



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

CAROLLINE DE BRITO LIMA

POTENCIAL BIOLÓGICO DOS EXTRATOS OBTIDOS DA FOLHA DO CUMARU
(*Amburana cearensis* A.C. Smith) SOBRE BACTÉRIAS TRANSMITIDAS POR
ALIMENTOS

FORTALEZA

2018

CAROLLINE DE BRITO LIMA

POTENCIAL BIOLÓGICO DOS EXTRATOS OBTIDOS DA FOLHA DO CUMARU
(*Amburana cearensis* A.C. Smith) SOBRE BACTÉRIAS TRANSMITIDAS POR
ALIMENTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Microbiana e Enzimática.

Orientadora: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana de Siqueira Oliveira

FORTALEZA

2018

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

- L697p Lima, Carolline de Brito.
Potencial biológico dos extratos obtidos da folha do cumaru (*Amburana cearensis* A.C. Smith) sobre bactérias transmitidas por alimentos. / Carolline de Brito Lima. – 2019.
86 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.
Coorientação: Profa. Dra. Luciana de Siqueira Oliveira.
1. cumaru. 2. atividade antimicrobiana. 3. microcápsulas. I. Título.

CDD 664

CAROLLINE DE BRITO LIMA

POTENCIAL BIOLÓGICO DOS EXTRATOS OBTIDOS DA FOLHA DO CUMARU
(*Amburana cearensis* A.C. Smith) SOBRE BACTÉRIAS TRANSMITIDAS POR
ALIMENTOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Microbiana e Enzimática.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Evânia Altina Texeira de Figueiredo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Luciana de Siqueira Oliveira (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Celli Rodrigues Muniz
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Dra. Giovana Matias do Prado
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Pedro e Jucileide.

A minha irmã, Camilla.

AGRADECIMENTOS

A Deus por se fazer presente em minha vida e nunca me desamparar ou me deixar desistir. Sem te, meu Deus, eu nada seria.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido.

A Universidade Federal do Ceará e ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos por me concederem a realização do mestrado.

A minha orientadora Profa. Dra. Evânia Altina Texeira de Figueiredo, pela sua orientação, dedicação, ensinamentos, apoio, confiança em meu trabalho, pelos conselhos e por sempre acreditar no meu potencial.

A minha coorientadora Profa. Dra. Luciana de Siqueira de Oliveira, pela sua orientação, dedicação, apoio e contribuição neste trabalho. Por sempre se mostrar solícita e tirar minhas dúvidas.

A professora Dra. Larissa Morais Ribeiro Silva pelo apoio, conselhos e contribuições para melhoria deste trabalho.

Ao professor Dr. Ícaro Gusmão por ter me acolhido em seu laboratório no Parque de Desenvolvimento Tecnológico, pelo apoio, disposição e contribuição para este trabalho.

A Dra. Celli Rodrigues Muniz por sua contribuição na análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

A Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte por sua contribuição na análise de citotoxicidade dos extratos.

Aos professores Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo e Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo por me receberem em seus laboratórios e contribuições para este trabalho.

A pesquisadora da Embrapa Dra. Marília de Albuquerque Oliveira pelas contribuições nas análises de Tamanho de partícula e potencial zeta.

Ao funcionário do Horto de Plantas Medicinais Prof. Francisco José de Abreu Matos, o Erondino, por toda ajuda com as coletas das folhas.

Aos funcionários do laboratório do PADETEC, Maurício, Caio, Diana e Helena.

A amiga Thays pela paciência, ajuda e por sempre ser tão prestativa.

A amiga Jorgiane por toda ajuda e incentivo. Pela sua contribuição nas análises de ABTS, fenólicos e dados estatísticos.

A amiga Leônia por estar sempre disposta a ajudar e pelos conselhos para melhoria deste trabalho.

A amiga Flayanna por todo seu conhecimento, por sempre estar disposta a ajudar.

As amigas do laboratório de Microbiologia de Alimentos, Iana e Gisani, pela paciência e conselhos.

Aos membros da banca pela contribuição para o melhoramento desse trabalho.

Obrigada pelas sugestões.

Aos colegas da turma de mestrado.

Ao senhor Luís, que hoje não se encontra entre nós, mas que foi muito importante ao longo de minha trajetória.

As amigas Micaela, Lorena, Rafaelly e Mariana pelos conselhos.

A minha irmã, Camilla, por toda paciência.

Aos meus Pais, Pedro e Jucileide, que sempre lutaram para que eu tivesse uma boa educação. Minhas fontes de inspiração e amor. Amo-os muito.

Enfim, o meu mais sincero agradecimento a todos que participaram e contribuíram para que o meu sonho de mestrado fosse concretizado.

“Sejam fortes e não desanimem, pois o trabalho de vocês será recompensado.”

2 Crônicas, 15:7

RESUMO

Os vegetais produzem a partir de seu metabolismo secundário compostos bioativos que apresentam propriedade antimicrobiana. Com isso, existe um crescente interesse da indústria de alimentos em utilizar extratos vegetais como antimicrobianos naturais em substituição aos sintéticos. O aumento no interesse dos consumidores por produtos mais naturais, o caráter carcinogênico e teratogênico que vem sendo atribuído aos conservantes sintéticos e o crescimento da resistência microbiana a conservantes tradicionais, tem justificado essa substituição. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos e microencapsulados obtidos da folha de cumaru frente a bactérias transmitidas em alimentos. Foram elaborados três extratos a partir da folha de cumaru, o extrato aquoso (EA) pelo método de decocção e os extratos hidroalcoólico 50:50 (EHA 50:50) e hidroalcoólico 70:30 (EHA 70:30) pelo método de maceração. Os extratos foram caracterizados quanto ao rendimento de extração, determinação de compostos fenólicos totais, antioxidantes totais e toxicidade. A atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada frente aos microrganismos Gram positivo (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram negativo (*Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*). Os extratos hidroalcoólicos apresentaram melhor rendimento de extração. O EHA 50:50 diferiu dos demais apresentando maior conteúdo de compostos fenólicos e nenhum dos extratos diferiu quanto aos antioxidantes totais. Nenhum dos extratos apresentou efeito tóxico. Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos estudados, sendo as bactérias Gram positivas mais sensíveis. O EA apresentou menor CIM frente ao *S. aureus* e o EHA 50:50 menor CBM para esse microrganismo. Os extratos hidroalcoólicos demonstraram melhor atividade antimicrobiana para os demais microrganismos testados. Como as CIM e CBM encontradas na atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos frente aos microrganismos estudados foram semelhantes, optou-se por continuar os estudos com um extrato hidroalcoólico. O EHA 50:50 foi escolhido devido a apresentar maior conteúdo de compostos fenólicos totais e requerer menor concentração de álcool no processo de extração. Avaliou-se o efeito do EA e EHA 50:50 na morfologia das células bacterianas por Microscopia Eletrônica de Transmissão e foram verificadas nítidas alterações na morfologia das bactérias quando em contato com as concentrações bactericidas desses extratos. O EA e o EHA 50:50 foram encapsulados utilizando maltodextrina, β -ciclodextrina e a combinação dessas duas (1:1) como material de parede pelo método de liofilização. As microcápsulas foram caracterizadas quanto à eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, potencial

zeta, morfologia, higroscopicidade, colorimetria e atividade antimicrobiana. As microcápsulas de ambos os extratos apresentaram eficiente encapsulação dos compostos fenólicos. As microcápsulas obtidas com a mistura de β -ciclodextrina e maltodextrina apresentaram maior tamanho de partícula. O potencial zeta de todas as microcápsulas apresentaram valor negativo e estabilidade moderada. As microcápsulas obtidas por liofilização apresentaram morfologia irregular. Aquelas que utilizaram a β -ciclodextrina como material de parede apresentaram-se mais higroscópicas. A microencapsulação proporcionou a obtenção de extratos de coloração mais clara. As microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 apresentaram melhor atividade antimicrobiana do que as microcápsulas do extrato aquoso de cumaru. Os resultados obtidos sugerem que os extratos da folha de cumaru podem ser uma alternativa de antimicrobiano natural a ser empregado na indústria de alimentos em substituição aos conservantes sintéticos.

Palavras-chave: Cumaru. Atividade antimicrobiana. Microcápsulas

ABSTRACT

Plants produce from their secondary metabolism bioactive compounds that have antimicrobial property. Thus, there is a growing interest in the food industry in using plant extracts as natural antimicrobials instead of synthetic ones. The increase in consumer interest in more natural products, the carcinogenic and teratogenic character attributed to synthetic preservatives and the growth of microbial resistance to traditional preservatives, has justified this substitution. Thus, this work had as objective to evaluate the antimicrobial activity of crude and microencapsulated extracts obtained from the leaf of cumaru against bacteria transmitted in food. Three extracts were prepared from the coumaru leaf, the aqueous extract (EA) by the decoction method and the hydroalcoholic extracts 50:50 (EHA 50:50) and hydroalcoholic 70:30 (EHA 70:30) by the maceration method. The extracts were characterized as extraction yield, determination of total phenolic compounds, total antioxidants and toxicity. The antimicrobial activity of the extracts was determined against Gram positive (*Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and Gram negative (*Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*) microorganisms. The hydroalcoholic extracts presented better yield of extraction. The EHA 50:50 differed from the others presenting higher content of phenolic compounds and none of the extracts differed as to the total antioxidants. None of the extracts presented toxic effects. All the extracts presented antimicrobial activity against the studied microorganisms, being the Gram positive bacteria more sensitive. The EA had a lower CIM compared to *S. aureus* and the lowest 50:50 EHA CBM for this microorganism. The hydroalcoholic extracts showed better antimicrobial activity for the other microorganisms tested. As the CIM and CBM found in the antimicrobial activity of the hydroalcoholic extracts against the studied microorganisms were similar, it was decided to continue the studies with a hydroalcoholic extract. The EHA 50:50 was chosen because it presents higher content of total phenolic compounds and requires a lower concentration of alcohol in the extraction process. The effect of EA and EHA 50:50 was evaluated on the morphology of bacterial cells by Electron Transmission Electron Microscopy and sharp changes were observed in bacterial morphology when in contact with the bactericidal concentrations of these extracts. EA and 50:50 EHA were encapsulated using maltodextrin, β -cyclodextrin and the combination of these two (1: 1) as the wall material by the freeze-drying method. Microcapsules were characterized for encapsulation efficiency, particle size, zeta potential, morphology, hygroscopicity, colorimetry and antimicrobial activity. The microcapsules of both extracts presented efficient encapsulation of the phenolic compounds.

Microcapsules obtained with the β -cyclodextrin and maltodextrin mixtures showed larger particle size. The zeta potential of all microcapsules presented negative value and moderate stability. Microcapsules obtained by lyophilization presented irregular morphology. Those that used β -cyclodextrin as a wall material were more hygroscopic. The microcapsules of the 50:50 hydroalcoholic extract presented better antimicrobial activity than the microcapsules of the aqueous extract of cumaru. The results obtained suggest that the extracts of the cumaru leaf can be an alternative of antimicrobial agent to be used in the food industry as a substitute for synthetic preservatives.

Keywords: Cumaru. Antimicrobial activity. Microcapsules

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas dos principais grupos responsáveis pela atividade antimicrobiana das plantas.....	23
Figura 2 - Cumaru (<i>Amburana cearensis</i> A.C. Smith).....	26
Figura 3 - Estruturas químicas de alguns compostos encontrados no cumaru.....	27
Figura 4 - Influência do equivalente de dextrose (DE) da maltodextrina nas características do material.....	31
Figura 5 - Formação de poros no processo de liofilização.....	33
Figura 6 - Fluxograma do processamento das folhas de cumaru.....	35
Figura 7 - Fluxograma do processo de elaboração do extrato aquoso de folha de cumaru.....	37
Figura 8 - Fluxograma do processo de elaboração dos extratos hidroalcoólicos 50:50 e 70:30 da folha de cumaru.....	39
Figura 9 - Distribuição dos poços na microplaca.....	43
Figura 10 - Fluxograma da atividade locomotora e toxicidade aguda do Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) tratado com os extratos da folha cumaru.....	46
Figura 11 - Citotoxicidade dos extratos secos de folha de cumaru frente às células epiteliais humanas.....	53
Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de <i>Staphylococcus aureus</i>	57
Figura 13 - Imagens da microscopia eletrônica de transmissão de <i>Listeria monocytogenes</i>	58
Figura 14 - Imagens da microscopia eletrônica de transmissão de <i>Escherichia coli</i>	59
Figura 15 - Imagens da microscopia eletrônica de transmissão de <i>Salmonella enteritidis</i>	60
Figura 16 - Atividade locomotora de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5min).....	61

Figura 17 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microcápsulas do extrato aquoso da folha de cumaru.....	63
Figura 18 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição da distribuição dos poços na microplaca.....	43
Tabela 2 - Formulações para obtenção das microcápsulas dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.....	47
Tabela 3 - Conteúdo de compostos fenólicos totais e antioxidantes totais dos extratos secos obtidos da folha de cumaru (<i>Amburana cearensis</i>).....	52
Tabela 4 - Atividade antimicrobiana dos extratos secos da folha de cumaru frente aos microrganismos transmitidos em alimentos.....	54
Tabela 5 - Resultado dos testes de toxicidade aguda dos extratos aquoso (EA) e hidroalcoólico 50:50 (EHA 50:50) da folha de cumaru frente ao Zebrafish adulto.....	62
Tabela 6 - Potencial zeta das microcápsulas do extrato aquoso e do extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.....	64
Tabela 7 - Tamanho das microcápsulas do extrato aquoso e extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.....	65
Tabela 8 - Higroscopicidade das microcápsulas do extrato aquoso e do extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.....	66
Tabela 9 - Colorimetria do extrato aquoso seco e das microcápsulas do extrato aquoso da folha de cumaru.....	67
Tabela 10 - Colorimetria do extrato hidroalcoólico 50:50 seco e das microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.....	68
Tabela 11 - Eficiência de encapsulação das microcápsulas do extrato aquoso e extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.....	69
Tabela 12 - Atividade antimicrobiana das microcápsulas do extrato aquoso da folha de cumaru.....	70
Tabela 13 - Atividade antimicrobiana das microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Sal de amnio do ácido 2,2 azinobis (3 – etilbenzeno- 6sulfônico)
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DO	Densidade óptica
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EA	Extrato aquoso de folha de cumaru
EHA 50:50	Extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol:água) de folha de cumaru
EHA 70:30	Extrato hidroalcoólico 70:30 (etanol: água) de folha de cumaru
MTT	[Brometo (3-(4,5-dimetiltiazol – 2-il) – 2,5- difenil tetrazolium)]
TSA	Tripticase soya agar
TSB	Tripticase soya
ZF	Zebrafish

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivo Específico	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	Extratos vegetais como antimicrobiano natural	21
3.2	Métodos de extração de compostos bioativos a partir de extratos vegetais	24
3.3	Cumaru (<i>Amburana cearensis</i> A.C Smith)	25
3.4	Microrganismos transmitidos por alimentos	28
3.5	Encapsulação de extratos vegetais	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Material vegetal	34
4.1.1	<i>Coleta</i>	34
4.1.2	<i>Preparo do material vegetal</i>	34
4.2	Obtenção dos extratos da folha de cumaru	36
4.2.1	<i>Extrato aquoso</i>	36
4.2.2	<i>Extratos hidroalcoólicos</i>	38
4.3	Caracterização dos extratos vegetais	40
4.3.1	<i>Rendimento dos extratos</i>	40
4.3.2	<i>Determinação de compostos fenólicos extraíveis totais</i>	40
4.3.3	<i>Determinação da atividade antioxidante total</i>	40
4.3.4	<i>Citotoxicidade dos extratos frente às células epiteliais humana</i>	41
4.3.5	<i>Atividade antimicrobiana dos extratos da folha de cumaru</i>	42
4.3.5.1	<i>Preparo do inóculo</i>	42
4.3.5.2	<i>Atividade antimicrobiana</i>	42
4.4	Microscopia eletrônica de transmissão na avaliação dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru sobre a morfologia das bactérias estudadas	44
4.5	Ensaio toxicológico dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru utilizando o Zebrafish (<i>Dario rerio</i>) como modelo <i>in vivo</i>	44

4.6	Encapsulação dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.....	46
4.6.1	<i>Obtenção das microcápsulas.....</i>	46
4.7	Caracterização das microcápsulas dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.....	47
4.7.1	<i>Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....</i>	47
4.7.2	<i>Tamanho de partícula e potencial zeta.....</i>	48
4.7.3	<i>Higroscopicidade.....</i>	48
4.7.4	<i>Determinação da cor.....</i>	48
4.7.5	<i>Eficiência da encapsulação.....</i>	49
4.7.6	<i>Atividade antimicrobiana das microcápsulas.....</i>	49
4.8	Análise estatística.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	Caracterização dos extratos da folha de Cumaru.....	51
5.1.1	<i>Rendimento dos extratos.....</i>	51
5.1.2	<i>Compostos fenólicos totais e antioxidantes totais.....</i>	51
5.1.3	<i>Citotoxicidade dos extratos frente às células epiteliais humanas.....</i>	53
5.1.4	<i>Atividade antimicrobiana dos extratos da folha de cumaru.....</i>	54
5.2	Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru sobre a morfologia das bactéria estudadas.....	56
5.3	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo de estudo da toxicidade <i>in vivo</i> dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.....	60
5.4	Caracterização das microcápsulas dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.....	62
5.4.1	<i>Morfologia das microcápsulas.....</i>	62
5.4.2	<i>Potencial Zerta.....</i>	64
5.4.3	<i>Tamanho de partícula.....</i>	65
5.4.4	<i>Higroscopicidade.....</i>	66
5.4.5	<i>Colorimetria.....</i>	67
5.4.6	<i>Eficiência de encapsulação.....</i>	68
5.4.7	<i>Atividade antimicrobiana das microcápsulas de extrato aquoso e extrato hidroalcoólico 50:50 de folha de cumaru.....</i>	70

6	CONCLUSÕES.....	72
7	SUGESTÕES DE TRABALHO FUTUROS.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS.....	86

1 INTRODUÇÃO

Existe uma grande discussão quanto à segurança dos conservantes químicos na indústria de alimentos. Esses são tidos como responsáveis por muitos atributos carcinogênicos e teratogênicos, além da toxicidade residual. A exploração de antimicrobianos naturais para a conservação de alimentos tem recebido grande atenção por parte das indústrias alimentícias, uma vez que, os consumidores exigem cada vez mais produtos naturais. Outro fator que intensifica essa exploração é a crescente resistência microbiana aos conservantes convencionais (MOREIRA *et al.* 2005).

Antimicrobianos naturais de origem vegetal, como os extratos, têm sido utilizados pelas indústrias de alimentos e farmacêutica no controle de microrganismos patogênicos (VITÓRIA, 2010), cujas propriedades antimicrobianas das substâncias produzidas pelas plantas são uma consequência do metabolismo secundário do vegetal (DUARTE, 2006).

Em muitos países têm sido relatado o estudo das atividades antimicrobianas de plantas nativas, uma vez que possuem flora diversificada e tradição na utilização de plantas medicinais (DUARTE, 2006). Dentre as plantas encontradas no Nordeste brasileiro, têm sido observados estudos referentes à atividade antimicrobiana dos compostos extraídos do cumaru (*Amburana cearensis* A.C. Smith), inclusive contra microrganismos de interesse em alimentos (BRAVO *et al.*, 1999; PEIXOTO, 2009). O cumaru pertence à família *Fabaceae* e é predominante da caatinga (CANUTO *et al.*, 2008). Essa planta é amplamente utilizada na medicina popular no tratamento de doenças como reumatismo, tosse, bronquite, asma e dores abdominais (SILVEIRA; PESSOA, 2005). O intenso uso comercial, principalmente, da casca do caule, colocou essa planta em risco de extinção (CANUTO *et al.*, 2008). A obtenção de extratos a partir da folha desta planta seria uma alternativa viável de exploração sustentável, uma vez que, as folhas são naturalmente renováveis (PINHO *et al.*, 2012). Além disso, existem poucos estudos referentes à atividade antimicrobiana de extratos obtidos da folha do cumaru (FIGUEREDO *et al.*, 2013).

Apesar da aplicação de extratos de plantas em alimentos serem uma tendência crescente, sua aplicação na matriz alimentar é limitado, uma vez que, seus compostos bioativos podem vir a ser pouco solúveis em água, apresentar baixa absorção, serem incapazes de atravessar as membranas lipídicas das células ou terem tamanho molecular elevado, resultando na perda da biodisponibilidade. Além disso, alguns compostos podem causar defeitos de qualidades em alimentos, como gosto adstringente, escurecimento, entre outros (BONIFÁCIO *et al.* 2014, CODEVILLA *et al.*, 2015; GORTZ *et al.*, 2007). Fatores

como conteúdo de gordura, proteínas, atividade de água, pH e enzimas presentes na matriz alimentar também podem interferir na eficácia dos antimicrobianos naturais (CALO *et al.*, 2015; GYAWALI; IBRAHIM, 2014; PISOSCHI *et al.*, 2018). Para contornar essas limitações, a encapsulação tem sido muito utilizada para ajudar na utilização de extratos vegetais como antimicrobianos naturais em alimentos. A encapsulação ajuda a preservar os compostos bioativos contra a oxidação, degradação e reação com outros materiais (CODEVILLA *et al.*, 2015).

Visando a extração de compostos bioativos que apresentem potencial antimicrobiano, a folha de cumaru pode vir a ser uma nova opção de antimicrobiano natural para indústria de alimentos e a encapsulação dos extratos dessa planta pode ajudar a preservar e manter a estabilidade dos compostos extraídos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos e microencapsulados obtidos da folha do cumaru (*Amburana cearensis* A.C. Smith) sobre bactérias transmitidas em alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar extrato aquoso e extrato hidroalcoólico a partir das folhas de cumaru, caracterizando os extratos secos quanto ao rendimento de extração, a toxicidade, conteúdo de compostos fenólicos e antioxidantes totais.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos da folha de cumaru frente às bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e Gram negativas (*Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*).
- Avaliar o efeito dos extratos selecionados na morfologia das células bacterianas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.
- Microencapsular os extratos selecionados utilizando os polissacarídeos β -ciclodextrina e maltodextrina como materiais de parede, caracterizando as microcápsulas obtidas quanto à eficiência de encapsulação, morfologia, tamanho de partícula, potencial zeta, colorimetria e higroscopicidade.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) das microcápsulas obtidas frente às bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e Gram negativas (*Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Extratos vegetais como antimicrobiano natural

A exploração de antimicrobianos naturais, visando à conservação de alimentos, tem recebido grande atenção das indústrias alimentícias. Isto se deve a crescente resistência microbiana a conservantes convencionais e a preocupação dos consumidores quanto à segurança de conservantes sintéticos, além das exigências por produtos naturais (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; MOREIRA *et al.*, 2005; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Graças ao metabolismo secundário das plantas, os vegetais são capazes de produzir substâncias com propriedades antimicrobianas. Por isso, extratos vegetais vêm sendo utilizados pela indústria de alimentos como antimicrobianos naturais, a fim de melhorar a segurança e a qualidade dos produtos (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Estudos recentes tem comprovado o potencial antimicrobiano dos extratos vegetais, inclusive contra microrganismos patogênicos de importância em alimentos.

