

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

ESTUDO E APLICAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Eugenia dysenterica* DC E EXTRATOS VEGETAIS DE  
*Capsicum chinense* JACQ

Autora: Larissa Sousa Santos  
Orientadora: Dr<sup>a</sup> Cássia Cristina Fernandes Alves

RIO VERDE – GO  
fevereiro – 2020

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

ESTUDO E APLICAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Eugenia dysenterica* DC E EXTRATOS VEGETAIS DE  
*Capsicum chinense* JACQ

Autora: Larissa Sousa Santos  
Orientadora: Cássia Cristina Fernandes Alves

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de concentração Agroquímica.

RIO VERDE – GO  
fevereiro – 2020

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO  
IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

**Identificação da Produção Técnico-Científica**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese  | <input type="checkbox"/> Artigo Científico              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação                      | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro              |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização                 | <input type="checkbox"/> Livro                          |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação                             | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ |   |

Nome Completo do Autor: Larissa Sousa Santos

Matrícula: 20181033103I0108

Título do Trabalho: ESTUDO E APLICAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia dysenterica* DC E EXTRATOS VEGETAIS DE *Capsicum chinense* JACQ

**Restrições de Acesso ao Documento**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique: \_\_\_\_\_

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

**DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA**

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde GO, 02/04/2020.

Local

Data

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

S237e Santos, Larissa Sousa  
ESTUDO E APLICAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE Eugenia  
dysenterica DC E EXTRATOS VEGETAIS DE Capsicum  
chinense JACQ / Larissa Sousa Santos; orientadora  
Cássia Cristina Fernandes Alves; co-orientador  
Mayker Lázaro Dantas Miranda. -- Rio Verde, 2020.  
70 p.

Dissertação ( em PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA) --  
Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2020.

1. Eugenia dysenterica. 2. Capsicum chinense. 3.  
filmes biodegradáveis. 4. atividade antioxidante. 5.  
atividade antifúngica. I. Cristina Fernandes Alves,  
Cássia, orient. II. Lázaro Dantas Miranda, Mayker,  
co-orient. III. Título.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**ESTUDO E APLICAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL  
DE *Eugenia dysenterica* DC E EXTRATOS VEGETAIS  
DE *Capsicum chinense* JACQ**

Autora: Larissa Sousa Santos  
Orientadora: Cássia Cristina Fernandes Alves

*TITULAÇÃO*: Mestre em Agroquímica – Área de concentração  
Agroquímica.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2020.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Aparecida Josefi  
da Silva  
*Avaliadora externa*  
IESRIVER / Rio Verde

  
Prof. Dr. Eugenio Miranda  
Sperandio  
*Avaliador externo*  
IF Goiano / Rio Verde

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cássia Cristina Fernandes Alves  
*Presidente da Banca*  
IF Goiano / Rio Verde

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, por ter me conduzido até aqui, nos momentos mais difíceis em que pensei que não conseguiria continuar, Ele me deu forças para prosseguir.

Aos meu pais Joenildo Miguel dos Santos e Cleide Maria de Sousa Santos, que sempre me incentivaram a estudar e ir atrás dos meus sonhos, apesar de que vocês não tiveram as mesmas oportunidades que eu tenho, me ensinaram sobre Deus, a ter valores e não negociá-los. Vocês são meus exemplos e eu espero retribuir tudo o que fizeram por mim.

A minha irmã Lidiane, que sempre foi meu exemplo para continuar estudando. A minha irmã Lauriane, que além de ser minha irmã também trabalhou na iniciação científica comigo e me ajudou a desenvolver o projeto, e teve que me ouvir sempre que algo dava errado. A toda a minha família, vó Isabel, vó Lili, minhas tias e tios, minhas primas e primos, em especial a Daiane, que sempre me ajudou com este projeto. Vocês podem sempre contar comigo.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cássia Cristina Fernandes Alves, que me orienta desde a graduação, a quem eu tenho tanto carinho e admiração. Aos professores Dr. João Carlos Perbone de Souza e Dr. Mayker L. Dantas Miranda, que me coorientaram e sempre estiveram dispostos a me ajudar.

A todos os meus colegas do Bloco Agroquímica e do Laboratório de Química de Produtos Naturais, em especial a Flávia, Aline Diniz, Aline Laiane, Aline Sousa, Amanda, Tainara, Isabela e Lauriane, sem vocês eu não teria feito nem metade deste trabalho.

A FAPEG, pelo financiamento da bolsa, ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano–Campus Rio Verde, que é a minha segunda casa, e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pela oportunidade.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Larissa Sousa Santos, filha de Cleide Maria de Sousa Santos e Joenildo Miguel dos Santos, nasceu em 23 de julho de 1996 na cidade de Santa Helena de Goiás – GO. Graduou-se em Licenciatura em Química, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde em março de 2018, no mesmo mês ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica nível Mestrado do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde sob orientação da Professora Dr.<sup>a</sup> Cassia Cristina Fernandes Alves.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Eugenia dysenterica</i> DC .....	1
1.2 <i>Capsicum chinense</i> .....	2
1.3 Produtos Naturais.....	3
1.4 Óleos essenciais e extratos vegetais.....	4
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	5
2. OBJETIVOS .....	9
2.1 OBJETIVO GERAL: .....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	9
3. CAPÍTULO I.....	10
3.1 Introdução.....	11
3.2 Materiais e métodos.....	12
3.2.1 Material vegetal .....	12
3.2.2 Processamento de plantas e extração do óleo essencial.....	12
3.2.3 Análise da composição química do óleo por CG/FID e CG/EM.....	12
3.2.4 Ensaio antibacteriano <i>in vitro</i> contra bactérias Gram-positivas .....	13
3.2.5 Ensaio tripanocida <i>in vitro</i> contra as formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	14
3.3 Resultados e discussões .....	15
3.3.1 Composição do óleo essencial .....	15
3.3.2 Atividade antibacteriana .....	16
3.3.3 Atividade tripanocida.....	17
3.4 Conclusão .....	18
3.5 Referências Bibliográficas.....	18
4. CAPÍTULO II.....	23



4.1	Introdução .....	24
4.2	Materiais e métodos .....	25
4.2.1	Preparo da amostra .....	25
4.2.2	Extração e obtenção do extrato etanólico.....	26
4.2.3	Rendimento da extração EECC.....	26
4.2.4	Caracterização de compostos fenólicos por CL-EM.....	26
4.2.5	Fenólicos Totais .....	27
4.2.6	Avaliação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP	27
4.2.7	Preparação dos filmes com EECC .....	27
4.2.8	Morfologia por microscopia eletrônica de varredura.....	28
4.2.9	Caracterização dos filmes incorporados com EECC .....	28
4.2.9.1	Espessura dos filmes .....	28
4.2.9.2	Teor de umidade.....	28
4.2.9.3	Solubilidade em água .....	28
4.2.9.4	Biodegradabilidade .....	29
4.2.9.5	Taxa de transmissão de luz (UV-VIS) .....	29
4.2.9.6	Análise de cor.....	29
4.2.10	Análise estatística.....	29
4.3	Resultados e discussões .....	30
4.4	Conclusão.....	38
4.5	Referências Bibliográficas .....	38
5.	CAPÍTULO III.....	42
5.1	Introdução .....	43
5.2	Materiais e métodos .....	45
5.2.1	Material vegetal .....	45
5.2.2	Obtenção dos extratos.....	45

5.2.3	Rendimento de extração .....	45
5.2.4	Ensaio antifúngico .....	45
5.2.5	Análise estatística .....	46
5.3	Resultados e discussões.....	46
5.3.1	Rendimento de extração .....	46
5.3.2	Atividade antifúngica .....	47
5.4	Conclusão.....	51
5.5	Referências Bibliográficas .....	51
6.	CONCLUSÕES GERAIS .....	55

## ÍNDICE DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1. Constituintes químicos do óleo essencial de folhas seca de <i>E. dysenterica</i> (OE-Ed).....	15
Tabela 2. Valores de concentrações inibitórias mínimas (CMI) em $\mu\text{g/mL}$ de óleo essencial de folhas secas de <i>E. dysenterica</i> (OE-Ed) contra bactérias cariogênicas selecionadas .....	16
Tabela 3. Atividade tripanocida do óleo essencial de folhas secas de <i>E. dysenterica</i> (OE-Ed) contra as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	17

### Capítulo II

Tabela 1. Substâncias identificadas no EECC por LC-MS $[[M - H]^-]$ (modo negativo)].....	30
Tabela 2. Substâncias identificadas no EECC por LC-MS $[[M +H]^+]$ (modo positivo)].....	31
Tabela 3. Teor de fenólicos totais (FT) e atividade antioxidante do EECC, esta última avaliada pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP (in $\mu\text{g/mL}$ ) .....	32
Tabela 4. Espessura, umidade e solubilidade dos filmes de araruta incorporados com EECC.....	34
Tabela 5. Medidas de cores dos filmes.....	37

### Capítulo III

Tabela 1. Valores médios da massa e rendimento percentual dos extratos de <i>C. chinense</i> .....	48
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo I

