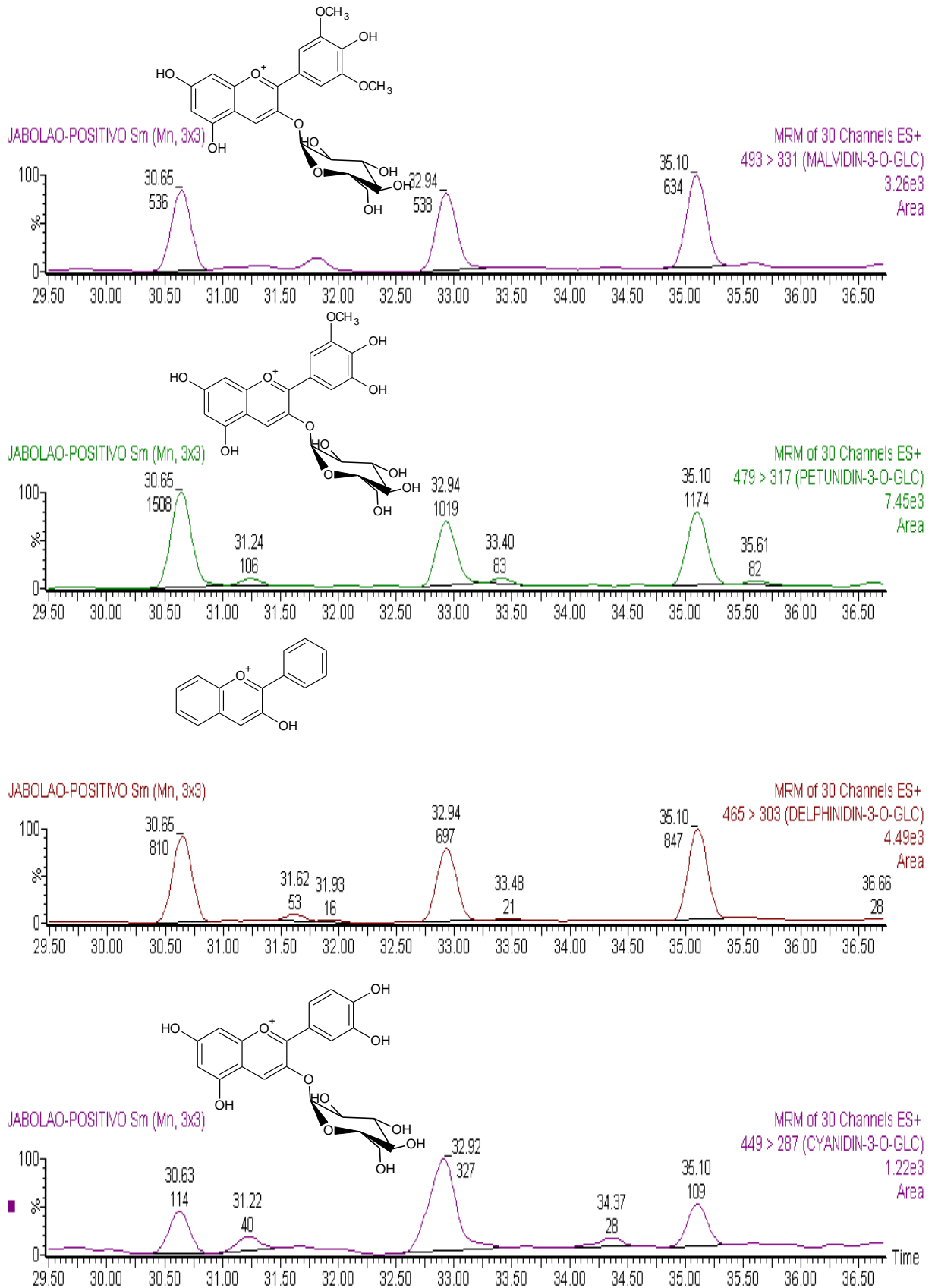
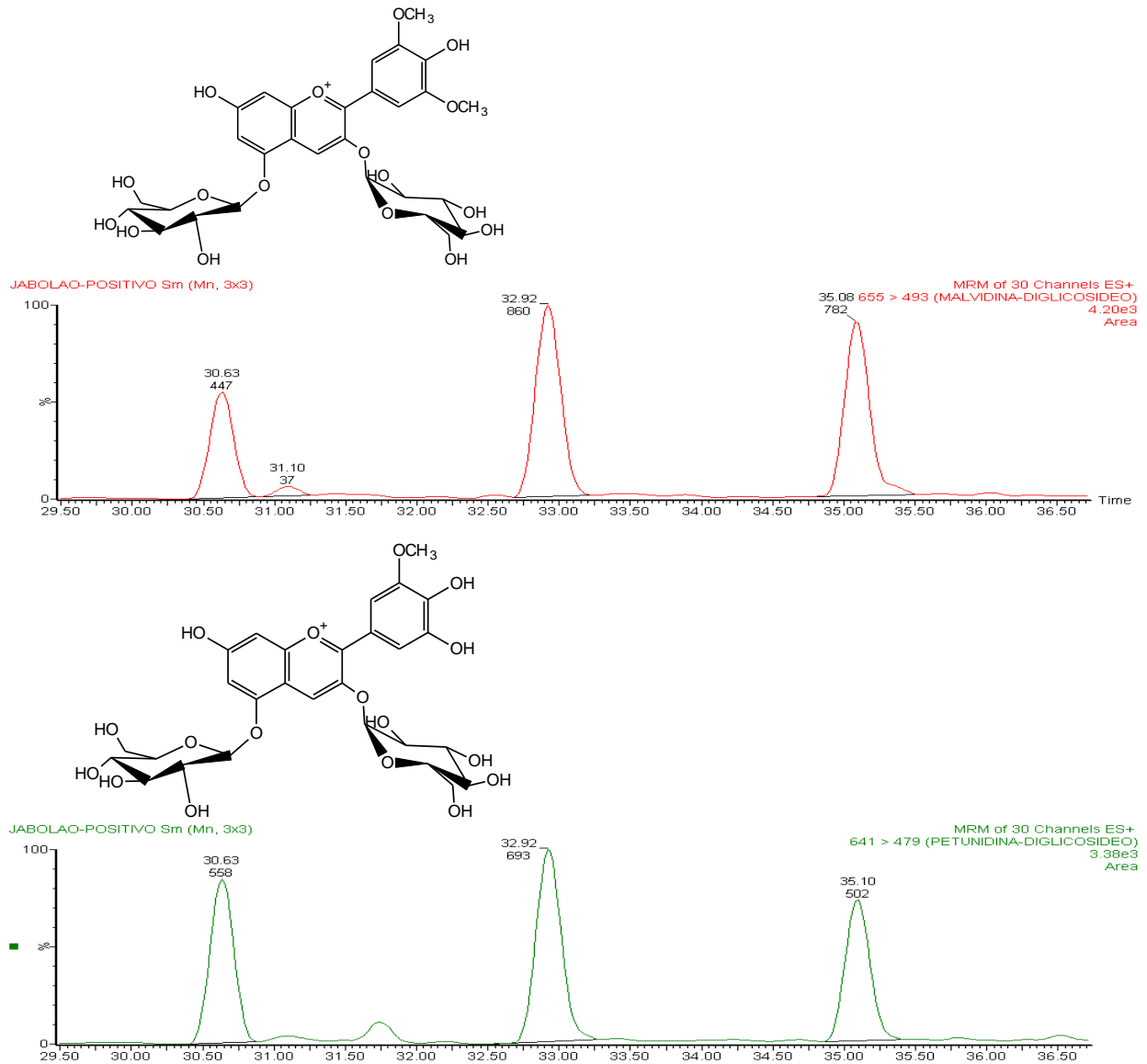


