



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ETNOBIOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
NATUREZA

AMANDA KARINE DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS DE *Eugenia jambolana* LAM.
POR CL-EM E REDUÇÃO DO EFEITO TÓXICO DO ALUMÍNIO UTILIZANDO
MODELO DE DESENVOLVIMENTO VEGETAL**

Crato, Ceará

2018

AMANDA KARINE DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS DE *Eugenia jambolana* LAM.
POR CL-EM E REDUÇÃO DO EFEITO TÓXICO DO ALUMÍNIO UTILIZANDO
MODELO DE DESENVOLVIMENTO VEGETAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza (PPGEtno) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) como requisito para obtenção do título de mestre em Etnobiologia e Conservação da Natureza.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Crato, Ceará

2018

Sousa, Amanda Karine
Caracterização de Produtos Naturais de *Eugenia jambolana* Lam. por CL-
EM e Redução do Efeito Tóxico do Alumínio Utilizando Modelo de
Desenvolvimento Vegetal

Amanda Karine de Sousa. – Crato – CE, 2018 p. 52

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Etnobiologia e Conservação da Natureza (PPGEtno) da Universidade
Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) como requisito para obtenção do
título de mestre em Etnobiologia e Conservação da Natureza.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

1. Efeito citoprotetor. 2. Metais pesados. 3. Alumínio. 4. *Eugenia
jambolana*

AMANDA KARINE DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS DE *Eugenia jambolana* LAM.
POR CL-EM E REDUÇÃO DO EFEITO TÓXICO DO ALUMÍNIO UTILIZANDO
MODELO DE DESENVOLVIMENTO VEGETAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza (PPGETno) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) como requisito para obtenção do título de mestre em Etnobiologia e Conservação da Natureza.

BANCA DE DEFESA

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Orientador)
Universidade Regional do Cariri - URCA

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa (Membro Interno)
Universidade Regional do Cariri - URCA

Prof. Dr. Edinaldo Fagner Ferreira Matias (Membro Externo)
Centro Universitário Dr. Leão Sampaio - UNILEÃO

Crato, Ceará

2018

Dedico aos meus pais, **Juciene de Lima Sousa e Adalberto de Sousa**, à minha irmã e amiga **Alana Karine de Lima Sousa** e à minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado força, discernimento e perseverança diante dos obstáculos e das dificuldades. Em todas as etapas tive a certeza de que Ele sempre esteve comigo.

À minha mãe, Juciene pelo exemplo de mulher forte, que não hesitou em nenhum momento para sempre me dar a melhor educação e oportunidades. Meu pai, Adalberto, por ser sempre espelho de paciência e humildade, e me tranquilizar nos momentos mais estressantes. Por todo exemplo de pais e pessoas que pude ter na vida.

À minha irmã, Alana Karine, pelas conversas, por me escutar em todos os momentos e acompanhar todo o processo e ajudar sempre que possível, por ser uma amiga enim.

À minha família, exemplos de pessoas fortes que sempre estão prontos para apoiar, independente das circunstâncias e momentos.

Ao meu orientador, professor Henrique Douglas, por ter sido mais que orientador indicando caminhos, aconselhando, encaminhando para que tudo corresse bem e pela oportunidade de me permitir aprender com ele.

Ao professor Edinaldo, por ter dado suporte necessário e estar acessível a me ensinar e ajudar no que fosse preciso.

Ao professor Galberto, por aceitar o convite de participar da banca e ter se disponibilizado a ler e contribuir com esta dissertação.

À professora Gorethe que se disponibilizou para co-orientar o projeto inicial, bem como disponibilizou recursos e auxílio, todo o suporte necessário, juntamente com o pessoal do Laboratório de Saneamento da Universidade Federal do Cariri (UFCA).

À professora Ana Ruth, coordenadora do curso de Biomedicina, por ter dado apoio e compreendido minhas ausências, e mais do que isso dá todo suporte necessário para que a realização deste trabalho fosse possível.

À Janaina e Elba sem vocês jamais teria conseguido realizar este trabalho, obrigada por compartilhar conhecimentos e experiências e mais do que isso terem se tornado amigas, estando sempre disponíveis.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular por ter me acolhido, me dado o suporte necessário e pela compreensão.

Aos colegas de mestrado contrerâneos, Ádamo, Wenderson e Carla, e as doutorandas, Jacqueline, Norma e Izabel, pois as trocas em cada módulo, as discussões, foram importantíssimas para o amadurecimento deste trabalho.

Aos colegas de mestrado recifenses, pela recepção e acolhimento, em especial à Rayana e Timóteo, que me ajudaram bastante, se disponibilizaram sempre que precisei para as tarefas que exigiam o meu deslocamento a Recife.

Aos colegas de trabalho, professores e preceptores do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, por sempre darem apoio e pela torcida.

Aos meus alunos, por me permitirem trocar saberes e por sempre acreditarem em mim, a torcida e a energia de vocês foram muito importantes nesta etapa.

Ao programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza e Bioprospecção Molecular e todos os seus membros. Pela enorme contribuição de todos os docentes que compõe estes programas.

Às universidades, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Regional do Cariri.

Às agências brasileiras fomentadoras de pesquisa FUNCAP pelo auxílio financeiro de grande importância para o desenvolvimento das pesquisas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização e finalização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos constituintes identificados no extrato de *Eugenia jambolana*

Figura 2. Estruturas dos constituintes identificados na fração tânica de *Eugenia jambolana*

Figura 3. Estruturas dos constituintes identificados na fração flavonoídica do extrato de *Eugenia jambolana*

Figura 5. Efeito citoprotetor do extrato e frações de *Eugenia jambolana* contra *Candida albicans*

Figura 4. Efeito citoprotetor do extrato e frações de *Eugenia jambolana* contra *Escherichia coli*

Figura 6. Gráficos da massa seca e comprimento de radículas e caulículos de sementes de alface (*Lactuca sativa*) em relação ao extrato etanólico e frações de *E. jambolana* em diferentes concentrações de alumínio.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de fase móvel utilizado na determinação qualitativa de amostras de *E. jambolana*.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS

BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentrações Bactericidas Mínimas
CFM	Concentração Mínima de Fungicida
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo - Espectrometria de Massas
DNA	cido Desoxirribonucléico
ERMO	Espécies Reativas do Metabolismo de Oxignio
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
GRI	ndice de Taxa de Germinação
HIA	Agar Heart Infusion
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
kV	Quilovolts
L/ min	Litros por minuto
CL-EM	Cromatografia Líquida com Espectrmetro De Massa
LPPN	Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais
NCCLS	Comit Nacional de Normas de Laboratórios Clínicos
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSI	Pound Force Per Square Inch
S	Sul
DAS	Sabouraud Dextrose Agar
UFC / mL	Unidades Formadoras de Colnias por mililitro
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
URCA	Universidade Regional do Cariri
W	Oeste

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	APRESENTAÇÃO	14
1.2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.2.1	Metais pesados	15
1.2.2	A família Myrtaceae e o gênero <i>Eugenia</i>	18
1.2.3	Espécie em estudo	19
1.3	JUSTIFICATIVA	21
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1	Material vegetal	23
2.2	Preparação do extrato etanólico	23
2.3	Preparo da fração flavonoídica	23
2.4	Fração tânica	23
2.5	Análise do extrato etanólico de <i>Eugenia jambolana</i> e frações por cromatografia líquida em espectrofotômetro de massa (CL-EM)	24
2.6	Meios de cultura e inoculação de microrganismos	24
2.7	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	25
2.8	Avaliação do potencial efeito citoprotetor em bactérias e fungos contra alumínio	25
2.9	Testes de alelopatia do extrato e frações de <i>Eugenia jambolana</i> Lam. em sementes de <i>Lactuca sativa</i> L.	26
2.10	Avaliação do efeito citoprotetor do extrato e frações de <i>E. jambolana</i> em um modelo de planta (<i>L. sativa</i>) contra cloreto de alumínio	26
2.11	Análises estatísticas	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
	CAPÍTULO I	34
	Caracterização por CL-EM e redução do efeito tóxico do alumínio utilizando produtos naturais de <i>Eugenia jambolana</i> Lam. utilizando modelo de desenvolvimento vegetal	34
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
	REFERÊNCIAS	28
	APOIO FINANCEIRO E/OU INSTITUCIONAL	Erro! Indicador não definido.
	ANEXO	52

CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS DE *Eugenia jambolana* LAM.
POR CL-EM E REDUÇÃO DO EFEITO TÓXICO DO ALUMÍNIO UTILIZANDO
MODELO DE DESENVOLVIMENTO VEGETAL

Sousa, Amanda Karine

Ma., Universidade Federal Rural de Pernambuco, fevereiro, 2018

Orientador: Professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

RESUMO

O alumínio é um metal tóxico extremamente comum em solos de todo o Brasil, sendo muitas vezes um fator impeditivo ao desenvolvimento de vegetais de interesse agrícola. Produtos naturais com atividade antioxidante podem mostrar-se como alternativa diante desta situação, uma vez que podem reduzir a toxicidade deste metal, diminuindo o dano causado às estruturas dos vegetais. Estudos anteriores relatam que *Eugenia jambolana* apresenta atividade antioxidante, como potencialidade citoprotetora contra metais pesados. Diante disto, o objetivo deste estudo foi identificar as substâncias presentes no extrato *Eugenia jambolana* Lam e suas frações por cromatografia líquida em espectrofotômetro de massa, determinar a potencial citoproteção contra a toxicidade do cloreto de alumínio em modelo procariótico e eucariótico, bem como o mecanismo de citoproteção do extrato e frações. Foram testados o extrato etanólico de *E. jambolana* e suas frações tânica e flavonoídica e estabelecidos a concentração bactericida e fungicida mínima dos produtos associados a cloreto de alumínio em diferentes concentrações. Estes mesmos produtos foram utilizados em germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*). O extrato e frações não mostraram atividade citoprotetora em modelos bacteriano e fúngico, uma vez que não foi capaz de interferir no perfil de crescimentos destes microrganismos. Já em relação ao modelo vegetal, foi possível observar efeitos significativos no crescimento de caulículos e radículas de alface, assim como no peso seco das radículas, mostrando efeito citoprotetor capaz de inibir a toxicidade do cloreto de alumínio nas diferentes concentrações. Este efeito foi melhor evidenciado utilizando o extrato etanólico quando comparado às frações flavonoídica e tânica, demonstrando que os compostos parecem agir melhor em associação do que isoladamente. Desta forma, diante dos problemas enfrentados na agricultura pela contaminação com alumínio e devido as características dos solos o extrato de *E. jambolana* pode mostrar alternativa à toxicidade deste metal.

Descritores: Efeito citoprotetor. Metais pesados. Alumínio. *Eugenia jambolana*

ABSTRACT

Aluminum is a toxic metal that is extremely common in soils all over Brazil and, as such, often impairs the development of plants of agricultural interest. Thus, natural products with antioxidant activity may represent a viable alternative to this problem, because they can reduce the toxicity of this metal, resulting in less damage to plant structures. Previous studies have reported that *Eugenia jambolana* presents an antioxidant activity and a cytoprotective potential against heavy metals. The objective of this study was to identify the constituents present in the extract and fractions obtained

from *Eugenia jambolana* Lam by liquid chromatography and mass spectrometry and evaluate their cytoprotective potential against the toxicity of aluminum chloride in prokaryotic and eukaryotic models, as well as determine the cytoprotective mechanism of these products. The ethanolic extract of *E. jambolana* and its tannic and flavonoid fractions were tested, and the minimum bactericidal and fungicidal concentrations of the products, in combination with aluminum chloride in different concentrations were established. The same products were used in tests of germination using lettuce (*Lactuca sativa*) seeds. The extract and the fractions did not present cytoprotective activity in bacterial and fungal models, since they did not interfere in the growth profile of these microorganisms. Regarding the vegetal model, significant effects were observed in the tests of growth of caulis and radicles of lettuce, as well as on the dry weight of radicles. A cytoprotective effect was observed, as the toxicity of aluminum chloride, at different concentrations, was inhibited. This effect was evidenced in a more significant way using the ethanolic extract, in comparison with the flavonoid and tannic fractions, demonstrating that the compounds seem to act better in association, than when isolated. Thus, in view of the problems caused by contamination with aluminum, associated to the characteristics of the soil in agriculture, the extract obtained from *E. jambolana* extract might represent an alternative to minimize the damage caused by the toxicity of this metal.

Keywords: Cytoprotective effect. Heavy metals. Aluminum. *Eugenia jambolana*

1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

Os metais pesados são compostos de ampla liberação no ambiente e a sua importância deve-se ao fato de constituírem os principais resíduos industriais, contaminando solos, plantas e animais no ecossistema com efeitos tóxicos ao homem e outros seres vivos. Estes são considerados os principais poluentes e com potencial citotóxico, carcinogênicos e mutagênicos. A ligação destes metais a grupos funcionais das proteínas podem inativar algumas enzimas e causar danos irreversíveis nos organismos, bloqueando atividades biológicas (DOMINGOS et al., 2005; VULLO, 2003).

Um desses metais é o alumínio que causa problemas, principalmente em solos ácidos, característica comum nos trópicos, por isso atinge 30 a 40% das terras cultiváveis do planeta. Isto ocorre porque em solos não-ácidos o alumínio está preso em compostos insolúveis, porém, quando em solos ácidos ele torna-se solúvel, desta forma é absorvido pelas raízes e inibe o crescimento das plantas. Somado a isso, o alumínio exerce efeito direto na disponibilidade de fosfato e, inibe a absorção de ferro, além de possuir efeito tóxico direto sobre o metabolismo vegetal (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

Diante disto, torna-se evidente que estudar as características da contaminação por metais pesados e identificar os seus riscos pela exposição ambiental, são além de condições básicas para prevenção e controle da poluição do solo, podem também fornecer informações importantes para estudos que busquem alternativas na remediação de solos contaminados.

Para este tipo de contaminação a vegetação pode representar alternativa na recuperação destes solos. Desta forma, ressalta-se a importância de plantas com efeito citoprotetor contra metais pesados, pois estas espécies podem diminuir os danos causados por estes metais. Em estudos anteriores, *Eugenia jambolana* mostrou efeito citoprotetor contra cloreto de mercúrio oferecendo maior crescimento nas radículas e nos caulículos da *Lactuca sativa* (alface), utilizada como modelo vegetal para o estudo (SOBRAL-SOUZA et al., 2014).