- Figura 1. Árvore e frutos de *E. dysenterica*. Fonte: de Sousa, Camilo & Vera (2018)... 1  
 Figura 2. Frutos de pimenta-biquinho, *C. chinense*..... 2

### Capítulo II

- Figura 1. Micrografias da área superficial do filme de amido sem adição de EECC (FAP1) .....33  
 Figura 2. Micrografias da área superficial do filme de amido com adição de 250 µL de EECC (FAP2) .....33  
 Figura 3. Micrografias da área superficial do filme de amido com adição de 500 µL de EECC (FAP3) .....33  
 Figura 4. Micrografias da área superficial do filme de amido com adição de 750 µL de EECC (FAP4) .....33  
 Figura 5. Micrografias da área superficial do filme de amido com adição de 1000 µL de EECC (FAP5) .....34  
 Figura 6. Filmes de amido de araruta incorporados com EECC. FAP1: Filme de amido de araruta sem EECC; FAP2: Filme de amido de araruta com 0,25% de EECC; FAP3: Filme de amido de araruta com 0,50% de EECC; FAP4: Filme de amido de araruta com 0,75% de EECC.....36  
 Figura 7. Taxa de transmissão de luz Uv-vis de filmes de araruta incorporados com diferentes doses de EECC.....37

### Capítulo III

- Figura 1. Rendimento de extração conforme a polaridade dos solventes.....48  
 Figura 2. Percentual de inibição micelial dos extratos EHCC, EACC, EMCC frente ao fungo *S. sclerotiorum*..... 49  
 Figura 3. Percentual de inibição micelial do extrato EHCC frente ao fungo *R. stolonifer*.. ..... 50  
 Figura 4. Percentual de inibição micelial do extratos EHCC frente ao fungo *Colletotrichum gloesporioides*.....51

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

<b>ABTS</b>	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
<b>ATCC 25975</b>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<b>ATCC 33478</b>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
<b>ATCC 25175</b>	<i>Streptococcus mutans</i>
<b>ATCC 49456</b>	<i>Streptococcus mitis</i>
<b>ATCC 10556</b>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<b>BDA</b>	Batata-dextrose-ágar
<b><i>C. chinense</i></b>	<i>Capsicum Chinense</i>
<b>CG-FID</b>	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
<b>CG-MS</b>	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
<b>CHD</b>	Dicloridrato de clorexidina
<b>CL-EM</b>	Cromatógrafo Líquido acoplado ao espectrômetro de Massas
<b>CMI</b>	Concentração Mínima Inibitória
<b>CN</b>	Ausência do extrato
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPPH</b>	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b><i>E. dysenterica</i></b>	<i>Eugenia dysenterica</i> DC
<b>EACC</b>	Extrato acetato de etila de <i>Capsicum chinense</i>
<b>EECC</b>	Extrato etanólico dos frutos maduros de <i>Capsicum chinense</i>
<b>EHCC</b>	Extrato hexânico de <i>Capsicum chinense</i>
<b>EMCC</b>	Extrato metanólico de <i>Capsicum chinense</i>
<b>FAP1</b>	Filme de amido de araruta sem EECC
<b>FAP2</b>	Filme de amido de araruta com 0,25% de EECC
<b>FAP3</b>	Filme de amido de araruta com 0,50% de EECC
<b>FAP4</b>	Filme de amido de araruta com 0,75% de EECC
<b>FAP5</b>	Filme de amido de araruta com 1% de EECC
<b>FRAP</b>	Ferric reducing antioxidant power
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória de 50%
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura

<b>OE-Ed</b>	Óleo essencial de folhas secas de <i>Eugenia dysenterica</i>
<b>PIC</b>	percentual de inibição do crescimento micelial
<b><i>S. sanguinis</i></b>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<b><i>S. sobrinus</i></b>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
<b><i>S. salivarius</i></b>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<b><i>S. mutans</i></b>	<i>Streptococcus mutans</i>
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TR</b>	Tempo de retenção
<b>IR<sub>exp</sub></b>	Índice de retenção determinado em relação aos n-alcenos (C <sub>8</sub> -C <sub>20</sub> )
<b>IR<sub>lit</sub></b>	Índice de retenção da literatura

## RESUMO

SANTOS, LARISSA SOUSA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, fevereiro de 2020. **Estudo e aplicações do óleo essencial de *Eugenia dysenterica* DC e extratos vegetais de *Capsicum chinense* JACQ.** Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Cássia Cristina Fernandes Alves. Coorientadores: Dr. João Carlos Perbone de Souza e Dr. Mayker L. Dantas Miranda.

Óleos essenciais e extratos vegetais são produtos naturais que podem ser extraídos das plantas. As espécies da família Myrtaceae e do gênero *Capsicum* apresentam grande variedade de compostos bioativos com propriedades biológicas, como antioxidante, antibacteriana, tripanocida e antifúngica. Com isto, objetivou-se extrair o óleo essencial das folhas secas de *E. dysenterica* DC e preparar extratos de *Capsicum chinense* JACQ para avaliar as suas propriedades químicas e biológicas. O OE-Ed foi extraído por hidrodestilação, os extratos de pimenta foram preparados utilizando o processo de maceração com diferentes solventes e calculados seus respectivos rendimentos. A identificação da composição química de OE-Ed foi realizada por detector de ionização de chama por cromatografia em fase gasosa (CG/FID) e espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa (CG/EM). As suas atividades biológicas *in vitro* foram investigadas contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e bactérias do gênero *Streptococcus*. O perfil químico do EECC foi analisado por cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (CL-EM) e avaliado a sua atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP. Em adição, foram preparados filmes biodegradáveis através da incorporação do EECC em biofilmes de Araruta. A atividade antifúngica de EHCC, EACC e EMCC foram avaliadas frente aos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum gloesporioides*. Como resultados, o OE-Ed apresentou o total de 24 compostos, foi altamente ativo quando testado contra formas tripomastigotas de *T.cruzi* e moderada ação contra patógenos orais. A espécie *C. chinense* apresentou alta concentração de substâncias químicas polares em relação as substâncias apolares. O EECC demonstrou promissora atividade antioxidante de acordo com os testes realizados, pela elevada concentração de compostos fenólicos presentes na pimenta biquinho. A alta atividade antioxidante do EECC foi expressa em valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) para os reagentes DPPH (IC<sub>50</sub> = 18.04

$\mu\text{g/mL}$ ), ABTS ( $\text{IC}_{50} = 25.33 \mu\text{g/mL}$ ) e FRAP ( $\text{IC}_{50} = 128.58 \mu\text{g/mL}$ ). Os filmes obtidos pela técnica de *Casting* e incorporados com EECC, demonstraram-se uniformes, com estrutura granulada na área superficial e leve rugosidade conforme se aumentava a concentração do extrato, estes exibiram aumento nos aspectos espessura, coloração e teor de umidade variável, além da diminuição da solubilidade. Os extratos EHCC, EACC e EMCC apresentaram percentuais de inibição micelial para o fungo *S. sclerotiorum*, no entanto, os extratos apolares exibiram as melhores atividades. Para os fungos *R. stolonifer* e *C. gloesporioides* apenas o EHCC apresentou atividade.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Eugenia dysenterica*; *Capsicum chinense*; filmes biodegradáveis; atividade antioxidante, atividade antifúngica.



## ABSTRACT

SANTOS, LARISSA SOUSA. Goiano Federal Institute of Education, Science and Technology - Rio Verde Campus, February 2020. **Study and applications of *Eugenia dysenterica* DC essential oil and plant extracts of *Capsicum chinense* JACQ.** Advisor: Dr.<sup>a</sup> Cássia Cristina Fernandes Alves. Co-advisors: Dr. João Carlos Perbone de Souza and Dr. Mayker L. Dantas Miranda.

Essential oils and plant extracts are natural products that can be extracted from plants. The Myrtaceae family and the *Capsicum* genus species present a wide variety of bioactive compounds with biological properties, such as antioxidant, antibacterial, trypanocidal and antifungal. With this, it is possible to extract the essential oil from the dry leaves of *E. dysenterica* DC and prepare extracts of *C. chinense* to evaluate its chemical and biological properties. The OE-Ed was extracted by hydrodistillation, and the pepper extracts were prepared using the maceration process with different solvents and their respective yields were calculated. A flame ionization detector was used to identify the chemical composition of OE-Ed by gas chromatography (CG/FID) and mass spectrometry by gas chromatography (CG/EM). Then *in vitro* biological activities were investigated against trypanomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and bacteria of the genus *Streptococcus*. A liquid chromatograph coupled to the high-resolution mass spectrometer (CL-EM) analyzed the EECC chemical profile and its antioxidant activity was evaluated by the DPPH, ABTS and FRAP methods. In addition, biodegradable films were prepared by incorporating EECC into arrowroot biofilms. The EHCC, EACC and EMCC antifungal activity were evaluated against the fungi *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* and *Colletotrichum gloesporioides*. As a result, OE-Ed presented a total of 24 compounds, was highly active when tested against trypanomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and moderate action against oral pathogens. The species *C. chinense* showed a high concentration of polar chemical substances in relation to nonpolar substances. The EECC demonstrated promising antioxidant activity according to the tests carried out, due to the phenolic compound high concentration present in the beak pepper. The EECC high antioxidant activity was expressed in IC<sub>50</sub> values ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) for DPPH reagents (IC<sub>50</sub> = 18.04  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), ABTS (IC<sub>50</sub> = 25.33  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) and FRAP (IC<sub>50</sub> = 128.58  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). The films obtained by the Casting technique and incorporated with EECC, proved to be uniform, with a granular structure in the surface area and slight roughness as the

concentration of the extract increased, these showed an increase in the aspects thickness, color and variable moisture content, in addition to decreased solubility. The EHCC, EACC and EMCC extracts showed mycelial inhibition percentage for the fungus *S. sclerotiorum*, however, nonpolar extracts showed the best activities. For fungi *R. stolonifer* and *C. gloesporioides* only the EHCC showed activity.