Mostafa *et al.* (2018) investigaram a atividade antimicrobiana de cinco extratos etanólicos de plantas contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi*. Os autores constataram que o extrato etanólico da casca da *Punica granatum* inibiu o crescimento de todos os microrganismos testados, já o extrato etanólico da semente de *C. Cyminum* foi efetivo apenas contra *S. aureus*. O extrato das flores do *Syzygium aromaticum* apresentou efeito inibitório contra quatro patógenos (*B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*), o extrato etanólico dos rizomas de *Zingiber officinales* foi eficaz para três deles (*B. cereus*, *S. aureus* e *P. Aeruginosa*) e o extrato das folhas de *Thymus vulgaris* inibiu somente *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

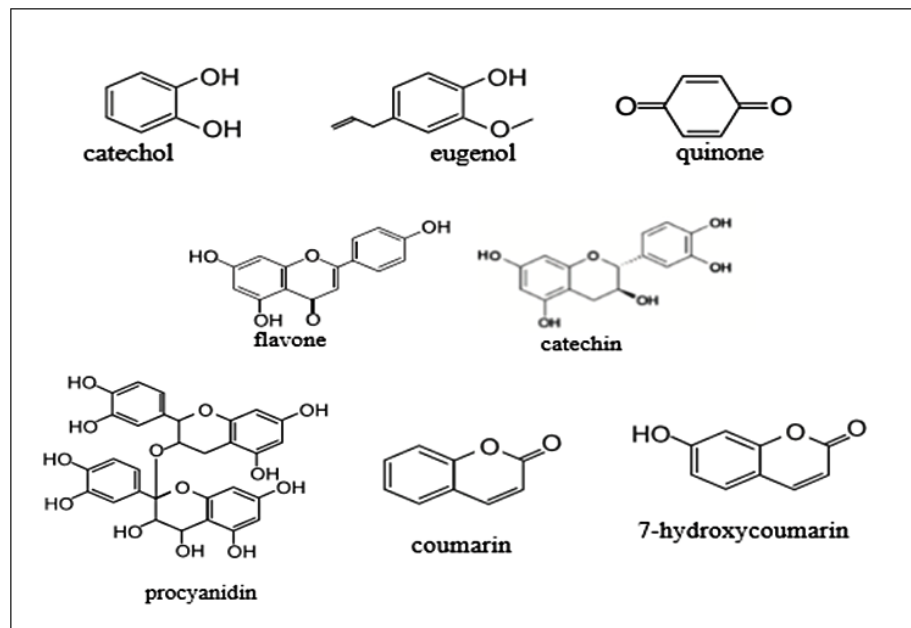
Dicastilho *et al.* (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos, hidroalcoólicos e aquosos de folha e frutos da murta (*Ugni molinae* Turcz.) contra *E.coli* e *L. monocytogenes*. Os autores verificaram que todos os extratos apresentaram ação antimicrobiana frente os microrganismo testados, porém o extrato hidroalcoólico de folha de murta foi mais efetivo frente *L. monocytogenes*, apresentando CIM e CBM de 0,07 mg/mL e 0,09 mg/mL, respectivamente. Para *E.coli* o extrato etanólico de fruto de murta foi mais eficiente, com CIM e CBM de 1,2 mg/mL e 1,7 mg/mL, respectivamente.

Elisha *et al.* (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de folhas de nove espécies de plantas diferentes (*Hypericum roeperianum*, *Cremastra triflora*,

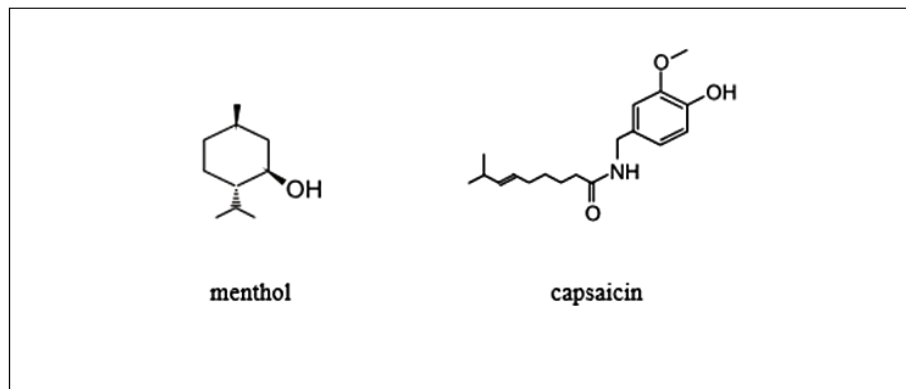
Heteromorpha arborescens, *Pittosporum viridiflorum*, *Bolusanthus speciosus*, *Calpurnia áurea*, *Maesa lanceolata*, *Elaeodendron croceum*, *Morus mesozygia*) frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*. Todos os extratos apresentaram ação antimicrobiana contra todos os patógenos estudados, como valores médios de CIM variando entre 0,02 a 0,52 mg/mL, porém os extratos das folhas de *Crema spora triflora* e *Maesa lanceolata* apresentaram melhor atividade que os demais extratos.

Os principais grupos de compostos extraídos das plantas responsáveis pelas propriedades antimicrobianas incluem os terpenóides, óleos essenciais, alcaloides e compostos fenólicos como, fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis, flavonoides, taninos e cumarinas (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; SOUZA *et al.*, 2017). A presença destes compostos nos extratos vegetais varia de acordo com a parte da planta que é elaborado o extrato, este pode ser obtido a partir da folha, caule, raiz, semente, fruto, flor e casca. Além disso, o processo de extração e a natureza do solvente também irão influenciar na composição final do produto (CABRAL; PINTO; PATRIARCA, 2013; CALO *et al.*, 2015). As estruturas químicas dos principais grupos encontrados nas plantas responsáveis pela atividade antimicrobiana são apresentadas na Figura 1.

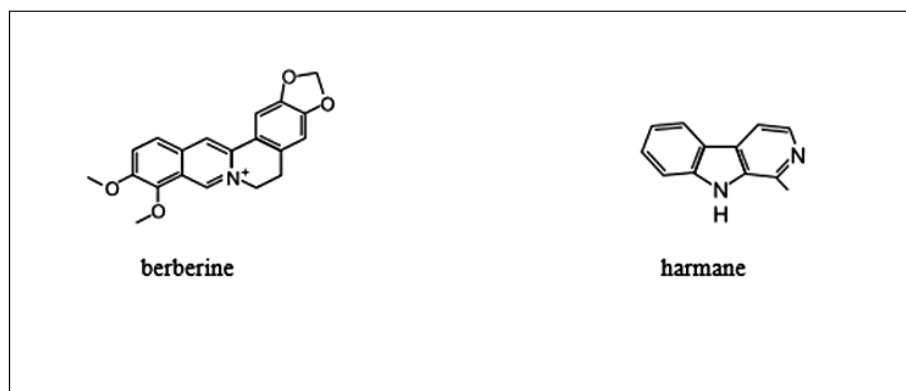
Figura 1 - Estruturas químicas dos principais grupos responsáveis pela atividade antimicrobiana das plantas.



(a)



(b)



(c)

Fonte: adaptado de Pisoschi *et al.* (2018). (a) Compostos fenólicos; (b) Terpenóides; (c) Alcalóides.

O sinergismo entre os compostos pode melhorar as propriedades bioativas do extrato, assim como, a variedade destes permitem diferentes modos de ação dificultando a resistência microbiana (CABRAL; PINTO; PATRIARCA, 2013).

Os mecanismos de ação antimicrobiana dos compostos extraídos das plantas incluem a alteração da parede celular com perda de rigidez, ruptura da membrana celular, vazamento de biomoléculas essenciais, inibição da atividade de ATP, ruptura da força motriz, inativação enzimática e coagulação do citoplasma (BURT, 2004; CABRAL; PINTO; PATRIARCA, 2013; PISOSCHI *et al.* 2018; VERMELHO *et al.*, 2011). Os compostos fenólicos, por exemplo, alteram a permeabilidade da célula microbiana, graças aos grupos hidroxilas (-OH) que interagem com a membrana celular da bactéria, causando o extravasamento de biomoléculas importantes do seu interior. Estes compostos afetam, também, a funcionalidade da membrana celular ao interagirem com as proteínas da membrana, modificando suas estruturas e funções intracelulares. Entre as funções afetadas estão as relacionadas ao transporte de elétrons, síntese de proteínas, síntese de ácidos nucleicos, absorção de nutrientes e atividade enzimática. A presença de grupos (-OH) nas estruturas fenólicas também pode causar o deslocamento de elétrons que atuam como trocadores de prótons e diminuem o gradiente de pH através da membrana citoplasmática. Como resultado haverá o colapso da força motriz do próton e a exaustão de ATP. (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; PISOSCHI *et al.* 2018).

3.2 Métodos de extração de compostos bioativos a partir de extratos vegetais

A extração consiste na separação de compostos bioativos da planta por meio de solventes selecionados através de procedimentos padronizados, cujo objetivo é separar os compostos vegetais solúveis existentes no material celular (AZWANIDA, 2015).

A escolha do solvente para a extração dos compostos bioativos das plantas depende da polaridade do soluto, uma vez que o solvente com polaridade semelhante ao do soluto proporcionará melhor dissolução (ALTEMIMI *et al.*, 2017). Normalmente, é utilizada na extração uma mistura de solventes, a fim de se obter uma melhor eficiência de extração (NGAHA NJILA *et al.*, 2017).

Anteriormente a extração, é realizada a preparação do material vegetal a fim de preservar as biomoléculas, onde as etapas consistem na lavagem, secagem e moagem. Na extração, pode-se utilizar tanto amostras frescas como secas, porém, considerando-se o tempo que se leva para a realização da extração, as amostras secas são preferidas, uma vez que as

amostras frescas se deterioram mais rapidamente. O processo de moagem proporcionará amostras menores e mais homogêneas, aumentando o contato do solvente com a amostra, melhorando a eficiência e a cinética da extração (AZWANIDA, 2015; SASIDHARAN *et al.*, 2011).

Os métodos convencionais comumente utilizados para a obtenção dos compostos bioativos das plantas são: maceração, decocção, infusão e extração Soxhlet (NGAHA NJILA *et al.*, 2017).

A maceração consiste em uma técnica de baixo custo, onde o material vegetal fica em contato com o solvente por um período de tempo determinado, sob agitação ocasional de modo a aumentar a difusão e facilitar a extração, com troca do solvente para maior rendimento da extração (AZMIR *et al.*, 2013).

A decocção é um método usado para extração de substâncias solúveis em água e resistentes ao calor. É empregada para as partes da planta mais resistentes e fibrosas como, as cascas, raízes e sementes. Esta técnica consiste em manter o material seco em contato com a água sob aquecimento por um período de tempo a 100° C (NGAHA NJILA *et al.*, 2017; VISHT; CHATURVEDI, 2012).

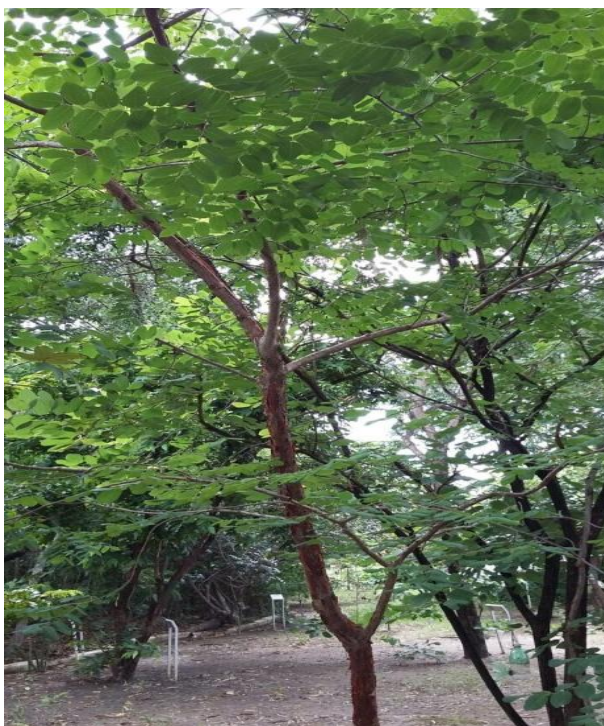
A infusão consiste em colocar a planta em contato com água fervente, em recipiente fechado, por um curto período de tempo. Este método é utilizado para as partes moles dos vegetais. (NGAHA NJILA *et al.*, 2017; SIMÕES, 2001).

A extração de Soxhlet é um método simples que utiliza uma pequena quantidade de material na extração. A extração ocorre em um ciclo repetido de extração com solvente fresco até que se tenha a exaustão completa do soluto, sendo esse tipo de extração considerado altamente eficiente (NGAHA NJILA *et al.*, 2017; SIMÕES, 2001).

3.3 Cumaru (*Amburana cearensis* A.C. Smith)

A *Amburana cearensis* A.C. Smith (FIGURA 2) também conhecida como cumaru, pertence à família *Fabaceae* e é típica da caatinga. Embora seja nativa do nordeste brasileiro, ela pode ser encontrada em toda a América do Sul (CANUTO *et al.* 2008). Ela é uma árvore que apresenta porte regular, flores brancas, vagem achatada, casca do caule grossa de cor vermelho-pardacenta, sementes pretas e rugosas (CANUTO; SILVEIRA, 2006; CORREA, 1974). A floração e frutificação são observadas após 10 anos de plantio. No nordeste o período de floração ocorre no início da estação seca, entre os meses de maio e junho, e a frutificação após a perda das folhas, entre agosto e outubro (CARVALHO, 1994; MAIA, 2004).

Figura 2 - Cumaru (*Amburana cearensis* A.C. Smith)



Fonte: autora

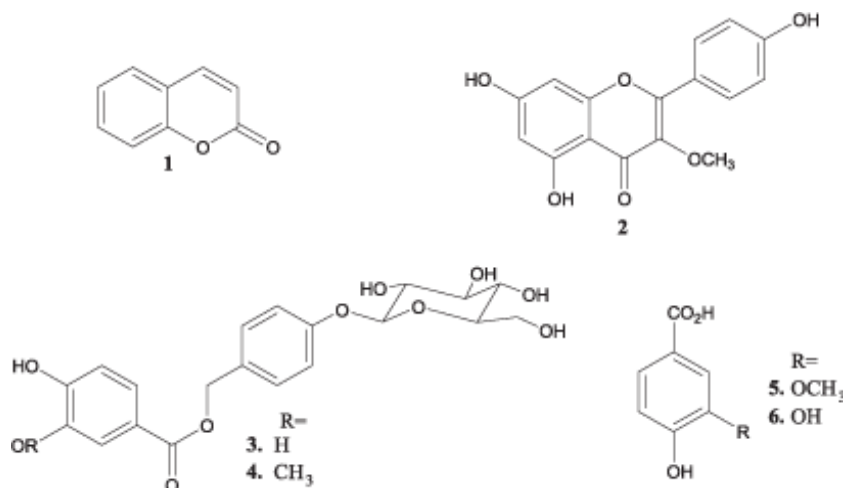
Essa planta é de grande importância comercial devido a suas várias aplicações, sendo amplamente empregada na carpintaria, perfumaria e farmacologia (CANUTO; SILVEIRA, 2010). Na medicina popular as cascas e sementes são comumente utilizadas no tratamento de doenças pulmonares, tosse, asma, bronquite, coqueluche (GUEDES *et al.* 2015).

O intenso uso comercial dessa planta, principalmente o extrativismo da casca do caule, colocou a espécie em risco de extinção (CANUTO *et al.*, 2008). Segundo Pinho *et al.* (2012) a parte da planta escolhida para extração de suas propriedades biológicas pode levar a ameaça de uma espécie. Por isso, medidas de exploração sustentável devem ser tomadas. As folhas são uma boa alternativa para elaboração de extratos vegetais, uma vez, que são naturalmente renováveis.

O perfil fitoquímico do cumaru está praticamente restrito ao estudo dos constituintes químicos da casca e da semente, onde vários compostos já foram isolados e identificados a partir dessas partes da planta, como cumarina, 6- hidroxycumarina, os flavonoides isocampferídeo, campferol, afrormosina, quercetina, 4'-metoxi-fisetina, biflavonóides amburanina A e amburanina B, os ácidos fenólicos ácido vanílico, ácido protocatecuico e ácido (E)-o-cumárico, os glicosídios fenólicos amburosídeo A e B (CANUTO *et al.*, 2014; CANUTO; SILVEIRA, 2006; CANUTO; SILVEIRA, 2010;

SILVEIRA; PESSOA, 2005).

Figura 3 - Estruturas químicas de alguns compostos encontrados no cumaru.



Fonte: Canuto e Silveira (2010). 1. Cumarina 2. Isocampferídeo 3. Amburosídeo A 4. Amburosídeo B 5. Ácido vanílico 6. Ácido protocatecuico

Várias atividades farmacológicas já foram atribuídas às cumarinas como antimicrobiana, hipotensiva, ant-inflamatória antitumoral, anti-malárica, leishmanicida e anti-chagásica (ALMEIDA *et al.*, 2010). Já os glicosídeos fenólicos, amburosídeo A e B encontrados no cumaru revelaram atividade antimalárica, antiprotozoária, antifúngica e antibacteriana *in vitro* contra *E.coli* e *Shingella flexneri* (BRAVO *et al.*, 1999). O flavonóide, isocampferídeo apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* e *Cladosporium cucumerinum* (WANG *et al.*, 1989).

Alguns estudos toxicológicos e teratogênicos já foram realizados para servirem de parâmetros de segurança para o uso dos extratos dessa planta (ALMEIDA *et al.*, 2010). O estudo toxicológico do extrato hidroalcoólico das cascas do caule da *A. cearensis*, administrado por via oral em ratos machos e fêmeas, revelou baixa toxicidade da planta (DL50: $1,79 \pm 0,12$ g/kg), além disso, a ingestão diária deste extrato não mostrou nenhum efeito teratogênico (LEAL *et al.*, 2003). O estudo clínico do xarope de cumaru com administração diária, durante 28 dias em voluntários saudáveis do sexo feminino e masculino, causou variações em alguns parâmetros bioquímicos, porém essas variações apresentaram valores que se mantiveram dentro dos limites de normalidade. Testes clínicos, laboratoriais e eletrocardiográficos realizados durante o estudo não mostraram sinais de toxicidade do xarope (SOARES *et al.*, 2007).

A maioria dos estudos quanto à atividade antimicrobiana do cumaru estão voltados para os extratos da casca do caule e da semente (AGUIAR *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2015; SÁ *et al.*, 2014). Pouquíssimos estudos relatam a atividade antimicrobiana dos extratos dessa planta obtidos a partir da folha. Figueredo *et al.* (2013), ao avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha de cumaru frente as cepas de *S.aureus* e *E.coli.*, encontraram para as cepas de *E.coli* testadas CIM iguais a 1024 µg/mL, já para as cepas de *S.aureus* foram encontradas CIM iguais a 1024 µg/mL e 512 µg/mL.

3.4 Microrganismos transmitidos por alimentos

Os microrganismos estão presentes no ambiente (água, ar, solo), no homem, em todos os seres vivos e em fontes de alimentos. Assim, qualquer alimento seja de origem animal ou vegetal, *in natura* ou industrializado, pode ser contaminado por microrganismos, inclusive os patogênicos (FERREIRA, 2006; SOUSA, 2006).

Além de contribuírem para expressivas perdas econômicas, os microrganismos patogênicos são responsáveis por sérios problemas de saúde pública. As enfermidades, resultantes da ingestão de alimentos contaminados por esses microrganismos são conhecidas como Doenças Transmitidas por alimentos (DTA). Os microrganismos patogênicos são muito mutáveis e podem se adaptar ao ambiente conseguindo sobreviver, multiplicar-se e/ou produzir compostos tóxicos (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogênica, gram positiva, pertencente ao gênero *Staphylococcus* (SILVA *et al.*, 2010). Este patógeno é encontrado na pele, fossas nasais, garganta de seres humanos e animais, por isso estudos tem apontado os manipuladores como principal fonte de contaminação dos alimentos (SOUSA *et al.*, 2014). Equipamentos e superfícies também podem ser fontes de contaminação, uma vez que o *S. aureus* é capaz de formar biofilmes em diferentes superfícies (DI CICCIO *et al.*, 2015). Por não ser resistente ao calor, este micro-organismo é facilmente destruído em temperatura de pasteurização ou cocção (SILVA *et al.*, 2010). *S. aureus* é responsável por intoxicações resultantes da ingestão de alimentos contaminados por toxinas termoestáveis produzidas por eles (OLIVEIRA *et al.*, 2010). As toxinas são proteínas de baixo peso molecular, resistentes ao calor, não sendo eliminadas na pasteurização ou cocção, e resistentes à ação de enzimas proteolíticas (FORSYTHE, 2013). Entre os sintomas dessas doenças estão náuseas, vômitos, diarreia e dores abdominais.

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram positiva, capaz de se desenvolver

em temperaturas de refrigeração, alta concentração de sal, baixa faixa de pH e ambientes secos. Estas características permitem sua sobrevivência em uma grande variedade de alimentos como produtos lácteos não pasteurizados, carnes, frutos do mar e vegetais. Além disso a *Listeria monocytogens* é capaz de formar biofilmes em plantas de produção de alimentos, podendo sobreviver por longos períodos. (AMAJOUD *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018; SWAMINATHAN; SMIDT, 2007). *Listeria monocytogenes* é responsável por uma das infecções mais severas transmitidas por alimentos, a listeriose. Esta doença afeta principalmente indivíduos com sistema imunológico comprometido e o desenvolvimento do feto durante a gravidez, levando a morte de 15% a 20% dos casos (AMAJOUD *et al.*, 2018; OVERNEY *et al.*, 2017). Mulheres grávidas podem não apresentar os sintomas ao contrair a doença, porém quando esta se manifesta pode causar aborto, nascimento prematuro e até a morte do feto. Já indivíduos saudáveis são mais resistentes à doença, onde febre, diarreia, sonolência e fadiga são alguns dos sintomas relatados. Já em indivíduos imunodeficientes os sintomas mais frequentes são meningite, meningoencefalite e bacteremia (DIAS, 2008).