Eugenia jambolana Lam (SYN. *Syzygium cumini* Skeels; *Syzygium jambolanum*), um membro da família Myrtaceace, é uma árvore nativa dos trópicos, que é distribuída principalmente no subcontinente indiano, sudeste da Ásia e África Oriental. O fruto do *E. jambolana*, conhecido como Jamun ou ameixa preta, no Brasil é conhecida como oliveira, é uma baga comestível com sabor levemente adstringente e cor intensamente roxa quando maduros. *E. jambolana* é utilizada na medicina popular utilizadas no tratamento de múltiplas

doenças na medicina popular, incluindo a diabetes (AYYANAR; SUBASH-BABU; IGNACIMUTHU, 2013; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013).

Perante este embasamento, no capítulo I do presente estudo são apresentados os resultados através do manuscrito principal que avaliou a redução do efeito tóxico do alumínio utilizando produtos naturais de *Eugenia jambolana* Lam. utilizando modelo de desenvolvimento vegetal, bem como caracterizou a composição destes produtos naturais por uso de CL-EM.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Metais pesados

As definições de metais pesados relatados na literatura diferem por levarem em consideração diferentes parâmetros, tais como, peso atômico, número atômico, toxicidade, entre outros. Tais metais apresentam toxicidade para organismos vivos, desta forma, agem como poluentes. Caso ingeridos em doses inadequadas podem representar sérios riscos à saúde humana. Portanto, fontes alimentadoras da poluição podem interferir na sua biodisponibilidade potencializando esses efeitos (DUFFUS, 2002; GUEDES; LIMA; SOUZA, 2005).

Os metais podem ser classificados quanto ao seu papel nos sistemas biológicos das plantas podendo ser essenciais e não essenciais. Aqueles que são necessários em pequenas quantidades para as funções fisiológicas e bioquímicas vitais da planta são ditos essenciais, entre eles, cobre, ferro, níquel, manganês e zinco, enquanto que os não essenciais não apresentam função conhecida e são tóxicos, como por exemplo, mercúrio, chumbo, cádmio e alumínio, sua toxicidade aumenta com a concentração crescente. Embora a alta concentração de metais essenciais também possa causar prejuízos equivalentes ou piores do que aqueles causados por metais não-essenciais (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; HÄNSCH; MENDEL, 2009; SFAKIANAKIS et al., 2015).

Esses elementos desempenham funções diferentes nos sistemas biológicos das plantas, podendo agir como redox ativos essenciais para a atividade catalítica das enzimas como co-fatores, outros tem papel estrutural nas proteínas estabilizadoras, cruciais para o crescimento, transcrição de DNA, fixação de nitrogênio, germinação de sementes, floração, fotossíntese, resistência para estresses bióticos e abióticos (BITYUTSKII et al., 2014; BOLDINGH et al., 2016; NAVARRO-LEÓN et al., 2016).

Apesar da importância que eles exercem, a poluição, tornou o excesso destes metais um sério problema mundial, uma vez que eles não são biodegradáveis, desta forma, acumulam-se em solos, águas, representando um risco para o meio ambiente e para os seres humanos. No solo, estes metais causam efeitos tóxicos que trazem consequências às atividades de organismos vivos, podendo diminuir e prejudicar as funções destes organismos neste ambiente (BARON et al., 2017).

1.2.1.1 Alumínio

No solo a quantidade de alumínio é farta, isto ocorre devido a ação do intemperismo, pois a maior parte dos minerais primários e secundários oriundos das rochas são aluminossilicatos. Ao entrarem em contato com a água contendo gás carbônico, ocorre a liberação de alumínio na sua forma catiônica (Al^{3+}), este elemento tem característica de ser anfótero, podendo atuar como cátion quando em meio ácido e como ânion em meio básico. Os íons Al^{3+} sofrem hidrólise, portanto formam hidróxidos incompletos de alumínio solúvel tornando-se tóxico para as plantas. Essa hidrólise constitui fonte de prótons hidrônios, gerando acidez. Já em pH maiores que 5,8 a 6,0, o Al quase completamente aparece de forma insolúvel, desta forma não sendo tóxico as plantas (FAQUIN, 2005; MALAVOLTA, 2006).



A presença deste metal no ambiente é ampla, por isso a exposição a ele se torna praticamente inevitável. Os relatos científicos mostram a sua presença em formas de vida diversas, como algas marinhas, animais, microrganismos, plantas e em seres humanos. Entretanto, em concentrações elevadas, o alumínio é tóxico tanto para plantas quanto para animais. Este é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre. Para algumas plantas, em baixas concentrações, ele pode ser benéfico, como por exemplo, o chá-da-índia (*Camelli sinensis*), neste caso induz aumento na atividade das enzimas antioxidantes. Há ainda as plantas que acumulam altas concentrações de alumínio em seus tecidos e utilizam esta propriedade para afastar herbívoros (KUMAR; BAL; GILL, 2009; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

O mecanismo de ação da toxicidade do alumínio é proposto por diversas hipóteses, incluindo inibição do fluxo de íons, ruptura da membrana plasmática, inibição do sinal de transdução e alteração da estrutura do citoesqueleto. Quando diluídos, os minerais de argila e óxido de alumínio, elevam a acidez do solo, condição associada a disponibilidade do alumínio que reduz a germinação, limitando a produtividade das plantas (MARIN et al., 2004).

Estes efeitos são causados quando este metal se encontra em níveis aumentados nos solos, levando a alta produção de espécies reativas do metabolismo de oxigênio (ERMO) que levam a planta ao estresse oxidativo. Este estresse pode levar a morte celular, uma vez que altera quimicamente as principais biomoléculas (proteínas, clorofila, ácidos nucleicos e lipídios) (BOSCOLO; MENOSSI; JORGE, 2003; RICHARDS et al., 1998; ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2001).

Íons hidrogênio (H^+) atuam sobre os minerais liberando íons Al^{3+} retidos pelas cargas negativas das partículas de argila de solo, desta forma o pH baixo influencia a quantidade de Al^{3+} disponível para as plantas em solos ácidos. Quando cultivadas em solos deste tipo, as plantas podem encontrar estes íons tóxicos, a sua toxicidade atinge principalmente o sistema radicular, inibindo seu crescimento, uma vez que as raízes são essenciais para a absorção de nutrientes e água, quando curtas estas raízes podem afetar o crescimento e a produtividade da planta. Quanto aos processos responsáveis pelo decréscimo do crescimento da raiz, estudos discutem como possíveis causas a redução da divisão celular ou a expansão das células radiculares. Outro ponto de discussão, é quanto a localização do Al^{3+} no apoplástico ou simplástico que causaria os efeitos tóxicos (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 2002; DUC et al., 2008; PEREIRA, 2018).

De fato, a maioria dos vegetais, apresentam seu crescimento de raízes limitado quando em contato com altas concentrações de alumínio, além disso, apresentam concomitantemente deficiência de fósforo e a absorção e translocação de cálcio proporcionais a concentração de alumínio no solo. Em virtude da raiz superficial, estes vegetais apresentam impedimento de obter água e nutrientes mais profundos. Portanto, a raiz é um bom indicador desta toxidez, pois isto ocorre antes de qualquer manifestação sintomática na parte aérea da planta (MIGUEL et al., 2010).

Esta toxidez pode ser observada em características macroscópicas das raízes, que normalmente se apresentam grossas e amareladas nas pontas, degeneradas, tortuosas, com ramificações secundárias, escuras em parte pela oxidação de compostos fenólicos e pela ausência de pelos absorventes. Quando observadas microscopicamente, há desintegração dos tecidos da epiderme e de porções externas do córtex nos ápices das raízes, redução no tamanho da coifa e desarranjo do tecido meristemático (PEIXOTO; PIMENTA; CAMBRAIA, 2007).

Já a contaminação em seres humanos pode ocorrer por vias diversas, podendo ser inalatória, quando ocorre por nanopartículas que penetram no corpo e são incorporadas aos órgãos e tecidos; via oral, veiculada por água e alimentos ou ainda por via perenteral, em

casos de nutrição parenteral, medicamentos e soluções para diálise que podem ser contaminadas durante a preparação. O alumínio pode se acumular nos mais diversos órgãos do corpo humano, como ossos, fígado, rins, coração, sangue e principalmente no cérebro, mais precisamente nas células nervosas. Por ser o principal órgão afetado as manifestações da intoxicação são principalmente neurológicas, como encefalopatia, déficits de memória, tremores, alterações na coordenação motora, convulsões, entre outras (NOREMBERG, 2010; WU et al., 2012).

1.2.2 A família Myrtaceae e o gênero *Eugenia*

A família Myrtaceae inclui 142 gêneros e mais de 5.500 espécies, com distribuição pantropical, com centros de diversidade principalmente na América tropical e Austrália. No Brasil, esta família compreende 23 gêneros e cerca de 1.000 espécies. Ocupa a oitava posição em diversidade no Nordeste, e por isso é considerada importante economicamente (STADNIK; OLIVEIRA; ROQUE, 2016). Algumas de suas espécies são utilizadas na alimentação, e utilizadas na fabricação de suco, doces, geleias e sorvetes, como por exemplo as espécies de *Psidium guajava* L. da goiaba e *Eugenia uniflora* L. da pitanga, outras podem ser utilizadas na ornamentação, como *Eugenia sprengelli* da murta, e ainda como medicinais como *Eucalyptus globulus* L., o eucalipto (LORENZI; MATOS, 2002).

O gênero *Eugenia* representa um terço destas espécies, e apresenta distribuição ampla ocorrendo do México a Argentina. As plantas do gênero *Eugenia* apresentam árvores ou arbustos. Esta planta tem utilização na medicina popular, sendo empregada como recurso terapêutico, principalmente por apresentar compostos fenólicos, como taninos e flavonoides, relacionados a atividade antioxidante (AURICCHIO; BACCHI, 2003; EINBOND et al., 2004).

No Brasil, há representações em diversas formações vegetacionais, quanto a riqueza específica, abundância e frequência de suas espécies. Apresentam propriedades alimentícias e medicinais, principalmente as folhas e frutos, por isso tem alto potencial de uso em sistemas de policultivos e agroflorestas. Diversas comunidades locais, tradicionais ou não, com origens diversificadas, como agrícolas, indígenas, rurais, religiosas, quilombolas, urbana ou de pescadores, localizadas no Brasil, utilizam espécies deste gênero, com destaque para as regiões Sudeste e Nordeste que apresentam maior registros de uso, diferenciando-se das demais também pela diversidade de espécies utilizadas (LAMARCA et al., 2013; ROMAGNOLO; SOUZA, 2006).

1.2.3 Espécie em estudo

Eugenia jambolana Lam., conhecida como oliveira, se distribui em zonas tropicais e subtropicais. Partes desta planta, como semente, fruto, folha e casca, costumam ser utilizadas pela população no combate a diversos tipos de doenças e distúrbios. Alguns estudos já demonstraram múltiplas propriedades farmacológicas, tais como, anti-inflamatória, antiulcerogênica, cardioprotetora, antidiarreica, antimicrobiana, antioxidante e atividades hepatoprotetoras e antidiabéticas (BALIGA et al., 2011a; CHATTOPADHYAY; SINHA; VAID, 1998; SHAFI et al., 2002; SHAIKH; BAQIR-MALEKA; NAQVI, 1994).

As sementes de *E. jambolana* são ricas em glicosídeos, ácido gálico, ácido elágico, corilagina, taninos e quercetina, além de elementos como zinco, cromo, vanádio, potássio e sódio. Os frutos contêm rafinose, glicose, frutose, ácido cítrico, ácido málico e ácido gálico. A característica ácida das frutas possivelmente deve-se a presença deste último composto. Já a cor, deve-se a presença de antocianinas, como definidina-3-gentiobiosídeo e malvidina-3-lamaribiosídeo. Das folhas foram isolados sitosterol, ácido betulínico e ácido cratególico e também detectaram n-hepatcosano, n-nonacosano, n-hentriacontano, n-octacosanol, n-triacontanol e n-dotricontanol, bem como açúcares - glicose, frutose, ácido oxálico, cítrico e glicólico e aminoácidos - glicina, alanina, tirosina e leucina. Foram isoladas ainda, quercetina (0,0085%), miricetina (0,023%), miricitrina (0,009%) e glicosídeos de flavonol, miricetina 3-O-(4"-acetil)- α -L-rhamnospiranósidos (0,059%). As flores de *E. jambolana* contêm ácido oleanólico, dois outros ácidos elágicos triterpenóides e isoquercetina, quercetina, caempferol e miricetina estão presentes em pequenas quantidades (GUPTA, 2014; RAVI; RAMACHANDRAN; SUBRAMANIAN, 2004; TIMBOLA et al., 2002).

Os estudos demonstraram atividade para os extratos etanólicos e aquoso desta espécie. A atividade antidiarreica foi observada através da redução dos níveis de prostaglandina E2 e da motilidade no sistema gastrointestinal de ratos, através do extrato etanólico das cascas. Já os frutos e sementes apresentaram ação hipoglicemiante, tendo efeito também sobre a liberação de insulina em coelhos diabéticos. Em ratos resistentes a insulina, mostrou prevenir a hiperglicemia e hiperinsulinemia. Foram também vistas atividades para os extratos metanólicos e diclorometano das folhas, como protetora do DNA exposto à radiação

gama (JAGETIA; BALIGA, 2002; MUKHERJEE et al., 1998; RAVI; RAMACHANDRAN; SUBRAMANIAN, 2004; SHARMA et al., 2003, 2006; VIKRANT et al., 2001).

Estudos relatam ainda que, extratos etanólico da semente de *E. jambolana* tiveram efeito sobre os níveis de hemoglobina glicada, o peso corporal e a hemoglobina de ratos diabéticos, além disso restaurou as atividades de superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase ao nível normal. Foram encontrados também aumento do teor de glutathione e níveis de peroxidação lipídica e hidroperóxidos no fígado e rins. Bem como, foram observados resultados similares no plasma e no pâncreas, juntamente com a capacidade de elevar o nível de vitamina C e E e a ceruloplasmina no plasma (RAVI; RAMACHANDRAN; SUBRAMANIAN, 2004a; RAVI; SEKAR; SUBRAMANIAN, 2004b).