**KEY WORDS:** *Eugenia dysenterica*; *Capsicum chinense*; biodegradable films; antioxidant activity, antifungal activity.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Eugenia dysenterica* DC

O Cerrado brasileiro é o segundo maior bioma do país. Abrange os Estados do Distrito Federal, Goiás, Tocantins, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e outros. Possui grande diversidade de espécies vegetais com potencial medicinal. No entanto, apesar da biodiversidade do Cerrado apenas 8% das plantas foram estudadas em relação aos seus compostos bioativos (da Conceição, Ruggieri, Araújo, da Conceição, & da Conceição, n.d.; Ribeiro Neto et al., 2020).

A espécie *Eugenia dysenterica* DC pertence à família Myrtaceae, conhecida no Brasil como cagaita ou cagaiteira (Figura 1). É uma árvore frutífera, originária do Cerrado, podendo atingir até 10 metros de altura. Seus frutos são levemente ácidos com coloração amarelo-claro, quando maduros são utilizados principalmente para consumo *in natura* ou para produção de geleias e suco (Fidelis-de-Oliveira et al., 2020; SILVA, CHAVES, & NAVES, 2001).



**Figura 1.** Arvore e frutos de *E. dysenterica*. Fonte: de Sousa, Camilo & Vera (2018).

Esta espécie possui propriedades medicinais, cosméticas e dermatológicas. Os frutos possuem ação antioxidante e laxante e o extratos das suas folhas e cascas são utilizados no tratamento de diabetes e como antidiarrético (Ferreira-Nunes et al., 2018; Silveira et al., 2019). Correia et al., 2016, identificou que os extratos das folhas da espécie

*E. dysenterica* apresenta bom potencial antifúngico contra espécies patogênicas de *Candida spp.*

## 1.2 *Capsicum chinense* JACQ

As pimentas do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae, compreendendo 38 espécies, sendo apenas seis domesticadas e amplamente cultivadas pelo homem, *Capsicum annuum*; *Capsicum baccatum*; *Capsicum chinense*; *Capsicum frutescens*, *Capsicum assamicum* e *Capsicum pubescens*. Os frutos de *Capsicum* geralmente apresentam diversidade de substâncias químicas como os carotenoides, capsaicinoides, compostos fenólicos e vitaminas, os quais são considerados benéficos para o organismo humano (Dubey et al., 2019; Ramchiary, Kehie, Brahma, Kumaria, & Tandon, 2014).

Estes frutos também apresentam benefícios para o organismo dos animais. Chen et al., 2019, relata alguns trabalhos com suplementação de *Capsicum* em alimentação animal, os quais apresentaram efeitos positivos, na ingestão de alimentos, no sistema imunológico e na produção de leite de vacas leiteiras. Além disso, apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticancerígenas



(Jaiswal et al., 2019).

**Figura 2.** Frutos de pimenta-biquinho, *C. chinense*.

A espécie *Capsicum chinense* Jacq é originária da Amazônia, e seus frutos apresentam ampla variabilidade de cores, formatos, tamanhos, sabores, aromas e pungência (Baruah, Pandey, Sarmah, & Lal, 2019; Ramchiary et al., 2014). A pimenta-biquinho (Figura 2) é uma das variedades de *C. chinense*, é uma pimenta cultivada em várias regiões do Brasil. Seus frutos apresenta sabor doce, baixa pungência, coloração

verde quando imaturos e vermelha quando maduros (Ribeiro, de Carvalho, Heinrich, & Reifschneider, 2018). Esta pimenta apresenta grande potencial nutricional assim como as outras do seu gênero, no entanto o seu uso ainda é limitado a utilização em molhos, saladas e ornamentação de pratos (Garruti et al., 2013).

### 1.3 Produtos Naturais

Os compostos bioativos presentes nas plantas têm a função de protegê-las de ataques microbiológicos. Eles podem ser extraídos de diversas partes das plantas, folhas, caule, raízes, sementes, flores e frutos na forma de extratos vegetais e óleos essenciais (Baptista, Horita, & Sant'Ana, 2020).

No entanto, estas substâncias químicas também apresentam propriedades medicinais benéficas ao ser humano, como ação anti-inflamatória, antibacteriana e no tratamento de câncer (Baptista et al., 2020; Huang et al., 2019) A enorme diversidade química e estrutural dos produtos naturais teve papel importante no processo de desenvolvimento dos medicamentos (Kalkreuter, Pan, Cepeda, & Shen, 2019; Shen, 2015).

A própolis por exemplo, é utilizada desde a antiguidade na medicina tradicional, no tratamento de infecções bucais e cutâneas. Na atualidade, estudos com o extrato de própolis apresentaram efeito antibacteriano em *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Além disso possui potencial antifúngico nas espécies *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida albicans* (Zabaiou et al., 2017).

Os produtos naturais também estão sendo utilizados na agricultura. Substâncias químicas antioxidantes extraídas de plantas, podem ser utilizadas para evitar o processo de corrosão de equipamentos e estruturas metálicas (Matos, Tabora, Banczek, D'Elia, & Rodrigues, 2019). Outra aplicação na agricultura é utilizar produtos naturais como alternativa aos defensivos agrícolas sintéticos, visto que o uso excessivo destes podem causar danos à saúde humana e ao meio ambiente, além de tornarem as plantas daninhas mais resistentes aos herbicidas (Díaz-Tielas, Graña, Reigosa, & Sánchez-Moreiras, 2016).

Os produtos naturais com propriedades bioativas como antioxidante e antifúngica também estão sendo aplicados em embalagens e revestimentos biodegradáveis para incorporar os compostos ativos nestes. Estas embalagens são alternativas as embalagens convencionais e podem ajudar na proteção dos alimentos,

prolongando o tempo de vida útil dos alimentos (Baptista et al., 2020; Roy, Thory, Sinhmar, Pathera, & Nain, 2020).

#### **1.4 Óleos essenciais e extratos vegetais**

Óleos essenciais e extratos são produtos naturais extraídos de plantas com propriedades variadas. Por serem naturais, muitos deles não são tóxicos para a saúde humana e ao meio ambiente (Díaz-Tielas et al., 2016), e tornaram uma alternativa para os diversos produtos sintéticos com a mesma função. Neste contexto, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas para explorar a composição química, a eficiência e a aplicabilidade destes produtos (Pateiro et al., 2018).

Os óleos essenciais são uma mistura de substâncias voláteis, cerca de 20 a 60 constituintes variados, produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários, com forte odor característico. São armazenados em células secretoras de diversas partes das plantas, desde a raiz até os frutos. Monoterpenos e sesquiterpenos geralmente são os componentes principais encontrados, e são os compostos principais que geralmente determinam as propriedades principais dos óleos essenciais (Chen et al., 2019; Tariq et al., 2019).