Salmonella enteritidis está amplamente distribuída na natureza, sendo o trato intestinal do homem e dos animais o seu principal reservatório. Esse microrganismo é considerado um importante patógeno no mundo todo. Alimentos como ovos e aves estão frequentemente envolvidos em surtos de salmonelose. Cólicas abdominais, febre, vômito, dores de cabeça, diarreia e mialgia são alguns dos sintomas desta doença (BAÚ; CARVALHAL; ALEIXO, 2001; HUNG *et al.*, 2017; SURECH *et al.*, 2006). Ela não produz esporos, porém elas possuem um conjunto de ferramentas que as ajudam a permanecer no ambiente mesmo em condições difíceis, como em ambientes e alimentos de baixa umidade e apesar de não conseguirem se multiplicarem nessas condições, elas podem sobreviver por muitos anos (LINS, 2018).

Escherichia coli são bactérias gram negativas e em sua maioria são inofensivas, porém algumas cepas podem produzir toxinas que são capazes de inibir a síntese de proteínas em células e causar graves doenças nos seres humanos como diarreia sangrenta, insuficiência renal, coagulação sanguínea e até a morte (DARYAEI *et al.*, 2018). Esta bactéria faz parte da microbiota normal do homem, atuando como um microrganismo comensal, porém ela também pode atuar como um microrganismo oportunista ocasionando doenças em hospedeiros susceptíveis e como patógeno extremamente especializado (SOUSA, 2006).

3.5 Encapsulação de extratos vegetais

A encapsulação consiste na incorporação de um ingrediente ativo dentro de um

material de parede a fim de melhorar a eficácia do agente ativo e protegê-lo contra reações de degradação, agindo como barreira a ação do oxigênio, luz, ácido e enzimas (NEDOVICK *et al.*, 2011; WANI; MASOODI; WANI, 2017).

Essa técnica é comumente empregada na aplicação de extratos vegetais em sistemas alimentares, uma vez que ajuda a melhorar a biodisponibilidade e a preservar os compostos bioativos da oxidação, das reações de escurecimento, da degradação por calor, acidificação ou luz durante as etapas de manipulação, processamento e armazenamento do produto final (CODEVILLA *et al.*, 2015; VINCEKOVIC *et al.*, 2017). A encapsulação também proporciona a liberação controlada dos compostos bioativos e mascara cor, sabor e odores indesejáveis (NEDOVICK *et al.*, 2011; SUAVE *et al.*, 2006). Essas propriedades são dependentes do tamanho da partícula, dos materiais de parede, dos ingredientes ativos e das técnicas de produção. As propriedades de estabilidade e liberação controlada, por exemplo, são muito dependentes do material de parede usado na encapsulação (WANI; MASOODI; WANI, 2017).

O material de parede deve ser selecionado em função das propriedades físicas e químicas do composto ativo, da aplicação pretendida e do método de obtenção da partícula (SUAVE *et al.*, 2006). Assim, o material de parede escolhido deve apresentar boas características reológicas em elevadas concentrações, possuir baixa higroscopicidade, ser de fácil manipulação durante o processo; não reagir com o material a ser encapsulado, possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo, liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados no processo de encapsulação, proporcionar proteção máxima ao seu conteúdo contra condições adversas, como luz, pH, oxigênio, entre outros, não apresentar sabor desagradável e ser econômico. Normalmente, utiliza-se uma mistura de substâncias encapsulantes, uma vez que nem sempre um único composto possui todas essas propriedades (AZEREDO, 2005; NEDOVICK *et al.*, 2011; SANTOS; FERREIRA, GROSSO, 2000; SUAVE *et al.*, 2006).

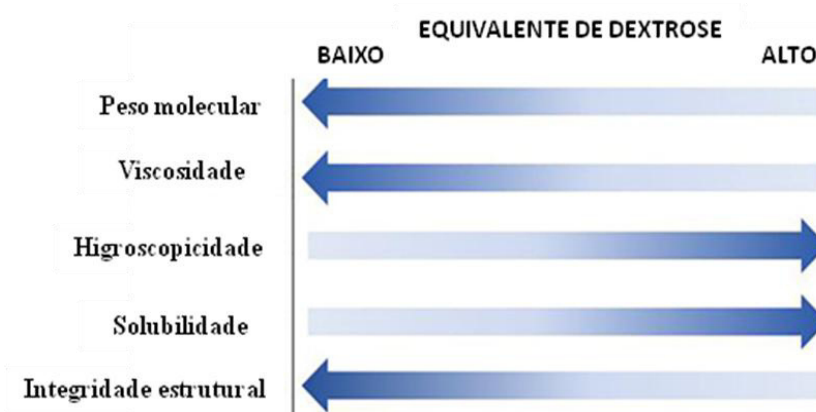
São utilizados pela indústria de alimentos como materiais de parede os carboidratos (amido, goma arábica, maltodextrina, ciclodextrina, etc), proteínas (proteínas do leite e do soro do leite, glúten, etc) e lipídios (ceras, glicerídeos, etc). Porém, os carboidratos são os mais utilizados devido a sua diversidade, capacidade de se ligar a compostos de sabor e o baixo custo (AZEREDO, 2005; NEDOVICK *et al.*, 2011; WANI *et al.*, 2015).

A maltodextrina é um amido hidrolisado obtido por hidrólise enzimática ou ácida parcial do amido, consistindo em cadeias de D-glicose ligadas em α (1,4). Este polissacarídeo é comumente usado como material de parede devido ao seu baixo custo, baixa

higroscopicidade, alta solubilidade em água, baixa viscosidade mesmo em altas concentrações de sólidos, baixo teor de açúcar, aroma e sabor neutro, boa proteção do sabor quanto à oxidação e suas soluções são incolores. Sua principal desvantagem é a baixa capacidade emulsificante e a baixa retenção de substâncias voláteis, por isso, geralmente é utilizada em misturas com outros materiais de parede (ANSELMO *et al.*, 2006; FERNANDES, BORGES, BOTREL, 2014; KLINKESORN *et al.*, 2004; MAHDAVI *et al.*, 2016).

Os hidrolisados do amido são descritos conforme a sua equivalência de dextrose (DE), que é a medida do poder redutor de polissacarídeos derivados do amido comparado com a quantidade de D-glicose em base seca. As maltodextrinas apresentam DE variando de 0 a 20, onde os diferentes valores de DE das maltodextrinas apresentam diferentes propriedades físicas e químicas, como solubilidade, viscosidade, temperatura de congelamento, etc (FIGURA 4) (KLINKESORN *et al.*, 2004; LABUSCHAGNE, 2018).

Figura 4 - Influência do equivalente de dextrose (DE) da maltodextrina nas características do material.



Fonte: Adaptado de Labuschagne (2018)

Entre as ciclodextrinas, a β - ciclodextrina é a mais utilizada como material de parede devido ao seu tamanho, disponibilidade e preço. Ela é um oligossacarídeo cíclico de glocopiranosil unidos por ligações em α (1,4). A estrutura dessa molécula apresenta cavidade hidrofóbica e superfície hidrofílica, podendo essa estrutura reter uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Ela é utilizada para melhorar a solubilidade, estabilizar compostos contra a oxidação, controlar a volatilização e sublimação, mascarar sabores, reter odores e controlar a liberação de compostos ativos e sabores (RAKMAI *et al.*, 2018; WILKOWSKA *et al.*, 2016).

Inúmeros métodos podem ser empregados para a encapsulação, porém a seleção

do método depende das propriedades físicas e químicas do agente ativo e do material de parede, do tamanho desejado da partícula, da aplicação a que será dada o encapsulado e do mecanismo de liberação (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008). Os métodos de encapsulação foram divididos em três grupos (SUAVE *et al.* 2006), conforme quadro a seguir:

Quadro 1 – Métodos de encapsulação

Métodos de encapsulação	
1. Métodos físicos	spray drying, spray cooling, pulverização em banho térmico, leite fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, cocristalização e liofilização.
2. Métodos químicos	inclusão molecular e polimerização interfacial
3. Métodos físico-químicos	coacervação ou separação de fases, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico

Fonte: Suave *et al.* (2006).

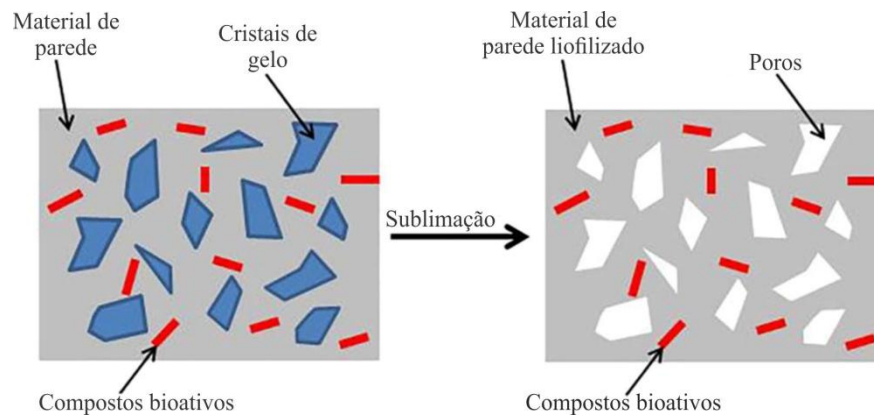
A liofilização é um dos métodos mais utilizados na obtenção de materiais encapsulados. Este método é o mais adequado para a encapsulação de substâncias termossensíveis (LABUSCHAGNE, 2018; SANCHEZ *et al.*, 2013).

No processo de liofilização o material congelado é submetido à baixa pressão e calor suficiente, de forma que a água congelada sublima diretamente da fase sólida para a fase gasosa (FANG; BHANDARI, 2010). A liofilização do material ocorre em três etapas. A primeira etapa consiste no congelamento do material, em seguida, o gelo formado é removido do material passando do estado sólido diretamente para vapor, num processo denominado de sublimação. Por fim, a água que ainda permanece fortemente ligada aos solutos, a água adsorvida, é transformada em vapor e removida do material num processo chamado de dessorção (ÖZBEK; ERGONUL, 2017; SILVA *et al.*, 2012)

As micropartículas obtidas neste processo apresentam geralmente estruturas porosas (FIGURA 5) e irregulares. A presença de poros nos materiais liofilizados está associada à água que foi removida durante a liofilização (ÖZBEK; ERGONUL, 2017). A

porosidade da partícula facilita a difusão do oxigênio e isso pode diminuir a estabilidade oxidativa (LABUSCHAGNE, 2018).

Figura 5 - Formação de poros no processo de liofilização.



Fonte: Adaptado de Labuschagne (2018).

A vantagem deste método é que ele conserva a maioria das propriedades iniciais do material como aparência, cor, sabor, textura, compostos bioativos, etc. (CEBALLOS; GIRALDO; ORREGO, 2012). Característica como a ausência de água, ar e as baixas temperaturas de processamento, previnem ou limitam a deterioração do material por meio de reações microbianas ou químicas (LABUSCHAGNE, 2018). Já o alto custo, o longo tempo de processo e a estrutura porosa são as desvantagens deste método (ÖZBEK; ERGONUL, 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

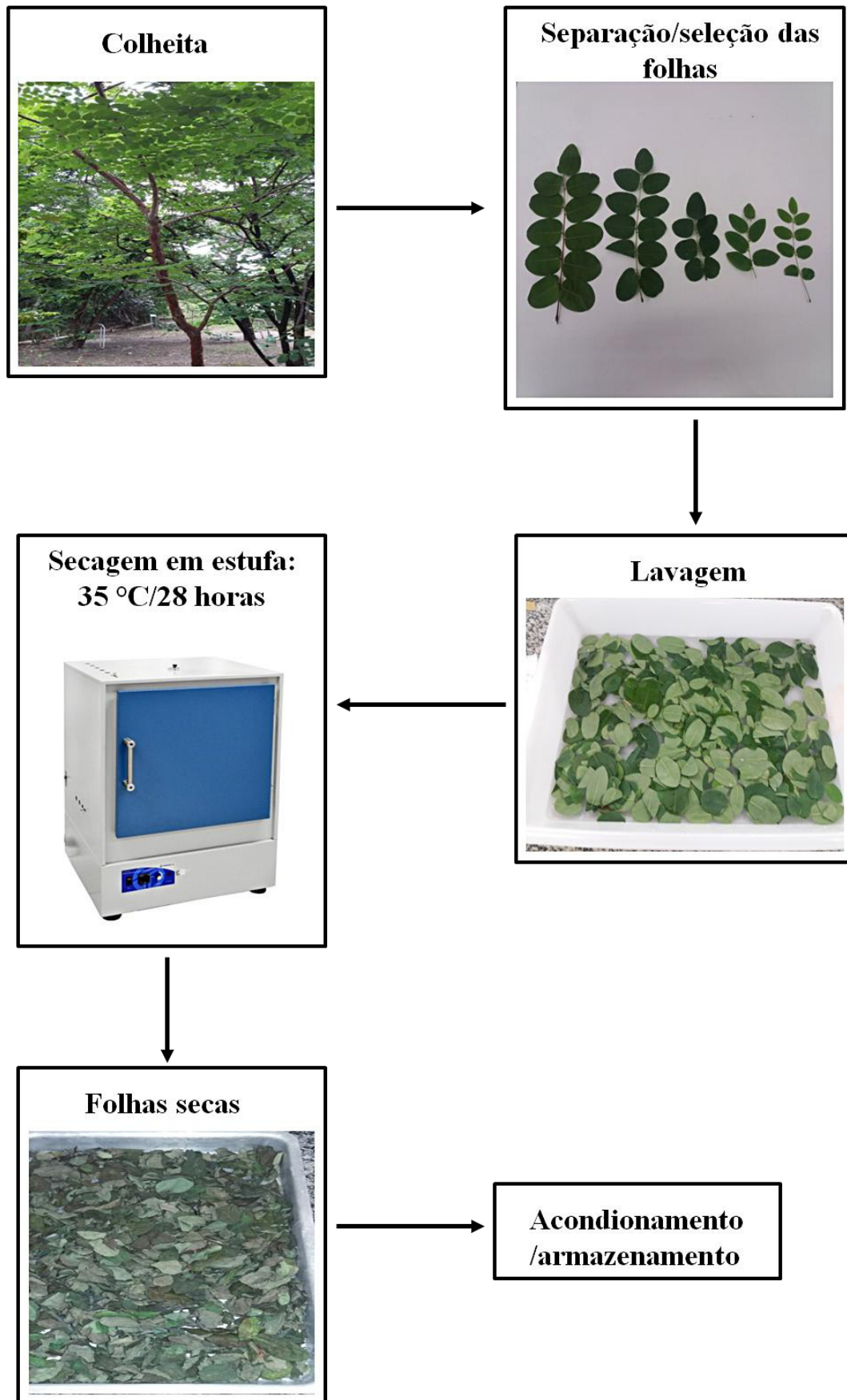
4.1.1 Coleta

As folhas do cumaru (*Amburana cearensis* A.C. Smith) foram obtidas no Horto de Plantas Medicinais Prof. Abreu Matos, localizado na Universidade Federal do Ceará (UFC), campus do Pici, Fortaleza- Ceará. Foram coletadas folhas verdes de diversas partes da copa, juntamente com os talos, entre Maio e Junho de 2017, sempre no período da manhã entre às 9h e 10h sob as condições de temperatura máxima, mínima e umidade relativa, 30° C, 24° C e 65%, respectivamente. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos e conduzidas ao Laboratório de Processamento de Frutos e Hortaliças, localizado no Departamento de Engenharia de Alimentos (DEAL) na UFC.

4.1.2 Preparo do material vegetal

No Laboratório de Processamento de Frutos e Hortaliças, conforme fluxograma apresentado na Figura 6 foi realizado a separação das folhas e do talo, selecionando-se as folhas íntegras. Em seguida, as folhas selecionadas foram lavadas com água destilada e parcialmente secas com papel absorvente. Após esse processo, elas foram distribuídas em bandejas de metal e submetidas à secagem em estufa de circulação de ar (Modelo 315 SE FANEM) a 35°C por 28 horas. Após a secagem, as folhas secas foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas ao abrigo da luz em depósitos de plástico (25°C) até a elaboração dos extratos (FIGURA 6).

Figura 6 – Fluxograma do processamento das folhas de cumaru.



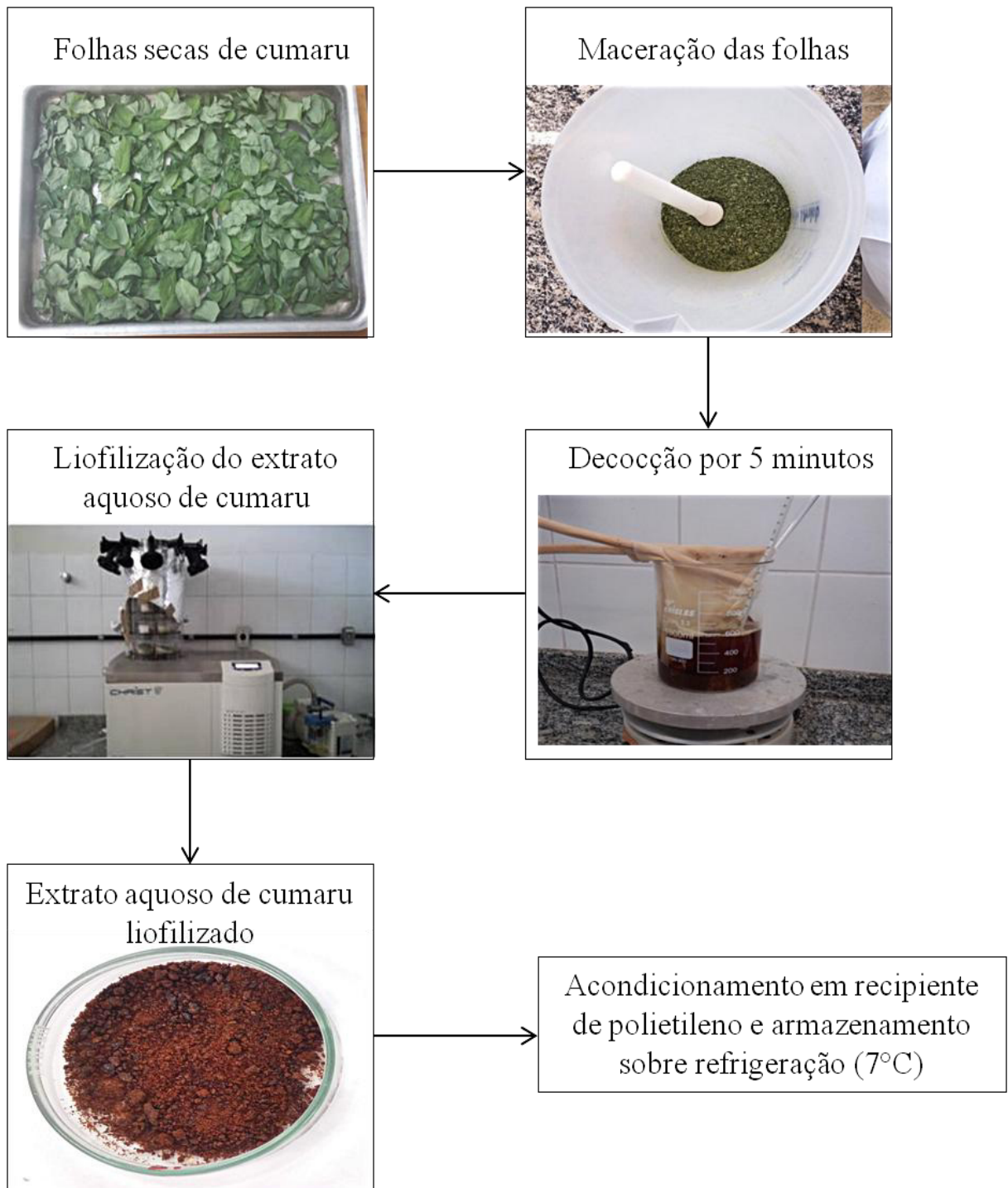
Fonte: autora

4.2 Obtenção dos extratos da folha de cumaru

4.2.1 Extrato aquoso

O extrato aquoso foi obtido seguindo a metodologia de Bazylko *et al.* (2013), com adaptações (FIGURA 7). As folhas secas de cumaru foram maceradas com o auxílio de almofariz e pistilo, obtendo granulometria de 0,84 mm. As folhas maceradas foram dispostas em sachê de algodão e submetidas à cocção em água destilada a 100°C/ 5 min na proporção de 1:10 m/v (folhas secas/ água), repetiu-se novamente o procedimento, reutilizando as folhas e mesma quantidade de água. Os extratos aquosos de cumaru obtidos foram dispostos em recipientes de polietileno, congelados e desidratados por liofilização (Modelo Beta 1-8 LD plus, CHRIST) numa pressão de 0,025 mbar e temperatura de - 40 ° C. Os extratos aquosos secos foram acondicionados em recipientes de polietileno opaco e armazenados sobre refrigeração a 7°C até o momento das análises.

Figura 7 – Fluxograma do processo de elaboração do extrato aquoso da folha de cumaru.