O extrato bruto das folhas de *E. jambolana* foram testados, mostrando atividade tripanocida, podendo ser aplicada no tratamento da doença de Chagas e modificador da atividade antifúngica de metronidazol, evidenciando uma alternativa para o tratamento da candidíase (DOS SANTOS et al., 2012). As substâncias isoladas, destas oito já conhecidas e três inéditas, apresentaram efeito hipoglicemiante, inibindo a enzima alfa-glucosidase. Quando comparadas ao fármaco acarbose, as substâncias eonoteína C, cornussino B e suertisino mostraram efeito superior a droga, sendo a mais ativa a isoeonoteína C, composto inédito (OMAR et al., 2012). Quanto ao potencial antibacteriano, foram testado in vitro o extrato aquoso, etanólico e acetato de etila, todos eles mostraram variações no grau de inibição das cepas testadas, porém o extrato etanólico se sobressaiu, seguido pela extrato acetônico e do extrato aquoso (BAG et al., 2012). Um estudo realizado com extrato metanólico e aquoso de folhas de *E. jambolana*, indicou que esta espécie poderia ser uma fonte de produtos naturais derivados de plantas com atividade modificadora de antibióticos aminoglicosídeos, como a gentamicina, representando um caminho para o combate bactérias resistentes a múltiplos fármacos (COUTINHO et al., 2010).

O extrato etanólico da casca da raiz de *E. jambolana* e suas frações quando utilizados para testes da atividade antinociceptiva, pelo método de contração abdominal induzida por ácido acético e nocicepção induzida por formalina e para a atividade anti-inflamatória, pelos métodos de edema da pata de rato induzido por carragenina e granuloma induzido por pelletes de algodão, demonstraram que a fração éter de petróleo é a mais eficaz. Em bioensaio realizado desta fração, foram isolados e identificados o β -sitosterol, estigmasterol e lupeol, substâncias relacionadas a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (SAHA et al., 2013).

1.3 JUSTIFICATIVA

A contaminação por metais pesados apresenta-se como problema ambiental de âmbito mundial, atingindo quase todos os tipos de solos e diversas regiões. A região do Cariri, local do estudo, apresenta quantidade considerável de indústrias de manufatura de joias, que utilizam metais pesados, o que contribui para promover a contaminação do solo e caso não seja dado adequado destino aos seus resíduos podem constituir fonte para esta contaminação.

Estudos que elucidem as características da toxicidade por metais, bem como, apresente alternativas a este problema, podem contribuir na busca por formas de solucionar este quadro. Além disso, a região em questão é rica em espécies típicas que podem ser exploradas no que concerne à sua composição e atividades para usos diversos. Desta forma, o estudo apresenta importância por trazer dados do comportamento da toxicidade do alumínio em modelos eucarionte e procarionte, bem como mostrar os resultados da *E. jambolana* na redução desta toxicidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a redução do efeito tóxico do alumínio utilizando produtos naturais de *Eugenia jambolana* Lam. utilizando modelo eucarionte e procarionte.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar por cromatografia líquida em espectrofotômetro de massa os compostos do extrato etanólico e frações enriquecidas de *Eugenia jambolana* Lam.;
- Avaliar o efeito tóxico do alumínio em modelos eucarionte e procarionte e a atividade citoprotetora do extrato etanólico e frações flavonoídica e tânica de *Eugenia jambolana* Lam. nesses modelos;
- Verificar a redução do efeito tóxico do alumínio pelos produtos naturais de *Eugenia jambolana* Lam. na germinação de sementes de *Lactuca sativa* (alface).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas de *Eugenia jambolana* Lam. foram obtidos na Universidade Regional do Cariri – URCA. Coordenadas: 07° 14' 18,1" de latitude S. e 39° 24' 52,9" W. de Greenwich. Os materiais vegetais foram identificados e uma exsicata da espécie foi depositada no herbário Dárdano Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri - URCA com o respectivo número de identificação #3107 (família Myrtaceae, espécie *Eugenia jambolana* Lam.).

2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

O extrato etanólico de *E. jambolana* Lam. foi preparado utilizando 1,832 g de folhas previamente trituradas e adicionado o álcool etílico a 95,5% onde permaneceram em temperatura ambiente protegidas do ar e da luz, por um período de 96h (MATOS, 2002). Posteriormente o macerado foi filtrado e levado a evaporador rotativo (Q-344B – Quimis – Brasil) 40 rpm a 60° C e banho maria, obtendo-se rendimento do extrato bruto de 124.7 g.

2.3 PREPARO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA COM FLAVONOIS

10 g do extrato foi dissolvido em 100 mL de hexano, no qual permaneceu em banho ultrassom por 10 minutos e em seguida foi centrifugado (3000 rpm) por 10 min. O sobrenadante foi separado, sendo adicionado ao resíduo 100 mL de hexano por mais duas vezes, conforme descrito anteriormente. Ao resíduo obtido no final foi adicionado 100 mL de clorofórmio, sendo levado ao ultrassom por 10 min e repetido os mesmos procedimentos anteriores 3 vezes. Ao resíduo obtido nesta etapa foi adicionado 50 mL de acetato de etila e levado ao ultrassom. A fração obtida foi seca no evaporador rotativo e o material obtido foi determinado como fração flavonoídica (BARBOSA, 2004).

2.4 PREPARO FRAÇÃO ENRIQUECIDA COM TANINOS

20 g do extrato foi misturado com 50 mL da mistura acetona/água (7:3), agitado em banho ultrassom por 40 minutos a 5°C. Após esse tempo, o material foi filtrado em funil comum com papel filtro e concentrado em evaporador rotativo para a evaporação da acetona

ficando com a fase aquosa. A fase aquosa foi particionada com éter de petróleo (3 vezes de 50 mL) e destilada em evaporador rotativo para garantir a evaporação total do éter de petróleo, em seguida o material foi liofilizado a partir da fase aquosa para originar a fração tânica (TERRILL et al., 1992).

2.5 ANÁLISE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Eugenia jambolana* E FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM ESPECTOFOTÔMETRO DE MASSA (CL-EM)

As soluções dos estudos foram selecionadas e submetidas individualmente a análise por CL-EM, utilizando uma coluna octadecilsilano (250 x 4.6 mm, 5 µm, Luna[®] C18, Phenomenex[®]), como fase estacionária e fase móvel composta de 2 solventes: solvente A – 0.1% de ácido fórmico em água ultrapura e solvente B 0,1% de ácido fórmico em metanol (grau CLAE) com fluxo de 1.0 mL/min, em gradiente de acordo com a Tabela 1. A fase estacionária foi mantida a 30°C e o volume injetado foi de 20 µL para as amostras (1 mg/mL) no CLAE-DAD-MS para análises monitoradas de 190 a 400 nm e de 50 a 1000 m/z. As análises desenvolvidas utilizaram um LC-20 Shimadzu[®] equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A, detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP. Acoplado a um espectrômetro de massas ESI-IT da Bruker Daltonics[®], equipado com uma fonte de ionização por electrospray operando no modo de analisador e por captura de ions positivos com trap para dividir o eluente do HPLC e uma taxa de fluxo de 0.2 mL/ min foi introduzido na fonte. Os parâmetros do espectrômetro de massa utilizados foram: tensão capilar de 3.5 kV; temperatura de dessolvatação de 320°C; fluxo de gás de 10 L/ min; pressão de 60 PSI, utilizando nitrogênio como gás de secagem e nebulização.

2.6 MEIOS DE CULTURA E INOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados foram a bactéria *Escherichia coli* 06 (EC 06) e o fungo *Candida albicans* 40006 (CA INCQS 40006), fornecido pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB e FIOCRUZ através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), respectivamente.

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion – HIA (Difco Laboratories Ltda) na concentração indicada pelo fabricante, Brain Heart Infusion - BHI e

Sabouraud Dextrose Agar - SDA (Sambrook et al., 1989, modificado). Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente. A bactéria foi inoculada em HIA (Difco Laboratories Ltda) e o fungo em SDA. Ambos foram incubados a 35 °C, aproximadamente, durante 24 horas.

2.7 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada por método de microdiluição de caldo. O inóculo foi depositado em solução salina para formar uma suspensão de 105 UFC / mL, as concentrações das amostras variaram de 1024 a 8 µg / mL. Uma solução contendo 900 µL de meio BHI a 10% e 100 µL do inóculo foram colocados em cada um dos *ependorfs*. Em seguida, foram distribuídos 100 µL desta solução em cada poço da placa de microdiluição e foram adicionados 100 µL das amostras ao primeiro poço e passaram em diluições sucessivas para os poços remanescentes na proporção de 1: 1 até o penúltimo poço. O último poço foi preservado para o controle. A placa foi colocada numa incubadora a 35 ° C durante um período de 24h (JAVADPOUR et al., 1996). Para ensaios bacterianos, adicionou-se uma solução de resazurina sódica e água destilada a cada poço (20 µL) e as placas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente. Para o desenvolvimento da CIM, a inibição do crescimento foi considerada como os poços que permaneceram com a coloração azul e a não-inibição, aqueles que obtiveram coloração vermelha, quando avaliados para os ensaios de bactérias, ou a ausência de turbidez no meio, quando avaliado para a ensaios de fungos. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano nos poços da placa de microdiluição, tal como detectado macroscopicamente (NCCLS, 2003)

2.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO CITOPROTETOR EM BACTÉRIAS E FUNGOS CONTRA ALUMÍNIO

Para a avaliação do efeito protetor do extrato e das frações sobre o cloreto de alumínio, os *ependorfs* contendo concentrações sub-inibitórias das amostras e suspensões a 105 UFC / ml de *Escherichia coli* 06 (EC 06) e *Candida albicans* (CA 40006) foram preparados em BHI médio 10%. A solução foi distribuída nos poços da placa de microdiluição. Imediatamente depois, foram adicionados 100 µL de cloreto de alumínio ao primeiro poço, seguidos de microdiluições sucessivas à penúltima cavidade. A concentração

de metal variou de 10 mM a 0,00488 mM. As placas de microdiluição foram incubadas durante 48 h a 37 ° C numa incubadora. Em seguida, as concentrações bactericidas mínimas (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas como a menor concentração capaz de matar toda a população de microrganismos. Foram utilizadas placas de Petri com Agar Infusão de Coração (HIA) para transferir as soluções incubadas nas placas de microdiluição. Uma alíquota de cada poço da placa de microdiluição foi sub-cultivada em placas de HIA. Após 24 horas de incubação a 35 ± 2 °C, a leitura foi feita, com o objetivo de observar o crescimento das colônias. As leituras de CBM e CFM foram realizadas com base no crescimento dos controles microbianos, considerando o CBM e o CFM a menor concentração do extrato e as frações que inibiram o crescimento visível da subcultura (SHADOMY et al., 1985).

2.9 TESTES DE ALELOPATIA DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Eugenia jambolana* LAM. EM SEMENTES DE *Lactuca sativa* L.

Foram realizados testes pilotos para determinar o efeito alelopático das amostras em estudo. Para realizar o teste, foram utilizados placas de Petri limpas, secas e estéreis. Elas estavam alinhadas com dois discos de papel de filtro, onde foram dispostas 20 sementes de *Lactuca sativa*. Foram adicionados 3mL das soluções de amostra a cada placa a concentrações de 256 µg / mL, 128 µg / mL e 64 µg / mL e as placas foram devidamente identificadas e preparadas em triplicatas. Após a adição da solução, as placas permaneceram embaladas em película plástica (SOBRAL-SOUZA et al., 2014). Os experimentos foram conduzidos em uma câmara de germinação a uma temperatura de aproximadamente 25 ° C \pm 2 ° C e fotoperíodo natural por sete dias. Os tratamentos foram organizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado (CRD), com três repetições de 20 sementes por placa. Os parâmetros analisados no final dos sete dias foram: contando o número de sementes germinadas. As sementes cujas raízes atingiram 1 mm de comprimento ou mais foram consideradas germinadas. Os testes foram feitos em triplicatas e expressos como significativos.

2.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *E. jambolana* EM UM MODELO DE PLANTA (*L. sativa*) CONTRA CLORETO DE ALUMÍNIO

Para realizar o teste, utilizaram-se placas de Petri preparadas conforme relatado anteriormente. Quanto às concentrações utilizou-se uma concentração sub-alelopática do extrato e das frações (64 µg / mL) e do cloreto de alumínio, variando entre 20 e 1,25 mM. A placa de controle foi umedecida com 3 mL de água destilada estéril. Os experimentos foram conduzidos em uma câmara de germinação a uma temperatura de aproximadamente 25 ° C ± 2 ° C e fotoperíodo natural por sete dias. Os tratamentos foram organizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado (CRD), com três repetições de 20 sementes por placa. Os parâmetros analisados no final dos sete dias foram: contagem de sementes germinadas, índice de taxa de germinação (GRI), biometria radicular e radicular, ocorrência de necrose radicular, anormalidades de plântulas e peso seco das radículas e caulículos, seguindo o Manual de Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). As sementes cujas raízes atingiram 1 mm de comprimento ou mais foram consideradas germinadas. Os testes foram feitos em triplicado e expressos como significativos

2.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados dos testes químicos e vegetais foram analisados pelo cálculo das médias aritméticas com Bonferroni e ANOVA. Os resultados dos ensaios microbiológicos foram analisados pelo cálculo das médias geométricas utilizando o *software* GraphPad Prism versão 5.0.