Os extratos de plantas apresentam uma mistura de mais de centenas de compostos com propriedades sinérgicas. Os compostos bioativos presentes em matrizes de origem vegetal e animal podem ser extraídos por diferentes métodos, como a extração Soxhlet e maceração, estas técnicas se baseiam na capacidade de extração de diferentes solventes e pela aplicação de calor e/ou agitação. No entanto, a escolha do solvente vai definir a eficiência da extração, pois a polaridade do composto alvo deve ser o mesmo do solvente (Azmir et al., 2013; Kharbach, Marmouzi, El Jemli, Bouklouze, & Vander Heyden, 2020).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Baptista, R. C., Horita, C. N., & Sant'Ana, A. S. (2020, January 1). Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: A review. *Food Research International*, Vol. 127. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108762>
- Baruah, J., Pandey, S. K., Sarmah, N., & Lal, M. (2019). Assessing molecular diversity among high capsaicin content lines of *Capsicum chinense* Jacq. using simple sequence repeat marker. *Industrial Crops and Products*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111769>
- Chen, F., Liu, S., Zhao, Z., Gao, W., Ma, Y., Wang, X., ... Luo, D. (2019). Ultrasound pre-treatment combined with microwave-assisted hydrodistillation of essential oils from *Perilla frutescens* (L.) Britt. leaves and its chemical composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*, 111908. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111908>
- Chen, X. J., Nedelkov, K., Oh, J., Harper, M. T., Wall, E. H., Felix, T. L., & Hristov, A. N. (2019). Effect of a blend of artificial sweetener and capsicum on productive performance and blood chemistry in growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 258. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114308>
- Correia, A. F., Silveira, D., Fonseca-Bazzo, Y. M., Magalhães, P. O., Fagg, C. W., da Silva, E. C., ... de Medeiros Nóbrega, Y. K. (2016). Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1164-3>
- da Conceição, G. M., Ruggieri, A. C., Araújo, M. de F. V., da Conceição, T. T. M. M., & da Conceição, M. A. M. M. (n.d.). Plantas do Cerrado: Comercialização, Uso e Indicação Terapêutica Fornecida pelos Raizeiros e Vendedores, Teresina, Piauí | da Conceição | Scientia Plena. Retrieved January 11, 2020, from

<https://www.scienciaplena.org.br/sp/article/view/23/421>

- de Sousa, E. R. B., Camilo, Y. M. V., & Vera, R. (2018). Cagaita— *Eugenia dysenterica*. In *Exotic Fruits* (pp. 77–83). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803138-4.00011-3>
- Díaz-Tielas, C., Graña, E., Reigosa, M. J., & Sánchez-Moreiras, A. M. (2016). Atividades Biológicas e Novas Aplicações das Chalconas. *Planta Daninha*, 34(3), 607–616. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582016340300022>
- Dubey, M., Jaiswal, V., Rawoof, A., Kumar, A., Nitin, M., Chhapekar, S. S., ... Ramchiary, N. (2019). Identification of genes involved in fruit development/ripening in *Capsicum* and development of functional markers. *Genomics*, 111(6), 1913–1922. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.01.002>
- Ferreira-Nunes, R., Silva, S. M. M. da, Souza, P. E. N. de, Magalhães, P. de O., Cunha-Filho, M., Gratieri, T., & Gelfuso, G. M. (2018). Incorporation of *Eugenia dysenterica* extract in microemulsions preserves stability, antioxidant effect and provides enhanced cutaneous permeation. *Journal of Molecular Liquids*, 265, 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.023>
- Fidelis-de-Oliveira, P., Aparecida-Castro, S., Silva, D. B., Morais, I. B. de M., Miranda, V. H. M. de, de Gobbi, J. I., ... Bispo-da-Silva, L. B. (2020). Hypotensive effect of *Eugenia dysenterica* leaf extract is primarily related to its vascular action: The possible underlying mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology*, 251. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112520>
- Garruti, D. dos S., Pinto, N. de O. F., Alves, V. C. C., Penha, M. F. A. da, Tobaruela, E. D. C., & Araújo, Í. M. da S. (2013). Perfil de voláteis e qualidade sensorial de novas variedades de pimentas *Capsicum chinense*. *Food Science and Technology*, 33(SUPPL.1), 102–108. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000500016>
- Huang, X. mei, Yang, Z. jie, Xie, Q., Zhang, Z. kang, Zhang, H., & Ma, J. ying. (2019, September 1). Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Vol. 117. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109142>
- Jaiswal, V., Rawoof, A., Dubey, M., Chhapekar, S. S., Sharma, V., & Ramchiary, N. (2019). Development and characterization of non-coding RNA based simple



- sequence repeat markers in *Capsicum* species. *Genomics*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.09.005>
- Kalkreuter, E., Pan, G., Cepeda, A. J., & Shen, B. (2019, January 1). Targeting Bacterial Genomes for Natural Product Discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.11.002>
- Kharbach, M., Marmouzi, I., El Jemli, M., Bouklouze, A., & Vander Heyden, Y. (2020, January 5). Recent advances in untargeted and targeted approaches applied in herbal-extracts and essential-oils fingerprinting - A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 177.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112849>
- Matos, L. A. C., Taborda, M. C., Banczek, E. do P., D'Elia, E., & Rodrigues, P. R. P. (2019). Aqueous Agro-Industrial Waste as Corrosion Inhibitor for Stainless Steel AISI 304 in Acidic Media. *Materials Research*, 22(5).  
<https://doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2018-0695>
- Pateiro, M., Barba, F. J., Domínguez, R., Sant'Ana, A. S., Mousavi Khaneghah, A., Gavahian, M., ... Lorenzo, J. M. (2018). Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 113, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.014>
- Ramchiary, N., Kehie, M., Brahma, V., Kumaria, S., & Tandon, P. (2014, March 1). Application of genetics and genomics towards *Capsicum* translational research. *Plant Biotechnology Reports*, Vol. 8, pp. 101–123. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0306-z>
- Ribeiro, C. S. d. C., de Carvalho, S. I. C., Heinrich, A. G., & Reifschneider, F. J. B. (2018). BRS tui: A new biquinho-type pepper cultivar released by embrapa. *Horticultura Brasileira*, 36(4), 526–528. <https://doi.org/10.1590/s0102-053620180417>
- Ribeiro Neto, J. A., Pimenta Tarôco, B. R., Batista dos Santos, H., Thomé, R. G., Wolfram, E., & Maciel de A. Ribeiro, R. I. (2020). Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 112547. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112547>
- Roy, K., Thory, R., Sinhmar, A., Pathera, A. K., & Nain, V. (2020). Development and

- characterization of nano starch-based composite films from mung bean (*Vigna radiata*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 242–251.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.113>
- Shen, B. (2015, December 3). A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. *Cell*, Vol. 163, pp. 1297–1300. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.031>
- SILVA, R. S. M., CHAVES, L. J., & NAVES, R. V. (2001). CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS E ÁRVORES DE CAGAITA (*Eugenia dysenterica* DC.) NO SUDESTE DO ESTADO DE GOIÁS, BRASIL. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23(2), 330–334. <https://doi.org/10.1590/s0100-29452001000200026>
- Silveira, A. A. da C., Gonçalves, L. A., Silva, E. C. e, Sales, N. da S., Silva, L. C. da, & Sibov, S. T. (2019). Shoot proliferation, leaf anatomy and pigment content of *Eugenia dysenterica* growing in conventional and natural ventilation systems. *Revista Ceres*, 66(5), 363–371. <https://doi.org/10.1590/0034-737x201966050005>
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., ... Rather, M. A. (2019, September 1). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, Vol. 134. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Zabaiou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., & Lobaccaro, J. M. A. (2017, October 1). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol. 207, pp. 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005>

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral:

O objetivo geral deste trabalho é extrair o óleo essencial das folhas secas de *E. dysenterica* e preparar extratos de *C. chinense* para avaliar as propriedades químicas e biológicas do óleo essencial e dos extratos.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Identificar a composição química das folhas secas do OE-Ed;
- Avaliar as atividades tripanocidas e antibacterianas *in vitro* das folhas secas do OE-Ed;
- Preparar extratos dos frutos de *C. chinense* com diferentes solventes;
- Verificar o rendimento dos extratos produzidos;
- Analisar a ação antioxidante do EECC;
- Desenvolver filmes biodegradáveis e ativos à base de fécula de araruta incorporados com EECC e caracterizar a sua morfologia, suas propriedades físicas, ópticas e de biodegradabilidade.
- Avaliar a ação antifúngica de EHCC, EACC e EMCC frente à *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum gloeosporioides*;

### 3. CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a revista Journal of Essential Oil Bearing Plants)

#### **Composição química, atividades tripanocidas e antibacterianas *in vitro* do óleo essencial de folhas secas de *Eugenia dysenterica* DC do Brasil**

**Resumo:** Os produtos naturais são uma fonte muito importante de biomoléculas de medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas. O óleo essencial de folhas secas de *Eugenia dysenterica* DC. (OE-Ed), da família Myrtaceae, foi analisado por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG/FID) e por espectrometria de massa (CG/MS), a fim de identificar seus componentes voláteis. Um total de 24 compostos foram identificados a partir de OE-Ed. Os principais compostos encontrados no OE-Ed foram limoneno (16,0%), óxido de cariofileno (15,0%), citral (9,0%), *trans*- cariofileno (8,0%) e 1,8-cineol (7,3%). As atividades biológicas *in vitro* do OE-Ed foram investigadas contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e bactérias do gênero *Streptococcus*. Estes resultados demonstram que o OE-Ed, testado contra *T. cruzi*, afetou o crescimento do tripomastigoto de maneira dependente da dose. O IC<sub>50</sub> dos OE-Ed foi de 9,5µg/mL, enquanto o IC<sub>50</sub> benzonidazol (controlo positivo) foi de 9,85µg/mL, revelando ação tripanocida notável. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas pelo método de diluição em caldo em microplacas de 96 poços. O OE-Ed apresentou atividade antibacteriana moderada contra *Streptococcus mitis* (MIC = 250 µg/mL), *S. sanguinis* (MIC = 200 µg/mL), *S. sobrinus* (MIC = 400 µg/mL) e *S. salivarius* (MIC = 400 µg/mL) e forte atividade contra *S. mutans* (CIM = 31,2 µg/mL). Estes resultados sugerem que o óleo essencial de folhas secas de *E. dysenterica* poderá ser testado em estudos futuros para o tratamento da doença de Chagas e cárie dentária.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Eugenia dysenterica*; cagaita; óleo essencial; *Trypanosoma cruzi*; patógenos orais.