Figura 24- MRM do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (*S. cumini*) para malvidina-3,5-O-diglicosídeo (655 m/z) e petunidina-3,5-O-diglicosídeo (641 m/z) para o modo positivo.

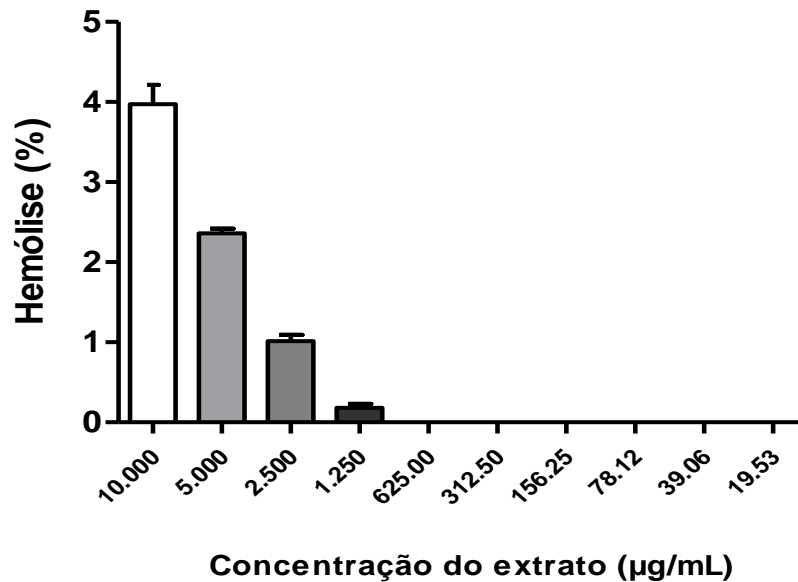


5.4 CITOTOXICIDADE

A figura 25 apresenta os resultados de toxicidade do extrato EBE100 para eritrócitos humanos. Este estudo mostrou que o extrato EBE100 tem baixa atividade hemolítica, sendo que a porcentagem de células que sofreram hemólise variou de 0 a 3,97% de hemólise. Mesmo nas mais altas concentrações testadas, a atividade hemolítica não foi expressiva, por isso não foi possível calcular o valor da concentração citotóxica a 50 % dos eritrócitos (CC_{50}). O triton x-100 utilizado como

controle positivo promoveu 100% de hemólise dos eritrócitos, pois atua como solubilizante das membranas lipídicas (PRETÉ et al., 2002).

Figura 25- Atividade hemolítica do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (*S. cumini*).



De acordo com o critério estabelecido no documento ASTM E2524-08 (2013), porcentagem maior que 5% indica dano aos eritrócitos humanos. No entanto, a maior concentração testada do extrato EBE100 causou apenas 3,97% de hemólise. Os resultados deste estudo corroboram com o estudo de Figueiredo et al. (2016) que avaliou a atividade hemolítica de extrato hidroetanólico (30:70) de folhas de Jambolão, mostrando que 500 µg/mL de extrato provocou 7,21% de hemólise, e as concentrações inferiores (250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL) não apresentaram atividade hemolítica.

Os metabólitos secundários de plantas são responsáveis por suas propriedades terapêuticas, porém reações adversas podem aparecer em virtude de da utilização indevida desse material vegetal. A utilização segura de compostos extraídos de planta na medicina tradicional é de suma importância, uma vez que esses princípios bioativos podem ser tóxicos devido a capacidade de se associarem à membrana de eritrócitos, possuindo ação hemolítica (EISENBRAND et al., 2002).

Embora no extrato avaliado tenha sido identificada a presença de metabólitos secundários possivelmente tóxicos, o ensaio de toxicidade *in vitro* não mostrou resultados condizentes com achados na literatura, uma vez que estudos

indicam que compostos isolados de plantas, tais como polifenóis, epicatequinas e saponinas são capazes de promover hemólise e consequente liberação de hemoglobina, além da sua oxidação formando metahemoglobina (GRINBERG et al., 1997; ZHANG et al., 1997; BUKOWSKA; KOWALSKA, 2004).

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.5.1 Disco-Difusão em Ágar e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A investigação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato EBE100, utilizando o teste de difusão em ágar, mostrou que o mesmo não possui ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, pois o ensaio mostrou ausência de halos de inibição de crescimento para *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae*.

É interessante salientar que o ensaio de difusão em ágar serve para análises qualitativas. A extração e o solvente utilizado nesse processo podem concentrar compostos com algum caráter apolar e estes, por consequência não difundem bem no meio de cultura utilizado (CABRAL, 2008). Desta forma, também foi realizado ensaio quantitativo por meio de determinação da CIM do extrato frente ao microrganismo, utilizando a técnica de microdiluição em caldo, sendo este método o mais recomendável para análise de atividade antimicrobiana.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de difusão em ágar para observação de halo de inibição e de determinação de CIM.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana do extrato EBE100 do fruto Jambolão (*S.cumin*).

| Bactéria | Extrato EBE100 | |
|-------------------------------------------|-----------------------|-------------|
| | Halo de Inibição (mm) | CIM (µg/mL) |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 25293) | 0 | >2000 |
| <i>E. coli</i> (ATCC 25922) | 0 | >2000 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031) | 0 | >2000 |

A determinação da atividade antimicrobiana quantitativa mostrou que houve crescimento bacteriano de *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* em todas as concentrações, apresentando CIM > 2000 µg/mL. De acordo com Ríos (2005), a

atividade antimicrobiana só é interessante em concentrações abaixo de 100 µg/mL para extratos brutos e abaixo de 10 µg/mL para compostos isolados, uma vez que elevadas concentrações são de difícil aproveitamento farmacêutico.