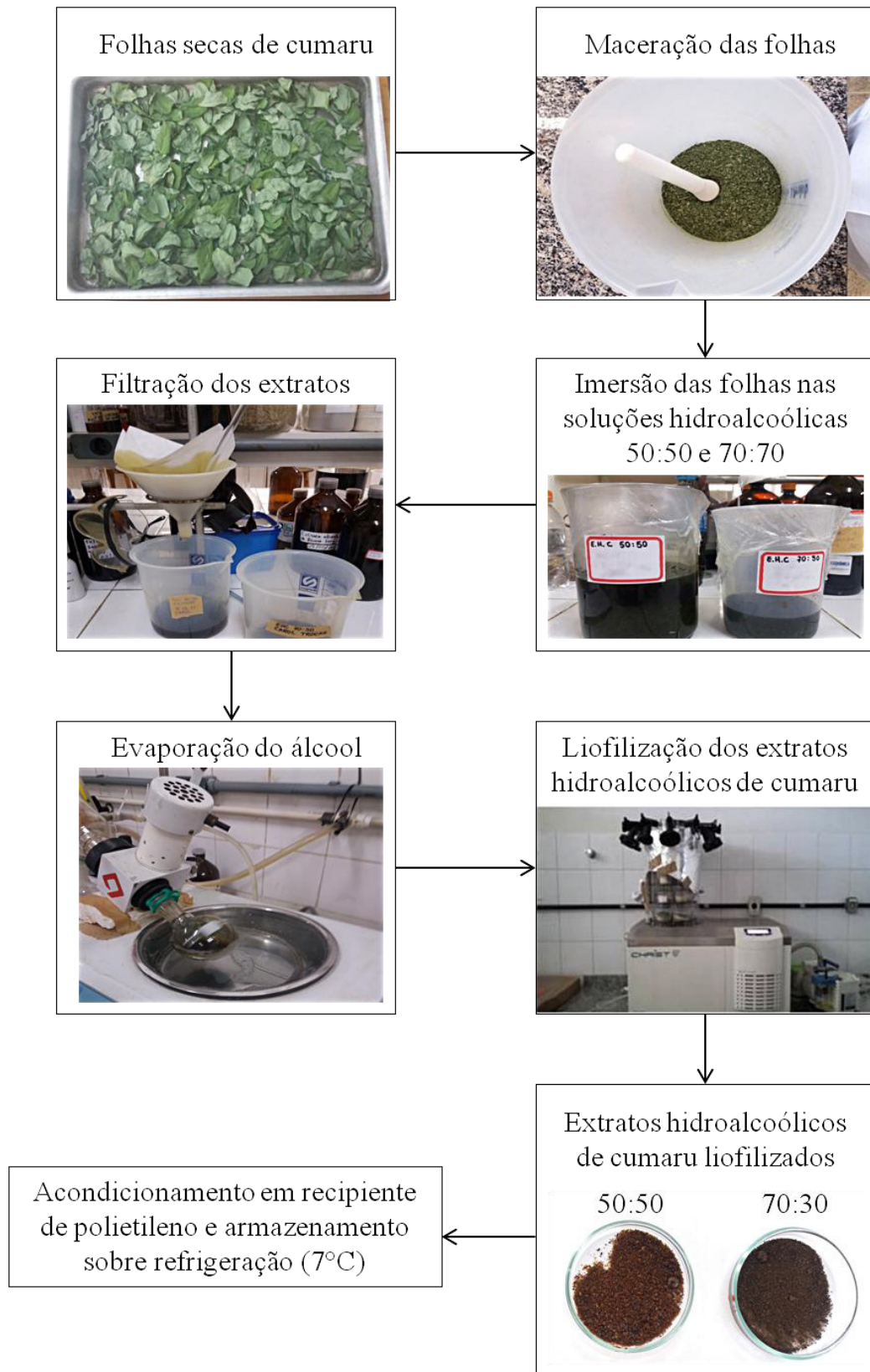


Fonte: autora.

4.2.2 Extratos hidroalcoólicos

Os extratos hidroalcoólicos foram obtidos conforme metodologia de Santos *et al.* (2016), com adaptações (FIGURA 8). As folhas secas foram maceradas com o auxílio de almofariz e pistilo, obtendo granulometria de 0,84 mm. As folhas maceradas foram imersas em solução hidroalcoólica 50:50 v/v (etanol:água) e solução hidroalcoólica 70:30 v/v (etanol:água) na proporção 1:10 m/v (folhas:solução), sendo mantidas a temperatura ambiente (25°C) por 24h. O processo de extração durou quatro dias. A cada 24h o processo era repetido sob as mesmas condições, reutilizando as folhas na proporção de 1:10 m/v (folhas:solução). Os extratos obtidos foram submetidos à filtração em filtro de papel da marca UNIFIL. Posteriormente, os extratos filtrados foram concentrados em rotaevaporador a 75° C (modelo Q344M, marca QUIMIS) para a retirada do álcool, congelados e liofilizados (Modelo Beta 1-8 LD plus, CHRIST) numa pressão de 0,025 mbar e temperatura de -40 ° C. Os extratos secos obtidos foram acondicionados em recipientes de polietileno opaco e armazenados sobre refrigeração a 7° C, até o momento das análises.

Figura 8 – Fluxograma do processo de elaboração dos extratos hidroalcoólicos 50:50 e 70:30 da folha de cumaru.



Fonte: autora.

4.3 Caracterização dos extratos vegetais

4.3.1 Rendimento dos extratos

Após a obtenção dos extratos secos procedeu-se o cálculo do rendimento em % de cada um deles, através da formula:

$$Rt = \frac{P_{ext}}{P_f} \times 100$$

Onde: Rt = Rendimento total do extrato (%);

P_{ext} = Peso do extrato seco (g);

P_f = Peso das folhas secas (g).

4.3.2 Determinação de compostos fenólicos extraíveis totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados pela metodologia descrita por Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997), que utiliza o Folin-Ciocalteu como reagente e o ácido gálico como padrão para elaboração da curva. Inicialmente, foram preparadas soluções iniciais (extrato:água) de concentração final de 1 mg/mL. Todo o processo foi realizado ao abrigo da luz. Em tubos de ensaio foram adicionadas alíquotas 100 µL da solução inicial e 400 µL de água destilada para completar o volume de 0,5 mL. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:3), 1 mL da solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 20% e 1,0 mL de água destilada. Os tubos foram agitados em agitador vortex para adequada homogeneização e deixados em repouso protegidos da luz por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800) a 700 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (AGE) /100 g de extrato. O teste foi realizado em triplicata.

4.3.3 Determinação da Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante total dos extratos foi determinada pelo método da captura do radical sal de amônio do ácido 2,2 azinobis (3-etilbenzeno-6-sulfônico) (ABTS), conforme metodologia descrita por Rufino *et al.* (2010), com modificações. Para realização do teste preparou-se uma solução (extrato:água destilada) de concentração igual a 5mg/mL.

Da solução inicial foram transferidas alíquotas de 30µL, 15 µL e 6 µL para tubos de ensaio, em triplicata. Posteriormente, os tubos foram completados com água destilada para volume de 30 µL, adicionados de 3ml do radical ABTS⁺ e homogeneizados durante 6 minutos. Realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800) a 734 nm. O álcool etílico foi usado como branco. Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox em µM / g de extrato seco de folha de cumaru.

4.3.4 Citotoxicidade dos extratos frente às células epiteliais humanas

Os extratos aquoso, hidroalcoólico 50:50 e hidroalcoólico 70:30 de folhas de cumaru foram avaliados quanto a citotoxicidade por meio de ensaios baseados na redução celular de MTT [Brometo (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium)]. O teste de MTT avalia a viabilidade celular a partir de um método colorimétrico simples. A redução do MTT ocorre através de enzimas desidrogenases mitocondriais. Como resultado da redução do MTT é formado cristais de formazan de cor azul, que ao serem dissolvidos absorvem na região do visível, podendo ser quantificados por espectrofotometria (MOSMANN, 1983).

A citotoxicidade foi medida através da exposição das células epiteliais intestinais (aproximadamente 20.000 células - cultura IEC 6), previamente cultivadas, nas concentrações de 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25% e 0,625 % (m/v) dos extratos aquoso, hidroalcoólico 50:50 e hidroalcoólico 70:30. Durante o ensaio, os sobrenadantes das culturas celulares, contendo ou não (controle negativo) a amostra testada, foram removidos e as células foram mantidas em solução de MTT (5 mg.mL⁻¹) em meio de Krebs, a uma temperatura de 37°C/ 20 minutos e ao abrigo da luz. Os cristais de formazan formados após este período, devido à redução do MTT, foram dissolvidos em solução de HCl 0,04 N em isopropanol. O valor da absorbância foi medido a um comprimento de onda de 570 nm. Os valores das absorbâncias obtidas de cada concentração dos extratos testados foram comparados à absorbância do controle positivo (citotoxina A do *Clostridium difficile*) e negativo (somente cultura celular em meio de cultura). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de comparação múltipla de Bonferroni's e os resultados expressos em média e desvio padrão.

4.3.5 Atividade antimicrobiana dos extratos de folha de cumaru

4.3.5.1 Preparo do inóculo

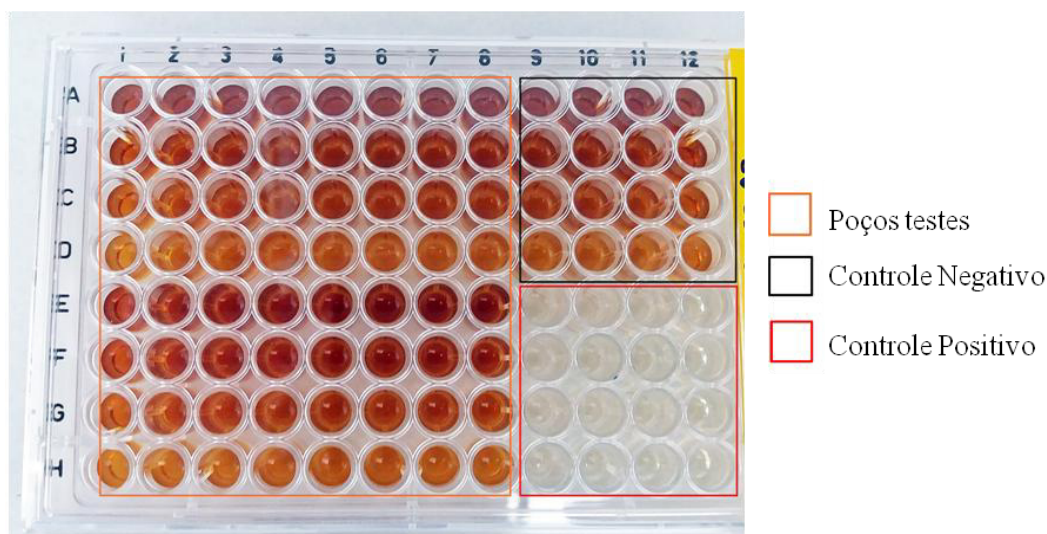
As cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 27664), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Salmonella enteritidis* (IAL 1132) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram cultivadas no meio de manutenção Trypticase Soya Agar - TSA (Difco, Sparks, USA) a 35 ° C por 24 horas. Após este período, colônias isoladas de aproximadamente 1 mm de diâmetro foram selecionadas e transferidas para tubos contendo 5 ml de caldo Trypticase Soya - TSB (Difco, Sparks, USA). As culturas foram incubadas a 35 ° C durante 24 horas. Após o período de incubação, a concentração das suspensões bacterianas em caldo TSB foi ajustada, por meio de diluições seriadas, para 10⁵ UFC/ ml. Segundo Scott *et al.* (2005) essa concentração é recomendada para avaliar o efeito do agente antimicrobiano em testes *in vitro*.

4.3.5.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada frente às cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 27664 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19115) e Gram negativas (*Salmonella enteritidis* IAL 1132 e *Escherichia coli* ATCC 25922), através do método de microdiluição em placas, onde foram avaliados os parâmetros de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), conforme metodologias descritas por Branen e Davidson (2004) e Brandt *et al.* (2010), com adaptações.

Para esse teste foram utilizadas placas de acrílico estéreis (Microtest TM, Becton Dickinson and Co), de 96 poços com capacidade para 300 µL/poço. Foram preparadas soluções iniciais dos extratos de concentração igual a 200 mg/mL. As soluções iniciais foram homogeneizadas em vortex até sua completa dissolução e filtradas em membrana estéril de 0,22 µm. A partir da solução inicial foi possível obter as concentrações utilizadas no teste da atividade antimicrobiana. As concentrações testadas variaram de 2 mg/mL a 100 mg/mL sobre os microrganismos testados. A distribuição dos poços na placa (FIGURA 9) ocorreu conforme descrito na Tabela 1.

Figura 9 - Distribuição dos poços na microplaca.



Fonte: autora.

Tabela 1 – Descrição da distribuição dos poços na microplaca.

Poços	Descrição
Poços testes	100 μ L solução antimicrobiana e 100 μ L da suspensão bacteriana a 10^5 UFC/mL em caldo TSB.
Controle negativo	100 μ L da solução antimicrobiana e 100 μ L de Caldo TSB.
Controle positivo	100 μ L da suspensão bacteriana a 10^5 UFC/mL em caldo TSB e água destilada estéril

Fonte: autora.

Após a distribuição da placa, foi realizada a leitura da densidade óptica (D.O.) a 630 nm em leitora de absorvância em microplacas Elx 808 (BioTek), no tempo imediato após a distribuição (t_0). Em seguida, a microplaca foi incubada a 35°C por 24 horas sob agitação na própria leitora. Após esse período, foi realizada nova leitura da densidade óptica (D.O.) $_{630nm}$ (t_{24}). As concentrações que apresentaram variação das leituras de DO ($t_{24} - t_0$) $\leq 0,05$ nm foram consideradas de efeito inibitório. A menor concentração de uma solução (mg/mL) capaz de inibir o crescimento microbiano é definida como concentração inibitória mínima (CIM) (BONA *et al.*, 2014).

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada a partir dos poços que apresentaram concentração de efeito inibitório ($\leq 0,05$ nm). Uma alíquota de 100 μ L foi retirada desses poços e plaqueada por spread plate na superfície de meios de cultura seletivos e diferenciais específicos para cada microrganismo, sendo utilizado ágar MacConkey (Oxoid)

para *E. coli*, ágar Listeria Oxford (HiMedia) para *L. monocytogenes*, ágar Baird-Parker (BP) para *S. aureus* e ágar desoxicolato-lisina-xilose (XLD) para *Salmonella enteritidis*. Em seguida as placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas.

A CBM é definida como a menor concentração da solução capaz de causar a morte do inóculo (BONA *et al.*, 2014). Assim, após o período de 48 horas, aquelas concentrações, que quando plaqueadas, não apresentaram crescimento microbiano foram consideradas bactericidas. A menor concentração com efeito bactericida foi considerada a concentração bactericida mínima (CBM).

4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão na avaliação dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru sobre a morfologia das bactérias estudadas.

O objetivo do ensaio foi verificar as modificações estruturais nas células bacterianas de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*, causadas pela exposição desses microrganismos aos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50. O teste foi realizado de acordo com o descrito por Hooton, Atterbury e Connerton (2011), com adaptações.

Foram preparadas culturas bacterianas na ordem de 10^6 UFC/ml. Em seguida, foram adicionados os extratos nas CBM encontradas, obedecendo às mesmas condições dos ensaios microbiológicos do item 4.3.5.2. Para cada amostra foi adicionado 100 µL da solução fixadora Karnovsky em cacodilato por 4 horas para matar a célula sem alterar sua estrutura celular. Posteriormente, as suspensões bacterianas foram dispostas na grade de cobre, onde adicionou-se uma gota da solução contrastante de ácido fosfotúngstico (pH 7,4), permanecendo por 3 minutos, sendo retirado o excesso, submetido à secagem em temperatura ambiente ($22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$) por 15 minutos. As imagens foram visualizadas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão (MEV-STEM TESCAN), com voltagem de 30 KV.

4.5 Ensaio toxicológico dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru utilizando Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo *in vivo*.

Os testes com Zebrafish foram realizados baseando-se em metodologias propostas por Magalhães *et al.* (2017). Para realização do ensaio foram utilizados zebrafishes (ZF) (*Danio rerio*) adultos, selvagens, de ambos os sexos com idade de 60 a 90 dias, tamanho de 3.5 ± 0.5 cm e peso 0.4 ± 0.1 g. Os peixes foram obtidos da Agroquímica: Comércio de

Produtos Veterinários LTDA, em Fortaleza-Ce.

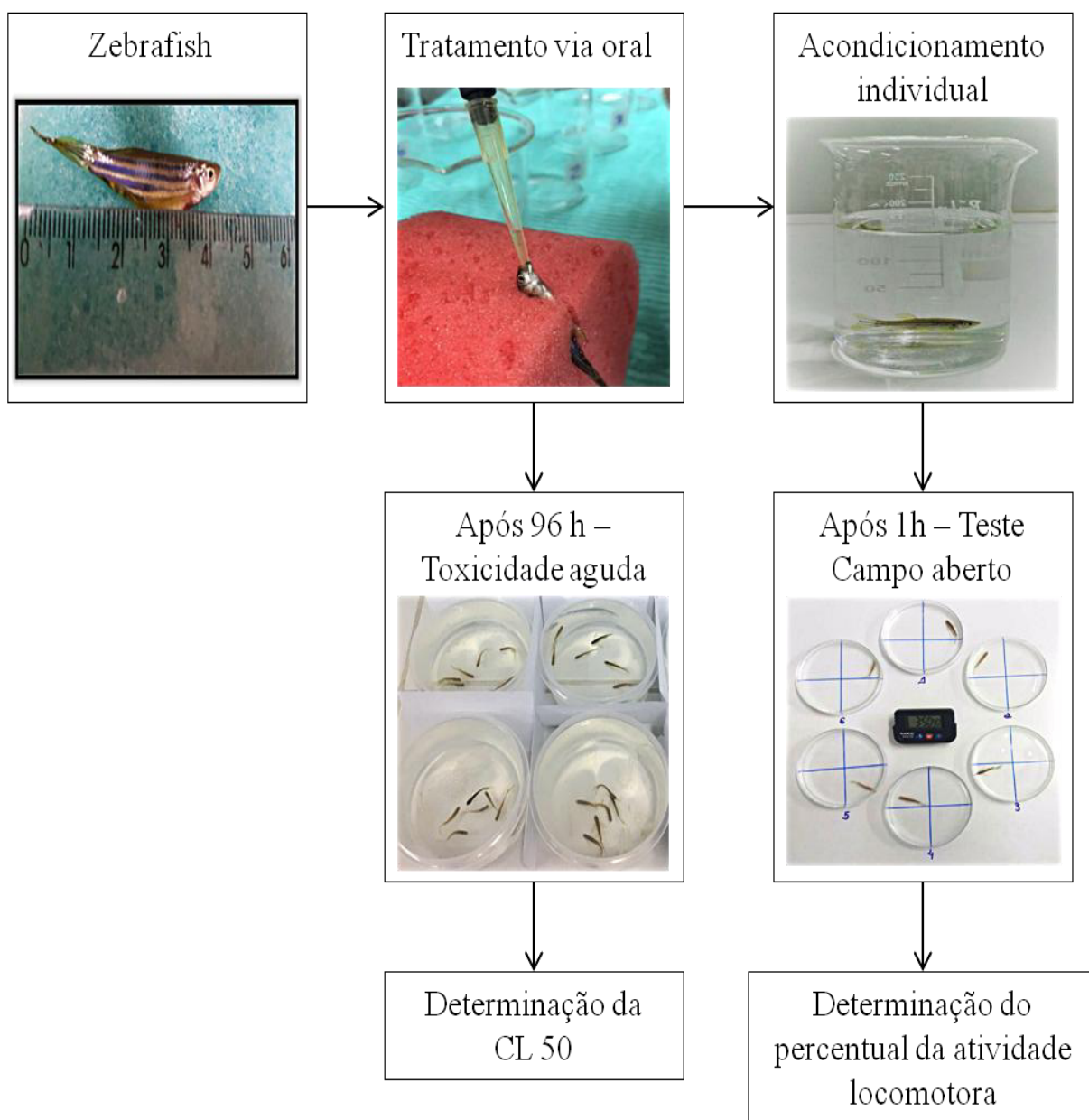
Grupos de 50 peixes foram aclimatados por 24 h em aquários de vidro (40 x 20 x 25 cm), contendo água desclorada (anticloro *ProtecPlus*[®]) e bombas de ar com filtros submersos, a 25°C e pH 7.0, com ciclo cicardiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração (*Spirulina*[®]) *ad libitum* 24h antes dos experimentos. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 3344801/2017 (Anexo 1).

O teste de campo aberto foi realizado para avaliar a alteração ou não da coordenação motora dos peixes, seja por sedação e/ou relaxamento muscular (AHMAD; RICHARDSON, 2013). Os animais (n=6/gupo) foram selecionados aleatoriamente, transferidos para uma esponja úmida e tratados com 20 µL, via oral, dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru, ou com água destilada estéril (grupo veículo) (COLLYMORE, RASMUSSEM; TOLWANI, 2013). Foi incluído um grupo de animais sem tratamento, denominado de Naive. As concentrações testadas dos extratos foram baseadas nas concentrações bactericidas mínimas (CBM) encontradas no teste da atividade antimicrobiana, sendo testadas também o dobro e o triplo dessas concentrações. Após os tratamentos os animais foram acondicionados individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Decorrido 1 hora, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL). Usando o valor de CL do grupo Naive como linha de base (100%), foi calculado a porcentagem de atividade locomotora (AL%) individualmente durante 0-5 minutos.

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish (*D. rerio*) adulto conforme metodologias propostas pela OECD (OECD, 1992) e Huang *et al.* (2014). Os animais (n=6/cada) foram tratados com as mesmas concentrações dos extratos a que foram submetidos no teste de campo aberto, porém os peixes foram deixados em repouso por 96 horas para analisar a taxa de mortalidade. O grupo veículo (água destilada estéril) foi utilizado como controle. Após as 96h, foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a concentração letal capaz de matar 50% dos animais (CL₅₀) através do método matemático Trimmed Spearman-Karber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR *et al.*, 2015).

O fluxograma do teste de atividade locomotora e toxicidade aguda estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Fluxograma da atividade locomotora e toxicidade aguda do zebrafish (*D. rerio*) tratados com extratos da folha de cumaru.



Fonte: autora.

4.6 Encapsulação dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.

4.6.1 Obtenção das microcápsulas

Os ensaios foram realizados seguindo o método sugerido por Paula *et al.* (2012) e Silva *et al.* (2018), com adaptações, onde foram preparadas diferentes formulações de microcápsulas utilizando a β -ciclodextrina, a maltodextrina (DE 16,5-19,5) e a combinação dos dois materiais de parede.

Os extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 foram usados como núcleo e sua massa foi mantida constante nas três formulações preparadas, sendo utilizado 7,5% de extrato e 30 % de material de parede nas formulações das soluções, conforme sugerido por Heinzelmann e Franke (1999) e 62,5 % de água (TABELA 2).

Tabela 2 – Formulações para obtenção das microcápsulas dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.

*Formulações	Extrato (%)	Ciclodextrina (%)	Maltodextrina (%)
F1	7,5	30	-
F2	7,5	-	30
F3	7,5	15	15

Fonte: autora.