### 3.1 Introdução

A família Myrtaceae contém cerca de 3000 espécies, compreendendo aproximadamente 130-150 gêneros, encontradas em regiões tropicais e subtropicais, como América do Sul, Austrália e Ásia Tropical<sup>1</sup>. O gênero *Eugenia*, um dos maiores da família Myrtaceae, é encontrado na América Central e do Sul, constituído por aproximadamente 1000 espécies de árvores e arbustos. Destes, cerca de 350 podem ser encontrados no Brasil<sup>2</sup>. Essa família botânica exibe potencial alimentar e os frutos de algumas espécies são comercializados frescos para uso na fabricação de doces e geleias<sup>3</sup>.

Especificamente, no Brasil, entre as espécies de frutos comestíveis nativas do Cerrado, a cagaita ou cagaiteira - *Eugenia dysenterica* - é muito apreciada pela população. Possui ampla distribuição no Cerrado, ocorrendo nos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo, Tocantins e Distrito Federal<sup>4</sup>. Esta planta é amplamente utilizada pela medicina popular para o tratamento de diarreia e diabetes e seus óleos essenciais têm ação eficaz contra fungos fitopatogênicos<sup>4-5</sup>. O fruto da cagaita tem um sabor característico e agradável. Além disso, a fruta possui potencial nutracêutico e farmacológico<sup>5</sup>. Algumas espécies de *Eugenia* desempenham importante potencial terapêutico em várias regiões do mundo, sendo bastante empregadas na medicina popular por possuírem ampla atividade medicinal como anti-inflamatória, hipoglicêmica, diurética, analgésica, antidiarreica, antirreumática, antibacteriana e proteção contra distúrbios estomacais<sup>6</sup>.

A doença de Chagas apresenta uma incidência preocupante na América Latina, onde aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas com *Trypanosoma cruzi*. É, portanto, uma infecção parasitária que pode ser causada pelas seguintes formas: transmitida por vetor, transfusão, congênita, por meio de transplante de órgãos e via oral<sup>7</sup>. Devido à sua alta mortalidade nas regiões endêmicas, a doença de Chagas é considerada grave problema de saúde pública e seu tratamento nas fases aguda e crônica é realizado com medicamentos como nifurtimox ou benzonidazol, porém pela sua toxicidade, os pacientes que os utilizam apresentam algumas condições clínicas como náusea, vômito e intolerância hepática<sup>8</sup>.

Os microrganismos presentes na cavidade oral podem ser a causa de uma série de infecções e inflamações, como cárie dentária, uma doença dos dentes relacionada à placa. A cárie dentária e as doenças periodontais têm sido associadas com as bactérias acidogênicas e acidúricas<sup>9</sup>. A maneira mais eficiente de prevenir essas doenças é remover

o biofilme escovando e passando o fio dental. No entanto, a maioria das pessoas falha em manter um nível de controle suficiente apenas através da remoção mecânica. Portanto, é necessário o uso de produtos químicos ou compostos naturais como medida complementar para diminuir o biofilme da superfície dentária, provando ser uma ferramenta valiosa para o tratamento da cárie dentária<sup>10</sup>.

Considerando o alto potencial medicinal dos óleos essenciais de *Eugenia*<sup>11</sup> e o interesse de nosso grupo de pesquisa por óleos essenciais de Myrtaceae e suas atividades biológicas<sup>12</sup>, o presente estudo relata a avaliação das atividades antibacterianas e tripanocidas *in vitro* e a composição do óleo essencial de folhas secas de *Eugenia dysenterica* localizadas no estado de Goiás, Brasil.

## **3.2 Materiais e métodos**

### **3.2.1 Material vegetal**

Folhas de *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) foram coletadas (300g) na Fazenda Gameleira, localizada em Montes Claros de Goiás (16°0'30''S e 51°23'24''W), estado de Goiás, Brasil, em outubro de 2015, autenticada pela botânica Erika Amaral e um espécime (n° 1039) foi depositado no herbário de Rio Verde, no Instituto Federal Goiano.

### **3.2.2 Processamento de plantas e extração do óleo essencial**

Amostras de folhas secas de *Eugenia dysenterica* foram submetidas a hidrodestilação por um aparelho do tipo Clevenger, por 3 horas. A análise foi realizada em triplicata, usando 300 g de material vegetal divididos em três amostras de 100 g e 500 mL de água destilada. Após a coleta manual de amostras de óleo essencial, os vestígios de água restante nos óleos essenciais foram removidos com sulfato de sódio anidro, seguido de filtração. O óleo essencial isolado foi armazenado sob refrigeração até a análise e teste. O rendimento (p/p) foi calculado a partir do peso das folhas secas e expresso como a média das análises em triplicata.

### **3.2.3 Análise da composição química do óleo por CG/FID e CG/EM**

O óleo essencial foi dissolvido em éter etílico e analisado por detector de ionização de chama por cromatografia em fase gasosa (CG/FID) e espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa (CG/EM) usando o sistema Shimadzu QP5000 Plus e GCMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A temperatura da coluna

no CG/FID foi programada para aumentar de 60 para 240°C a 3°C/min foi mantido a 240°C por 5 min; o gás transportador era H<sub>2</sub> a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. O equipamento foi configurado para operar no modo de injeção; O volume de injeção da solução de óleo foi de 0,1µL (1:10), e as temperaturas do injetor e do detector foram de 240 e 280°C, respectivamente. A porcentagem de compostos foi calculada pela normalização da área, considerando a resposta de fatores. A autenticação dos compostos presentes no óleo essencial também foi determinada pelas amostras padrão adquiridas da Sigma Aldrich (Alemanha). As áreas relativas consistiram da média das análises CG/FID em triplicata. As condições do CG/EM e a identificação do óleo essencial foram relatadas anteriormente<sup>9</sup>.

A identificação dos componentes voláteis do OE-Ed (Tabela 1) foi baseada em seus índices de retenção em um Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,250 µm) coluna capilar nas mesmas condições operacionais usadas para o CG em relação a uma série homóloga de n-alcenos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>). As estruturas foram equiparadas por computador com Wiley 7, NIST 08 e FFNSC1.2, e seus padrões de fragmentação foram comparados com os dados da literatura<sup>13</sup>. A concentração dos compostos identificados foi calculada diretamente através das áreas de pico e expressas em porcentagem.

### **3.2.4 Ensaio antibacteriano *in vitro* contra bactérias Gram-positivas**

Os valores da concentração mínima inibitória (CMI) do OE-Ed foram calculados usando o método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços. As seguintes cepas padrão da ATCC foram usadas (Bactérias gram-positivas): *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456) e *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Colônias individuais de 24 horas (Difco Labs, Detroit, Mich, EUA) foram suspensas em 10,0 mL caldo de soja trípico (Difco). Padronização de cada suspensão de microrganismos foi realizada como descrito anteriormente<sup>14</sup>. As amostras de OE-Ed foram dissolvidas em DMSO (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 1 mg/mL e diluído em caldo de soja trípico (Difco) para que as concentrações na faixa de 4000 a 3,9 µg/mL fossem alcançadas. A concentração final de DMSO foi de 5% (v/v) e esta solução foi usada como controle negativo. Um poço inoculado foi incluído, de modo a controlar a adequação do caldo ao crescimento do organismo. Um poço não inoculado, livre de agente antimicrobiano foi também incluído para garantir esterilidade média. Dicloridrato

de clorexidina (CHD) (C8527 Sigma) foi dissolvido em caldo de soja trípico (Difco) e usado como controle positivo variando concentrações de 59,0 a 0,115  $\mu\text{g/mL}$ . As microplacas (96 poços) foram seladas com filme plástico e incubado a 37°C por 24 h como descrito acima. Após a incubação, 30  $\mu\text{L}$  de 0,02% de resazurina (199303 Sigma, Stl Louis, MO, EUA) solução aquosa foi vertida em cada microplaca para indicar viabilidade de microrganismos. Os valores de CMI foram determinados como a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir o crescimento de microrganismos. Foram realizados três ensaios de réplicas para cada micro-organismo (ou microrganismo).