REFERÊNCIAS

- AKESON, M. A.; MUNNS, D. N.; BURAU, R. G. Adsorption of Al³⁺ to phosphatidylcholine vesicles. **BBA - Biomembranes**, v. 986, n. 1, p. 33–40, 1989.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869–881, 2013.
- ANIOL, A. Induction of aluminum tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminum in the nutrient solution. **Plant physiology**, v. 76, n. 3, p. 551–5, 1984.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas *Eugenia uniflora* L. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 1, p. 55–61, 2003.
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P.; IGNACIMUTHU, S. **Syzygium cumini (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: Folk medicinal and pharmacological evidences** *Complementary Therapies in Medicine*, 2013.
- BAG, A. et al. In vitro antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. **Microbiological Research**, v. 167, n. 6, p. 352–357, 2012.
- BALIGA, M. S. et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1776–1789, 2011a.
- BALIGA, M. S. et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1776–1789, 2011b.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 48, n. 1, p. 75–92, 2002.
- BARON, D. et al. IS *Annona emarginata* CAPABLE OF ACCUMULATE ESSENTIAL HEAVY METALS WITHOUT DAMAGES IN THE METABOLISM? **Rev. Bras. Frutic**, v. 39, n. 4, p. 1–7, 2017.
- BASTOS, D. H. M. et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423–432, 2007.
- BENHERLAL, P. S.; ARUMUGHAN, C. Chemical composition and in vitro antioxidant studies on *Syzygium cumini* fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 14, p. 2560–2569, 2007.
- BITYUTSKII, N. et al. Contrasting effect of silicon on iron, zinc and manganese status and accumulation of metal-mobilizing compounds in micronutrient-deficient cucumber. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 74, p. 205–211, 2014.
- BOLDINGH, H. L. et al. Carbohydrate and boron content of styles of “Hass” avocado (*Persea americana* Mill.) flowers at anthesis can affect final fruit set. **Scientia Horticulturae**, v. 198, p. 125–131, 2016.
- BOSCOLO, P. R. S.; MENOSSI, M.; JORGE, R. A. Aluminum-induced oxidative stress in

maize. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 181–189, 2003.

CALDWELL, C. R. Analysis of aluminum and divalent cation binding to wheat root plasma membrane proteins using terbium phosphorescence. **Plant physiology**, v. 91, n. 1, p. 233–41, 1989.

CHATTOPADHYAY, D.; SINHA, B. K.; VAID, L. K. Antibacterial activity of *Syzygium* species. **Fitoterapia**, v. 69, p. 356–367, 1998.

CHO, M. J. et al. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 13, p. 1771–1782, 2004.

COUTINHO, H. et al. Potentiation of Antibiotic Activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. v. 13, n. 4, p. 1024–1026, 2010.

DOMINGOS, V. D. et al. Efeito do cobre na atividade da enzima pirogalol peroxidase em plantas de *Myriophyllum aquaticum* cultivadas em solução nutritiva. **Planta Daninha**, v. 23, n. 2, p. 375–380, 2005.

DOS SANTOS, K. K. A et al. Cytotoxic, trypanocidal, and antifungal activities of *Eugenia jambolana* L. **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 1, p. 66–70, 2012.

DUC, L. et al. Tolerância Ao Alumínio Em Plantas: Toxicidade, Mecanismos E Genes Em Espécies Cultivadas Aluminum Tolerance in Plants: Toxicity, Mechanisms and Genes in Cultivated Species. **Agrociência Pelotas**, v. 14, p. 1–10, 2008.

DUFFUS, J. H. “ Heavy Metals ”— A Meaningless Term? v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.

EINBOND, L. S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23–28, 2004.

FAQUIN, V. Solos E Meio Ambiente Nutrição Mineral De Plantas. **Universidade Federal de Lavras-UFLA**, v. III, n. FAEPE, p. 186, 2005.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 807–821, 2011.

GARCIA, S. C.; GIODA, A.; NASCIMENTO, D. B. DO. Common Difficulties Which Occur in Trace Analysis Are Those Which Involve Contamination , Mainly. **Química Nova**, v. 20, n. 4, p. 407–411, 1996.

GUEDES, J. DE A.; LIMA, R. F. DE S.; SOUZA, L. C. DE. Metais pesados em água do rio Jundiá - Macaíba / RN. **Revista de Geologia**, v. 18, n. 2, p. 131–142, 2005.

GUPTA, G. S. Triterpenoid and other. **Phytochemical Reports**, v. 12, n. 1965, p. 225–226, 2014.

HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 259–266, 2009.

HORST, W. J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: A review. **Annals of Botany**, v. 106, n. 1, p. 185–197, 2010.

- HVATTUM, E. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 7, p. 655–662, 2002.
- ISHIKAWA, S.; WAGATSUMA, T. Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species. **Plant and Cell Physiology**, v. 39, n. 5, p. 516–525, 1998.
- JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S. *Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: A preliminary study. **Toxicology Letters**, v. 132, n. 1, p. 19–25, 2002.
- JAVADPOUR, M. M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107–3113, 1996.
- JONES, D. L. et al. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 7, p. 1309–1318, 2006.
- JONES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Aluminum Interaction with Plasma-Membrane Lipids and Enzyme Metal-Binding Sites and Its Potential Role in Al Cytotoxicity. **FEBS Letters**, v. 400, n. 1, p. 51–57, 1997.
- KUMAR, V.; BAL, A.; GILL, K. D. Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminium induced oxidative damage. **Toxicology**, v. 255, n. 3, p. 117–123, 2009.
- LAMARCA, E. V. et al. Contribuições do conhecimento local sobre o uso de *Eugenia* spp. em sistemas de policultivos e agroflorestas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 3, p. 119–130, 2013.
- LEITE, N. F. et al. Efecto citoprotector de extractos de *Eugenia jambolana* y *Psidium mtrsinites* DC. A. contra peroxidación lipídica inducida por hierro II. **Acta Toxicol. Argent.**, v. 24, n. 3, p. 187–192, 2016.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. [s.l: s.n.].
- MACEDO, F. L. DE et al. Efeito do alumínio em plantas de Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.), cultivadas em solução nutritiva Effect of aluminum in plants of *Jatropha curcas* L. grown in nutritive solution. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 157–164, 2011.
- MAHMOUD, I. I. et al. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1239–1244, 2001.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. [s.l: s.n.].
- MARIN, A. et al. Germinação de sementes de guandu sob efeito da biodisponibilidade hídrica e de doses subletais de alumínio. **Bragantia**, v. 63, n. 1, p. 13–24, 2004.
- MIGUEL, P. et al. Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. **CES Revista**, v. 24, p. 13–30, 2010.
- MUKHERJEE, P. K. et al. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 1, p. 85–89, 1998.

- NAVARRO-LEÓN, E. et al. Comparative study of Zn deficiency in *L. sativa* and *B. oleracea* plants: NH_4^+ assimilation and nitrogen derived protective compounds. **Plant Science**, v. 248, p. 8–16, 2016.
- NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved S ed. Wayne, Pennsylvania: [s.n.].
- NOREMBERG, S. Influência da formação de hidroxialuminsilicatos na biodisponibilidade do alumínio. 2010.
- OLIVEIRA, L. E. M.; RENA, A. B. Influência do alumínio sobre o comportamento nutricional de cultivares de mandioca em solução nutri. **Pesq. agropec. bras.**, v. 24, n. 9, p. 1119–1130, 1989.
- OMAR, R. et al. α -Glucosidase inhibitory hydrolyzable tannins from *Eugenia jambolana* seeds. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 8, p. 1505–1509, 2012.
- PALLU, A. Bioissorção de cádmio por linhagens de *Aspergillus* sp. **Universidade de São Paulo**, n. Dissertação de mestrado, p. 69, 2011.
- PEIXOTO, P. H. P.; PIMENTA, D. S.; CAMBRAIA, J. Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. **Bragantia**, v. 66, n. 1, p. 17–25, 2007.
- PEREIRA, J. F. Soils and Plant Nutrition | Note Initial root length in wheat is highly correlated with acid soil tolerance in the field. n. February, p. 79–83, 2018.
- RAO IM, MILES JW, BEEBE SE, H. W. Root adaptations to soils with low fertility and aluminium toxicity. **Annals of Botany**, v. 117, n. 7, p. 1–13, 2016.
- RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S. **Biologia Vegetal**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. Effect of *Eugenia Jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Life Sciences**, v. 75, n. 22, p. 2717–2731, 2004.
- RAVI, K.; SEKAR, D. S.; SUBRAMANIAN, S. Hypoglycemic activity of inorganic constituents in *Eugenia jambolana* seed on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Biological trace element research**, v. 99, n. 1–3, p. 145–55, 2004.
- RICHARDS, K. D. et al. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 409–418, 1998.
- ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. DE. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 529–548, 2006.
- ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, v. 21, n. 1, p. 3–21, 2001.
- SAHA, S. et al. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and fractions of *Eugenia jambolana* root bark and isolation of phytoconstituents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 4, p. 651–661, 2013.
- SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS

combined with NMR. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8402–8416, 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. [s.l.: s.n.].

SFAKIANAKIS, D. G. et al. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. **Environmental Research**, v. 137, p. 246–255, 2015.

SHAFI, P. M. et al. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 414–416, 2002.

SHAIKH, M. R.; BAQIR-MALEKA, F. A.; NAQVI, S. Partial purification and antibacterial studies of extracts from *Eugenia jambolana* Linn and *Vinca rosea* Linn. Pak. **Journal Scientific and Industrial Research**, v. 37, n. 6–7, p. 279–280, 1994.

SHARMA, S. B. et al. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2–3, p. 201–206, 2003.

SHARMA, S. B. et al. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p. 367–373, 2006.

SOBRAL-SOUZA, C. E. et al. Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Eugenia uniflora* lineau e *Psidium sobleianum* Proença & Landrum contra metais pesados. **Revista Ciencias de la Salud**, v. 12, n. 3, p. 401–409, 2014.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2084–2093, 2013.

STADNIK, A.; OLIVEIRA, M.; ROQUE, N. Levantamento florístico de Myrtaceae no município de Jacobina, Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 43, n. 1, p. 87–97, 2016.

SUN, J. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 679–693, 2007.

TERRILL, T. H. et al. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 58, n. 3, p. 321–329, 1992.

TIMBOLA, A. K. et al. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 2, p. 174–176, 2002.

VIKRANT, V. et al. Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 2, p. 139–143, 2001.

VULLO, D. L. Interacción En Beneficio Del Medio Ambiente. **Química Viva**, v. 2, p. 93–104, 2003.

WU, Z. et al. Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 1, 2012.

YADAV, M.; YADAV, A.; YADAV, J. P. In vitro antioxidant activity and total phenolic

content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. S1, p. S256–S261, 2014.

YAMAMOTO, Y.; HACHIYA, A.; MATSUMOTO, H. Oxidative Damage to Membranes by a Combination of Aluminum and Iron in Suspension-Cultured Tobacco Cells. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, n. 12, p. 1333–1339, 1997.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid Peroxidation Is an Early Symptom Triggered by Aluminum, But Not the Primary Cause of Elongation Inhibition in Pea Roots. **Plant physiology**, v. 125, n. 1, p. 199–208, 2001.

YAMASHITA, O. M.; GUIMARÃES, S. C. Germinação de sementes de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* em função da presença de alumínio no substrato. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, p. 599–601, 2011.

CAPÍTULO I

Caracterização por CL-EM e redução do efeito tóxico do alumínio utilizando produtos naturais de *Eugenia jambolana* Lam. utilizando modelo de desenvolvimento vegetal

Amanda K. Sousa^a, Celestina E. Sobral – Souza^b, Larissa A. Rolim^c, Ana R. P. Silva^b,
Nadghia F. Leite^b, Janaina E. Rocha^b, Henrique D. M. Coutinho^{b*}

1Centro Universitário Dr. Leão Sampaio – UNILEÃO. Juazeiro do Norte - CE – Brasil;

2Universidade Regional do Cariri – URCA. Crato - CE – Brasil;

3Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Petrolina – PE – Brasil.

Resumo

O alumínio é um metal tóxico extremamente comum em solos de todo o Brasil, sendo muitas vezes um fator impeditivo ao desenvolvimento de vegetais de interesse agrícola. O objetivo deste estudo foi quantificar os flavonoides presentes no extrato *Eugenia jambolana* Lam e suas frações, para identificar sua composição por CL-EM, determinar a potencial citoproteção contra a toxicidade do cloreto de alumínio em modelo procariótico e eucariótico, bem como o mecanismo de citoproteção do extrato e frações. Foram testados o extrato etanólico de *E. jambolana* e suas frações tânica e flavonoídica e estabelecidos a concentração bactericida e fungicida mínima dos produtos associados a cloreto de alumínio em diferentes concentrações. Estes mesmos produtos foram utilizados em germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*). O extrato e frações não mostrou atividade citoprotetora em modelos bacteriano e fúngico, uma vez que não foi capaz de interferir no perfil de crescimentos destes microrganismos. Já em relação ao modelo vegetal, foi possível observar efeitos significativos no crescimento de caulículos e radículas de alface, assim como no peso seco das radículas, mostrando efeito citoprotetor capaz de inibir a toxicidade do cloreto de alumínio nas diferentes concentrações. Desta forma, diante dos problemas enfrentados pela contaminação com alumínio e devido as características dos solos o extrato de *E. jambolana* pode mostrar alternativa a toxicidade deste metal.

Keywords: Efeito citoprotetor. Metais pesados. Alumínio. *Eugenia jambolana*

1. Introdução

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante da crosta terrestre. Este elemento atinge a atmosfera por emissões naturais, mas principalmente por ação antropogênica devido ao fato de ser bastante aplicado a nível industrial. Este metal possui uso geral e compostos de alumínio são empregados como catalisadores na produção de plástico, na forma de óxido de alumínio em quase todos os tipos de vidros, além de ser usado como agente floculante em estações de tratamento de água, representando uma fonte adicional de contaminação, pois traços de alumínio existentes na água não são totalmente retirados em processos convencionais de purificação (Garcia; Gioda; Nascimento, 1996).

Sua toxicidade em sistemas aquáticos e terrestres está correlacionada a concentração da sua fração biologicamente ativa. As formas monoméricas Al^{3+} são consideradas as mais importantes. Os complexos de Al orgânicos e inorgânicos são considerados não fitotóxicos ou com fitotoxicidade reduzida. Esta contaminação por

51 alumínio é a principal restrição para o crescimento e desenvolvimento de plantas em
52 solos ácidos. A inibição do alongamento da raiz provocada por este metal pode ser
53 observada em horas após a exposição ao seu excesso (Horst; Wang; Eticha, 2010).
54 A toxicidade desse metal pode ser devido a interações desses íons em locais
55 específicos nas paredes celulares, no simplasma, na membrana plasmática ou na
56 formação de calose, interagindo com aspectinas e hemiceluloses, inibindo a divisão
57 celular, ligando-se ao DNA ou com lipídeos (Boscolo; Menossi; Jorge, 2003).