Primeiramente, foram preparadas as soluções do material de parede (ciclodextrina + água ou maltodextrina + água ou ciclodextrina + maltodextrina + água) e homogeneizadas por 20 minutos em banho ultrassônico. Em seguida, o extrato foi adicionado em cada formulação e novamente levado ao banho de ultrassom por 30 minutos, até a obtenção de uma emulsão estável do material do núcleo (extrato) com a solução do material de parede.

Para melhor estabilidade da solução, foi necessária a adição de 3 gotas de Tween 40 para cada 10 mL de solução. Posteriormente, as dispersões foram homogeneizadas, utilizando um homogeneizador Ultra-Turrax (Turratec, TE-102, Tecnal, Brasil) durante 5 minutos a 14 000 rpm. As soluções foram congeladas e submetidas ao processo de secagem por liofilização numa pressão de 0,025 mbar e temperatura de -40°C. As microcápsulas obtidas foram acondicionadas em potes de polietileno opaco e armazenadas sobre refrigeração.

4.7 Caracterização das microcápsulas dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.

4.7.1 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

O estudo morfológico das microcápsulas foi realizado na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, através do equipamento de microscopia eletrônica de varredura (Modelo Inspect F50). As amostras foram montadas com fita de carbono em suporte de aço (“stubs”) e recobertas com ouro pelo sistema Quorum® Q150T ES.

4.7.2. Tamanho de partícula e potencial zeta

As amostras foram dissolvidas em água destilada na proporção 1:1 (m/v) e submetidas à agitação contínua por 24h. A determinação do diâmetro médio de partículas das amostras foi realizada utilizando o equipamento ZetaPlus (Brook haven Instruments Company, EUA), por espectroscopia de correlação de fótons (GOMES, 2011) e o potencial Zeta das amostras foi obtido através de medidas de mobilidade eletroforética a 25°C.

4.7.3 Higroscopicidade

A análise de higroscopicidade foi determinada conforme descrito por Goula e Adamopoulos (2008). Foi pesado 1,0 g de cada amostra, em triplicata, em placa de petri. O material foi espalhando uniformemente sobre a placa e colocado no dessecador por 90 minutos, sob as condições de 24 °C e 75% de umidade relativa, utilizando solução saturada de NaCl. O cálculo foi realizado pela diferença de massa e os resultados expressos em percentual de higroscopicidade.

4.7.4 Determinação da cor

A análise de cor dos extratos selecionados e seus encapsulados foi determinada através da utilização do colorímetro da marca Minolta (modelo Choma-Meter CR410). As amostras foram colocadas em placas de petri em quantidade suficiente para cobrir toda a base da placa. Foram realizadas as leituras das coordenadas de acordo com o sistema CIELAB (L^* , a^* , b^*), Hue (h^*) e Chroma (c^*), onde:

- L^* é a luminosidade da amostra, variando de 0 (preto) a 100 (branco);
- a^* é a intensidade de vermelho a verde, sendo vermelho os valores positivos e verde os negativos;
- b^* é intensidade de amarelo a azul, cujo amarelo é positivo e azul é negativo;
- c^* (Chroma) representa o grau de concentração ou pureza de uma cor;
- h^* (hue) a tonalidade das cores (ALVES *et al.*, 2008).

4.7.5 Eficiência da encapsulação

Para esta análise, os encapsulados foram solubilizados em água destilada obtendo-se concentração igual a 1 mg/mL. As soluções foram homogeneizadas durante 3 minutos no vortex e deixadas em repouso ao abrigo da luz por 24 horas. Após este período as amostras foram filtradas em filtro de papel e o teor de compostos fenólicos totais presentes nas microcápsulas foi determinado através da metodologia descrita no item 4.3.2

A eficiência de encapsulação desses compostos foi obtido através da seguinte equação (GOMES; MOREIRA; CASTELL-PEREZ, 2011):

$$%EE = \frac{CFT_1}{CFT_2} \times 100$$

Onde:

%EE = Eficiência da encapsulação ;

CFT₁ = Compostos Fenólicos Totais do extrato aquoso encapsulado;

CFT₂ = Compostos Fenólicos Totais do extrato aquoso bruto.

4.7.6 Atividade antimicrobiana das microcápsulas

A atividade antimicrobiana das microcápsulas foi realizada pelo método de microdiluição em placas, utilizando a mesma metodologia descrita no item 4.3.5.2, onde foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) das microcápsulas. As concentrações testadas variaram de 25 mg/mL a 200 mg/mL frente os microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 27664), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Salmonella enteritidis* (IAL 1132) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

4.8 Análises estatísticas

Os resultados das análises de determinação de compostos fenólicos totais, determinação de antioxidantes totais, potencial zeta, tamanho de partícula, higroscopicidade e colorimetria foram analisados estatisticamente por ANOVA e os níveis de significância foram determinados pelo Teste Tukey 5% de probabilidade pelo programa estatístico Statistica 10.0.

Para o ensaio toxicológico dos extratos utilizando o Zebrafish como modelo animal, os resultados foram expressos como valores da média \pm erro padrão da média para cada grupo de 6 animais e submetidos à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do Teste de Tukey a 5% probabilidade pelo programa GraphPad Prism v. 5.01.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos extratos da folha de cumaru

5.1.1 *Rendimento dos extratos*

O rendimento dos extratos aquoso (EA), hidroalcoólico 50:50 (EHA 50:50) e hidroalcoólico 70:30 (EHA 70:30) após a liofilização foram 34,12%, 44,94% e 45,12%, respectivamente. Diante dos resultados, observa-se que, o método de extração influenciou no rendimento dos extratos, além disso, a solução extratora também pode ter influenciado no conteúdo final da extração.

Além do método de extração, o menor rendimento do extrato aquoso também pode estar relacionado à menor proporção de compostos solúveis em água. Segundo Chaicouski *et al.* (2014) a utilização de uma solução extratora hidroalcoólica é capaz de extrair tanto compostos mais polares quanto os menos polares, significando, assim, uma vantagem na extração. Com isso os solventes hidroalcoólicos podem ter sido mais seletivos do que a água na extração dos compostos presentes na folha de cumaru.

Oliveira *et al.* (2016) obtiveram extratos etanólicos e hidroalcoólicos 70% de folhas de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) através de seis métodos de extração (ultra-som, turbólise, maceração, infusão, decocto e soxhlet). O solvente hidroalcoólico 70% foi o que apresentou melhor rendimento para cinco dos métodos de extração utilizados (ultra-som, turbólise, maceração, infusão, decocto). Mallmann *et al.* (2018) verificaram que o extrato aquoso, obtido por infusão, de folhas de *Acanthospermum australe* apresentou maior rendimento de extração (28,5%) que o extrato hidroalcoólico 90% (18,7%), obtido por maceração.

5.1.2 *Compostos fenólicos totais e antioxidantes totais*

Os resultados dos compostos fenólicos totais e antioxidantes totais dos extratos de folha de cumaru aquoso (EA), hidroalcoólico 50:50 (EHA 50:50) e hidroalcoólico 70:30 (EHA 70:30) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Conteúdo de compostos fenólicos totais e antioxidantes totais dos extratos secos obtidos da folha de Cumaru (*Amburana cearensis*).

Extratos de folha de cumaru	Compostos Fenólicos Totais (g AGE/100g)	Antioxidantes totais ($\mu\text{M TE/g}$)
EA	28,38 ^b \pm 0,71	832,69 ^a \pm 39,01
EHA 50:50	31,34 ^a \pm 0,11	836,59 ^a \pm 7,98
EHA 70:30	28,12 ^b \pm 0,40	792,14 ^a \pm 68,50

Fonte: autora. Médias com letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de significância para o teste de Tukey. EA: Extrato aquoso de folha de cumaru. EHA 50:50: Extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol : água) de folha de cumaru. EHA 70:30: Extrato hidroalcoólico 70:30 (etanol : água) de cumaru.

O EA e o EHA 70:30 não apresentaram diferença significativa quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais, já o EHA 50:50 diferiu significativamente destes, apresentando maior conteúdo de substâncias fenólicas totais. É possível verificar que os extratos apresentaram bons valores de compostos fenólicos. Santos *et al.* (2016) encontraram para extratos etanólicos da folha e casca de cumaru conteúdo de compostos fenólicos igual a 0,131 g EAG/g e 0,119g EAG/g, respectivamente.

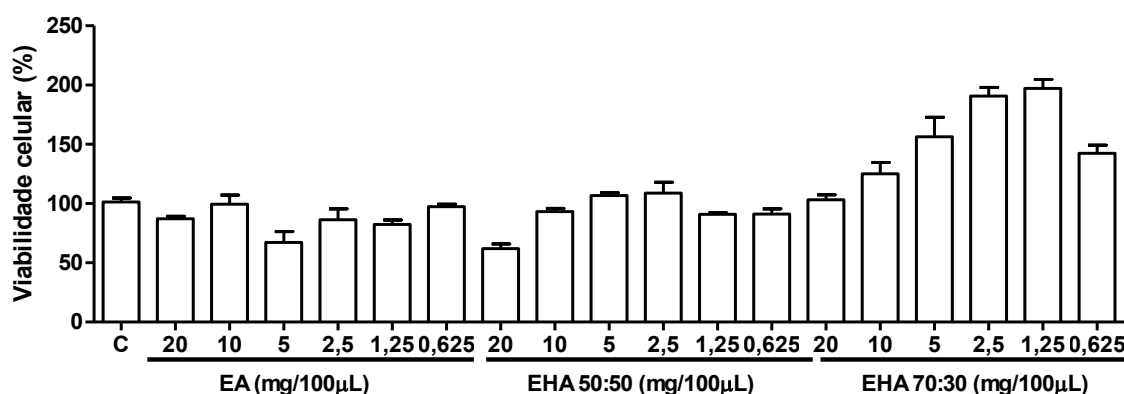
Com relação aos antioxidantes totais verificamos que, independente do método de extração utilizado, os três extratos não apresentaram diferença significativa. Embora os compostos fenólicos sejam considerados os principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante, eles não são os únicos (LIMA *et al.* 2006). Como não houve uma relação proporcional entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante, uma vez que esta última não diferiu nos três extratos estudados, sugere-se que algum outro composto extraído, em todos os extratos, tenha contribuído de maneira mais efetiva na redução de radicais livres, não diferindo esse composto a atividade antioxidante para os três extratos (SOUSA *et al.* 2007).

Diante dos resultados, os três extratos da folha de cumaru podem ser uma alternativa viável como antioxidantes na indústria de alimentos, uma vez que, existe uma crescente busca por substâncias com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, que funcionem como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e que limitem o uso de antioxidantes sintéticos, responsáveis por efeitos nocivos à saúde, entre eles, o câncer (OLIVEIRA *et al.*, 2007; RAMESHKUMAR; SIVASUDHA, 2012).

5.1.3. Citotoxicidade dos extratos frente às células epiteliais humanas

Os resultados da análise citotóxica dos extratos aquoso (EA), hidroalcoólico 50:50 (EHA 50:50) e hidroalcoólico 70:30 (EHA 70:30) da folha de cumaru estão apresentados na Figura 11.

Figura 11– Citotoxicidade dos extratos secos da folha de cumaru frente às células epiteliais humanas.



Fonte: autora. EA: extrato aquoso de folha de cumaru; EHA 50:50: extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol: água) de folha de cumaru; EHA 70:30: extrato hidroalcoólico 70:30 (etanol: água) de folha de cumaru.

Ensaio de toxicidade são muito utilizados para estudos toxicológicos *in vitro* como, por exemplo, o método do MTT. Este método consiste em um teste rápido e simples que avalia a viabilidade celular a fim de determinar a toxicidade após a exposição a diferentes substâncias (MELO *et al.*, 2017; UYSAL *et al.*, 2018). Diante disso, não foi encontrado potencial citotóxico para nenhum dos extratos de cumaru frente às células epiteliais humanas, uma vez que a viabilidade celular se manteve acima de 50% para todas as concentrações testadas (FIGURA 11).

Segundo Simonetti *et al.* (2016), o potencial citotóxico de um extrato é baseado no percentual de morte celular que é causado nas células testadas, onde o extrato é considerado de alta atividade citotóxica quando apresentam mais de 75% de morte celular e nenhuma atividade tóxica para valores abaixo de 50%.

Verificou-se, ainda, um estímulo ao crescimento das células epiteliais pelo extrato hidroalcoólico 70:30 em todas as concentrações testadas. Provavelmente, os solventes utilizados nesta extração, em suas dadas concentrações, extraíram algum composto diferente ou em maior quantidade em relação aos demais extratos, que intensificou o crescimento

celular.

Pereira *et al.* (2017) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de quatro extratos (etanólico, hexânico, diclometânico e acetato de etila) obtidos da semente de cumaru pelo método de MTT, onde culturas de células neurais PC 12 foram expostas a concentrações dos extratos variando de 0,1 a 2000 µg / ml e não apresentaram efeitos tóxicos. O extrato etanólico na concentração de 2000 µg / ml, além de não ter efeito tóxico, também apresentou estímulo ao crescimento celular.

5.1.4 Atividade antimicrobiana dos extratos da folha de cumaru

Na Tabela 4 são apresentadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações bactericidas mínimas (CBM) encontradas para os extratos secos aquoso (EA), hidroalcoólico 50:50 (EHA 50:50) e hidroalcoólico 70:30 (EHA 70:30) de folha de cumaru sobre *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*.

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana dos extratos secos da folha de cumaru frente aos microrganismos transmitidos em alimentos.

Extratos	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
EA	2	30	15	30	40	40	35	35
EHA 50:50	15	25	10	25	25	30	25	35
EHA 70:30	10	25	15	25	25	30	25	30

Fonte: autora. CIM: concentração inibitória mínima(mg/mL). CBM: concentração bactericida mínima(mg/mL). EA: Extrato aquoso de folha de cumaru. EHA 50:50: Extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol: água) de folha de cumaru. EHA 70:30: Extrato hidroalcoólico 70:30 (etanol: água) de cumaru.

Os extratos obtidos a partir da folha de cumaru apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos Gram positivos (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e Gram negativos (*Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*). Para *S. aureus* o EA apresentou melhor efeito inibitório e os extratos hidroalcoólicos melhor efeito bactericida. Para *L.monocytogenes* o EHA 50:50 apresentou melhor atividade antimicrobina. Os extratos hidroalcoólicos apresentaram melhor atividade antimicrobiana frente *S. enteritidis* e *E.coli*. A atividade antimicrobiana é associada ao efeito antimicrobiano dos compostos ativos presentes nos extratos (FARAG *et al.* 1989). Sendo assim, a diferença na atividade

antimicrobiana observada entre os extratos frente aos microorganismos estudados pode estar relacionada à variação de compostos ativos presentes em cada extrato, assim como o sinergismo entre eles.

Segundo Auricchio e Bacchi (2003) a parte da planta estudada, a forma que se prepara o material para o estudo, aspectos climáticos, estágio de desenvolvimento do vegetal e protocolos seguidos nos experimentos podem influenciar na variação da atividade antimicrobiana de plantas de mesma espécie, dificultando os estudos de comparação de resultados. Figueredo *et al.* (2013) ao trabalharem com extrato etanólico da folha de cumaru, pelo método de microdiluição em placa obtiveram CIM igual 0,512 mg/mL e 1,024 mg/mL para *S.aureus* e *E.coli*, respectivamente. Sá *et al.* (2014) não encontraram atividade antimicrobiana para o extrato clorofórmico da casca do caule do cumaru frente a *S. aureus*, *L.monocytogenes*, *E.coli* e *Samonella enterica Typhimurium* pelo método de microdiluição em placas. Aguiar *et al.* (2017) ao trabalharem pelo método de microdiluição em placa com extrato etanólico 80% e extrato aquoso de semente de cumaru, encontraram para *S.aureus* CIM igual a 0,25 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente. Para *L.monocytogenes* e *E.coli* encontraram, para ambos os extratos, CIM igual a 0,5 mg/mL e 1 mg/mL. Sá *et al.* (2011) em estudo realizado com extratos etanólicos de cumaru encontraram médias de CBM iguais a 166,7 mg/mL para *E. coli*, 125 mg/mL para *Listeria sp.* e 145 mg/mL para *Salmonella spp.* E *S. aureus* pelo método de microdiluição. Observa-se que existe uma variação de resultados da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos nesse estudo quando comparados aos resultados de atividade antimicrobiana encontrados por outros autores utilizando extratos da mesma planta, provavelmente, a parte da planta utilizada na extração, o solvente e a metodologia de extração tenham contribuído para essa variação.

As bactérias Gram positivas mostraram maior sensibilidade aos extratos aquoso e hidroalcoólico da folha de cumaru do que as bactérias Gram negativas (TABELA 4). Outros autores também observaram maior sensibilidade de bactérias Gram positivas em relação aos seus extratos. Pinho *et al.* (2012) ao avaliarem a atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de folhas de diferentes plantas frente ao *Staphylococcus aureus* e *E.coli*, verificaram que todos os extratos apresentaram ação bacteriostática para a cepa Gram positiva e nenhuma ação foi detectada para Gram negativa. Koohsari *et al.* (2015) em seu estudo quanto à atividade antimicrobiana de extratos etanólicos e aquosos de seis plantas nativas da cidade de Azadshahr do norte do Irã, também observaram que as bactérias Gram positivas foram mais sensíveis do que as Gram negativas, em especial *S. aureus*.

As bactérias Gram negativas apresentam estruturas de parede mais complexas.

Elas possuem parede celular constituída interna e externamente por membranas separadas por glicopeptídio, sendo assim, a composição celular dessas bactérias oferece uma dupla proteção, o que reduz a ação dos compostos antimicrobianos (SÁ *et al.*, 2011). A membrana externa dessas bactérias é formada por lipopolissacarídeo e fosfolipídio. Para a substância antimicrobiana ter acesso à célula bacteriana ela precisa atravessar a parede celular através de canais protéicos de porina, embebidos na bicamada lipídica, que apresentam características hidrofílicas em seu interior. Logo os compostos antimicrobianos com maior sensibilidade frente às bactérias Gram negativas são aqueles que apresentam, em suas estruturas, grupos ionizáveis (GUIMARÃES; MONESSO; PUPO, 2010).

Diante dos resultados obtidos, a aplicação de extratos de folha de cumaru na indústria de alimentos pode ser uma alternativa viável como antimicrobiano natural, uma vez que todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana contra importantes microrganismos contaminantes de alimentos.

Como as CIM e CBM encontradas na atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos frente aos microrganismos estudados foram semelhantes, optou-se por continuar o estudo com um extrato hidroalcoólico. O extrato hidroalcoólico 50:50 foi escolhido para dar seguimento as análises por apresentar maior conteúdo de compostos fenólicos totais e requerer menor concentração de álcool no processo de extração.

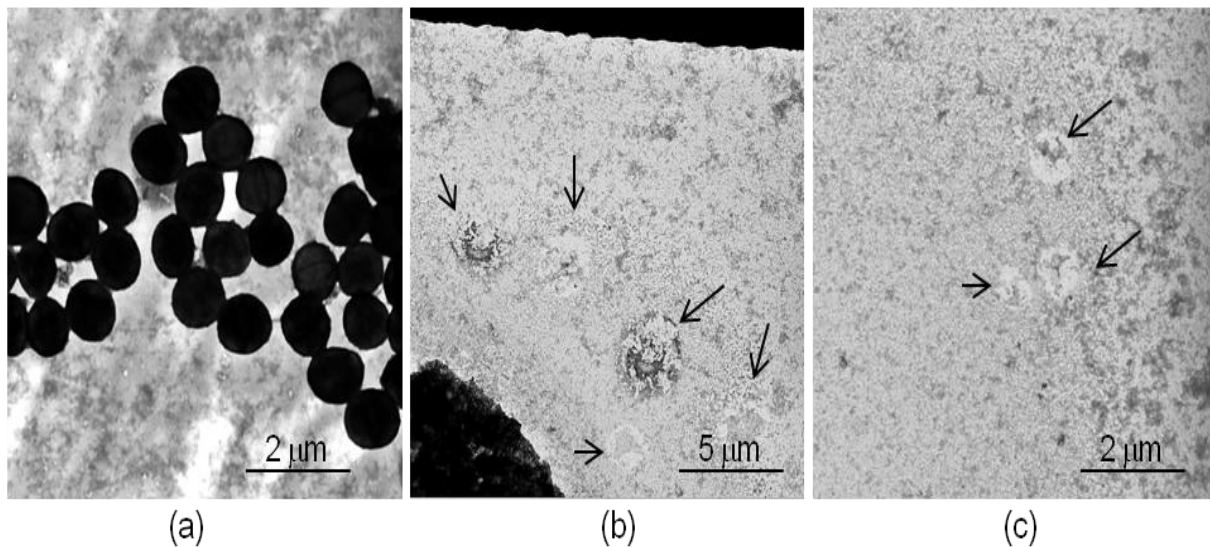
5.2 Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru sobre a morfologia das bactérias estudadas.

As Figuras 12, 13, 14 e 15, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, apresentam os efeitos das concentrações bactericidas mínimas (CBM) encontradas dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 (TABELA 4) da folha de cumaru sobre as células das bactérias estudadas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*, respectivamente.

A morfologia da cultura controle de *Staphylococcus aureus*, cuja estrutura apresenta-se em forma de cocos, com parede e membrana celular intacta é demonstrada na Figura 12a. As células tratadas com extrato aquoso (FIGURA 12b) extrato hidroalcoólico (FIGURA 12c) de folha de cumaru mostraram-se lisadas, com paredes e membranas rompidas, e desintegradas em decorrência da perda de todo conteúdo celular. Jung *et al.* (2008) quando analisaram as características morfológicas das células de *S. aureus* tratadas com íons de prata observaram estruturas celulares lisadas com paredes e membrana quebradas

e separadas uma da outra.