### **3.2.5 Ensaio tripanocida *in vitro* contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi***

O ensaio tripanocida *in vitro* foi realizado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, constituída por formas finas de tripomastigotas. Esta estirpe foi mantida no viveiro da Universidade de Franca através de testes sucessivos em camundongos suíços por punção cardíaca no dia do pico da parasitemia (sétimo dia de infecção). Este procedimento foi aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Comitê de Ética na Universidade de Franca, sob protocolo número 010/14. O ensaio foi realizado com sangue de ratos albinos infectados por punção cardíaca em pico da parasitemia (sétimo dia de infecção). O sangue infectado foi diluído com solução fisiológica para atingir a concentração sanguínea final de  $10^6$  formas de tripomastigotas/mL. Amostras do óleo essencial foram diluídas em DMSO e alíquotas desta solução-mãe foram adicionados aos sangues infectados na placa de microtitulação (96 poços), totalizando 200 $\mu\text{L}$ . No ensaio tripanocida, as amostras foram avaliadas em triplicata nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$ . Em relação aos controles, o positivo foi o benzonidazol, enquanto o negativo foi DMSO a 0,5% (concentração atóxica para esse tipo de célula). A microplaca foi incubada a 37°C por 24 horas. Depois, a atividade foi verificada quantitativamente contando as formas tripomastigotas de acordo com a técnica descrita anteriormente na literatura <sup>15</sup>. A determinação da porcentagem de lise do parasita foi realizada por comparação com o grupo controle sem tratamento. Duas experiências foram realizadas em triplicado. A determinação dos valores de concentração inibitória de 50% (IC50) foi realizada por curvas de regressão não linear de um GraphPad *Software Prism* versão 5.0 para Windows (GraphPad *software*, EUA).



### 3.3 Resultados e discussões

#### 3.3.1 Composição do óleo essencial

O óleo essencial das folhas secas de *E. dysenterica* de cor amarelado claro produziu um rendimento de 1,5%, semelhante ao já relatado na literatura para o óleo essencial desta espécie<sup>16</sup>. O OE-Ed foi obtido e analisado por GC/FID e GC/EM para determinar sua composição. Vinte e quatro compostos foram identificados (Tabela 1). Os constituintes principais foram limoneno (16,0%), óxido de cariofileno (15,0%), citral (9,0%), trans-cariofileno (8,0%) e 1,8-cineol (7,3%). O limoneno, o óxido de cariofileno, o citral e o trans-cariofileno totalizaram 55,3% da composição química do óleo essencial das folhas secas de *E. dysenterica*.

**Tabela 1.** Constituintes químicos do óleo essencial de folhas seca de *E. dysenterica* (OE-Ed).

N°	Compostos	TR	IR <sub>exp</sub>	IR <sub>lit</sub>	Porcentagem %
1	$\alpha$ -Pinenos	9,09	935	934	1,2
2	Sabineno	10,78	975	974	3,0
3	$\beta$ -Mirceno	11,57	993	991	1,5
4	<i>p</i> -Cimeno	13,12	1028	1026	2,5
5	Limoneno	13,30	1032	1031	16,0
6	1,8-Cineol	13,45	1026	1027	7,3
7	<i>Trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	14,32	1052	1050	0,2
8	$\gamma$ -Terpineno	14,81	1065	1062	3,4
9	Linalool	17,00	1106	1107	1,6
10	Óxido de limoneno	18,59	1133	1133	1,2
11	Isopulegol	19,97	1141	1145	1,3
12	$\alpha$ -Terpineol	21,13	1184	1185	4,7
13	Citral	21,40	1241	1241	9,0
14	$\alpha$ -Copaeno	29,51	1379	1376	3,0
15	<i>trans</i> -Cariofileno	31,30	1420	1418	8,0
16	$\alpha$ -Humoleno	31,77	1458	1456	5,0
17	$\gamma$ -Muuroleno	32,08	1476	1474	2,2
18	Germacreno D	33,67	1479	1480	1,5
19	$\beta$ -Selineno	34,15	1485	1484	0,8
20	$\delta$ -Selineno	34,30	1495	1495	1,5
21	$\gamma$ -Cadineno	34,99	1513	1512	1,2
22	$\delta$ -Cadineno	35,54	1527	1524	4,7
23	Óxido de cariofileno	37,95	1582	1580	15,0
24	Globulol	37,73	1611	1610	1,3
	Total				97,1

TR: Tempo de retenção;

IR<sub>exp</sub>: Índice de retenção determinado em relação aos n-alcenos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>);

IR<sub>lit</sub>: Índice de retenção da literatura (Adams, 2007);

Porcentagem %: área relativa (área do pico em relação à área total do pico no cromatograma CG/FID), média de três repetições.

A composição química aqui obtida não era muito semelhante às composições descritas na literatura. Por exemplo, é relatado que, independentemente da estação do ano,

os principais constituintes do óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* são o  $\beta$ -cariofileno,  $\delta$ -cadineno e  $\alpha$ -copaeno<sup>17</sup>. Em outro estudo, houve alta concentração do constituinte óxido de cariofileno, mais de 50% da composição do óleo<sup>16</sup>, diferente do presente estudo em que o constituinte com maior concentração foi o limoneno (16,0%). Contudo, os dados de composição química obtidos no presente estudo foram semelhantes a um estudo já publicado, que revelou que o óleo essencial da hidrodestilação das folhas de *E. dysenterica* consistia principalmente de  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, limoneno,  $\alpha$ -terpineol e óxido de cariofileno<sup>18</sup>. Segundo a literatura, as diferenças na composição química dos óleos essenciais nas mesmas espécies botânicas são provavelmente pela interferência do ciclo vegetativo e a fatores ambientais<sup>19</sup>.

### 3.3.2 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas secas de *E. dysenterica* foi testada para verificar sua atividade contra alguns patógenos orais (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores de concentrações inibitórias mínimas (CMI) em  $\mu\text{g/mL}$  de óleo essencial de folhas secas de *E. dysenterica* (OE-Ed) contra bactérias cariogênicas selecionadas.

<i>Microrganismos</i>	<i>CMI (OE-Ed)</i>	<i>CMI (CHD)</i>
Streptococcus mutans	31,2	0,9221
Streptococcus mitis	250	1,844
Streptococcus sanguinis	200	0,922
Streptococcus sobrinus	400	0,922
Streptococcus salivarius	400	0,737

CMI: Concentração mínima inibitória ( $\mu\text{g/mL}$ ).

OE-ED: Óleo essencial de folhas secas de *E. dysenterica*.

CHD: Dicloridrato de clorexidina (controle positivo).

A literatura descreve valores de CMI inferiores a 100  $\mu\text{g/mL}$ , entre 100 e 500  $\mu\text{g/mL}$  e entre 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ , correspondentes aos promissores, moderados, e atividades fracas, respectivamente, enquanto valores de CMI superiores a 1000  $\mu\text{g/mL}$  denotam inatividade<sup>20</sup>. Assim, o óleo essencial das folhas secas de *E. dysenterica* exibiu atividade antibacteriana promissora contra *Streptococcus mutans* (CMI = 31,2  $\mu\text{g/mL}$ ) e atividade moderada contra as outras bactérias do gênero *Streptococcus* testadas. Em relação à atividade antibacteriana, dois pontos são importantes neste estudo, além do óleo essencial de *E. dysenterica* exibir forte atividade contra *S. mutans*, principal responsável pela cárie dentária, o segundo é que poucos produtos naturais têm atividade contra essa bactéria<sup>20</sup>.

A atividade antibacteriana *in vitro* exibida pelo óleo essencial de folhas secas de *E. dysenterica* pode ser justificado levando em consideração os principais constituintes identificados no óleo essencial, como limoneno, citral, trans-cariofileno, óxido de cariofileno e 1,8-cineol. O potencial antibacteriano de cada um desses constituintes já está bem descrito na literatura <sup>21-23</sup>, incluindo a ação do  $\beta$ -cariofileno no combate a cárie canina <sup>24</sup>.

Vários mecanismos foram propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Entende-se que a inibição do crescimento microbiano pela ação de óleos essenciais é devido aos danos causados direto à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, que afeta diretamente a manutenção de pH celular e balanço de íons inorgânicos <sup>25</sup>.

Os efeitos inibitórios do óleo essencial são consistentes com a ação dos constituintes do monoterpeno e sesquiterpeno na membrana celular e que danos na membrana produzem efeitos diferentes em diferentes micro-organismos. Além disso, a perda do conteúdo celular, como lipídios e proteínas, é relatada em função de alguns componentes dos óleos essenciais em bactérias gram-positivos e gram-negativos. Também é importante notar que o risco de microrganismos patogênicos que desenvolvem resistência aos óleos essenciais é muito baixo, essa é uma característica vantajosa dos óleos essenciais em relação a outros agentes antimicrobianos, pois pode trazer benefícios as várias áreas que podem ser aplicadas <sup>26</sup>

### 3.3.3 Atividade tripanocida

O óleo essencial de folhas secas de *E. dysenterica* foi altamente ativo quando testado contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Houve redução da viabilidade das células tripomastigotas com o aumento da concentração óleo essencial, com um valor de IC<sub>50</sub> de 9,5  $\mu\text{g/mL}$ , um valor promissor, principalmente quando comparado ao controle positivo usado, benzonidazol (IC<sub>50</sub> = 9,8  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Atividade tripanocida do óleo essencial de folhas secas de *E. dysenterica* (OE-Ed) contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

	% LISES $\pm$ D.V./CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{G/ML}$ )					
	200	100	50	25	12,2	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>OE-ED</b>	91.83 $\pm$ 4.0	81.63 $\pm$ 1.5	73.46 $\pm$ 2.0	69.38 $\pm$ 4.0	53.74 $\pm$ 3.2	9.5
D.V.: Desvio Padrão; Controle Positivo: benzonidazol (IC <sub>50</sub> = 9,8 $\mu\text{g/mL}$ ).						