58 A baixa fertilidade do solo, que inclui a pouca disponibilidade de nutrientes e
59 desequilíbrio de pH do solo, somada a já referida toxicidade do Al, representa um
60 problema na produtividade agrícola e impede que atinja seu potencial de produção.
61 Por estes motivos existe um uso excessivo de fertilizantes que poluem o ambiente e
62 contribuem para alterações climáticas e degradação ambiental, principalmente em
63 países desenvolvidos (Rao; Miles; Beebe, 2016). Solos com presença de elementos
64 tóxicos como o alumínio são uma característica comum em várias regiões do
65 mundo. Estas condições influenciam diretamente na germinação das sementes
66 (YAMASHITA; GUIMARÃES, 2011). O alumínio induz também a formação de
67 espécies reativas de oxigênio, desta forma, substâncias com efeito antioxidante
68 podem ser eficazes em amenizar os impactos gerados pela toxicidade do alumínio,
69 assim como a quelação deste metal como forma de citoproteção contra a toxicidade
70 (BENHERLAL; ARUMUGHAN, 2007; LEITE et al., 2016).

71 *Eugenia jambolana* Lam., conhecida como “jambolão” é usada pela população
72 rural do Brasil para diversos propósitos na medicina popular (BALIGA et al., 2011b;
73 SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013), no entanto, nossos estudos são pioneiros no uso
74 de produtos naturais desta planta em proteção contra o efeito tóxico de metais
75 pesados como o alumínio. Com isso em mente, o objetivo deste estudo foi
76 quantificar os flavonóides presentes no extrato e frações de *Eugenia jambolana*
77 Lam, para identificar sua composição por CL-EM, para determinar o potencial
78 citoprotetor contra a toxicidade do cloreto de alumínio em um modelo procariótico e
79 eucariótico, bem como o mecanismo de citoproteção do extrato e das frações.

80

81 **2. Material e métodos**

82

83 *2.1 Material vegetal*

84

85 Folhas de *Eugenia jambolana* Lam. foram obtidos no Horto Botânico de
86 Plantas Medicinais do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LPPN, da
87 Universidade Regional do Cariri – URCA. Coordenadas: 07° 14' 18,2" de latitude S.
88 e 39° 24' 53" W. de Greenwich. Os materiais vegetais foram identificados e uma
89 exsiccata da espécie foi depositada no herbário Dárdano Andrade Lima da
90 Universidade Regional do Cariri - URCA com o respectivo número de identificação
91 #3107 (família Myrtaceae, espécie *Eugenia jambolana* Lam.).

92

93 *2.2 Preparação do extrato etanólico*

94

95 O extrato etanólico de *E. jambolana* Lam. foi preparado utilizando 1,832 g de
96 folhas previamente trituradas para aumento de superfície de contato e adicionado o
97 álcool etílico a 100% onde permaneceram em temperatura ambiente protegidas do
98 ar e da luz, por um período de 96 horas (Matos, 2002). Posteriormente o macerado
99 foi filtrado e levado a evaporador rotativo (Q-344B – Quimis – Brasil) 40 rpm a 60° C
100 e banho maria, obtendo-se rendimento do extrato bruto de 124.7 g.

101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150

2.3 Preparo da fração flavonoídica

10 g do extrato foi dissolvido em 100 mL de hexano, no qual permaneceu em banho ultrassom por 10 minutos e em seguida foi centrifugado (3000 rpm) por 10 min. O sobrenadante foi separado, sendo adicionado ao resíduo 100 mL de hexano por mais duas vezes, conforme descrito anteriormente. Ao resíduo obtido no final foi adicionado 100 mL de clorofórmio, sendo levado ao ultrassom por 10 min e repetido os mesmos procedimentos anteriores 3 vezes. Ao resíduo obtido nesta etapa foi adicionado 50 mL de acetato de etila e levado ao ultrassom. A fração obtida foi seca no evaporador rotativo e o material obtido foi determinado como fração flavonoídica (Barbosa, 2004).

2.4 Fração tânica

20 g do extrato foi misturado com 50 mL da mistura acetona/água (7:3), agitado em banho ultrassom por 40 minutos a 5°C. Após esse tempo, o material foi filtrado em funil comum com papel filtro e concentrado em evaporador rotativo para a evaporação da acetona ficando com a fase aquosa. A fase aquosa foi particionada com éter de petróleo (3 vezes de 50 mL) e destilada em evaporador rotativo para garantir a evaporação total do éter de petróleo, em seguida o material foi liofilizado a partir da fase aquosa para originar a fração tânica (TERRILL et al., 1992).

2.5 Análise do extrato etanólico de eugenia jambolana e frações por cromatografia líquida em espectrofotômetro de massa (CL-EM)

As soluções dos estudos foram selecionadas e submetidas individualmente a análise por CL-EM, utilizando uma coluna octadecilsilano (250 x 4.6 mm, 5 µm, Luna[®] C18, Phenomenex[®]), como fase estacionária e fase móvel composta de 2 solventes: solvente A – 0.1% de ácido fórmico em água ultrapura e solvente B 0,1% de ácido fórmico em metanol (grau CLAE) com fluxo de 1.0 mL/min, em gradiente de acordo com a Tabela 1. A fase estacionária foi mantida a 30°C e o volume injetado foi de 20 µL para as amostras (1 mg/mL) no CLAE-DAD-MS para análises monitoradas de 190 a 400 nm e de 50 a 1000 m/z. As análises desenvolvidas utilizaram um LC-20 Shimadzu[®] equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A, detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP. Acoplado a um espectrômetro de massas ESI-IT da Bruker Daltonics[®], equipado com uma fonte de ionização por electrospray operando no modo de analisador e por captura de ions positivos com trap para dividir o eluente do HPLC e uma taxa de fluxo de 0.2 mL/ min foi introduzido na fonte. Os parâmetros do espectrômetro de massa utilizados foram: tensão capilar de 3.5 kV; temperatura de dessolvatação de 320°C; fluxo de gás de 10 L/ min; pressão de 60 PSI, utilizando nitrogênio como gás de secagem e nebulização.

2.6 Meios de cultura e inoculação de microrganismos

Os microrganismos utilizados foram a bactéria *Escherichia coli* 06 (EC 06) e o fungo *Candida albicans* 40006 (CA INCQS 40006), fornecido pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB e FIOCRUZ através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), respectivamente.

151 Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion – HIA
152 (Difco Laboratories Ltda) na concentração indicada pelo fabricante, Brain Heart
153 Infusion - BHI e Sabouraud Dextrose Agar - SDA (Sambrook et al., 1989,
154 modificado). Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as
155 especificações do fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente. A
156 bactéria foi inoculada em HIA (Difco Laboratories Ltda) e o fungo em SDA. Ambos
157 foram incubados a 35 °C, aproximadamente, durante 24 horas.

158

159 2.7 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

160

161 A Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi realizada por método de
162 microdiluição de caldo. O inóculo foi depositado em solução salina para formar uma
163 suspensão de 105 CFU / mL, as concentrações da amostra variaram de 1024 a 8 µg
164 / mL. Uma solução contendo 900 µL de meio BHI a 10% e 100 µL do inóculo foram
165 colocados em cada um dos *ependorfs*. Em seguida, foram distribuídos 100 µL
166 desta solução em cada poço da placa de microdiluição e foram adicionados 100 µL
167 das amostras ao primeiro poço e passaram em diluições sucessivas para os poços
168 remanescentes na proporção de 1: 1 até o penúltimo poço. O último poço foi
169 preservado para o controle. A placa foi colocada numa incubadora a 35 ° C durante
170 um período de 24 horas (Javadpour et al., 1996). Para ensaios bacterianos,
171 adicionou-se uma solução de Resazurina sódica e água destilada a cada poço (20
172 µL) e as placas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente. Para o
173 desenvolvimento da MIC, a inibição do crescimento foi considerada como os poços
174 que permaneceram com a coloração azul e a não-inibição, aqueles que obtiveram
175 coloração vermelha, quando avaliados para os ensaios de bactérias, ou a ausência
176 de turbidez no meio, quando avaliado para a ensaios de fungos. A Concentração
177 Inibitória Mínima (MIC) foi definida como a menor concentração capaz de inibir o
178 crescimento bacteriano nos poços da placa de microdiluição, tal como detectado
179 macroscopicamente (NCCLS, 2003).

180

181 2.8 Avaliação do potencial efeito citoprotetor em bactérias e fungos contra alumínio

182

183 Para a avaliação do efeito protetor do extrato e das frações sobre o cloreto de
184 alumínio, os *ependorfs* contendo concentrações sub-inibitórias das amostras e
185 suspensões a 105 CFU / ml de *Escherichia coli* 06 (EC 06) e *Candida albicans* (CA
186 40006) foram preparados em BHI médio 10%. A solução foi distribuída nos poços da
187 placa de microdiluição. Imediatamente depois, foram adicionados 100 µL de cloreto
188 de mercúrio ao primeiro poço, seguidos de microdiluições sucessivas à penúltima
189 cavidade. A concentração de metal variou de 10 mM a 0,00488 mM. As placas de
190 microdiluição foram incubadas durante 48 h a 37 ° C numa incubadora. Em seguida,
191 as concentrações bactericidas mínimas (MBC) e a concentração mínima de
192 fungicida (MFC) foram determinadas como a menor concentração capaz de matar
193 toda a população de microrganismos. Foram utilizadas placas de Petri com Agar
194 Infusão de Coração (HIA) para transferir as soluções incubadas nas placas de
195 microdiluição. Uma alíquota de cada poço da placa de microdiluição foi sub-cultivada
196 em placas de HIA. Após 24 horas de incubação a 35 ± 2 °C, a leitura foi feita, com o
197 objetivo de observar o crescimento das colônias. As leituras de MBC e MFC foram
198 realizadas com base no crescimento dos controles microbianos, considerando o
199 MBC e o MFC a menor concentração do extrato e as frações que inibiram o
200 crescimento visível da subcultura (Shadomy et al., 1985).

201
202 *2.9 Testes de alelopatia do extrato e frações de Eugenia jambolana Lam. Allelopathy*
203 *test of the Eugenia jambolana Lam. em sementes de Lactuca sativa L.*
204

205 Foram realizados testes piloto para determinar o efeito alelopático das
206 amostras em estudo. Para realizar o teste, foram utilizados placas de Petri limpas,
207 secas e estéreis. Elas estavam alinhadas com dois discos de papel de filtro, onde
208 foram dispostas 20 (vinte) sementes de Lactuca sativa. Foram adicionados 3 ml das
209 soluções de amostra a cada placa a concentrações de 256 µg / mL, 128 µg / mL e
210 64 µg / mL e as placas foram devidamente identificadas e preparadas em triplicatas.
211 Após a adição da solução, as placas permaneceram embaladas em película plástica
212 (Sobral-Souza et al., 2014). Os experimentos foram conduzidos em uma câmara de
213 germinação a uma temperatura de aproximadamente 25 ° C ± 2 ° C e fotoperíodo
214 natural por sete dias. Os tratamentos foram organizados em um delineamento
215 experimental inteiramente casualizado (CRD), com três repetições de 20 sementes
216 por placa. Os parâmetros analisados no final dos sete dias foram: contando o
217 número de sementes germinadas. As sementes cujas raízes atingiram 1 mm de
218 comprimento ou mais foram consideradas germinadas. Os testes foram feitos em
219 triplicatas e expressos como significativos.
220

221 *2.10 Avaliação do efeito citoprotetor do extrato e frações de E. jambolana em um*
222 *modelo de planta (L. sativa) contra cloreto de alumínio*
223

224 Para realizar o teste, utilizaram-se placas de Petri preparadas conforme
225 relatado anteriormente. Quanto às concentrações utilizou-se uma concentração sub-
226 alelopática do extrato e das frações (64 µg / mL) e do cloreto de alumínio (AlCl₂),
227 variando entre 20 e 1.25 mM. A placa de controle foi umedecida com 3 mL de água
228 destilada estéril. Os experimentos foram conduzidos em uma câmara de germinação
229 a uma temperatura de aproximadamente 25 ° C ± 2 ° C e fotoperíodo natural por
230 sete dias. Os tratamentos foram organizados em um delineamento experimental
231 inteiramente casualizado (CRD), com três repetições de 20 sementes por placa. Os
232 parâmetros analisados no final dos sete dias foram: contagem de sementes
233 germinadas, índice de taxa de germinação (GRI), biometria radicular e radicular,
234 ocorrência de necrose radicular e anormalidades de plântulas, seguindo o Manual de
235 Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). As sementes cujas raízes
236 atingiram 1 mm de comprimento ou mais foram consideradas germinadas. Os testes
237 foram feitos em triplicado e expressos como significativos
238

239 *2.11 Análises estatísticas*
240

241 Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados dos
242 testes químicos e vegetais foram analisados pelo cálculo das médias aritméticas
243 com Bonferroni e ANOVA. Os resultados dos ensaios microbiológicos foram
244 analisados pelo cálculo das médias geométricas utilizando o *software* GraphPad
245 Prism versão 5.0
246

247 **3. Resultados e Discussão**
248

249 A partir da análise cromatográfica das amostras foi possível sugerir a
250 presença dos compostos descritos na figura 1, por meio da semelhança entre

251 espectro de absorção em ultravioleta, razão massa carga e fragmentação (MS²) com
252 dados descritos na literatura e no banco de dados GNPS (Global Natural Products
253 Social Molecular Networking).

254 Na amostra do extrato etanólico de *Eugenia jambolana* Lam., nas condições
255 utilizadas, foi possível observar três compostos de destaque, sendo um derivado
256 glicosilado de quercetina (Figura 1 - composto 1), um derivado glicosilado da
257 miricetina (Figura 1 - composto 2) e o ácido elágico (Figura 1 – composto 3) com
258 tempo de retenção de 5.3 min e 481.05 m/z, 22.4 min e 463.09 m/z, 24.7 min e
259 300.89 m/z, respectivamente (BASTOS et al., 2007; CHO et al., 2004; FISCHER;
260 CARLE; KAMMERER, 2011; HVATTUM, 2002; SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL,
261 2013; SUN et al., 2007).