Figura 12- Imagens da microscopia eletrônica de transmissão de *Staphylococcus aureus*

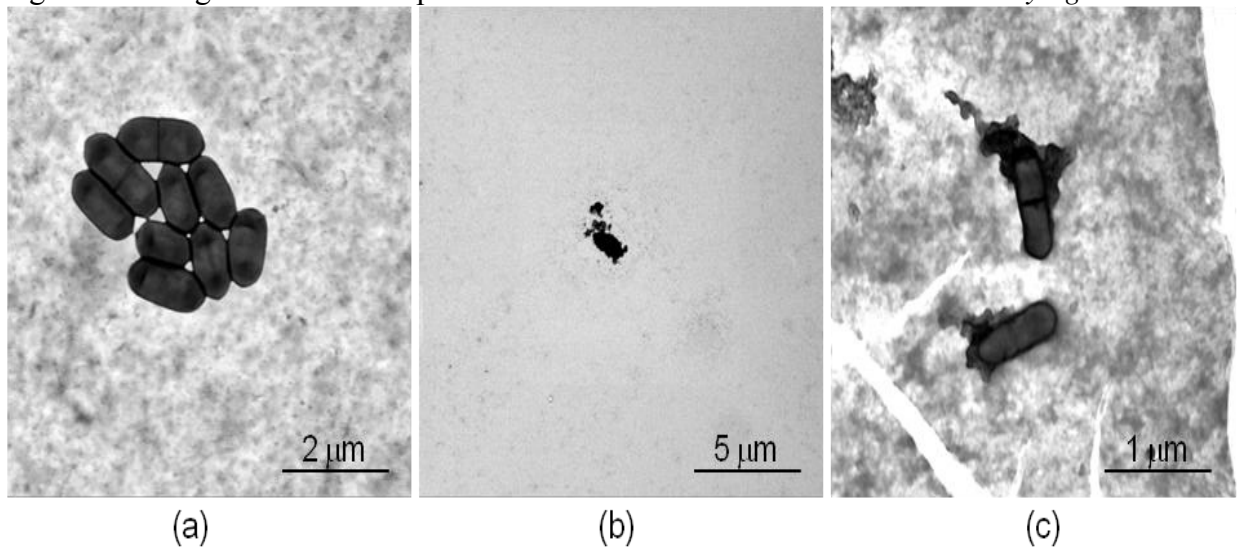


Fonte: autora. (a) Controle: *Staphylococcus aureus* no meio de cultura; (b) *Staphylococcus aureus* tratado com extrato aquoso de folha de cumaru (CBM = 30 mg/mL) ; (c) *Staphylococcus aureus* tratado com o extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol:água) de folha de cumaru (CBM = 25 mg/mL). Aumento das imagens: (a) 41,9 kx, (b) 15,6kx e (c) 17,3 kx.

A cultura controle de *Listeria monocytogenes* apresentou-se com estrutura morfológica na forma de bastonete, parede celular intacta, superfície lisa e boa integridade da célula (FIGURA 13a). Tanto as células tratadas com extrato aquoso (FIGURA 13b) como as células tratadas com extrato hidroalcoólico 50:50 (FIGURA 13c) de folha de cumaru apresentaram a superfície celular enrugada, forma original alterada e perda da integridade física da parede. Os extratos ocasionaram o rompimento da parede celular levando ao vazamento do material intracelular, sendo esta a principal causa da morte da célula bacteriana.

Liu *et al.* (2017) em estudo com células de *L. monocytogenes* tratadas com bifidocina A observaram, por meio de microscopia eletrônica de varredura, alterações morfológicas, com superfície celular enrugada e notório isolamento do citoplasma da parede celular.

Figura 13- Imagens da microscopia eletrônica de transmissão de *Listeria monocytogenes*.

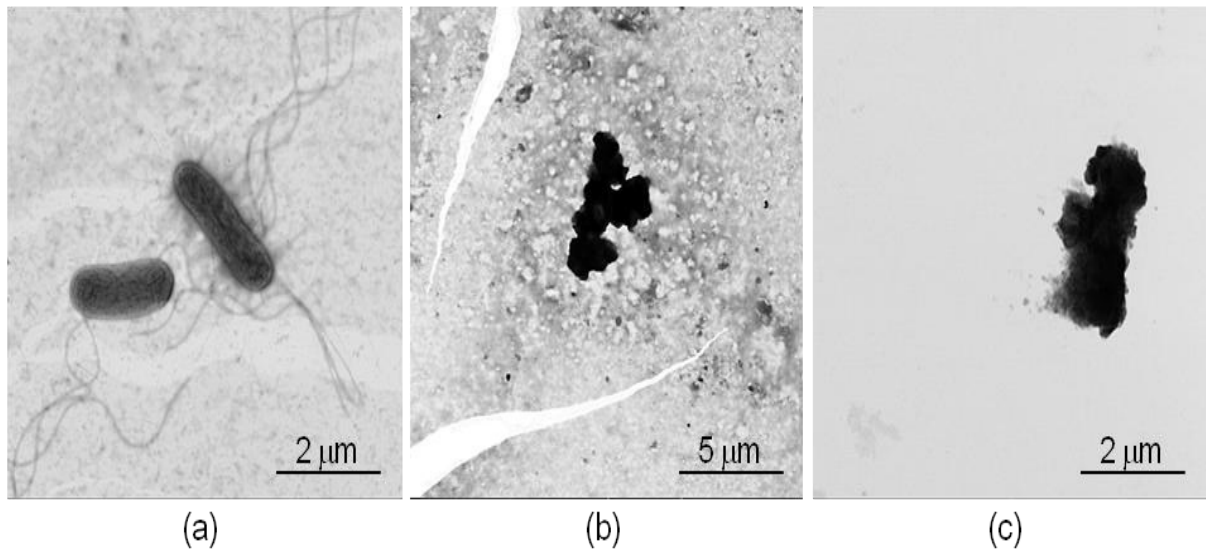


Fonte: autora. (a) Controle: *Listeria monocytogenes* no meio de cultura; (b) *Listeria monocytogenes* tratado com o extrato aquoso de folha de cumaru (CBM = 30 mg/mL); (c) *Listeria monocytogenes* tratado com o extrato hidroalcoólico 50:50 de folha de cumaru (CBM = 25 mg/mL). Aumento das imagens: (a) 41,4 kx, (b) 16,0 kx e (c) 45,4 kx.

A cultura controle de *E. coli* revela células regulares na forma de bastonetes, presença flagelo, parede celular intacta, superfície lisa e contínua (FIGURA 14a). Observa-se que para ambos os tratamentos (FIGURA 14b e 14c) a célula bacteriana apresentou perda dos flagelos, forma irregular e desfigurada, membrana celular interrompida e vazamento do citoplasma. É possível notar a organização celular claramente interrompida no tratamento da cultura bacteriana com o extrato hidroalcoólico 50:50 (FIGURA 14c), assim como a parede celular destruída. Observa-se, ainda, que o tratamento bacteriano com extrato aquoso resultou no agregamento do citoplasma e aglomerado de células mortas (FIGURA 14b).

Alshaibani, Zhang e Wu (2017) ao avaliarem a morfologia da *Escherichia coli* após ação das proantocianidinas da amoreira americana (*Vaccinium macrocarpon*) por microscopia eletrônica de transmissão, observaram que as células apresentaram forma irregular, claras perfurações na membrana celular e extravassamento de material citoplasmático.

Figura 14- Imagens da microscopia eletrônica de transmissão de *Escherichia coli*

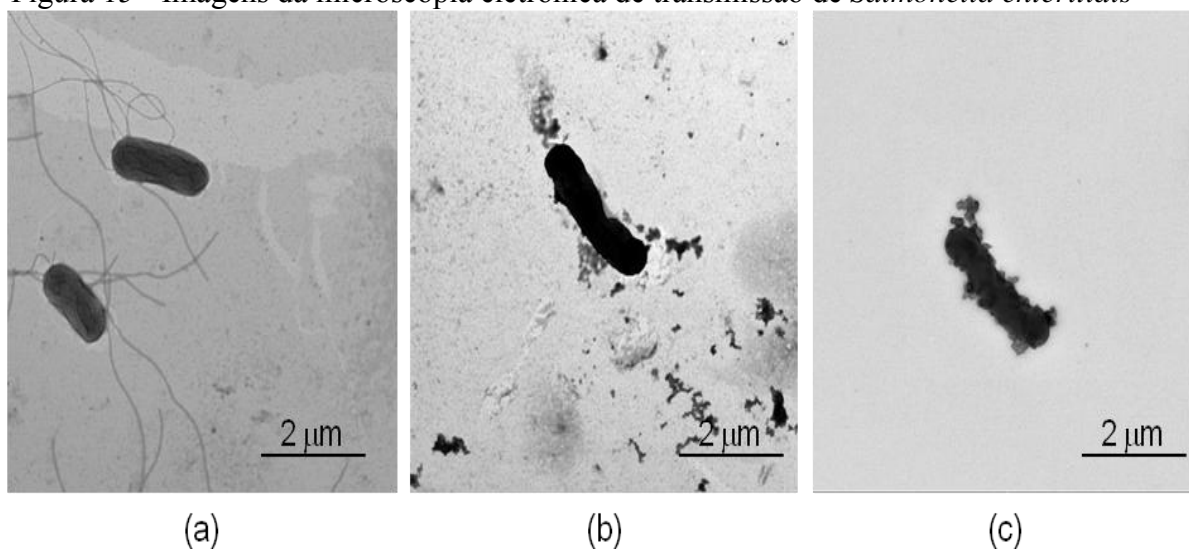


Fonte: autora. (a) Controle: *Escherichia coli* no meio de cultura; (b) *Escherichia coli* tratado com o extrato aquoso de folha de cumaru (CBM = 35 mg/mL); (c) *Escherichia coli* tratado com o extrato hidroalcoólico 50:50 de folha de cumaru (CBM = 35 mg/mL). Aumento das imagens: (a) 29,9 kx, (b) 10,3 kx e (c) 38,2 kx.

A morfologia da cultura de *Salmonella enteritidis* apresentou-se sob forma de bastonete, com presença de flagelos, parede e membrana celular intacta e uniforme (Figura 15a). Para ambos os tratamentos (FIGURA 15b e 15c) foi observado ausência dos flagelos, deformação da célula, superfície irregular e enrugada, comprometimento da parede celular com perda da integridade e extravasamento de constituintes citoplasmáticos.

Alterações morfológicas semelhantes foram observadas por Wang *et al.* (2013) ao avaliar os efeitos da alta pressão hidrostática em células de *Salmonella enterica*. Devi *et al* (2010) ao avaliarem a morfologia, por microscopia eletrônica de varredurade, de células de *Salmonella tphi* tratadas com eugenol observaram deformação na superfície da membrana, rompimento da membrana celular e a perda completa da integridade da membrana.

Figura 15 - Imagens da microscopia eletrônica de transmissão de *Salmonella enteritidis*



Fonte: autora. (a) Controle: *Salmonella enteritidis* no meio de cultura; (b) *Salmonella enteritidis* tratado com o extrato aquoso de folha de cumaru (CBM = 40 mg/mL; (c) *Salmonella enteritidis* tratado com o extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol:água) de folha de cumaru (CBM = 30 mg/mL). Aumento das imagens: (a) 29,3 kx, (b) 36,4 kx e (c) 33,3 kx.

As alterações ocorridas nas células bacterianas devem ter sido decorrentes da ação dos compostos bioativos presentes nos extratos. Estes, provavelmente, atuaram principalmente na parede celular das bactérias, agindo, primeiramente, na superfície, alterando a permeabilidade da membrana, provocando a liberação dos constituintes celulares e lise (SHUNYING *et al.* 2005).

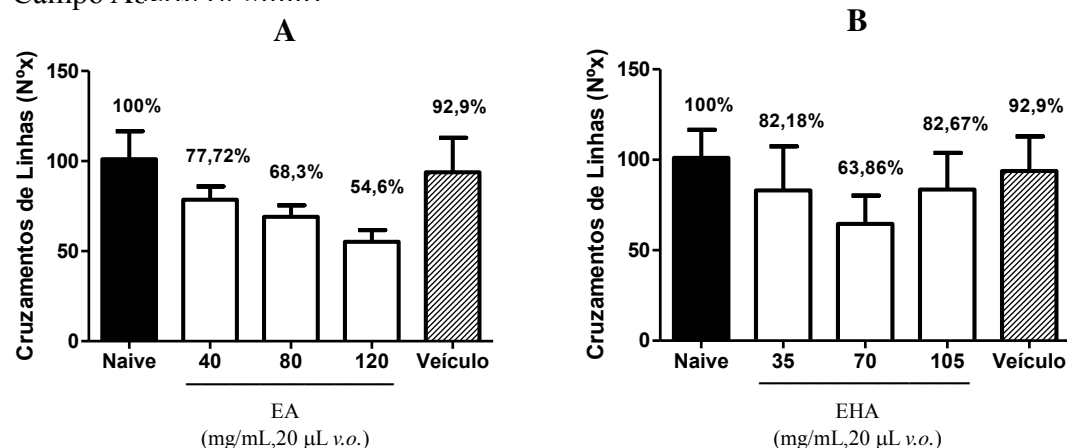
5.3 Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo de estudo da toxicidade *in vivo* dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.

As concentrações utilizadas nesse estudo foram baseadas nas maiores concentrações bactericidas mínimas (CBM) encontradas para cada extrato (TABELA 4). Além das maiores CBM encontradas, o teste também foi realizado com o dobro e o triplo dessas concentrações.

Os extratos aquoso (EA) e hidroalcoólico 50:50 (EHA 50:50) da folha de cumaru não ocasionaram nenhum efeito sedativo e/ou comprometimento locomotor nos animais, uma vez que apresentaram atividade locomotora (AL) significativamente ($p > 0,05$) semelhante entre cada grupo de amostra, bem como em relação aos controles, naive (AL = 100%) e veículo (AL = 92,9%) (FIGURA 16). A atividade locomotora é um dos parâmetros de análise comportamental empregada para avaliar o comportamento de substâncias que podem atuar sob o sistema nervoso central do zebrafish (*Danio rerio*) adulto e causar ou não o

comprometimento locomotor do animal (GEBAUER *et al.*, 2011; KURTA; PALESTIS, 2010; TAYLOR *et al.*, 2017).

Figura 16 - Atividade locomotora de Zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5min)



Fonte: autora. (A) EA – extrato aquoso da folha de cumaru. (B) EHA 50:50 – extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol:água) da folha de cumaru. Naive - animais não tratados. Veículo – animais tratados com água destilada estéril. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey. Os números acima de cada coluna indicam porcentagem de atividade locomotora (%AL).

O Zebrafish adulto vem sendo empregado como modelo animal em diversas aplicações incluindo desenvolvimento embrionário, toxicidade de compostos farmacêuticos, monitoramento de contaminantes ambientais, desenvolvimento de medicamentos, pesquisas sobre o câncer e sobre doenças humanas (CABALLERO; CANDIRACCI, 2018; HILL, *et al.*, 2005; HUANG, *et al.*, 2014; LU, *et al.*, 2015). Esse modelo apresenta uma série de vantagens sobre roedores, pois apresenta baixo custo, rápido desenvolvimento, alta fecundidade, reprodução externa e embriões transparentes, diversidade de adaptação, fácil observação comportamental e necessita de pouco espaço para manutenção. Além disso, seu pequeno tamanho na fase adulta minimiza a quantidade de substâncias a serem testadas e dosadas, reduz a quantidade de reagentes e materiais utilizados no tratamento e manutenção dos animais (BELIAEVA *et al.*, 2010; DAI *et al.*, 2014; FLEMING; RUBINSZTEIN, 2011; HILL *et al.* 2005; TAYLOR *et al.*, 2017).

Com isso, o Zebrafish adulto foi empregado como modelo animal para avaliar a toxicidade aguda dos EA e EHA 50:50. E constatou-se que todas as concentrações testadas do EA (40 mg/mL, 80 mg/mL e 120 mg/mL) e do EHA 50:50 (35 mg/mL, 70 mg/mL e 105 mg/mL) da folha de cumaru mostraram-se seguras, uma vez que, não foram tóxicas frente ao zebrafish adulto em até 96 h de análise (TABELA 5). Esse resultado mostrou-se muito

interessante para uma possível aplicação dos extratos da folha de cumaru como conservantes naturais em alimentos.

Tabela 5 - Resultados dos testes de toxicidade aguda dos extratos aquoso (EA) e hidroalcoólico 50:50 (EHA 50:50) da folha de cumaru frente ao Zebrafish adulto.

Amostra	Mortalidades do Zebrafish Adulto				96h
	CN	C1	C2	C3	CL ₅₀ (mg/mL) / IV
EA	0	0	1	0	> 120
	CN	C1*	C2*	C3*	
EHA 50:50	0	0	0	0	> 105

Fonte: Autora. CN- Grupo controle negativo: água destilada estéril. EA – extrato aquoso da folha de cumaru. EHA 50:50 – extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol:água) da folha de cumaru. C1 – concentração 1 (40 mg/mL); C2 – concentração 2 (80 mg/mL); C3 - concentração 3 (120 mg/mL); C1* – concentração 1 (35 mg/mL); C2* – concentração 2 (70 mg/mL); C3* – concentração 3 (105 mg/mL); CL₅₀-concentração letal para matar 50% dos Zebrafish adulto; IV – intervalo de confiança;

5.4 Caracterização das microcápsulas dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de Cumaru

5.4.1 Morfologia das microcápsulas

As morfologias das microcápsulas obtidas para os extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 de folha de cumaru estão apresentadas nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

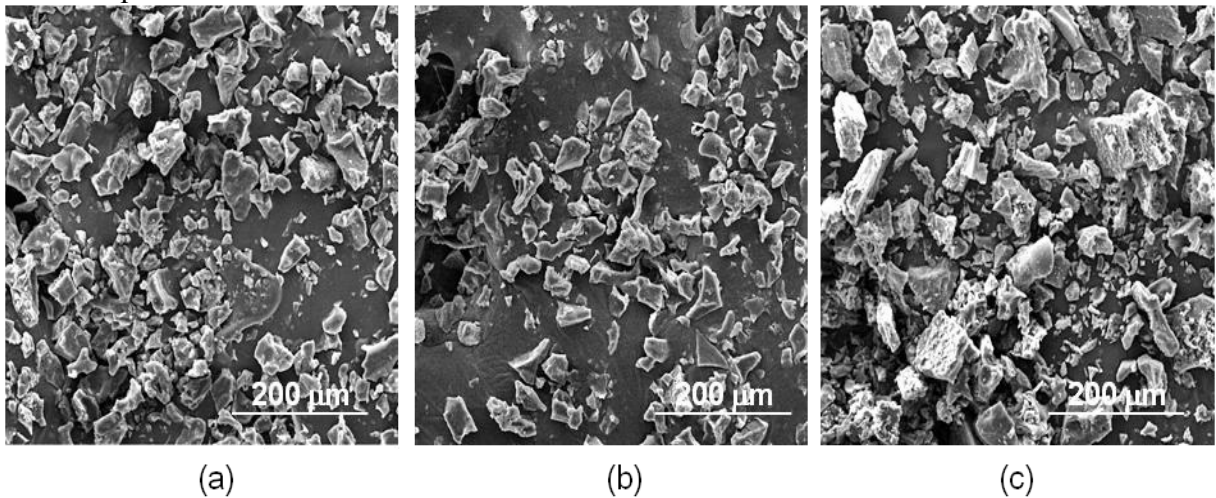
Todas as microcápsulas formadas de ambos os extratos encapsulados, aquoso e hidroalcoólico, apresentaram morfologia indefinida e irregular. Essas características são comuns a encapsulados obtidos por processo de liofilização, a qual sua estrutura assemelha-se a serragem ou a vidro quebrado em tamanhos variados (BALLESTEROS *et al.*, 2017; YAMASHITA *et al.*, 2017).

Estruturas como estas foram observadas em microcápsulas de compostos fenólicos, revestidos com maltodextrina e goma arábica, obtidas pelo processo de liofilização (BALLESTEROS *et al.*, 2017). Yamashita *et al.* (2017) também observaram a ocorrência de

estruturas irregulares na microencapsulação por liofilização de extrato de amora-preta com maltodextrina.

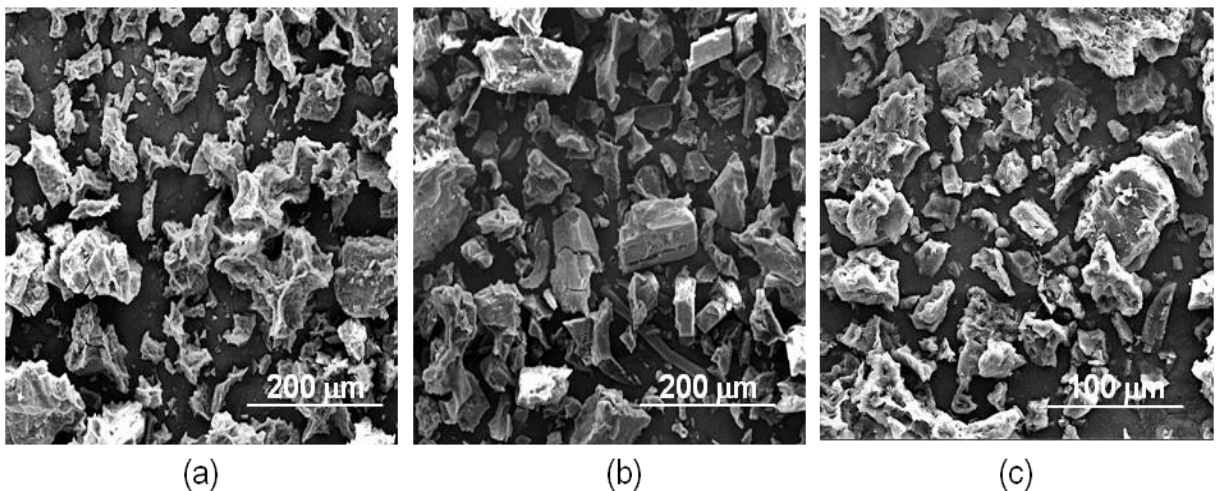
Segundo Chen; Chi e Xu (2012) a baixa temperatura envolvida no processo de liofilização e a falta de forças para realizar a quebra do líquido congelado ou alterar sua topologia de superfície durante a evaporação podem ser os responsáveis pela estrutura não uniforme das microcápsulas obtidas pelo método de liofilização.

Figura 17 - Imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das microcápsulas do extrato aquoso da folha de cumaru.



Fonte: autor. (a) microcápsula do extrato aquoso de folha de cumaru encapsulado com ciclodextrina; (b) microcápsula do extrato aquoso de folha de cumaru encapsulado com maltodextrina; (c) microcápsula do extrato aquoso de folha de cumaru encapsulado com a mistura de ciclodextrina e maltodextrina. Aumento das imagens: (a) 500x, (b) 500x e (c) 500x.

Figura 18 - Imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.



Fonte: autora. (a) microcápsula do extrato hidroalcoólico 50:50 de folha de cumaru encapsulado com ciclodextrina; (b) microcápsula do extrato hidroalcoólico 50:50 de folha de cumaru encapsulado com maltodextrina; (c) microcápsula do extrato hidroalcoólico 50:50 de folha de cumaru encapsulado com a mistura de ciclodextrina e maltodextrina. Aumento das imagens: (a) 500x, (b) 500x e (c) 1000x.