Para Holetz et al., (2002), o extrato bruto de vegetais que apresenta CIM abaixo de 100 µg/mL tem boa atividade antimicrobiana, para valores entre 100 e 500 µg/mL a atividade é moderada, de 500 e 1000 µg/mL é fraca e quando acima de 1000 µg/mL, o extrato é considerado inativo. Considerando os critérios sugeridos por Holetz et al., (2002), os resultados contra *S. aureus*, *E.coli* e *K.pneumoniae* revelaram que o extrato avaliado neste estudo é inativo para atividade antimicrobiana.

Bezerra (2015) avaliou o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antimicrobiana do extrato aquoso do fruto de Jambolão. Os resultados encontrados para compostos fenólicos foi de 19,90 mg EAG.g⁻¹ e a atividade antimicrobiana para as bactérias *E.coli* e *S. aureus*, mostraram inibição do crescimento inibição apenas contra *S.aureus*, com CIM igual a 110 µg/mL. Estes resultados foram diferentes do encontrado para o extrato EBE100, onde a concentração de compostos fenólicos foi duas vezes inferior (10,92 mg EAG.g⁻¹).

Singh et al., (2016) investigou o extrato hidroetanólico (30:70) da polpa de Jambolão, os resultados encontrados para compostos fenólicos totais foi igual a 11,74 mg EAG.g⁻¹ e a atividade antimicrobiana frente *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* foi CIM igual a 500 µg/mL, 2000 µg/mL e 2000 µg/mL, respectivamente. O estudo realizado por Turatti (2008) avaliou a atividade antimicrobiana do extrato etanólico do fruto Jambolão frente a *S. aureus* e *E. coli*, mostrando valores de CIM iguais a 78,1 µg/mL e 625,0 µg/mL, respectivamente. No experimento conduzido por Taguri, Tanaka e Kouno (2006), foi avaliada a atividade antimicrobiana de 22 compostos fenólicos isolados, entre eles o ácido gálico, que apresentou CIM de 533 µg/mL para *S. aureus*, 400 µg/mL para *K. pneumoniae* e 600 µg/mL para *E. coli*. Assim, as concentrações inibitórias mínimas relatadas na literatura tanto para compostos isolados quanto para o extrato bruto foram distintas do extrato EBE100 investigado neste estudo.

O resultado encontrado neste estudo para o extrato EBE100 corrobora com o encontrado por Ruggiero (2004) que avaliou a atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico (30:70) das folhas de *S. cumini* frente as

bactérias *S. aureus* e *E. coli*. O extrato não apresentou atividade antimicrobiana mesmo na mais alta concentração testada sendo CIM > 1000 µg/mL.

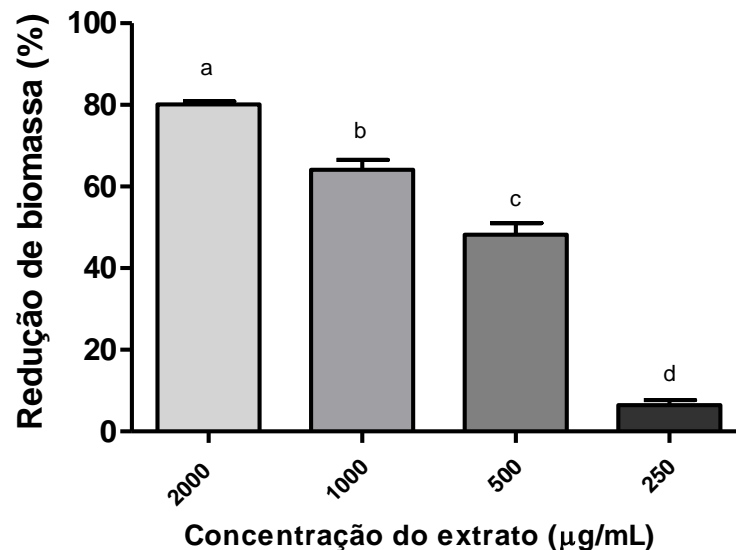
Provavelmente a concentração e o perfil de constituintes químicos apresentam semelhança com alguma caracterização descrita anteriormente dos estudos, porém dificilmente será igual, visto que os metabólitos secundários resultam da interação química entre a planta e o ambiente. Desse modo, sua síntese pode ser afetada por diversas variações como disponibilidade hídrica, temperatura, altitude, nutrientes do solo, sazonalidade, radiação ultravioleta, órgão onde são produzidos, estágio de desenvolvimento, localização geográfica, estação do ano, sinergismo, além dos métodos de extração e avaliação (PROBST, 2012).

5.5.2 Atividade Antimicrobiana Frente a Biofilme

5.5.2.1 Ação sobre biofilme em formação pelos métodos colorimétricos utilizando cristal violeta e MTT

O ensaio de quantificação de biomassa bacteriana total, utilizando a coloração com cristal violeta, indicou que o extrato EBE100 reduziu a formação de biofilme. Esse efeito inibitório se mostrou dependente da concentração, conforme o aumento da concentração, aumenta-se a taxa inibitória. A figura 26 mostra que os melhores resultados foram obtidos nas concentrações de 500, 1000 e 2000 µg/mL, que provocaram redução da biomassa total em relação ao controle em 48,18%, 64,14% e 80,09%, respectivamente. Os diferentes extratos apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$).

Figura 26- Redução de biomassa total do biofilme de *E.coli* na presença do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (*S. cumini*).