262 Entre estes compostos, derivados de miricetina e quercetina já foram citados
263 em trabalhos anteriores. Já quanto ao ácido elágico, já havia sido isolado de outras
264 partes da planta, a casca do caule, flores e sementes (Mahmoud et al., 2001;
265 Sagrawat, Mann and Kharya, 2006). Em *screening* fitoquímicos, realizados
266 anteriormente, também foram revelados alcaloides, fenóis, taninos, aminoácidos,
267 carboidratos, saponinas, terpenos e flavonoides que são responsáveis pelas
268 diferentes propriedades medicinais da espécie (YADAV; YADAV; YADAV, 2014).

269 Na amostra da fração tânica de *E. jambolana*, foi possível identificar ácido
270 quínico, tempo de retenção 5 min, 190.93 m/z (Figura 2 – composto 1),
271 catequina/epitaquina, tempo de retenção 12.7 min, 288.95 m/z (Figura 2 – Composto
272 2), procianidina, tempo de retenção 14 min, 577.17 m/z (Figura 2 – composto 3),
273 quercetina, tempo de retenção 29.7 min, 301 m/z (Figura 2 – composto 4),
274 miricetina-3-O- α -arabinopiranosídeo, tempo de retenção 19.3, 449.02 m/z (Figura 2
275 – composto 5), ácido elágico, tempo de retenção 24.8 min e 300.98 m/z (Figura 2 –
276 composto 8) e três compostos derivados de quercetina: quercetina-O-(O-galoil)-
277 hexosídeo, tempo de retenção 21.3 min e 615.12 m/z (Figura 2 – composto 6),
278 quercetina-3-O- β -D-xilofuranosídeo, tempo de retenção 25.2 e 433.08 m/z (Figura 2
279 – compostos 7) e quercetina-O-(O-galoil)-pentosídeo, tempo de retenção 24.2 e
280 433.03 m/z (Figura 2 – composto 9) (BASTOS et al., 2007; CHO et al., 2004;
281 FISCHER; CARLE; KAMMERER, 2011; HVATTUM, 2002; SALDANHA; VILEGAS;
282 DOKKEDAL, 2013; SUN et al., 2007).

283 No que se refere a fração flavonoídica do extrato de *E. jambolana* foram
284 identificados ácido quínico tempo de retenção 5 min, 190.93 m/z (Figura 3 –
285 composto 1), quercetina, tempo de retenção 29.7 min, 301 m/z (Figura 3 – composto
286 2) e derivados de quercetina com tempos de retenção 19.3 min, 449.05m/z, 21.2
287 min, 615.12 m/z, 23.4 min, 463.06 m/z, 24.1 min, 433.1 m/z, 24.7 min, 624.97 m/z,
288 25.6 min, 447.08 m/z, 25.9 min, 585.08, respectivamente (Figura 3 – compostos 3 -
289 9).

290 O extrato etanólico de *E. jambolana* Lam. e frações acrescidas do cloreto de
291 alumínio (AlCl₃) não mostraram concentração bactericida mínima estatisticamente
292 significativa em relação ao controle. Diante disso, a presença dos extratos não
293 mostrou atividade citoprotetor *in vitro* no modelo bacteriano, pois não alterou o perfil
294 de sobrevivência da cepa testada (Figura 4).

295 Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativa para
296 o extrato etanólico de *E. jambolana* Lam. e frações acrescidas do cloreto de alumínio
297 (AlCl₃) na concentração fungicida mínima em relação ao controle. Desta forma,
298 percebe-se que não houve alteração no comportamento de sobrevivência dos
299 microrganismos na presença dos extratos, não havendo atividade citoprotetor no
300 modelo fúngico (Figura 5).

301 A Figura 6 exhibe o resultado da massa seca de caulículos e radículas realizando
302 uma comparação entre o controle com água, a solução apenas com o cloreto de
303 alumínio e a mesma solução acrescidas dos produtos extrato e frações flavonoidica
304 e tânica. Pode-se observar que há uma diferença (embora não tenha mostrado
305 significância estatística) entre as médias de massa seca da amostra submetida
306 apenas ao metal e a mesma submetida ao metal sob efeito dos produtos de *E.*
307 *jambolana*. Enfatizando a atividade do extrato etanólico que mostra um melhor
308 desenvolvimento da composição destas estruturas, até mesmo se comparado ao
309 controle com água. O que permite supor que o extrato tenha interferido não só no
310 crescimento, como em termos de componentes estruturais destas estruturas.

311 Quanto ao teste de citoproteção no modelo de germinação utilizando sementes
312 de alface, observa-se a solução de $AlCl_3$ em todas as concentrações (1,25mM,
313 0,5mM, 0,1mM e 0,05Mm) mostrou diminuição no crescimento das radículas e
314 caulículos, bem como do peso seco das mesmas (figura 6A) quando comparadas ao
315 controle utilizando água. O extrato etanólico (figura 6B), a fração tânica (figura 6C) e
316 flavonoídica (figura 6D) de *E. jambolana* Lam. mostraram efeito citoprotetor neste
317 modelo, uma vez que em relação ao controle foi possível observar que o
318 crescimento e peso seco das radículas e caulículos da alface apresentaram-se
319 maiores.

320 É possível analisar que houve uma maior alteração na massa seca na maior e
321 menor concentração do metal comparada ao crescimento em comprimento da
322 radícula e caulículo, o que pressupõe que embora tenha havido um desenvolvimento
323 dessas estruturas, a massa seca revela um ganho deficiente de componentes
324 estruturais da planta. Desta forma, o crescimento deu-se perante a incorporação de
325 água e não necessariamente a uma melhor condição.

326 Macedo et al. (2011), encontraram resultados semelhantes ao avaliar a resposta
327 fisiológica de diferentes acessos de pinhão-manso em doses variadas de alumínio,
328 obtendo que as doses afetam o crescimento das raízes para todas as procedências,
329 sendo as doses superiores a 3 mg L⁻¹, as mais prejudiciais ao crescimento da planta.
330 Marin et al. (2002), também observaram diminuição da massa seca de raízes
331 proporcional ao aumento das concentrações de alumínio na germinação de
332 sementes de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.).

333 O acúmulo de alumínio ocorre preferencialmente na raiz o que reduz seu
334 crescimento e desenvolvimento, causando um aumento no diâmetro das raízes e
335 diminuição do número de raízes laterais. A literatura relata a diminuição do
336 crescimento das raízes como sintomas iniciais da toxicidade por alumínio (ANIOL,
337 1984; OLIVEIRA; RENA, 1989)

338 O alumínio afeta a parede celular e membrana plasmática. Ao interagir com
339 lipídeos e proteínas da membrana induz modificações na sua fluidez e
340 permeabilidade. Essas mudanças nas propriedades da membrana plasmática pelo
341 Al afetam suas propriedades de transporte de íons (AKESON; MUNNS; BURAU,
342 1989; CALDWELL, 1989; ISHIKAWA; WAGATSUMA, 1998; JONES; KOCHIAN,
343 1997). O comprometimento produzido pelo alumínio pode estar relacionado ao
344 estresse oxidativo através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS)
345 levando a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (BOSCOLO; MENOSSI;
346 JORGE, 2003; JONES et al., 2006; YAMAMOTO; HACHIYA; MATSUMOTO, 1997).
347 No entanto, o estresse oxidativo nas raízes parece não ser a principal causa de
348 inibição do alongamento radicular (YAMAMOTO; KOBAYASHI; MATSUMOTO,
349 2001).

350

351 4. Conclusões

352 Os produtos testados não foram capazes de modificar o perfil de crescimento
 353 dos microrganismos pela concentração bactericida e fungicida mínima. No entanto, a
 354 partir das análises foi possível evidenciar uma atividade citoprotetora de *Eugenia*
 355 *jambolana* Lam. contra alumínio eficaz em modelo vegetal. Principalmente para o
 356 extrato etanólico, uma vez que este produto apresenta variedade de compostos,
 357 exibindo melhores resultados no crescimento e massa seca de caulículo e radículas
 358 na germinação de alface.

359 Diante dos resultados obtidos, o extrato de *Eugenia jambolana* pode
 360 apresentar-se como alternativa para inibir os efeitos tóxicos do alumínio sobre as
 361 raízes das plantas, tendo em vista que este é um problema recorrente e frequente
 362 nos solos das mais diversas regiões, que pode afetar drasticamente o
 363 desenvolvimento da agricultura. Nesse estudo foram abordados o efeito citoprotetor
 364 contra alumínio de compostos flavonoides até agora não estudados e que podem
 365 embasar o desenvolvimento de produtos para aplicação na agricultura.
 366
 367

368 Referências

- 369 AKESON, M. A.; MUNNS, D. N.; BURAU, R. G. Adsorption of Al³⁺ to
 370 phosphatidylcholine vesicles. **BBA - Biomembranes**, v. 986, n. 1, p. 33–40, 1989.
- 371 ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and
 372 applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869–881, 2013.
- 373 ANIOL, A. Induction of aluminum tolerance in wheat seedlings by low doses of
 374 aluminum in the nutrient solution. **Plant physiology**, v. 76, n. 3, p. 551–5, 1984.
- 375 AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga):
 376 propriedades farmacobotânicas , químicas e farmacológicas *Eugenia uniflora* L.
 377 **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 1, p. 55–61, 2003.
- 378 AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P.; IGNACIMUTHU, S. **Syzygium cumini (L.)**
 379 **Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: Folk medicinal and**
 380 **pharmacological evidences****Complementary Therapies in Medicine**, 2013.
- 381 BAG, A. et al. In vitro antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts
 382 against multidrug-resistant human bacterial pathogens. **Microbiological Research**,
 383 v. 167, n. 6, p. 352–357, 2012.
- 384 BALIGA, M. S. et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia*
 385 *jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p.
 386 1776–1789, 2011a.
- 387 BALIGA, M. S. et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia*
 388 *jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p.
 389 1776–1789, 2011b.
- 390 BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates,
 391 and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and
 392 resistance: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 48, n. 1, p. 75–
 393 92, 2002.
- 394 BARON, D. et al. IS *Annona emarginata* CAPABLE OF ACCUMULATE ESSENTIAL
 395 HEAVY METALS WITHOUT DAMAGES IN THE METABOLISM? **Rev. Bras. Frutic**,
 396 v. 39, n. 4, p. 1–7, 2017.
- 397 BASTOS, D. H. M. et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté
 398 (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, n.
 399 3, p. 423–432, 2007.

- 400 BENHERLAL, P. S.; ARUMUGHAN, C. Chemical composition and in vitro antioxidant
401 studies on *Syzygium cumini* fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,
402 v. 87, n. 14, p. 2560–2569, 2007.
- 403 BITYUTSKII, N. et al. Contrasting effect of silicon on iron, zinc and manganese
404 status and accumulation of metal-mobilizing compounds in micronutrient-deficient
405 cucumber. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 74, p. 205–211, 2014.
- 406 BOLDINGH, H. L. et al. Carbohydrate and boron content of styles of “Hass” avocado
407 (*Persea americana* Mill.) flowers at anthesis can affect final fruit set. **Scientia**
408 **Horticulturae**, v. 198, p. 125–131, 2016.
- 409 BOSCOLO, P. R. S.; MENOSSI, M.; JORGE, R. A. Aluminum-induced oxidative
410 stress in maize. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 181–189, 2003.
- 411 CALDWELL, C. R. Analysis of aluminum and divalent cation binding to wheat root
412 plasma membrane proteins using terbium phosphorescence. **Plant physiology**, v.
413 91, n. 1, p. 233–41, 1989.
- 414 CHATTOPADHYAY, D.; SINHA, B. K.; VAID, L. K. Antibacterial activity of *Syzygium*
415 species. **Fitoterapia**, v. 69, p. 356–367, 1998.
- 416 CHO, M. J. et al. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry,
417 blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid
418 chromatography/mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and**
419 **Agriculture**, v. 84, n. 13, p. 1771–1782, 2004.
- 420 COUTINHO, H. et al. Potentiation of Antibiotic Activity by *Eugenia uniflora* and
421 *Eugenia jambolanum*. v. 13, n. 4, p. 1024–1026, 2010.
- 422 DOMINGOS, V. D. et al. Efeito do cobre na atividade da enzima pirogalol peroxidase
423 em plantas de *Myriophyllum aquaticum* cultivadas em solução nutritiva. **Planta**
424 **Daninha**, v. 23, n. 2, p. 375–380, 2005.
- 425 DOS SANTOS, K. K. A et al. Cytotoxic, trypanocidal, and antifungal activities of
426 *Eugenia jambolana* L. **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 1, p. 66–70, 2012.
- 427 DUC, L. et al. Tolerância Ao Alumínio Em Plantas: Toxicidade, Mecanismos E Genes
428 Em Espécies Cultivadas Aluminum Tolerance in Plants: Toxicity, Mechanisms and
429 Genes in Cultivated Species. **Agrociência Pelotas**, v. 14, p. 1–10, 2008.
- 430 DUFFUS, J. H. “ Heavy Metals ”— A Meaningless Term? v. 74, n. 5, p. 793–807,
431 2002.
- 432 EINBOND, L. S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**,
433 v. 84, n. 1, p. 23–28, 2004.
- 434 FAQUIN, V. Solos E Meio Ambiente Nutrição Mineral De Plantas. **Universidade**
435 **Federal de Lavras-UFLA**, v. III, n. FAEPE, p. 186, 2005.
- 436 FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of
437 phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril
438 and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, v. 127, n.
439 2, p. 807–821, 2011.
- 440 GARCIA, S. C.; GIODA, A.; NASCIMENTO, D. B. DO. Common Difficulties Which
441 Occur in Trace Analysis Are Those Which Involve Contamination , Mainly. **Química**
442 **Nova**, v. 20, n. 4, p. 407–411, 1996.
- 443 GUEDES, J. DE A.; LIMA, R. F. DE S.; SOUZA, L. C. DE. Metais pesados em água
444 do rio Jundiá - Macaíba / RN. **Revista de Geologia**, v. 18, n. 2, p. 131–142, 2005.
- 445 GUPTA, G. S. Triterpenoid and other. **Phytochemical Reports**, v. 12, n. 1965, p.
446 225–226, 2014.
- 447 HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu,
448 Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 259–
449 266, 2009.