5.4.2 Potencial Zeta

Na Tabela 6 constam os resultados do potencial zeta para as microcápsulas dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.

Não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quanto ao potencial zeta das microcápsulas do extrato aquoso de cumaru. O mesmo resultado foi obtido para as microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50.

Tabela 6 – Potencial zeta das microcápsulas de extrato aquoso e extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.

Tratamentos	Microcápsulas	
	EA	EHA 50:50
	Potencial Zeta (mV)	Potencial Zeta (mV)
CD	$-25,27^a \pm 3,90$	$-20,40^a \pm 3,48$
MD	$-25,17^a \pm 0,71$	$-17,03^a \pm 1,51$
CD:MD	$-26,73^a \pm 4,25$	$-22,53^a \pm 1,74$

Fonte: autora. EA: extrato aquoso de folha de cumaru; EHA 50:50: extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol:água) de folha de cumaru; CD: ciclodextrina; MD: maltodextrina; CD:MD : proporção ciclodextrina:maltodextrina (1:1 m/m). Médias com letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de significância para o teste de Tukey.

O potencial zeta é utilizado para obter informações sobre a carga de superfície das partículas (THIELBEER; DONALDSON; BRADLEY, 2011) e indicar a estabilidade destas em sistemas dispersos. Este parâmetro pode apresentar-se em valor positivo ou negativo, dependendo da composição química do material de parede usado na encapsulação (DELGADO, 2013; SARMIENTO *et al.*, 2018). Neste trabalho, tanto as microcápsulas do extrato aquoso como as microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 de cumaru apresentaram potencial zeta negativo. Segundo Delgado (2013) a carga residual das cadeias presentes nos materiais de parede utilizados são de carga negativa. Logo, esse potencial negativo pode ser atribuído à presença de cadeias hidroxilas na composição da β - ciclodextrina e da maltodextrina.

Com relação a estabilidade os sistemas dispersos podem ser classificados em estáveis e instáveis onde valores, negativos ou positivos, entre 0–10, 10–20, 20–30 e ≥ 30 mV são considerados, respectivamente, muito instáveis, relativamente estável, moderadamente estável e altamente estável (SARMIENTO *et al.*, 2018). De acordo com Sharma *et al.* (2014) a estabilidade das emulsões depende do equilíbrio entre as forças que atuam na interface de

uma partícula em solução. De modo geral, quando o potencial zeta de um sistema é alto, as forças repulsivas excedem as forças de atração, resultando em emulsão relativamente estável, ou seja, com menor tendência em criar agregados (DELGADO, 2013; LU;GAO,2010). De acordo com a definição acima, as microcápsulas obtidas neste trabalho são considerados de estabilidade moderada, ou seja, apresentam tendência moderada a aglomeração.

5.4.3 Tamanho de partícula

Não houve diferença estatística, ao nível de 5%, no tamanho das partículas das microcápsulas de extrato aquoso tratados com CD e MD, porém o tratamento com CD:MD, diferiu estatisticamente dos demais. O mesmo resultado foi obtido para as microcápsulas de extrato hidroalcoólico 50:50 de cumaru. Para ambas microcápsulas, o tratamento com CD:MD proporcionou maior tamanho de partícula (TABELA 7).

Os encapsulados obtidos neste estudo são denominados como microcápsulas, uma vez que, segundo Azeredo (2005) as partículas podem ser classificadas quanto ao seu tamanho e aquelas que apresentam tamanho entre (0,2-5000 μm) são nomeadas como tal.

Tabela 7– Tamanho das microcápsulas de extrato aquoso e extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.

Tratamentos	Microcápsulas	
	EA	EHA 50:50
	Tamanho de partícula (μm)	Tamanho de partícula (μm)
CD	0,60 ^a ± 17,06	0,29 ^a ± 17,54
MD	0,56 ^a ± 30,67	0,32 ^a ± 39,22
CD:MD	0,79 ^b ± 18,46	0,98 ^b ± 76,52

Fonte: autora. EA: extrato aquoso da folha de cumaru; EHA 50:50: extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol:água) da folha de cumaru; CD: ciclodextrina; MD: maltodextrina; CD:MD : proporção ciclodextrina:maltodextrina (1:1 m/m). Médias com letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de significância para o teste de Tukey.

Quanto menor a partícula maior é a taxa de dissolução, devido a relação superfície/volume. Logo, partículas menores melhoram a biodisponibilidade do material encapsulado. Por outro lado, quanto maior o diâmetro médio da partícula, maior é a estabilidade, ou seja, melhor é a proteção dos compostos bioativos contra o meio externo, onde umidade, oxigênio, luz, ph e temperatura são tidos como os principais responsáveis pela baixa estabilidade desses compostos (DI; KERNIS *et al.* 2016; LABUSCHAGNE, 2018;

OZTURK, *et al.*, 2014) Logo, as microcápsulas tratados com CD:MD apresentam maior proteção dos compostos bioativos. Segundo Hategekimana *et al.* (2015) uma maior viscosidade da solução pode levar a formação de partículas maiores. Possivelmente, esse fator pode ter contribuído para o maior tamanho de partícula das microcápsulas com CD:MD.

5.4.4 Higroscopicidade

Conforme Tabela 8, as microcápsulas do extrato aquoso apresentaram diferença estatística no parâmetro higroscopicidade. O mesmo resultado foi observado para as microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50.

Tanto as microcápsulas do extrato aquoso como as microcápsulas do extrato hidroalcoólico apresentaram baixa higroscopicidade em umidade relativa de 75%. Este resultado é muito satisfatório, uma vez que, considerando uma possível aplicação dessas microcápsulas em alimentos, a baixa higroscopicidade do material ajudará a manter a estabilidade física, química e microbiológica durante possível armazenamento.

A menor higroscopicidade foi revelada para as microcápsulas que utilizaram a maltodextrina como material de parede, já a maior higroscopicidade foram apresentadas pelas microcápsulas que utilizaram como material de parede a ciclodextrina.

Tabela 8 - Higroscopicidade das microcápsulas do extrato aquoso e do extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.

Tratamentos	Microcápsulas	
	EA	EHA 50:50
	Higroscopicidade (%)	Higroscopicidade (%)
CD	7,33 ^c ± 0,58	7,33 ^c ± 0,58
MD	2,00 ^a ± 0	2,67 ^a ± 0,58
CD:MD	4,00 ^b ± 0	5,33 ^b ± 0,58

Fonte: autora. EA: extrato aquoso da folha de cumaru; EHA 50:50: extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol:água) da folha de cumaru; CD: ciclodextrina; MD: maltodextrina; CD:MD : proporção ciclodextrina:maltodextrina (1:1 m/m). Médias com letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5% de significância para o teste de Tukey.

Outros autores também encontraram baixa higroscopicidade para materiais microencapsulados com maltodextrina. Farias (2016) observou baixa higroscopicidade do extrato da palma microencapsulado com maltodextrina, por liofilização, na proporção 1:3

(palma: extrato), onde o valor encontrado foi de 1,90%. As condições desse ensaio foram às mesmas aplicadas neste trabalho. Saikia, Mahnot e Mahanta (2015) ao microencapsular, por processo de liofilização, compostos fenólicos do bagaço da *Averrhoa carambola* utilizando a maltodextrina como material de parede, observaram que as microcápsulas tornavam-se menos higroscópicas ao aumentar a concentração de maltodextrina.

5.4.5 Colorimetria

Na Tabela 9 são apresentados os resultados dos parâmetros de cor do extrato aquoso liofilizado da folha de cumaru e das microcápsulas obtidas a partir dele. Os resultados da análise de cor do extrato hidroalcoólico 50:50 liofilizado e suas microcápsulas estão apresentados na Tabela 10.

Observa-se que os extratos liofilizados (EA e EHA 50:50) apresentaram diferença estatística frente suas respectivas microcápsulas para todos os parâmetros avaliados (TABELAS 9 e 10). Logo, o material de parede influenciou diretamente nas características de cor dos extratos.

Tabela 9 – Colorimetria do extrato aquoso seco e das microcápsulas do extrato aquoso da folha de cumaru.

Tratamentos	L	a*	b*	c*	h*
EA	27,76 ^a ± 0,03	9,87 ^c ± 0,09	14,35 ^b ± 0,10	17,42 ^b ± 0,12	55,48 ^a ± 0,16
EA+ C	67,84 ^d ± 0,67	3,3 ^b ± 0,01	19,58 ^a ± 0,16	19,89 ^a ± 0,32	80,12 ^c ± 0,21
EA+ M	58,24 ^b ± 0,11	4,25 ^a ± 0,31	19,83 ^a ± 0,03	20,15 ^a ± 1,30	77,3 ^b ± 0,18
EA+ C:M	70,5 ^c ± 0,11	3,96 ^a ± 0,03	27,9 ^c ± 0,08	28,34 ^c ± 0,04	81,89 ^d ± 0,14

Fonte: autora. EA: extrato aquoso de folha de cumaru; EA + C: extrato aquoso de folha de cumaru + ciclodextrina; EA+ M: extrato aquoso de folha de cumaru + maltodextrina; EA + C:M: extrato aquoso de folha de cumaru + proporção ciclodextrina:maltodextrina (1:1 m/m) . Médias com letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5% de significância para o teste de Tukey.

Tabela 10 - Colorimetria do extrato hidroalcoólico 50:50 seco e das microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.

Tratamentos	L	a*	b*	c*	h*
EHA 50:50	25,42 ^b ± 0,17	3,63 ^a ± 0,02	6,37 ^a ± 0,35	7,52 ^a ± 0	60,75 ^a ± 0,33
EHA 50:50 + C	50,05 ^a ± 0,40	4,69 ^b ± 0,06	23,3 ^b ± 0,35	23,22 ^b ± 0,14	78,39 ^c ± 0,04
EHA 50:50 + M	49,29 ^a ± 0,73	9,84 ^d ± 0,31	25,15 ^c ± 0,79	26,72 ^c ± 0,58	69,07 ^b ± 0,08
EHA 50:50 +C:M	59,73 ^c ± 0,06	5,5 ^c ± 0,05	28,8 ^d ± 0,01	29,41 ^d ± 0,05	79,3 ^d ± 0,02

Fonte: autora. EHA 50:50: extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol:água) de folha de cumaru; EHA 50:50 + C: extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol:água) de folha de cumaru + ciclodextrina; EHA 50:50 + M: extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol:água) de folha de cumaru + maltodextrina; EHA 50:50 + C:M : extrato hidroalcoólico 50:50 (etanol:água) de folha de cumaru + proporção ciclodextrina:maltodextrina (1:1 m/m). Médias com letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5% de significância para o teste de Tukey.

Para o parâmetro L (luminosidade) observa-se que os extratos EA e EHA 50:50 apresentaram coloração mais escura quando comparados suas microcápsulas, uma vez que apresentaram baixa luminosidade. Os extratos microencapsulados com proporção de ciclodextrina e maltodextrina apresentaram luminosidade mais próxima de 100, ou seja, com mais brilho.

Os extratos e suas microcápsulas apresentaram tendência das cores para o vermelho e amarelo, uma vez que os parâmetros a* e b* foram positivos. O parâmetro c* aumentou após a encapsulação dos extratos, significando que essas amostras apresentam maior pureza de cor. Segundo Rezende, Nogueira e Narain (2018) essa é uma característica bastante desejada. A microencapsulação dos extratos com a proporção de ciclodextrina e maltodextrina proporcionou maior intensidade desse parâmetro. O parâmetro h* também aumentou após a encapsulação dos extratos. Este parâmetro mede a tonalidade das cores, e neste caso a tendência de tonalidade das amostras para o tom vermelho e amarelo.

Diante dos resultados, a microencapsulação dos extratos pode proporcionar melhores características de cor, com a obtenção de extratos de coloração mais clara. Assim, a encapsulação seria uma alternativa para modificar a cor original dos extratos, que poderia atribuir características sensoriais indesejáveis, quando realizado sua aplicação em algum alimento.

5.4.6 Eficiência de encapsulação

Os percentuais de eficiência de encapsulamento (% EE) dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Eficiência de encapsulação das microcápsulas do extrato aquoso e extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.

Tratamentos	Microcápsulas	
	EA	EHA 50:50
	% EM	% EM
CD	82%	83,51%
MD	72,98%	83,36%
CD:MD	88%	95%

Fonte: autora. EA: extrato aquoso de folha de cumaru; EHA 50:50: extrato hidroalcoólico 50:50 de folha de cumaru; CD: ciclodextrina; MD: maltodextrina; CD:MD : proporção ciclodextrina : maltodextrina (1:1 m/m).

Para a encapsulação ser eficiente, o material encapsulado deve apresentar em seu interior máxima retenção do composto de interesse (JAFARI *et al.*, 2008). Assim, conforme a Tabela 11, a combinação de ciclodextrina e maltodextrina (CD:MD) como material de parede revelou melhor eficiência de encapsulação dos compostos fenólicos para as duas microcápsulas. Já o material de parede maltodextrina (MD) proporcionou menor eficiência de encapsulação. A eficiência de encapsulação depende muito dos compostos encapsulados e do material de parede utilizado (ROSA *et al.*, 2014). Logo, se explica a diferença de eficiência de encapsulação das microcápsulas deste estudo.

Ballesteros *et al.* (2017) obtiveram para compostos fenólicos, extraídos do café, encapsulados com maltodextrina por processo de liofilização, eficiência de encapsulação igual a 62%. Kalogeropoulos *et al.* (2010) encapsularam por liofilização o extrato etanólico de *Hypericum perforatum* utilizando a β - ciclodextrina como material de parede. Eles analisaram a eficiência de encapsulação de três flavonoides extraídos dessa planta, epicatequina, catequina e a quercitina e obtiveram eficiência igual a 30%, 27,5% e 35%, respectivamente.

O processo de encapsulação por liofilização dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru mostrou-se efetivo na retenção dos compostos fenólicos e, provavelmente, oferecerá maior proteção e maior estabilidade durante o armazenamento. Além disso, as microcápsulas obtidas possivelmente darão continuidade à propriedade antimicrobiana frente às bactérias testadas neste estudo

5.4.7 Atividade antimicrobiana das microcápsulas de extrato aquoso e extrato hidroalcoólico 50:50 de folha de cumaru.

Nas Tabelas 12 e 13 estão os resultados referentes à atividade antimicrobiana das microcápsulas de extrato aquoso e das microcápsulas de extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru, respectivamente.

As microcápsulas do extrato aquoso com CD e CD:MD apresentaram melhor atividade antimicrobiana frente *S. aureus*, apresentando mesma CIM. Já para *L. monocytogenes* a microcápsula do extrato aquoso com CD apresentou melhor ação antimicrobiana, uma vez que foi necessária menor concentração dessa microcápsula para inibir o crescimento desse microrganismo. Para *E. coli* as microcápsulas com MD e CD:MD revelaram melhor atividade antimicrobiana, uma vez que, apresentaram mesma CIM frente a esse microrganismo. Nenhuma microcápsula do extrato aquoso apresentou efeito bacteriostático frente *S. enteritidis* nas concentrações testadas. Também, não foi encontrada CBM para nenhuma das microcápsulas do extrato aquoso nas concentrações testadas frente aos microrganismos estudados (TABELA 12). A maior concentração das microcápsulas testadas foi de 200 mg/mL, logo concentrações maiores seriam necessárias para promover efeito bactericida. Considerando que a concentração de 200 mg/mL já é alta, valores maiores que ela podem tornar a produção das microcápsulas e possível aplicação na indústria inviável.

Tabela 12 - Atividade antimicrobiana das microcápsulas do extrato aquoso da folha de cumaru.

Microcápsula	<i>S.aureus</i>		<i>L.monocytogenes</i>		<i>S. Enteritidis</i>		<i>E.coli</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
CD	25	-	100	-	-	-	-	-
MD	40	-	130	-	-	-	200	-
CD:MD	25	-	130	-	-	-	200	-

Fonte: autora. CIM : concentração inibitória mínima (mg/mL). CBM : concentração bactericida mínima (mg/mL). CD: microcápsula com ciclodextrina; MD: microcápsula com maltodextrina; CD:MD: microcápsula com proporção de ciclodextrina:maltodextrina (1:1 m/m).

As microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 de folha de cumaru que utilizaram a CD como material de parede apresentaram melhor atividade antimicrobiana frente *S. aureus* e *L.monocytogenes*. Já para *S. enteritidis* a microcápsula com MD apresentou melhor atividade antimicrobiana. Para *E.coli* as microcápsulas com MD e CD:MD foram as que apresentaram melhor atividade antimicrobiana com CIM e CBM iguais para ambas

microcápsulas (TABELA 13).

Tabela 13 - Atividade antimicrobiana das microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.

Microcápsula	<i>S.aureus</i>		<i>L.monocytogenes</i>		<i>S. Enteritidis</i>		<i>E.coli</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
CD	80	160	80	160	120	180	120	180
MD	80	180	80	200	120	160	120	160
CD:MD	80	180	80	200	120	180	120	160

Fonte: autora. CMI : concentração inibitória mínima (mg/mL). CBM : concentração bactericida mínima (mg/mL). CD: microcápsula com ciclodextrina; MD: microcápsula com maltodextrina; CD:MD : microcápsula com proporção de ciclodextrina:maltodextrina (1:1 m/m).

Observa-se que, conforme ocorreu com os extratos brutos (TABELA 4), as bactérias Gram positivas foram mais sensíveis as microcápsulas do extrato aquoso e as microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru.

Conforme se esperava, as microcápsulas do extrato aquoso apresentaram melhor ação inibitória frente ao *S. aureus* e as microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 melhor ação bactericida, uma vez que os mesmos resultados foram observados para os extratos brutos. Assim, como ocorreu com o extrato hidroalcoólico 50:50 bruto, suas microcápsulas apresentaram melhor atividade antimicrobiana para os demais microrganismos (TABELA 4).

Os resultados da atividade antimicrobiana das microcápsulas do extrato aquoso e hidroalcoólico 50:50 (TABELAS 12 e 13) da folha de cumaru são muito superiores aos resultados dos extratos brutos (TABELA 4), pois a concentração do extrato é menor na microcápsula, se fazendo necessária maior concentração das microcápsulas para atividade antimicrobiana. Esse fato pode ser explicado pela quantidade de extrato utilizado como núcleo na encapsulação, sendo a proporção de 1:4 m/m (extrato/material de parede).

Diante dos resultados, observa-se que as microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 apresentaram melhor atividade antimicrobiana, tanto inibitória como bactericida, sobre um maior número de microrganismos.

6 CONCLUSÕES

Os extratos apresentaram bons rendimentos de extração, destacando-se os extratos hidroalcoólicos. O extrato hidroalcoólico 50:50 apresentou maior quantidade de compostos fenólicos e não houve diferença de conteúdo de antioxidantes totais entre os extratos.

Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram positivas e Gram negativas de importância em alimentos. O extrato aquoso mostrou melhor atividade antimicrobiana frente *S. aureus* e os extratos hidroalcoólicos demonstraram melhor atividade antimicrobiana frente aos demais microrganismos.

Os extratos não apresentaram efeito tóxico nos testes realizados, indicando a segurança em seu uso. As imagens da Microscopia Eletrônica de Transmissão dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 mostraram alterações morfológicas e possíveis danos a parede das bactérias expostas as concentrações bactericidas mínimas encontradas para esses extratos.

As microcápsulas de ambos os extratos apresentaram eficiente encapsulação dos compostos fenólicos. A microencapsulação dos extratos proporcionou a obtenção de extratos com coloração mais clara, com destaque para as microcápsulas que utilizaram a proporção de β -ciclodextrina e maltodextrina como material de parede. A atividade antimicrobiana se manteve após a microencapsulação, porém as microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru apresentaram melhor atividade antimicrobiana sobre os microrganismos testados. Sendo assim, as microcápsulas do extrato hidroalcoólico 50:50 da folha de cumaru seriam as melhores alternativas para aplicação do extrato da folha de cumaru na indústria de alimentos como conservante natural.

7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se a caracterização dos extratos aquoso e hidroalcoólico 50:50 quanto ao perfil fitoquímico de forma a verificar seus principais compostos e os possíveis responsáveis pela atividade antimicrobiana dos extratos.

Sugere-se a aplicação dos extratos na matriz alimentar como um aditivo natural, uma vez que, além do potencial antimicrobiano, eles também poderiam enriquecer o produto graças aos teores de compostos fenólicos e antioxidantes totais.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A.A. *et al.* Development of a rich fraction in phenolic compounds with high antioxidant and antimicrobial activity in *Amburana cearensis* seeds extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, [S.l.], v. 11, n. 41, p. 648- 655, 2017.
- AHMAD, F.; RICHARDSON, M.K.. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. **Behav Processes**, [S.l.], v. 92, p.88-98.
- ALMEIDA *et al.* *Amburana cearensis* – uma revisão química e farmacológica. **Scientia plena**, [S.l.], v.6, n.11, p. 1–8, 2010.
- ALSHAIBANI, D.; ZHANG, R.; WU, V.C.H . Antibacterial characteristics and activity of Vaccinium macrocarpon proanthocyanidins against diarrheagenic Escherichia coli. **Journal Of Functional Foods**, [S.l.], v. 39, p.133-138, 2017.
- ALTEMIMI, A. *et al.* Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. **Plants**, [S.l.], v.6, n.42, p. 1-23, 2017, [s.l.].
- ALVES, C. C. O. *et al.* Estabilidade da microestrutura e do teor de carotenóides de pós obtidos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) liofilizada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S. l.], v. 28, n. 4, p.830-839, 2008.
- AMAJOUD, N. *et al.* Prevalence of *Listeria* spp. and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from food products in Tetouan, Morocco. **Food Control**, [S.l.], v.84, p.436-441, 2018.
- ANSELMO, G.C.S. *et al.* Determinação da higroscopicidade do cajá em pó por meio da secagem por atomização. **Rev de Biologia e Ciências da terra**, [S.l.], v.6, n. 2, p. 58-65, 2006.
- ARELLANO-AGUIAR, O. *et al.* Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheriessciences**, [S.l.], v.9, p.52-62, 2015.
- AURICCHO,M.T, BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Rev Inst Adolfo Lutz**, [S.l.], v. 62, p. 55-61,2003.
- AZEREDO, H. M.C. Encapsulação: Aplicação à tecnologia de alimentos. **Alim. Nutr., Araraquara**, [S.l.], v. 16, n. 1, p.89-97, 2005.
- AZMIR, J. *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plants materials: A review. **Journal of food engineering**, [S.l.], v. 117, p. 426-436, 2013.
- AZWANIDA, N.N. A. Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Med Aromat Plants**, [S.l.], v. 4, n. 3, p. 1-6, 2015.
- BALLESTEROS, L. F. *et al.* Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 237, p.623-631, 2017.