Valores representam a média. Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

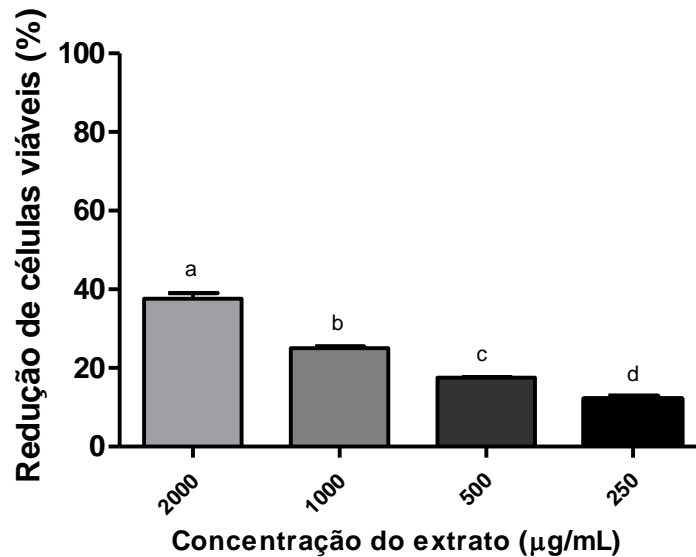
Para avaliar se o extrato interfere na formação do biofilme, foram utilizadas concentrações subinibitórias, ou seja, que não afetam o crescimento de células planctônicas, uma vez que o teste de determinação de CIM, realizado anteriormente neste estudo, mostrou que o extrato EBE100 não afetou o crescimento de *E.coli* (CIM > 2000 µg/mL). Portanto, o extrato EBE100 possui a capacidade de inibir a formação de biofilme de *E. coli* sem afetar o crescimento de células em suspensão, apenas reduzindo a colonização da superfície por células sésseis.

Os resultados encontrados no estudo estão de acordo com os dados relatados por Gopu, Kothandapani e Shetty (2015) que avaliaram a formação de biofilme de *K. pneumoniae* na presença do extrato metanol:água (70:30) do fruto de jambolão, utilizando ensaio com cristal violeta. Os resultados encontrados mostram que nas concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL o extrato inibiu em 35,85%, 64,03% e 79,94% a formação de biofilme.

Além de reduzir a formação de biomassa total em biofilme, o extrato também reduziu a viabilidade celular na formação do biofilme de *E.coli*. A figura 27 mostra os resultados obtidos no ensaio de MTT para avaliar metabolismo microbiano no biofilme em formação, indicando que as concentrações de 2000, 1000, 500 e 250 µg/mL de extrato provocaram redução de 37,59%, 25,08%, 17,51% e 12,14% de

células viáveis em relação ao controle, respectivamente. Os diferentes extratos apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$).

Figura 27- Redução de células viáveis sésseis do biofilme de *E.coli* na presença do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (*S. cumini*).



Valores representam a média. Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O ensaio de MTT confirmou o resultado encontrado no ensaio com cristal violeta, que mostrou redução de biomassa total. O MTT mostrou que concentrações subinibitórias de extrato EBE100 podem afetar o metabolismo do biofilme de *E. coli* em formação, ou seja, verificou-se redução de células sésseis viáveis sem interferência na viabilidade de células planctônicas, indicando a ação do extrato EBE100 contra a formação de biofilme.

O extrato EBE100 pode ter atuado em uma série de etapas na formação de biofilme. Trentin, Giordani e Macedo (2013) relatam que a inibição da formação de biofilmes ocorre por vias que não envolvem a morte da bactéria, mas através de interferência na adesão bacteriana à superfície ou na comunicação celular bacteriana QS.

Para a inibição da adesão celular bacteriana, o antimicrobiano tem que ser capaz de inibir a biossíntese de pili, uma estrutura bacteriana responsável pela adesão, ou ter propriedades de quelação de ferro, um elemento crítico para a adesão bacteriana a superfícies (BERG et al., 2008; PINKNER et al., 2006). A interferência na comunicação bacteriana QS por compostos naturais ocorre através

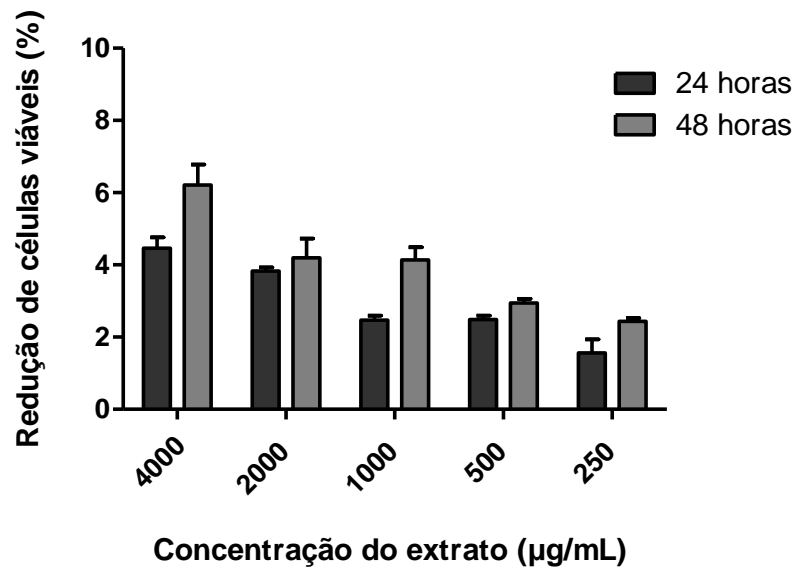
da degradação ou da competição com o receptor das moléculas sinalizadoras (MARTIN; HOVEN; COOK, 2008; TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013), devido semelhança estrutural dos compostos naturais com as moléculas sinalizadoras. Desta maneira, a produção de EPS e outras atividades são prejudicadas (LAZAR, 2011).

Gopu, Kothandapani e Shetty (2015) avaliaram dois extratos da polpa do fruto de Jambolão, o extrato hidroetanólico (25:75) com resultados satisfatórios na atividade inibitória na produção de EPS por *K. pneumoniae*; e o extrato hidrometanólico (30:70) apresentou atividade anti-quorum sensing.

5.5.2.2 Ensaio de MTT para análise da atividade antimicrobiana sobre biofilme formado

O efeito do extrato EBE100 contra biofilme formado de *E.coli* é apresentado na Figura 28. Assim como nas células planctônicas avaliadas, todas as concentrações testadas não apresentaram ação sobre o biofilme formado. Mesmo na maior concentração testada (4000 µg/mL), houve a redução de viabilidade de células sésseis apenas em 4,46% e 6,21% para 24 e 48 horas de tratamento, respectivamente. Sendo este resultado já esperado, uma vez que neste estudo não foi encontrado valor de CIM do extrato de jambolão para *E.coli*, ou seja, o extrato não afeta facilmente células livres, portanto a possibilidade de afetar células envolvidas em uma estrutura complexa como a de biofilme é menor.