Este é o primeiro relato sobre a atividade tripanocida do óleo essencial extraído das folhas secas de *E. dysenterica*. É importante mencionar que a investigação do potencial tripanocida *in vitro* de óleos essenciais tem sido frequentemente descrita<sup>27</sup>. A literatura descreve que amostras com  $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$  tiveram atividade tripanocida altamente ativa, enquanto outros estavam ativos ( $IC_{50} > 10 < 50 \mu\text{g/mL}$ ), moderadamente ativo ( $IC_{50} > 50 < 100 \mu\text{g/mL}$ ) e inativo ( $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ )<sup>28</sup>.

A promissora atividade tripanocida *in vitro* exibida pelo óleo essencial das folhas secas de *E. dysenterica* pode ser pela presença dos constituintes principais identificados no óleo. Limoneno, citral, óxido de cariofileno e trans-cariofileno são terpenos com ação tripanocida relatada na literatura<sup>29-30</sup>. Além disso, o grande número de constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de várias espécies botânicas, podem através de interações sinérgicas ou antagônicas potencializar as várias atividades biológicas exibidas por esses óleos<sup>31</sup>. Sugere-se como principal hipótese de que esses terpenos reduziram a permeabilidade da membrana plasmática, causou a despolarização da membrana mitocondrial e conseqüentemente levando à morte dos parasitas<sup>32</sup>.

### 3.4 Conclusão

O óleo essencial de folhas secas de *E. dysenterica* é eficaz contra os parasitas *Trypanosoma cruzi* e patógenos orais, como *Streptococcus mutans*, com valores de relevância clínica. Nesse sentido, os óleos essenciais de folhas secas de *E. dysenterica* podem ser usados como promissor componente de novos produtos de higiene bucal, salientando que *S. mutans* é um dos principais agentes causadores de distúrbios bucais, como a cárie dentária. Em suma, este estudo *in vitro* sugere que a constituição química dos compostos e o efeito sinérgico desses compostos presentes no óleo essencial das folhas secas de *E. dysenterica* podem contribuir ainda mais para aumentar os efeitos antiparasitários e antibacterianos.

### 3.5 Referências Bibliográficas

1. **Siddique, S., Perveen, Z., Nawas, S., Shahzad, K., Ali, Z. (2015).** Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of six species from Family Myrtaceae. J. Essential Oil Bear Pl. 18: 950-956.

2. **Kauffmann, C., Ethur, E.M., Arossi, K., Hoehne, L., Freitas, E.M., Machado, G.M.C., Cavalheiro, M.C., Flach, A., Costa, L.A.M.A., Gnoatto, S.C.B. (2017).** Chemical composition and evaluation preliminary of antileishmanial activity *in vitro* of essential oil from leaves of *Eugenia pitanga*, a native species of Southern of Brazil. J. Essent Oil Bear Pl. 20: 559-569.
3. **Aboutabl, E.A., Meselhy, K.M., Elkhreisy, E.M., Nassar, M.I., Fawzi, R. (2011).** Composition and bioactivity of essential oils from leaves and fruits of *Myrtus communis* and *Eugenia supraxillaris* (Myrtaceae) grown in Egypt. J. Essent. Oil Bear Pl. 14: 192-200.
4. **Malta, C.M., Ferreira, E.M.S., Coelho, C.M., Pimenta, R.S. (2015).** Fungos endofíticos de *Eugenia dysenterica* DC como biocontroladores de fitopatógenos *in vitro*. J. Bioen. Food Sci. 2: 189-193.
5. **Mota, C.S., Araújo, E.L.S., Silva, F.G., Dornelles, P., Freiburger, M.B., Mendes, G.C. (2018).** Physiology and quality of *Eugenia dysenterica* DC seedlings grown in vermiculite and rice husk-based substrates. Rev. Bras. Frutic. 40: e-049.
6. **Tenfen, A., Boeder, A.M., Bella-Cruz, C.C., Bella-Cruz, A., Córdova, C.M.M., Cechinel-Filho, V. (2017).** Chemical composition, antibacterial and antimycoplasma activities of four *Eugenia* species growing in Brazil. J. Med. Plants Res. 11: 596-602.
7. **Junior, G.S., Massago, M., Kian, D., Toledo, M.J.O. (2018).** Efficacy of essential oil of *Syzygium aromaticum* alone and in combination with benznidazole on murine oral infection with *Trypanosoma cruzi* IV. Exp Parasitol. 185: 92-97.
8. **Jones, A.J., Grkovic, T., Sykes, M.L., Avery, V.M. (2013).** Trypanocidal activity of marine natural products. Mar. Drugs 11: 4058-4082.
9. **Vieira, T.M., Dias, H.J., Medeiros, TCT., Grundmann, C.O., Groppo, M., Heleno, V.C.G., Martins, C.H.G., Cunha, W.R., Crotti, A.E.M., Silva, E.O. (2017).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia absinthium* Asteraceae leaves. J. Essent. Oil Bear Pl. 20: 123-131.
10. **Dias, H.J., Vieira, T.M., Carvalho, C.E., Aguiar, G.P., Wakabayashi, K.A.L., Turatti, I.C.C., Willrich, G.B., Groppo, M., Cunha, W.R., Martins, C.H.G., Crotti, A.E.M. (2017).** Screening of selected plant-derived extracts for their antimicrobial activity against oral pathogens. Int. J. Complement. Alt. Med. 6: e-00188.
11. **Silva, J.K.R., Andrade, E.H.A., Barreto, L.H., Silva, N.C.F., Ribeiro, A.F., Montenegro, R.C., Maia, J.G.S. (2017).** Chemical composition of four essential oils

- of *Eugenia* from the Brazilian Amazon and their cytotoxic and antioxidant activity. *Medicines* 4: e-51.
12. **Silva, V.P., Alves, C.C.F., Miranda, M.L.D., Bretanha, L.C., Balleste, M.P., Micke, G.A., Silveira, E.V., Martins, C.H.G., Ambrosio, M.A.L.V., Silva, T.S., Tavares, D.C., Magalhães, L.G., Silva, F.G., Egea, M.B. (2018).** Chemical composition and *in vitro* leishmanicidal, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome. *Ind Crops Prod.* 123: 638-645.
  13. **Adams, R.P. (2007).** *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4<sup>th</sup> ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Dstream, IL.
  14. **Ferreira, M.A., Carvalho, T.C., Turatti, I.C.C., Furtado, N.A.J.C., Martins, C.H.G., Lopes, N.P., Cunha, W.R., Crotti, A.E.M. (2010).** Antimicrobial activity of *Aegiphila sellowiana* Cham., Lamiaceae, against oral pathogens. *Braz. J. Pharmacogn.* 20: 246-249.
  15. **Rashed, K., Ferreira, D.S., Esperandim, V.R., Marçal, M.G., Sequeira, B.M., Flauzino, L.G.B., Cunha, W.R. (2016).** *In vitro* trypanocidal activity of the Egyptian plant *Schinopsis lorentizii* against trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Appl. Pharm Sci.* 6: 055-060.
  16. **Feitosa, C.M., Barbosa, A.R., Melo, C.H.S., Freitas, R.M., Fontes, J.E.N., Costa, E.V., Rashed, K.N.Z., Júnior, J.S.C. (2017).** Antioxidant and anticholinesterase activities of the essential oil of *Eugenia dysenterica* DC. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 11: 241-249.
  17. **Duarte, A.R., Naves, R.R., Santos, S.C., Seraphin, J.C., Ferri, P.H. (2009).** Seasonal influence on the essential oil variability of *Eugenia dysenterica*. *J. Braz. Chem. Soc.* 20: 967-974.
  18. **Costa, T.R., Fernandes, O.F.L., Santos, S.C., Oliveira, C.M.A., Lião, L.M., Ferri, P.H., Paula, J.R., Ferreira, H.D., Sales, B.H.N., Silva, M.R. (2000).** Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *J. Ethnopharmacol.* 72: 111-117.
  19. **Amaral, W., Deschamps, C., Bizzo, H.R., Pinto, M.A.S., Biasi, L.A., Silva, L.E. (2017).** Essential oil yield and composition of native tree species from Atlantic Forest, South of Brazil. *J. Essent. Oil Bearing Plants* 20: 1525-1535.