- BAÚ, A.C.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Prevalência de salmonella em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.2, p.303-307, 2001.
- BAZYLKO, A. *et al.* Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. **Industrial Crops And Products**, [S.l.], v. 50, p.88-94, 2013.
- BELIAEVA, N.F. *et al.* Zebrafish as a model organism for biomedical studies. **Biomed khim.**, [S.l.], v.56, n. 1, p. 120-131, 2010.
- BONA, E.A.M. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.
- BONIFÁCIO, B.V. *et al.* Nanotechnology – based drug delivery systems and herbal medicines : a review. **Int. J Nanomedicine**, [S.l.], v.9, n. 1, p. 1-15, 2014.
- BORGE, B.R.; GEORGETTI, S.R.; KUROZAWA, L.E. Microencapsulation of grape seed oil by spray dryin. **Food science and Technology**, [S.l.], v. 38, n.2, 263-270, 2018.
- BRANDT, A. L. *et al.* Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. **Journal of Food Science**, [S.l.], v. 75, n. 9, p.557-563, 2010.
- BRANEN, J. K.; DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 90, p. 63-74, 2004.
- BRAVO, J.A. *et al.* Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, [S.l.], v.50, p.71-74, 1999.
- BURT, S. **Essential Oils: their antibacterial properties and potential application in foods – a review.** International Journal of Food Microbiology, [S.l.], v.94, n.3, p.1-14, 2004.
- CABALLERO, M.V.; CANDIRACCI, M. **Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy.** Journal of Unexplored Medical Data, [S.l.], v.3, n. 4, p. 1-14, 2018.
- CABRAL, L. C.; PINTO, V.F.; PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 166, p.1-14, 2013.
- CALO, J. R. *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, [S.l.], v. 54, p.111-119, 2015.
- CANUTO *et al.* **Uso de plantas jovens de *Amburana cearensis* A. C. Smith** : alternativa para preservação e exploração econômica da espécie. Petrolina: Embrapa Semi Árido, 2008.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Química Nova**, [S.l.], v. 29, n. 6, p. 1241-1243, 2006.

CANUTO, K.M; SILVEIRA, E.R. Estudo Fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith). **Quim. Nova**, [S.l.], v. 33, n. 3, p. 662-666, 2010.

CANUTO, K.M. *et al.* Amburanins A and B from *Amburana cearensis*: Daphnodorin-type biflavonoids that modulate human neutrophil degranulation. **J. Braz. Chem. Soc**, [S.l.], v. 25, n. 4, p. 639–647, 2014.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, potencialidade e uso da madeira.** Brasília: Embrapa, 1994.

CEBALLOS, A.M.; GIRALDO, G.I.; ORREGO, C.E. Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursoop fruit pulp. **Journal of Food Engineering**, [S.l.], v. 111, p. 360-365, 2012.

CHAICOUSKI, A. *et al.* Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquido e seco de erva-mate (*Llex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, [S.l.], v.16, n.1, p. 33-41, 2014.

CHEN, C.; CHI, Y. ; XU, W. Comparisons on the Functional Properties and Antioxidant Activity of Spray-Dried and Freeze-Dried Egg White Protein Hydrolysate. **Food Bioprocess Technol**, [S.l.],v. 5, p. 2342–2352, 2012.

CODEVILLA, C.F. *et al.* Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. **Ciência e Natura**, [S.l.], v.37, p. 142-151, 2015.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro:Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1974, v. 5, 687 p.

COLLYMORE, C.; RASMUSSEN, S.; TOLWANI,R.J. Gavaging adult zebrafish. **J Vis Exp.**, [S.l.], v. 78, p. 1-5; 2013.

DAI, Y.J. *et al.* Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S.l.], v.33,n. 1, p.11-17, 2014.

DARYAEI, H. *et al.* Heat inactivation of Shiga toxin – producing *Escherichia coli* in a selection of low moisture foods. **Food Control**, [S.l.], v. 85, p. 48-56, 2018.

DELGADO, J.M.F. **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas, e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa.** 2013.117 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Biomédica) – Instituto Politécnico de Bragança, Goiás, 2013.

DEVI, K.P. *et al.* Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 130, p. 107–115, 2010.

DIAS, D. A. M. **Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de abate industrial de frango em um matadouro localizado no Estado de São Paulo.** 2008.84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) – Universidades de São Paulo, São Paulo,

2008.

DICASTILHO, C.L. Chilean berry *Ugni molinae* Turcz. fruit and leaves extracts with interesting antioxidant, antimicrobial and tyrosinase inhibitory properties. **Food Research International**, [S.l.], v. 102, p. 119-128, 2017.

DI CICCIO, P. *et al.* Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food control**, [S.l.], v.50, p. 930-936, 2015.

DI, L.; KERNS, E. **Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization**. 2 ed. USA: Academic Press, 2016.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, [S.l.], n.7, 2006.

ELISHA, L. *et al.* The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts Ishaku. **BMC complementary and alternative medicine**, [S.l.], v. 17, p. 1-10, 2017.

FANG, Z.; BHANDARI, B.. Encapsulation of polyphenols - a review. **Trends In Food Science & Technology**, [S.l.], v. 21, p.510-523, 2010.

FARIAS, P.M. **Obtenção e caracterização do extrato de palma forrageira e avaliação do potencial antioxidante em modelo de lesão gástrica induzida por etanol**. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

FAVARO- TRINDADE, C.M. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Braz. J. Food Technol.**, [S.l.], v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FARAG, R.S. Antimicrobial Activity of some Egyptian Spice Essential Oils. **Journal of Food Protection**, [S.l.], v. 12, n. 9, p. 665-667, 1989.

FERNANDES, A.W.C. *et al.* Atividade antimicrobiana in vitro de extratos de plantas do bioma caatinga em isolados de *Escherichia coli* de suínos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, [S.l.], v.17, n.4, p.1097-1102, 2015.

FERNANDES, R.V.; BORGES, S.V.; BOTREL, D.A. Gum arabic/ starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 101, p. 524-532, 2014.

FERREIRA, S.M.S. **Contaminação de alimentos ocasionada por manipuladores**. 2006. 47f. Monografia (Especialização em Qualidade de alimentos) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

FIGUEREDO, F.G. *et al.* Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A.C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, [S.l.], p. 1 -5, 2013.

FLEMING, A.; RUBINSZTEIN, D.C. Zebrafish as a model to understand autophagy and its role in neurological disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.l.], v. 1812, n. 3, p. 520-526, 2011.

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

GEBAUER, D.L. *et al.* Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacol Biochem Behav**, [S.l.], v. 99, p.480-486, 2011.

GOMES, C.; MOREIRA, R.G.; CASTELL-PEREZ, E. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. **Journal of Food Science**, [S.l.], v. 76, p.16-24, 2011.

GOMES, G. V. L. **Produção e caracterização microestrutural de sistemas lipídicos sólidos micro e nanoparticulados utilizados na encapsulação de beta-caroteno**. 2011. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

GORTZI, O. *et al.* Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes. **Molecules**, [S.l.], v. 12, p. 932-945, 2007.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Effect of Maltodextrin Addition during Spray Drying of Tomato Pulp in Dehumidified Air: II. Powder Properties. **Drying Technology**, [S.l.], v.26, n.6, p. 726-737, 2008.

GUEDES, R.S. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Amburana cearensis* (Allemano) A.C. Smith. **Semina: Ciências Agrárias**, [S.l.], v. 36, n.4, p. 2373-2381, 2015.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, [S.l.], v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, [S.l.], v. 46, p. 412- 429, 2014.

HATEGEKIMANA, J. *et al.* Encapsulation of vitamin E: Effect of physicochemical properties of wall material on retention and stability. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v.124, p.172-174, 2015.

HEINZELMANN, K.; FRANKE, K. Using freezing and dryer techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 223-229, 1999.

HILL, A. J. ; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, [S.l.], v.86, p. 6-19, 2005.

HOOTON, S. P. T.; ATTERBURY, R.J.; CONNERTON, I. F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.l.], v. 151, p.157-163, 2011.

HUANG, Y. *et al.* The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S.l.], v.11, n. 4 p.3650-3660, 2014.

HUNG, Y. T *et al.* Characteristics of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis in Taiwanese children: A 9-year period retrospective medical record review. **Journal Of Infection And Public Health**, [S.l.], v. 10, p.518-521, 2017.

JAFARI, S.M. *et al.* Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. **Drying Technology**, [S.l.], v. 26, p. 816–835, 2008.

JUNG, W.K. *et al.* Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, [S.l.], v.74, n.7, p. 2171–2178, 2008.

KALOGEROPOULOS, N. *et al.* Polyphenol characterization and encapsulation in α -cyclodextrin of a flavonoid – rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. **Food Science and Technology**, [S.l.], v. 43, p. 882 -889, 2010.

KLINKESORN, U. *et al.* Stability and rheology of corn oil-in-water emulsions containing maltodextrin. **Food Research International**, [S.l.], v. 37, p. 851–859, 2004.

KOOHSARI, H. *et al.* The investigation of antibacterial activity of selected native plants from North of Iran. **Journal of Medicine and Life**, [S.l.], v. 8, n. 2, p.38-42, 2015.

KURTA, A.; PALESTIS, B. G. Effects of ethanol on the shoaling behavior of zebrafish (*Danio rerio*). **Dose-Response**, [S.l.], v.8, n. 4 p.527-533, 2010.

LABUSCHAGNE, P. Impact of wall material physicochemical characteristics on the stability of encapsulated phytochemicals: A review. **Food Research International**, [S.l.], v. 107, p. 227–247, 2018.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 45, p. 1390-1393, 1997.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. **Pharmaceutical Biology**, [S.l.], v. 41, p. 308-314, 2003.

LI, R. *et al.* Controlo f *Listeria monocytogenes* biofilm by paenibacterian, a natural antimicrobial lipopeptide. **Food Control**, [S.l.], v. 84, p. 529-535, 2018.

LIMA, A.R. *et al.* Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.l.], v.16, n. 1, p. 531-536, 2006.

LINS, P. Antimicrobial activities os spices and herbs against *Salmonella* Oranienburg. **Food Control**, [S.l.], v.83, p. 123- 130, 2018.

- LIU, G. *et al.* Antibacterial activity and mechanism of bifidocin A against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, [S.l.], v. 73, p.854-861, 2017.
- LU, G.W; GAO, P. Chapter 3 - Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. **Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems**. p.59-94, 2010.
- LU, W.L. *et al.* Zebrafish as a disease model for studying human hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, [S.l.], v. 21, n. 42, p. 12042 – 12058, 2015.
- MAIA, G.N. **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D & Z Computação gráfica e Editora, 2004.
- MAGALHÃES, F. E. A. *et al.* Adult zebrafish: an alternative behaviora model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**, [S.l.], v. 4, p.422-429, 2017.
- MAHDAVI, S.A. *et al.* Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin , gum arabic and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 85, p. 379-385, 2016.
- MALLMANN, R. *et al.* Effectiveness of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze against diarrhea-inducing bacteria. **Braz. J. Biol.** [S.l.], v. 78, n. 4, p. 619- 624, 2018.
- MELO, J.G. *et al.* Cytotoxicity of plants from the Brazilian semi-arid region: A comparison of different selection approaches. **South African Journal Of Botany**, [S.l.], v. 113, p.47-53, 2017.
- MOREIRA, M. R. *et al.* . Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **Food Science and Tecnology**, [S.l.], v. 38, n. 5, p. 565-570, 2005.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [S.l.], v. 65, n. 1, p. 55–63, 1983.
- MOSTAFA, A.A *et al.* Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S.l.], v. 25, p. 361-366, 2018.
- NEDOVIC, V *et al.* Na overview os encapsulation Technologies for food applications. **Precedia Food Science**, [S.l.], v. 1, p. 1806-1815, 2011.
- NGAHA NJILA, M.I. *et al.* Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. *In: 7th Int'l Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences*, 2017, Kuala Lumpur, **Anais...** Kuala Lumpur: ACBES, 2017. p. 67.
- OECD Guideline for testing of chemicals. Fish, acute toxicity test. 1992. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf> . Acesso em: 20 jun. 2018.
- OLIVEIRA. A.B.A. *et al.* Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Rev HCPA**, [S.l.], v. 30, n. 3, p.297-285, 2010.

- OLIVEIRA, V.B. *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil clae-dad de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook dicksoniaceae. **Rev. Bras. Pl. Med.**, [S.l.], v. 18, n.1, p.230 -236, 2016.
- OLIVEIRA, M.S. *et al.* Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alim. Nutr.**, Araraquara, [S.l.], v.18, n.3, p. 267-275, 2007.
- OVERNEY, Anais *et al.* Impact of environmental factors on the culturability and viability of *Listeria monocytogenes* under conditions encountered in food processing plants. **International journal of food microbiology**, [S.l.], v. 244, p. 74-81, 2017.
- OZBEKL, Z. A.; ERGONUL,P. G. A Review on Encapsulation of Oils. **CBU J. of Sci**, [S.l.], v. 13, n. 2, p. 293-309, 2017.
- OZTURK, B. *et al.* Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural surfactants: Quillaja sapoin and lecithin. **Journal of Food Engineering**, [S.l.], v. 142, p. 57-63,2014.
- PAULA, H. C. B. *et al.*Protective effect of cashew gum nanoparticles on natural larvicide Moringa oleífera seeds. **Journal of Applied Polymer Science**, [S.l.], v. 124, n. 3, p. 1778-1784, 2012.
- PEIXOTO R. M. 2009. 129 p. **Mastite em pequenos ruminantes: etiologia, fatores de risco, diagnóstico e sensibilidade aos agentes antimicrobianos e extratos de plantas.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Campus de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco –UNIVASF, Petrolina, 2009.
- PEREIRA, E.P.L. *et al.* *Amburana cearensis* seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.l.], v.27, n. 2, p. 199-205, 2017.
- PINHO, L. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, [S.l.], v. 42, n.2, p. 326-331, 2012.
- PISOSCHI, A. M. *et al.* Na overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 43, p. 922-935, 2018.
- RAKMAI, J. Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Industrial Crops & Products**, [S.l.], v. 111, p. 219-225, 2018.
- RAMESHKUMAR, A.; SIVASUDHA, T. In Vitor antioxidant and antibacterial activity of aqueous and methanolic extract of *Mollugo nudicaulis* Lam. Leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [S.l.], v. 2, n. 2, p. 895-900, 2012.
- RESENDE, R.R., SOCCOL, C.R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações.** v.1, São Paulo: Blucher, 2015, p. 22.

- REZENDE, Y. R. R. S. ; NOGUEIRA, J. P.; NARAIN, N. . Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 254, p.281-291, 2018.
- RODRIGUES, T.S. *et al.* Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Rev. Bras. Pl. Med.**, [S.l.], v.13, p.587-590, 2011.
- ROSA, C.G. *et al.* Encapsulation of the phenolic compounds of blackberry (*Rubus fruticosus*). **Food Science and Technology**, [S.l.], v. 58, n. 2, p. 527-533, 2014.
- RUFINO, M. S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 121, n. p. 996–1002, 2010. S
- SÁ, M.B. *et al.* Phytochemistry and Preliminary Assessment of the Antibacterial Activity of Chloroform Extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. against *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Strains. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S.l.], v. 2014, p.1-7, 2014.
- SÁ, M.C. *et al.* Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. **R. bras. Ci. Vet.**, [S.l.], v. 18, n. 2/3, p. 62-66, 2011.
- SAIKIA, S.; MAHNOT, N.K.; MAHANTA, C.L. Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 171, p. 144-152, 2015)
- SANCHEZ, V. *et al.* Freeze-Drying Encapsulation of Red Wine Polyphenols in an Amorphous Matrix of Maltodextrin. **Food Bioprocess Technol**, [S.l.], v. 6, p. 1350–1354, 2013.
- SANTOS, A.B.; FERREIRA, V.P.; GROSSO, C.R.F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. **Biociência e Desenvolvimento**, [S.l.], v.3, n.16, p.26-30, 2000.
- SANTOS, L. O. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante de compostos fenólicos presentes em *Amburana cearensis*. **Orbital: Electron. J. Chem**, [S.l.], v.8, n.1, p. 44-49, 2016.
- SASIDHARAN, S. *et al.* Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.
- SARMIENTO, C.C. *et al.* Zeta Potential of Food Matrices. **Food Eng Rev**, [S.l.], v.10, n. 3, p. 113- 138, 2018.
- SHUNYING, Z. *et al.* Chemical Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 96, p. 151-158, 2005.
- SCOTT, V. N. *et al.* Guidelines for Conducting *Listeria monocytogenes* Challenge Testing of Foods. **Food Protection Trends**, [S.l.], v. 25, n. 11, p. 818-825, 2005.

SHARMA *et al.* Chapter 8 - Interfacial and colloidal properties of emulsified systems: Pharmaceutical and biological perspective. **Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development**. p. 149-172, 2014.

SILVA, F. *et al.* Cashew gum and maltodextrin particles for green tea (*Camellia sinensis* var *Assamica*) extract encapsulation. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 261, p.169-175, 2018.

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SILVA, R. M.F. *et al.* Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 103-109, 2012.

SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. **Constituintes micromoleculares de plantas do nordeste com potencial farmacológico**: com dados de RMN ¹³C. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2005.

SIMÕES, C M.O. *et al.* **FARMACONOSIA**: da planta ao medicamento, 3ed. Porto Alegre: UFRGS/EDUSC, 2001, cap.13, p. 228-254.

SIMONETTI, E. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, [S.l.], v. 18, n. 1, p.9-18, 2016

SOARES, A.K.A. *et al.* Clinical toxicology study of a herbal medicine formulation of *Torresea cearensis* in healthy volunteers. **Rev. Bras. Plantas Med.**, [S.l.], v.9, n.2, p.55-60, 2007.

SOUSA, C.P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, [S.l.], v.9, n.1, p. 83-88, 2006.

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

SOUSA, A. Z. B. *et al.* Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arq. do Inst. Biol.**, [S.l.], v. 81, n. 1, p. 30-35, 2014.

SOUZA, C.N. *et al.* Atividade antimicrobiana de plantas medicinais do cerrado mineiro frente a bactérias isoladas de ovinos com mastite. **Revista Unimontes Científica**, [S.l.], v.19, n. 2, p. 51-61, 2017.

SUAVE, J. *et al.* Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SURESH, T. *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enteritidis* and other *Salmonellas* in the eggs and egg- storing trays from retails markets of Coimbatore, South India. **Food Microbiology**, [S.l.], v. 23, p.294-299, 2006.

- SWAMINATHAN, B.; SMIDT, P. The epidemiology of human listerioses. **Microbes and Infection**, [S.l.], v. 9, p. 1236- 1243, 2007.
- TAJKARIMI, M.M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, [S.l.], v.21, p. 1199-1218, 2010.
- TAYLOR, J.C. *et al.* A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology & Behavior**, [S.l.], v.174, p.83-88, 2017.
- THIELBEER, F.; DONALDSON, K; BRADLEY, M. Zeta Potential Mediated Reaction Monitoring on Nano and Microparticles. **Bioconjugate Chem.**, [S.l.], v. 22, p. 144–150, 2011.
- UYSAL, S. *et al.* In vitro antioxidant, cytotoxicity and chemical profile of different extracts from *Acanthus hirsutus* Boiss used in Anatolian folk medicine. **European Journal Of Integrative Medicine**, [S.l.], v. 17, p.135-140, 2018.
- VERMELHO, A.B. *et al.* **Práticas de microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- VINCEKOVIC, M. *et al.* Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. **Trends in Food Science & Technology**, [S.l.], v. 69, p. 1-12, 2017.
- VISHT, S.; CHATURVEDI, S. Isolation of natural products. **Current Pharma Research**, [S.l.], v. 2, n. 3, p. 584–599, 2012.
- VITORIA, F. N. **Novos Compostos Organosselênio Bioativos: Estudo da Ação Antimicrobiana frente à Patógenos de Importância em Alimentos**. 2010. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.
- WANI, T. A.; MASOODI, F.A.; WANI, I.A. The possible nomenclature of encapsulated products. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 234, p. 119-120, 2017.
- WANI, T.A. *et al.* Suitability of different food grade materials for the encapsulation of some functional foods well reported for their advantages and susceptibility. **Crit Rev Food Sci Nutr**, [S.l.], v. 56, p. 2431-2454, 2015.
- WANG, C. *et al.* The relationship between inactivation and morphological damage of *Salmonella enterica* treated by high hydrostatic pressure. **Food Research International**, [S.l.], v. 54, p.1482-1487, 2013.
- WANG, Y. *et al.* Antimicrobial flavonoids from *Psidia trinervia* and their methylated acetylated derivatives. **Phytochemistry**, v.9, p. 2323-2327, 1989.
- WILKOWSKA, A. Effect of Microencapsulation by Spray-Drying and Freeze-Drying Technique on the Antioxidant Properties of Blueberry (*Vaccinium myrtillus*) Juice Polyphenolic Compounds. **Pol. J. Food Nutr. Sci.**, [S.l.], v. 66, n. 1, p. 11–16, 2016.
- YAMASHITA, C. *et al.* Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (*Rubus* spp.)

by-product extract by freeze-drying. **Food Science And Technology**, [S.l.], v. 84, p.256-262, 2017.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o **Projeto de Pesquisa** intitulado “**Uso do zebrafish (*Danio rerio*) como biosensor em testes toxicológicos**” registrado sob o número **3344801/2017**, tendo como pesquisador principal **Francisco Ernani Alves Magalhães**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE)**, tendo sido aprovado em 09 de junho de 2017. Este certificado expira-se em 16 de dezembro de 2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled “**Uso do zebrafish (*Danio rerio*) como biosensor em testes toxicológicos**” registered with the protocol **3344801/2017**, under the supervision of **Francisco Ernani Alves Magalhães** is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE)**. This certificate will expire in december 16, 2020.

RESUMO

Vigência do projeto	01/08/2017 a 31/07/2020
Espécie/linhagem	<i>Zebrafish (Danio rerio)</i>
Número de animais	1000
Peso/idade	0,3 a 0,6 gr/ três meses
Sexo	500 Machos e 500 Femeas
Origem	Obtidos de um fornecedor comercial de Fortaleza

Fortaleza, 25 de julho de 2017.

Maria Erivalda Farias de Aragão
Presidente CEUA-UECE