Figura 28- Redução de células viáveis sésseis do biofilme formado de *E.coli* na presença do extrato EBE100 do fruto do Jambolão (*S. cumini*).



Um agravante associado aos biofilmes bacterianos é a sua resistência aos agentes antimicrobianos (CARTAXO, 2014). Bactérias que vivem nessas comunidades são frequentemente 10 a 1000 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos do que quando estão na forma planctônica (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). Considerando essa característica, foram realizados um tratamento no período de 24 horas e outro em 48 horas, além de utilizar uma concentração duas vezes mais alta comparada à do teste de MIC.

Os resultados apontam que as variáveis tempo de contato e concentração de jambolão não afetam o metabolismo microbiano do biofilme de *E. coli*, ou seja, o tempo de contato do extrato com o biofilme e a concentração de extrato nos tratamentos (24 e 48 horas) não interferiram na porcentagem de células sésseis viáveis em comparação ao controle de biofilme não tratado. A partir dessa investigação, é notável que a inibição de formação de biofilme seja mais fácil de ser alcançada do que a erradicação de biofilme já estabelecido.

Diversos fatores têm sido postulados para explicar a maior resistência de células incorporadas a biofilmes aos antimicrobianos, tais como a baixa penetração de agentes químicos na matriz EPS, que atua como barreira física interagindo e retendo parte dos agentes antimicrobianos, sequestrando os antimicrobianos hidrofílicos e carregados positivamente (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Apesar de não apresentar ação contra células sésseis do biofilme formado, uma alternativa e estratégia de aplicação a ser considerada é a utilização do extrato em conjunto com outro antibiótico; a combinação atuaria em duas frentes distintas, o antibiótico afetando a viabilidade celular e o extrato na inibição da formação de biofilme.

6. CONCLUSÃO

O solvente extrator EtOH 100% foi o mais eficiente na extração de compostos fenólicos e flavonoides.

A técnica MRM foi eficaz na identificação química do EBE100 foi eficaz, indicando a presença de ácidos fenólicos e antocianinas, que podem ser atribuídos a atividade antioxidante e anti-biofilme.

O extrato EBE100 possui potencial bioativo, com bons resultados na capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS, FRAP e batofenantrolina. Os resultados encontrados para citotoxicidade de EBE100 foram baixos, variando de 0% a 3,97% de hemólise, mesmo para as mais altas concentrações testadas.

Para atividade antimicrobiana, o extrato não apresentou ação frente a células planctônicas mesmo na máxima concentração testada 2000 µg/mL, mas teve ação na redução de biomassa e viabilidade celular na formação do biofilme de *E.coli*.

Embora o extrato EBE100 não tenha demonstrado o mesmo patamar de atividade antioxidante e antimicrobiana de alguns extratos ou compostos isolados, pode-se concluir que o extrato produzido nas condições deste estudo, pode ser considerado fonte antioxidante natural e com ação na formação biofilmes, e podendo ser utilizados em associação com outros produtos para estes fins.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. **Jambolão: a cor da saúde**. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/Jambolao/Index.htm>. Acesso em: 12 nov. 2016.
- AKHAVAN, M.; JAHANGIRI, S.; SHAFAGHAT, A. Studies on the antioxidant and antimicrobial activity and flavonoid derivatives from the fruit of *Trigonostadium brachytaenium* (Boiss.) Alava. **Industrial Crops And Products**, v. 63, n. 1, p.114-118, jan. 2015.
- AQIL, F. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). **Nutrition And Cancer**, v. 64, n. 3, p.428-438, abr. 2012.
- ALVES, A. B. **Compostos antioxidantes em polpa de tomate: efeito do processamento e da estocagem**. 163 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- ALVES, C. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p.2202-2210, out. 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/3769/1/33.pdf>>. Acesso em: 02 dez. 2016.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 1, n. 66, p.1-9, jul. 2007. Disponível em: <<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v66n1/v66n1a01.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2016.
- ANTUNES, P. B. **Análise comparativa das frações polpa, casca, semente e pó comercial do guaraná (*Paullinia cupana*): caracterização química e atividade antioxidante in vitro**. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- APAK, R. et al. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: cuprac method. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p.7970-7981, dez. 2004.
- APAK, R. et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay. **Molecules**, v. 12, n. 1, p.1496-1547, jul. 2007.
- ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 49, n. 12, p.5736-5742, dez. 2001.

AUGUSTO, T. R. **Avaliação da atividade antioxidante de extrato hidroalcoólico de murtila (*Ugni molinae turcz*)**. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p.240-246, mar. 2012.

BALIGA, M. S. et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p.1776-1789, ago. 2011.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p.191-203, jan. 2006.

BANERJEE, D.N; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of fruit. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p.727-733, maio 2005.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 4, p.629-643, ago. 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p.113-123, maio 2006.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 1, p.63-72, jan. 2004.

BAUER, A W et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p.493-496, abr. 1966.

BENHERLAL, P. S.; ARUMUGHAN, C. Chemical composition and in vitro antioxidant studies on *Syzygium cumini* fruit. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 87, n. 14, p.2560-2569, 2007.

BERGAMASCHI, K. B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BERG, V. et al. Carboxylic acid isosteres improve the activity of ring-fused 2-pyridones that inhibit pilus biogenesis in *E. coli*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 12, p.3536-3540, jun. 2008.

BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, v. 303, n. 2, p.474-482, jun. 1993.

BEZERRA, M. de F. **Polpa de Jambolão (*Eugenia Jambolana Lam.*) fresca e desidratada**: características físico-químicas, bioativas e funcionais, efeitos biológicos em *Caenorhabditis elegans* e uso para produção de frozen yogurt caprino probiótico. 225 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use a stable free radical. **Nature**, v. 26, p. 1199-1200, 1958.

BIOQUELL. Disponível em: <http://www.bioquell.com/en-uk/resources-and-support/microbiology/klebsiella-pneumoniae> / Acesso em: 20 dez. 2016.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p.317-333, 01 Nov. 1998.

BRITO, E. S. et al. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p.9389-9394, nov. 2007.

BROINIZI, P. R. B. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale L.*). **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p.902-908, dez. 2007.