- 450 HORST, W. J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminium-
451 induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: A review.
452 **Annals of Botany**, v. 106, n. 1, p. 185–197, 2010.
- 453 HVATTUM, E. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using
454 liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry
455 and diode-array detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16,
456 n. 7, p. 655–662, 2002.
- 457 ISHIKAWA, S.; WAGATSUMA, T. Plasma membrane permeability of root-tip cells
458 following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among
459 plant species. **Plant and Cell Physiology**, v. 39, n. 5, p. 516–525, 1998.
- 460 JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S. *Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-
461 induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: A
462 preliminary study. **Toxicology Letters**, v. 132, n. 1, p. 19–25, 2002.
- 463 JAVADPOUR, M. M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell
464 toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107–3113, 1996.
- 465 JONES, D. L. et al. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive
466 oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant, Cell
467 and Environment**, v. 29, n. 7, p. 1309–1318, 2006.
- 468 JONES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Aluminum Interaction with Plasma-Membrane Lipids
469 and Enzyme Metal-Binding Sites and Its Potential Role in Al Cytotoxicity. **FEBS
470 Letters**, v. 400, n. 1, p. 51–57, 1997.
- 471 KUMAR, V.; BAL, A.; GILL, K. D. Susceptibility of mitochondrial superoxide
472 dismutase to aluminium induced oxidative damage. **Toxicology**, v. 255, n. 3, p. 117–
473 123, 2009.
- 474 LAMARCA, E. V. et al. Contribuições do conhecimento local sobre o uso de *Eugenia*
475 spp. em sistemas de policultivos e agroflorestas. **Revista Brasileira de
476 Agroecologia**, v. 8, n. 3, p. 119–130, 2013.
- 477 LEITE, N. F. et al. Efecto citoprotector de extractos de *Eugenia jambolana* y *Psidium*
478 *mtrsinites* DC. A. contra peroxidación lipídica inducida por hierro II. **Acta Toxicol.
479 Argent.**, v. 24, n. 3, p. 187–192, 2016.
- 480 LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas
481 cultivadas**. [s.l: s.n.].
- 482 MACEDO, F. L. DE et al. Efeito do alumínio em plantas de Pinhão-Manso (*Jatropha*
483 *curcas* L.), cultivadas em solução nutritiva Effect of aluminum in plants of *Jatropha*
484 *curcas* L. grown in nutritive solution. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 157–
485 164, 2011.
- 486 MAHMOUD, I. I. et al. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves.
487 **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1239–1244, 2001.
- 488 MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. [s.l: s.n.].
- 489 MARIN, A. et al. Germinação de sementes de guandu sob efeito da
490 dbiodisponibilidade hídrica e de doses subletais de alumínio. **Bragantia**, v. 63, n. 1,
491 p. 13–24, 2004.
- 492 MIGUEL, P. et al. Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas:
493 mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles
494 genéticos. **CES Revista**, v. 24, p. 13–30, 2010.
- 495 MUKHERJEE, P. K. et al. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts
496 of a specific region of West Bengal, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n.
497 1, p. 85–89, 1998.
- 498 NAVARRO-LEÓN, E. et al. Comparative study of Zn deficiency in *L. sativa* and *B.*
499 *oleracea* plants: NH₄⁺ assimilation and nitrogen derived protective compounds. **Plant**

- 500 **Science**, v. 248, p. 8–16, 2016.
- 501 NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that**
- 502 **grow aerobically**. Approved S ed. Wayne, Pennsylvania: [s.n.].
- 503 NOREMBERG, S. Influência da formação de hidroxialuminsilicatos na
- 504 biodisponibilidade do alumínio. 2010.
- 505 OLIVEIRA, L. E. M.; RENA, A. B. Influência do alumínio sobre o comportamento
- 506 nutricional de cultivares de mandioca em solução nutri. **Pesq. agropec. bras.**, v. 24,
- 507 n. 9, p. 1119–1130, 1989.
- 508 OMAR, R. et al. α -Glucosidase inhibitory hydrolyzable tannins from *Eugenia*
- 509 *jambolana* seeds. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 8, p. 1505–1509, 2012.
- 510 PALLU, A. Biossorção de cádmio por linhagens de *Aspergillus* sp. **Universidade de**
- 511 **São Paulo**, n. Dissertação de mestrado, p. 69, 2011.
- 512 PEIXOTO, P. H. P.; PIMENTA, D. S.; CAMBRAIA, J. Alterações morfológicas e
- 513 acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio.
- 514 **Bragantia**, v. 66, n. 1, p. 17–25, 2007.
- 515 PEREIRA, J. F. Soils and Plant Nutrition | Note Initial root length in wheat is highly
- 516 correlated with acid soil tolerance in the field. n. February, p. 79–83, 2018.
- 517 RAO IM, MILES JW, BEEBE SE, H. W. Root adaptations to soils with low fertility and
- 518 aluminium toxicity. **Annals of Botany**, v. 117, n. 7, p. 1–13, 2016.
- 519 RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S. **Biologia Vegetal**. 8^a ed. Rio de Janeiro:
- 520 Guanabara Koogan, 2014.
- 521 RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. Effect of *Eugenia Jambolana*
- 522 seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats.
- 523 **Life Sciences**, v. 75, n. 22, p. 2717–2731, 2004.
- 524 RAVI, K.; SEKAR, D. S.; SUBRAMANIAN, S. Hypoglycemic activity of inorganic
- 525 constituents in *Eugenia jambolana* seed on streptozotocin-induced diabetes in rats.
- 526 **Biological trace element research**, v. 99, n. 1–3, p. 145–55, 2004.
- 527 RICHARDS, K. D. et al. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis*
- 528 *thaliana*. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 409–418, 1998.
- 529 ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. DE. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na
- 530 planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná,
- 531 Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 529–548, 2006.
- 532 ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review.
- 533 **Agronomie**, v. 21, n. 1, p. 3–21, 2001.
- 534 SAHA, S. et al. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of
- 535 extract and fractions of *Eugenia jambolana* root bark and isolation of
- 536 phytoconstituents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 4, p. 651–661,
- 537 2013.
- 538 SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids
- 539 and phenolic acids in *Myrcia bella* cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-
- 540 ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8402–8416, 2013.
- 541 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory**
- 542 **Manual**. [s.l: s.n.].
- 543 SFAKIANAKIS, D. G. et al. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A
- 544 review. **Environmental Research**, v. 137, p. 246–255, 2015.
- 545 SHAFI, P. M. et al. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium*
- 546 *travancoricum* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 414–416, 2002.
- 547 SHAIKH, M. R.; BAQIR-MALEKA, F. A.; NAQVI, S. Partial purification and
- 548 antibacterial studies of extracts from *Eugenia jambolana* Linn and *Vinca rosea* Linn.
- 549 Pak. **Journal Scientific and Industrial Research**, v. 37, n. 6–7, p. 279–280, 1994.

- 550 SHARMA, S. B. et al. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of
551 seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits. **Journal of**
552 **Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2–3, p. 201–206, 2003.
- 553 SHARMA, S. B. et al. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana*
554 in experimental diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p.
555 367–373, 2006.
- 556 SOBRAL-SOUZA, C. E. et al. Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos
557 extratos de *Eugenia uniflora* lineau e *Psidium soblealeanum* Proença & Landrum
558 contra metais pesados. **Revista Ciencias de la Salud**, v. 12, n. 3, p. 401–409, 2014.
- 559 SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: A
560 review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2084–2093,
561 2013.
- 562 STADNIK, A.; OLIVEIRA, M.; ROQUE, N. Levantamento florístico de Myrtaceae no
563 município de Jacobina, Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v.
564 43, n. 1, p. 87–97, 2016.
- 565 SUN, J. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid
566 chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries.
567 **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 679–693, 2007.
- 568 TERRILL, T. H. et al. Determination of extractable and bound condensed tannin
569 concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains.
570 **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 58, n. 3, p. 321–329, 1992.
- 571 TIMBOLA, A. K. et al. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**,
572 v. 73, n. 2, p. 174–176, 2002.
- 573 VIKRANT, V. et al. Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia*
574 *jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats.
575 **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 2, p. 139–143, 2001.
- 576 VULLO, D. L. Interacción En Beneficio Del Medio Ambiente. **Química Viva**, v. 2, p.
577 93–104, 2003.
- 578 WU, Z. et al. Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from
579 increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production.
580 **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 1, 2012.
- 581 YADAV, M.; YADAV, A.; YADAV, J. P. In vitro antioxidant activity and total phenolic
582 content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. **Asian Pacific**
583 **Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. S1, p. S256–S261, 2014.
- 584 YAMAMOTO, Y.; HACHIYA, A.; MATSUMOTO, H. Oxidative Damage to Membranes
585 by a Combination of Aluminum and Iron in Suspension-Cultured Tobacco Cells.
586 **Plant and Cell Physiology**, v. 38, n. 12, p. 1333–1339, 1997.
- 587 YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid Peroxidation Is an Early
588 Symptom Triggered by Aluminum, But Not the Primary Cause of Elongation Inhibition
589 in Pea Roots. **Plant physiology**, v. 125, n. 1, p. 199–208, 2001.
- 590 YAMASHITA, O. M.; GUIMARÃES, S. C. Germinação de sementes de *Conyza*
591 *canadensis* e *C. bonariensis* em função da presença de alumínio no substrato.
592 **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, p. 599–601, 2011.
- 593

Tabela 1. Gradiente de fase móvel utilizado na determinação qualitativa de amostras de *E. jambolana*.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0,00	95	5
60,00	5	95
70,00	0	100
75,00	0	100
80,00	95	5
90,00	95	5

Figura 1. Estruturas dos constituintes identificados no extrato de *Eugenia jambolana*

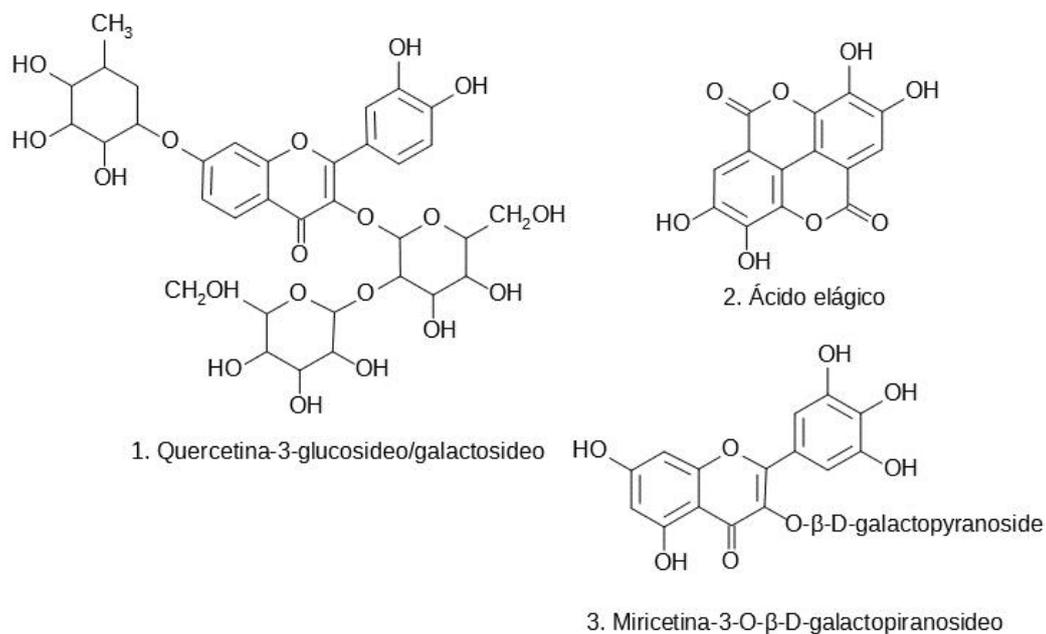


Figura 2. Estruturas dos constituintes identificados na fração tânica de *Eugenia jambolana*.