BODINI, S.F. et al. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. **Letters In Applied Microbiology**, v. 49, n. 5, p.551-555, nov. 2009.

BOVOLENTA, Y. R. **Uva 'Isabel': Perfil fenólico de cascas e sementes e influência sob a capacidade antioxidante e cor do suco após aplicação do ácido abscísico**. 123 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, 2015.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology Letters**, v. 152, n. 1, p.73-84, ago. 2004.

BYLKA, W.; MATYAWSKA, I.; PILEWSKI, N. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **Journal On Nutraceutical Science**, v. 7, n. 2, p.24-31, jan. 2004.

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. **1º Seminário Internacional de Vitivinicultura**. 2004, Lisboa. **Anais**. p.61-102, 2004.

CADY, N. C. et al. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. **Plos One**, v. 7, n. 6, p.1-12, jun. 2012.

CAMARGO, I. L. B.C; BOSSOLAN, N. R. S. Disponível em: <<http://biologia.ifsc.usp.br/micro/aula/aula01a.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2017

CAMPANINI, M. Z. et al. Topical formulations containing pimenta pseudocaryophyllus extract: in vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against uv-b-induced oxidative stress. **Aaps Pharmscitech**, v. 15, n. 1, p.86-95, nov. 2013.

CAMPBELL, M.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752 p.

CARDOSO, R. L. **Estabilidade de geleia de jambo-vermelho (*Eugenia malaccensis*, Lin.) em copo de vidro**. 181 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

CARTAXO, N. A. de O. **Estudos com *Syzygium cumini* (L.) Skeel: Caracterização da matéria-prima, perfil fitoquímico, citotoxicidade e atividade antimicrobiana sobre microrganismos associados ao biofilme dental**. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia *in vivo***. 229f. Tese (Doutorado)- Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CASAGRANDE, R. et al. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. **AAPS PharmSciTech**, v.7, n. 1, p. 64-71, mar. 2006.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p.499-509, mar. 2011.

CHANDRASEKARAN, M; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p.105-108, mar. 2004.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p.3670-3695, jun. 2013.

CECHINEL, F.; Valdir, Y. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p.99-105, fev. 1998.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, n. 1, p.1161-1168, set. 2002.

CONTRERAS-CALDERÓN, J. et al. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p.2047-2053, ago. 2011.

CROZIER, A. Classification and Biosynthesis of Plants and Secondary Products: An Overview. In: FOUNDATION), Bnf (british Nutrition. **Plants: Diet and Health**. Oxford: John Wiley & Sons, p. 27-30, 2003.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de ions de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v.29, n.2, p.287-292, 2006.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Wayne: **Clinical And Laboratory Standards Institute**. 9 ed. 88p. 2016.

CULLER, H. F. **Formação de biofilme por escherichia coli enteropatogênica atípica**. 2010. 32 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CUSHNIE, T.P.T ; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 2, p.99-107, ago. 2011.

DANUM – Instrumental Analysis. Disponível em: <<https://danum74.wordpress.com/2014/05/15/espectroscopia-de-masas-2/>>. Acesso em 16 Jan. 2017.

DAMETTO, A. C. **Bioprospecção em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)**. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; R. FENNEMA, Owen. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p.167-193, abr. 2002.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food And Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2-3, p.193-236, fev. 2002.

ESPIN, J.C. et al. Anthocyanin based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n. 5, p. 1588-1592, fev. 2000.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p.1571-1578, jun. 2011.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, jun. 1997.

FRANKEL, E. N; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 80, n. 13, p.1925-1941, ago. 2000.

FREIMOSER, F. M. et al. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p.3727-3729, ago. 1999.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p.623-633, ago. 2010.

FERGUSON, L. R; HARRIS, P. J. Protection against cancer by wheat bran. **European Journal Of Cancer Prevention**, v. 8, n. 1, p.17-26, fev. 1999.

FIGUEIREDO, T. R. M. et al. Investigação do efeito citotóxico do extrato de *Syzygium cumini* (L.) Skeel em células eucarióticas humanas. In: Congresso brasileiro de ciências da saúde, Campina Grande. **Congresso**. Campina Grande: Conbracis, 2016.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p.239-247, nov. 2000

FORTE, A. L. S. A. **Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica**. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

FLOEGEL, A. et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal Of Food Composition And Analysis**, v. 24, n. 7, p.1043-1048, nov. 2011.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p.3597-3604, ago. 2000.

GARCIA, K. C. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da polpa do fruto de *Eugenia brasiliensis* Lam**. 168 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

GÓMEZ-RUIZ, J. Á.; LEAKE, D. S.; AMES, J. M. In Vitro Antioxidant Activity of Coffee Compounds and Their Metabolites. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p.6962-6969, ago. 2007.

GEORGETTI, S.R, et al. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**. v. 41, p.1521-1527, mar. 2008.

GILLETE, M.; CARR, S. A. Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. **Nature Methods**, v. 10, p. 28-34, jan. 2013.

GOPU, V.; KOTHANDAPANI, S.; SHETTY, P. H. Quorum quenching activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels and its anthocyanin malvidin against *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 79, p.61-69, fev. 2015.

GRINBERG, L. N. et al. Protective Effects of Tea Polyphenols against Oxidative Damage to Red Blood Cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, n. 1, p.973-978, jan. 1997.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. 534 p. Springer, 2004.

GÜLÇİN, İ. et al. Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: cepharanthine and fangchinoline. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 1, p.44-53, 23 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/14756360902932792>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. **Journal Of Neurochemistry**, v. 59, n. 5, p.1609-1623, nov. 1992.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, 3ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B. Oxidative stress markers in pregnant women with preeclampsia. **The Lancet**, v. 355, p.1179-1180, 2000.

HAO, C.; ZHAO, X.; YANG, P. GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p.569-580, jun. 2007.

HARBORNE, J. B; WILLIAMS, C. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p.481-504, nov. 2000.

HOIBY, N. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal Of Oral Science**, v. 3, n. 2, p.55-65, abr. 2011.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3ª ed. 502 p. John Wiley and sons, 2007.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p.1027-1031, out. 2002.

HOSSAIN, H. et al. HPLC profiling, antioxidant and in vivo anti-inflammatory activity of the ethanol extract of *Syzygium jambos* available in Bangladesh. **Bmc Research Notes**, v. 9, n. 1, p.1-21, mar. 2016.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.6, p. 1841-1856, mar.2005.