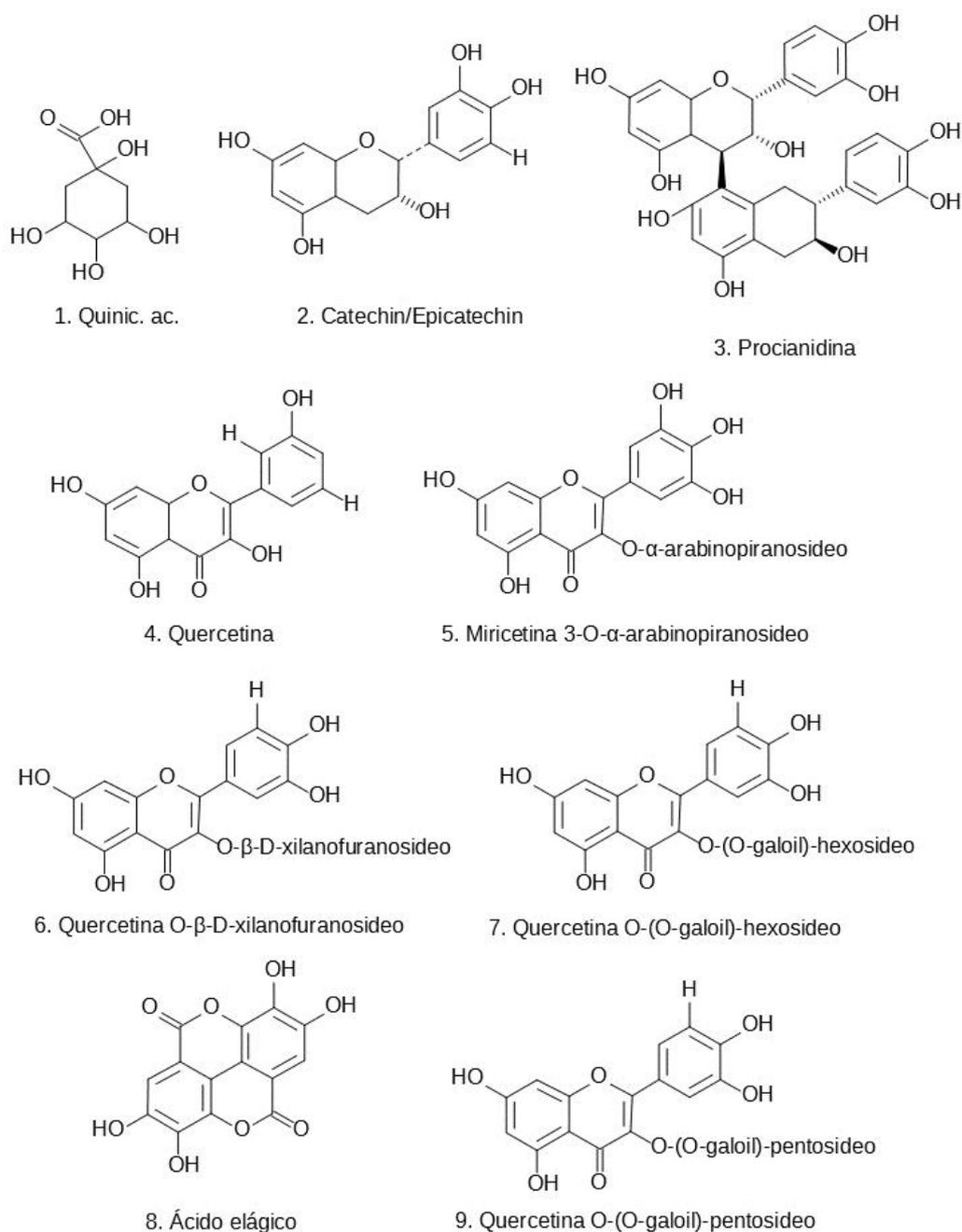
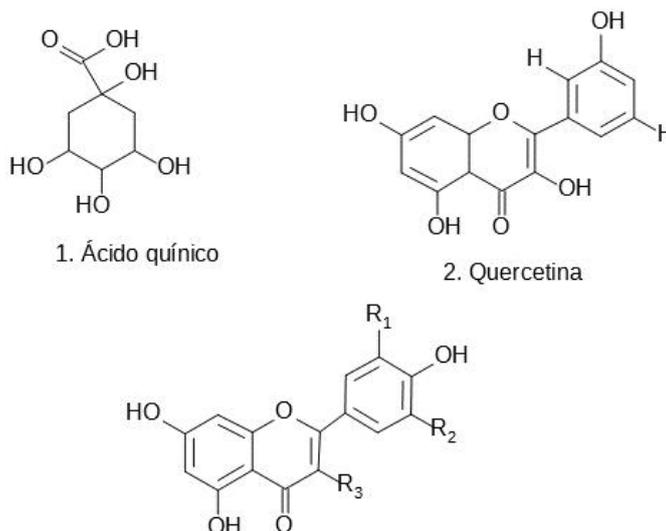
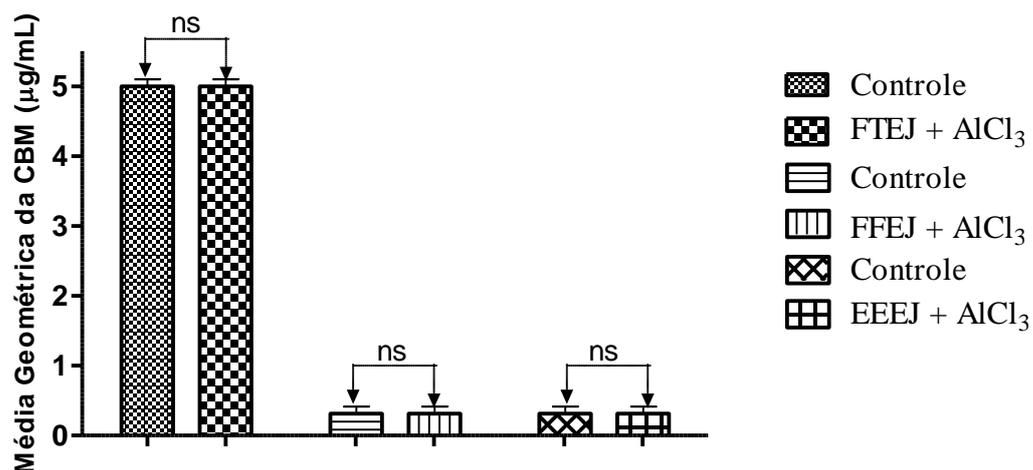


Figura 3. Estruturas dos constituintes identificados na fração flavonoídica do extrato de *Eugenia jambolana*



Compound	R1	R2	R3
3. Miricetina-3- <i>O</i> - α -arabinopiranosídeo	OH	OH	<i>O</i> - α -arabinopiranosídeo
4. Quercetina- <i>O</i> -(<i>O</i> -galoil)-hexosídeo	H	OH	(<i>O</i> -gall)-hex
5. Quercetina-3- <i>O</i> - β -D-galactopiranosídeo	OH	OH	OH
6. Quercetina-3- <i>O</i> - β -D-xilopiranosídeo	H	OH	<i>O</i> - β -D-xilopiranosídeo
7. Quercetina 3-Glicosídeo cafeico	OH	H	<i>O</i> -caff-glc
8. Quercetina <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo	H	H	<i>O</i> - α -L-rhamnopyranosídeo
9. Quercetina <i>O</i> -(<i>O</i> -galoil)-pentosídeo	H	OH	(<i>O</i> -gall)-pent

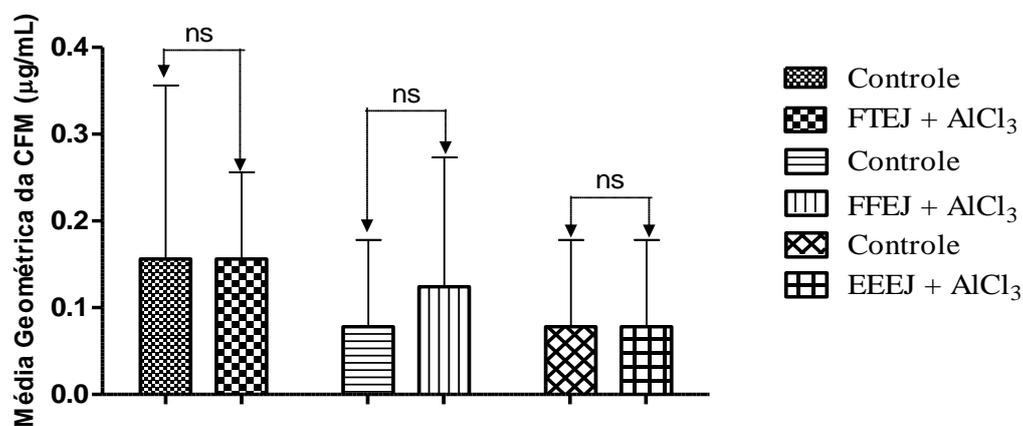
Figura 4. Efeito citoprotetor do extrato e frações de *Eugenia jambolana* contra *Escherichia coli*



ns = Estatisticamente não-significante $p > 0,05$

EEEJ – Extrato etanólico de *Eugenia jambolana*; FFEJ – Fração flavonoídica de *Eugenia jambolana*; FTEJ – Fração Tânica de *Eugenia jambolana*; AlCl₃ – Cloreto de alumínio; CBM - Concentração Bactericida Mínima.

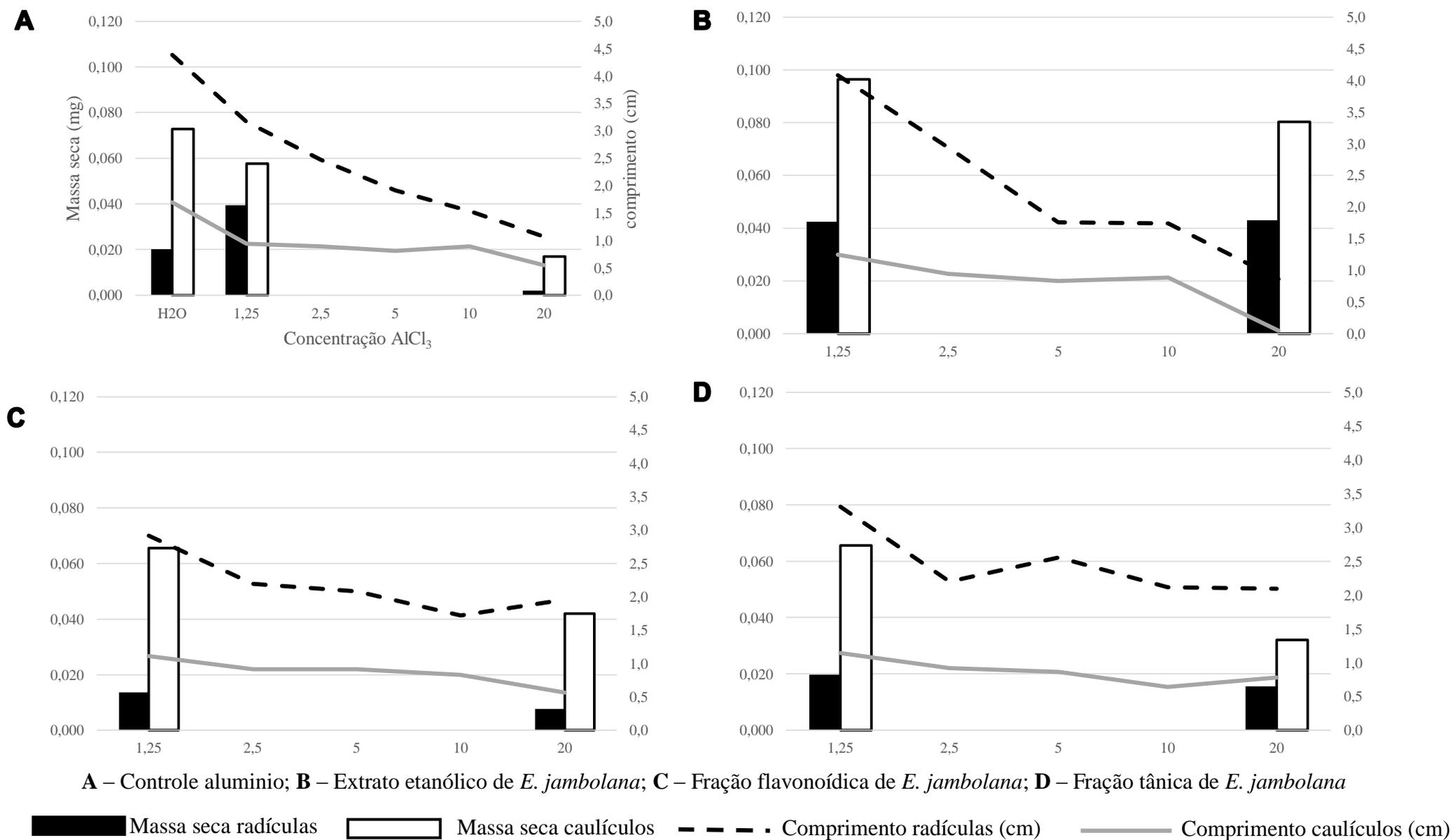
Figura 5. Efeito citoprotetor do extrato e frações de *Eugenia jambolana* contra *Candida albicans*



ns = Estatisticamente não-significante $p > 0,05$

EEEJ – Extrato etanólico de *Eugenia jambolana*; FFEJ – Fração flavonoídica de *Eugenia jambolana*; FTEJ – Fração Tânica de *Eugenia jambolana*; AlCl₃ – Cloreto de alumínio; CFM - Concentração Fungicida Mínima.

Figura 6. Gráficos da massa seca e comprimento de radículas e caulículos de sementes de alface (*Lactuca sativa*) em relação ao extrato etanólico e frações de *E. jambolana* em diferentes concentrações de alumínio.



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os produtos testados não foram capazes de modificar o perfil de crescimento dos microrganismos pela concentração bactericida e fungicida mínima. No entanto, a partir das análises foi possível evidenciar uma atividade citoprotetora de *Eugenia jambolana* Lam. contra alumínio eficaz em modelo vegetal. Principalmente para o extrato etanólico, uma vez que este produto apresenta variedade de compostos, exibindo melhores resultados no crescimento e massa seca de caulículo e radículas na germinação de alface.

Diante dos resultados obtidos, o extrato de *Eugenia jambolana* pode apresentar-se como alternativa para inibir os efeitos tóxicos do alumínio sobre as raízes das plantas, tendo em vista que este é um problema recorrente e frequente nos solos das mais diversas regiões, que pode afetar drasticamente o desenvolvimento da agricultura. Nesse estudo foram abordados o efeito citoprotetor contra alumínio de compostos flavonoides até agora não estudados e que podem embasar o desenvolvimento de produtos para aplicação na agricultura.

ANEXO

ANEXO A – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO A REVISTA: ARABIAN JOURNAL OF CHEMISTRY

Submission Confirmation x Elsevier Editorial System Nova guia x Vanessa de Car...

Seguro | <https://ees.elsevier.com/arabjc/>

Arabian Journal of Chemistry Contact us Help ?

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out Username: hdmcoutinho@gmail.com Switch To: Author Go to: [My EES Hub](#) Version: EES 2017.10

Submissions Being Processed for Author Henrique Douglas Coutinho, Professor

Page: 1 of 1 (2 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	ARABJC-D-17-01721	LC-MS characterization and Reduction of the toxic effect of aluminium by natural products from Eugenia jambolana Lam.	Sep 15, 2017	Sep 17, 2017	Under Review
Action Links	ARABJC-D-17-01179	Synthesis, characterizations, and antibacterial properties of PbMoO ₄ nanocrystals	Jul 06, 2017	Aug 31, 2017	Under Review

Page: 1 of 1 (2 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

[Help](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#) | [About Us](#) Copyright © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved. Cookies are set by this site. To decline them or learn more, visit our [Cookies](#) page.