HUSAIN, S.R. CILLARD, P. **Phytochemistry**, p.2489, 1987.

IGLESIAS, A. H. Introdução ao acoplamento cromatografia líquida: espectrometria de massas. Disponível em:<
<http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20ao%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20-%20espectrometria%20de%20massas.pdf>>. Acesso em 13 Jan. 2017.

INFANTE, J. **Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente e folha de espécies frutíferas nativas do Brasil**. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

IPE, V. **Jambolão (*Syzygium cumini*)**. Disponível em:<
<http://www.viveiroipe.com.br/?mudas=jambolao>>. Acesso em: 03 out. 2016.

IZUMI, E et al. Terpenes from copaifera demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p.2994-3001, abr. 2012.

KUSKOSKI, E. M. et al. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p.1283-1287, ago. 2006.

KUSKOSKI, E. M.et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p.726-732, dez. 2005.

KUMATZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chem**. v. 84, p.329-339, out. 2004.

LAGO, E. S.; GOMES, El.; SILVA, R. Produção de geleia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico - químicos e avaliação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p.847-852, dez. 2006.

LAZAR, V. Quorum sensing in biofilms – How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p.280-285, dez. 2011.

LEE, K. W. et al. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 51, n. 25, p.7292-7295, dez. 2003.

LEITE, B. A. **Estudo da susceptibilidade e resposta dos biofilmes de estafilococos aos agentes antimicrobianos**. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

LENZ, A. P. et al. Localized Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 74, n. 14, p.4463-4471, mai. 2008.

Li, L.; ZHANG, Y.; SEERAM, N. P. Structure of anthocyanins from *Eugenia jambolana* fruit. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 2, p.217-219, fev. 2009.

LIMA, L. A. et al. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium cumini* (*L.*) *skeels* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p.860-864, ago. 2007.

LÓPEZ, P. V. A. **Bioprospecção de extratos de croton urucurana baill e seus fungos endofíticos**. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; CROZIER, A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common *Mauritian* exotic fruits. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 83, n. 5, p.496-502, nov. 2003.

MACHADO, A. F. F. **Identificação e determinação da atividade antioxidante de carotenoides e antocianinas de frutas**. 224 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MADAMANCHI, N. R. Oxidative Stress and Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, Chapel Hill, v. 25, n. 1, p.29-38, nov. 2004.

MADIGAN, M. T. et al. **Biologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1006 p.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1218-1223, abr. 2008.

MARGARET, E.; SHAILAJA, A. M.; RAO, V. V. Evaluation of Antioxidant Activity in Different Parts of *Syzygium cumini* (*Linn.*). **International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences**, v. 4, n. 9, p.372-379, nov. 2015.

MARQUES, A. M. **Caracterização de fatores de virulência e do perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) oriunda da comunidade de São Luís-MA**. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Parasitária, Centro Universitário do Maranhão-, São Luís, 2011.

MARTIN, C. A.; HOVEN, A. D.; COOK, A. M. Therapeutic frontiers: preventing and treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 8, p.635-642, mar. 2008

MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 192, n. 1, p.1-15, jun. 2002.

MARTINEZ, R.M. et al. Tephrosia sinapou extract reduces inflammatory leukocyte recruitment in mice : effect on oxidative stress, nitric oxide and cytokine production. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n.1, p. 587–597, jun. 2012.

MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum Sabine*) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p.916-922, out. 2011.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p.193-201, jun. 2008.

MERCADANTE, A. Z.; BOBBIO, F. O. Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical properties. In: MERCADANTE, Adriana Z.; BOBBIO, Florinda O. **Food colorants – chemical and functional properties**. New York: Carmen Socaciu, Cap. 4. p. 241-276, 2008.

MIGLIATO, K. F. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of fruit extract from *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Latin American Journal Of Pharmacy**, v. 29, n. 5, p.725-730, jan. 2010.

MIGLIATO, K. F. ***Syzygium cumini* (L.) Skeels – JAMBOLÃO**: estudo farmacognóstico, otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade antisséptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato. 181 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, p. 1655-1666, ago. 2009.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends In Microbiology**, v. 17, n. 2, p.73-87, fev. 2009.

MUBASSARA, S. et al. In vitro phytochemical, antibacterial and antioxidant analyses in different plant parts of *Syzygium cumini*. **International Journal Of Pharmacognosy And Phytochemical Research**, v. 7, n. 1, p.150-155, fev. 2015.

NIEMETZ, R.; GROSS, G. G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 66, n. 17, p.2001-2011, set. 2005.

NOFIANI, R.; KURNIADI, R.; ARDININGSIH, P. Antimicrobial, antioxidant, hemolytic activities and toxicity of ethyl acetate extract from an unidentified coral-associated fungus, *Aspergillus brevipes* RK06. **Indonesian Journal Of Cancer Chemoprevention**, v. 2, n. 2, p.212-216, nov. 2011.

NPR. Germ resistant to antibiotic of last resort appears in u.s. Disponível em: <<http://www.npr.org/sections/healthshots/2016/05/26/479639936/germ-resistant-to-antibiotic-of-last-resort-appears-in-u-s>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.689-702, nov. 2009.

OLIVEIRA, F. P. et al. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (*Verbenaceae*) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 510-516, dez. 2006.

OLIVEIRA, D. A. **Caracterização fitoquímica e biológica de extrato obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades Merlot e Syrah**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2010.

PAIVA, F. P. T. **Quorum sensing em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PANCHAVARNAKILI, N. et al. Antimicrobial studies and phytochemical screening of stem bark in *Syzygium cumini* (L.) and *Lannea coromentalis* Houtt (Merr.). **Asian Journal Of Plant Science And Research**, v. 2, n. 2, p.89-94, jan. 2012.

PANTANELLA, F.; VALENTI, P.; NATALIZI, T.. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. **Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità**, v. 1, n. 1, p.31-42, fev. 2013.

PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review Of Microbiology**, v. 57, n. 1, p.677-701, out. 2003.

PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: from plant to health. **Phytochemistry Reviews**, Madrid, v. 7, n. 2, p.281-299, out. 2007.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 700 p., 2010.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p.157-165, fev. 2008.

PEREIRA, R. J. **Composição centesimal, aspectos fitoquímicos, atividades antioxidante, hipoglicemiante e hiperlipidêmica de frutos do gênero**

Syzygium. 157 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

PEREIRA, C. A. et al. Ação antimicrobiana in vitro de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L. e *Pimpinella anisum* L. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p.102-108, mar. 2009.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p.146-152, 2012.

PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal Of Natural Products**, v. 63, n. 7, p.1035-1042, jul. 2000.

PINKNER, J. S. et al. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 103, n. 47, p.17897-17902, nov. 2006.

PITTS, B. et al. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 54, n. 2, p.269-276, ago. 2003.

PRETÉ, P.S.C. et al. Quantitative assessment of human erythrocyte membrane solubilization by Triton X-100. **Biophysical Chemistry**, v. 97, n. 1, p.1-5, maio 2002.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 26, n. 9-10, p.1231-1237, maio 1999.

RENDUELES, O.; GHIGO, J. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. **Fems Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p.972-989, set. 2012.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible *Myrtaceae* fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p.883-890, ago. 2008.

RÍOS, J.I.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal Of Ethnopharmacology**, v.100, n. 1-2, p.80-84, ago. 2005.

RISS, T. et al. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**, p. 31, 2016

ROCKENBACH, I. I. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p.238-244, dez. 2008.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p.53-60, abr. 2007.

ROGINSKY, V; LISSI, E. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p.235-254, set. 2005.

ROLIM, A. et al. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olachoides* Benth (Olacaceae) commercial extracts. **Journal AOC International**, v.88, p.1015–1019, 2005

RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p.996-1002, ago. 2010.

RUGGIERO, A. A. **Estudo farmacognóstico do jambolão *Syzygium cumini* (L.) Skeels Myrtaceae**. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C.; XAVIER, G. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 33, n.1, p.35-50, dez. 2004.

SÁ, A. P. C. S. **Potencial antioxidante e aspectos químicos e físicos das frações comestíveis (polpa e cascas) e sementes de Jambolão (*Syzygium cumini*, L. Skeels)**. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p.3875-3883, jan. 1991.

SANTOS, G. S. et al. Identificação e quantificação do cristal violeta em aguardentes de mandioca (tiquira). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p.583-586, ago. 2005.

SANTOS, L. P. et al. Compounds and fatty acids in different parts from *Vitis labrusca* and *V. vinifera* grapes. **Food Research International**, v.44, p. 1414-1418, nov. 2011.

SÀNCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, v.90, p.133-139, nov. 2005.

SCHWARTZ, S. J. et al. **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 445-498, mar. 2010.

SHAN, Bin et al. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 117, n. 1, p.112-119, jun. 2007.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 32, n. 1, p.67-103, jan. 1992.

SCHMIDT, A. et al. Proteomanalyse und Systembiologie. **Biospectrum**, p.44-47, 2014.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p.94-103, abr. 1999.

SILVA, F. L.N. Aplicação da espectrometria de massas na avaliação da composição química de vinhos e uvas. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, 2013.

SILVA, M. Z. C. **Formulações tópicas contendo extrato de pimenta *pseudocaryophyllus***: avaliação da atividade antioxidante in vitro e da eficácia anti-inflamatória e antioxidante in vivo. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SILVA, M. O. **Atividade antioxidante e composição de oligossacarídeos em subproduto obtido do processamento industrial da goiaba (*psidium guajava*)**. 154 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Ufrgs, 2010. 1104 p.

SINGLETON, V.L., ROSSI, J.R. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SINGH, J. P. et al. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 65, p.1025-1030, jan. 2016.

SHIPP, J.; ABDEL-AAL, E. M. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. **The Open Food Science Journal**, v. 4, n. 1, p.7-22, mar. 2010.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p.153-166, abr. 2007.

SOARES, J. C. **Aproveitamento alimentar de jabolão**. 211 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SOUZA, R. F. V.; SUSSUCHI, E. M.; GIOVANI, W. F. Synthesis, electrochemical, spectral, and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal

ions. **Synthesis And Reactivity In Inorganic And Metal-organic Chemistry**, v. 33, n. 7, p.1125-1144, jan. 2003.

SOUSA, C. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.351-355, abr. 2007.

SOUZA, V. B. Aproveitamento dos subprodutos de vinificação da uva Bordô (*Vitis labrusca*) para obtenção de pigmentos com propriedades funcionais. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Of Microbiology**, v. 56, n. 1, p.187-209, out. 2002.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *azadirachta indica*, *terminalia arjuna*, *acacia nilotica*, and *eugenia jambolana lam*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p.1106-1114, jan. 2007

TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p.2226-2235, jan. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 820 p. 2009.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 11, n. 22, p.213-238, out. 2013.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, p.939, 2017.

TURATTI, K. F. M. **Syzygium cumini (L.) Skeels**: avaliação da qualidade, estudo morfoanatômico, estudo da atividade antimicrobiana, conservante, genotóxica, mutagênica, citotóxica e incorporação em formulações cosméticas para uso tópico. 184 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: an Evolving Crisis of Global Dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p.682-707, out. 2012.

UPADHYAY, A. et al. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-18, out. 2014.

VANDEPUTTE, O. M. et al. Identification of Catechin as One of the Flavonoids from Combretum albiflorum Bark Extract That Reduces the Production of Quorum-

Sensing-Controlled Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p.243-253, 23 out. 2009.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p.816-823, dez. 2008.

VASCONCELOS, M. A. **Atividade de Lectinas e metabólitos bioativos de plantas sobre biofilmes microbianos de interesse clínico**. 267 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

VEIGAS, J. et al. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p.619-627, nov. 2007.

VELIOGLU, Y. S. et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p.4113-4117, out. 1998.

VELURI, R. et al. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p.1077-1082, fev. 2004.

VICENTINI, F. T.M.C. et al. Influence of vehicle on antioxidant activity of quercetin: a liquid crystalline formulation. **Latin American Journal Of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p.805-810, ago. 2007.

VIKRAM, A. et al. Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p.515-527, fev. 2010.

VIZZOTTO, M.; FETTER, M. R. **Jambolão: o poderoso antioxidante**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPACT-2010/12299/1/jambolao-Marcia.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

WAKIMOTO, N. et al. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **The American Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 5, n. 71, p.687-690, maio 2004.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation**. 4^a ed. 861 p. John Wiley and sons, 2008.

ZHANG, L.; LIN, Y. M. Antioxidant tannins from *Syzygium cumini* fruit. **African Journal Of Biotechnology**, v. 8, n. 10, p.2301-2309, mai. 2009.

ZHANG, A. et al. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sciences**, v. 61, n. 4, p.383-394, abr. 1997.