20. Lemes, R.S., Alves, C.C.F., Estevam, E.B.B., Santiago, M.B., Martins, C.H.G., Santos, T.C.L., Crotti, A.E.M., Miranda, M.L.D. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. An Acad. Bras. Cienc. 90: 1285-1292.
21. Kasim, L.S., Olaleye, K.O., Fagbohun, A.B., Ibitoye, S.F., Adejumo, O.E. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Struchium sparganophora* Linn. Ktze Asteraceae. Adv Biol Chem. 4: 246-252.
22. Vuuren, S.F.V., Viljoen, A.M. (2007). Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole olone and in combination. Flavour Fragr. J. 22: 540-544.
23. Shi, C., Song, K., Zhang, X., Sun, Y., Sui, Y., Chen, Y., Jia, Z., Sun, H., Sun, Z., Xia, X. (2016). Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. PLoS One 11: e-0159006.
24. Pieri, F.A., Souza, M.C.C., Vermelho, L.L.R., Vermelho, M.L.R., Perciano, P.G., Vargas, F.S., Borges, A.P.B., Veiga-Junior, V.F., Moreira, M.A.S. (2016). Use of  $\beta$ -caryophyllene to combat bacterial dental plaque formation in dogs. Vet Res. 12: e-216.
25. Cherrat, L., Dumas, E., Bakkali, M., Degraeve, P., Laglaoui, A., Oulahal, N. (2016). Effect of essential oils on cell viability, membrane integrity and membrane fluidity of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. J Essent Oil Bear Pl. 19: 155-166.
26. Bajpai, V.K., Baek, K.H. (2016). Biological efficacy and application of essential oils in foods-a review. J. Esset. Oil Bear Pl. 19: 1-19.
27. Pereira, P.S., Maia, A.J., Tintino, S.R., Oliveira-Tintino, C.D.M., Raulino, I.S.S., Vega, M.C., Rolón, M., Coronel, C., Barros, L.M., Duarte, A.E., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Silva, T.G. (2017). Trypanocide, antileishmania and cytotoxic activities of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L *in vitro*. Ind Crops Prod. 109: 724-729.
28. Estevam, E.B.B., Deus, I.P.B., Silva, V.P., Silva, E.A.J., Alves, C.C.F., Alves, J.M., Casal, C.M., Magalhães, L.G., Pagotti, M.C., Esperandim, V.R., Souza, A.F., Miranda, M.L.D. (2017). *In vitro* antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil from *Protium ovatum* leaves (Burceraceae). An Acad. Bras. Cienc. 89: 3005-3013.
29. Moreno, E.M., Leal, S.M., Stashenko, E.E., García, L.T. (2018). Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their

- major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). Complement. Altern. Med. 18: e-225.
30. **Martínez-Díaz, R.A., Ibáñez-Escribano, A., Burillo, J., Heras, L.L., Prado, G.D., Agulló-Ortuño, M.T., Julio, L.F., Gonzáles-Coloma, A. (2015).** Trypanocidal, trichomonacidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110: 693-699.
  31. **Silva, E.A.J., Estevam, E.B.B., Silva, T.S., Nicolella, H.D., Furtado, R.A., Alves, C.C.F., Souchie, E.L., Martins, C.H.G., Tavares, D.C., Barbosa, L.C.A., Miranda, M.L.D. (2019).** Antibacterial and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). Braz. J. Biol. 79: 697-702.
  32. **Baldissera, M.D., Silva, A.S., Oliveira, C.B., Zimmermann, C.E.P., Vaucher, R.A., Santos, R.C.V., Rech, V.C., Tonin, A.A., Giongo, J.L., Mattos, C.B., Koester, L., Santurio, J.M., Monteiro, S.G. (2013).** Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: *in vitro* tests. Exp. Parasitol. 134: 356-361.



## 4. CAPÍTULO II

(Normas de acordo com a revista Food Science and Technology)

### **Extrato etanólico dos frutos maduros de *Capsicum chinense* Jacq: perfil químico, atividade antioxidante e preparação de filmes biodegradáveis**

**Resumo:** A pimenta *Capsicum* spp. apresenta expressiva importância econômica e social para o agronegócio mundial, associada, em grande parte, ao seu alto aproveitamento na culinária para temperos. As pimentas constituem matéria-prima para extração de corantes, aromatizantes, óleo resinas e de substâncias que conferem sabor e aumentam a estabilidade oxidativa dos lipídios pelo alto potencial antioxidante. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil químico do extrato etanólico dos frutos maduros de *Capsicum chinense* Jacq. (EECC) por Cromatógrafo Líquido acoplado ao espectrômetro de Massas de Alta Resolução (CL-EM), analisar e avaliar sua atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP. Em adição, foram preparados filmes biodegradáveis através da incorporação do EECC em filmes de Araruta. Por HPLC, foram identificados 10 compostos fenólicos, este resultado corrobora a alta concentração de compostos fenólicos totais,  $277.62 \pm 12.06$  mg de ácido ferúlico/100g do extrato bruto. A alta atividade antioxidante do EECC foi expressa em valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) para os reagentes DPPH ( $IC_{50} = 18.04 \mu\text{g/mL}$ ), ABTS ( $IC_{50} = 25.33 \mu\text{g/mL}$ ) e FRAP ( $IC_{50} = 128.58 \mu\text{g/mL}$ ). Os filmes biodegradáveis incorporados com diferentes doses de EECC (250-1000  $\mu\text{L}$ ) foram obtidos pela técnica de *Casting*, e, conforme se aumentou a concentração de EECC, estes exibiram aumento nos aspectos espessura, coloração e teor de umidade variável, além da diminuição da solubilidade. Sugere-se com este estudo, uma nova aplicação para o extrato vegetal obtido a partir de *C. chinense* (pimenta-biquinho), podendo este produto natural ser empregado no preparo de filmes para revestimento de alimentos retardando assim sua deterioração.

**PALAVRAS-CHAVE:** Filmes biodegradáveis; Pimenta; Atividade antioxidante, Fenólicos totais.

## 4.1 Introdução

A pimenta-biquinho, *Capsicum chinense*, pertence ao gênero *Capsicum* e a família Solanaceae. É uma pimenta nativa do Brasil, seus frutos apresentam sabor doce e pungência suave. As pimentas geralmente possuem em sua composição química diversos nutrientes, compostos fenólicos, carotenoides, capsaicinoides e capsinoides. Os compostos fenólicos, em especial, são substâncias antioxidantes que estão associadas a mecanismos de defesa das plantas contra fungos, bactérias e predadores. Em virtude de sua ação antioxidante, extratos vegetais que apresentam substâncias fenólicas podem ser considerados aditivos potenciais para filmes ativos, com o intuito de proteger os alimentos (Antonious et al., 2006; Castro Alves et al., 2014; de Aguiar et al., 2014; de Aguiar et al., 2019).

As embalagens são utilizadas com o intuito de ajudar no transporte, armazenamento e proteção de alimentos e mercadorias. Elas geralmente são feitas de material plástico no entanto, este polímero pode estar associado a contaminação de alimentos e problemas de poluição ambiental (Kalpana et al., 2019; Piñeros-Hernandez et al., 2017).

Para garantir a segurança dos alimentos e diminuir o impacto causado ao meio ambiente pela grande quantidade de resíduos gerados por embalagens plásticas à base de petróleo, novas opções de embalagens biodegradáveis estão sendo mundialmente propostas. Neste cenário, os polímeros naturais, como o amido, são considerados os melhores substitutos aos polímeros sintéticos (Jiménez et al., 2012).

O amido é um polissacarídeo vegetal amplamente abundante. Disponível em 60 % dos grãos de cereais, é uma fonte renovável, de baixo custo e biodegradável. Este polímero possui excelentes propriedades de formação de géis, podendo ser utilizado na produção de filmes e revestimentos (Jiménez et al., 2012; Thakur et al., 2019).

Entre as plantas amiláceas, a araruta (*Maranta arundinacea*) possui alto potencial como matéria-prima para extração de amido. O amido presente nos rizomas de araruta diferentemente dos amidos de milho e mandioca possui características de digestibilidade e alto teor de amilose, polímero com ótima capacidade de formação de filmes (de Oliveira Guilherme et al., 2019; Nogueira et al., 2018). No entanto, é importante destacar que apesar de suas excelentes características físico-químicas, ainda há poucos trabalhos de pesquisa utilizando o amido de Araruta.

Os filmes de embalagens de alimentos produzidos a partir de polímeros naturais, além de serem biodegradáveis, de matéria-prima renovável e não tóxicos, eles ainda podem ser aprimorados com a adição de agentes antioxidantes, antimicrobianos e antifúngicos. Estas substâncias ativas podem migrar da embalagem para o alimento, aumentando seu tempo de vida útil (Piñeros-Hernandez et al., 2017; Rambabu et al., 2019).

Filmes que contêm agentes antioxidantes podem ser usados para evitar a oxidação e degradação lipídica de produtos gordurosos, como carnes. Aditivos sintéticos são frequentemente utilizados em embalagens ativas, no entanto eles podem causar efeitos adversos a saúde humana. Sendo assim, produtos naturais como os extratos vegetais e óleos essenciais com ação antioxidante podem ser alternativa aos produtos sintéticos (Domínguez et al., 2018; Vásconez et al., 2009).

Considerando que o amido de araruta possui excelentes características para produção de filmes biodegradáveis e as pimentas do gênero *Capsicum* apresentam capacidade antioxidante, o objetivo do presente estudo foi determinar o perfil químico do extrato etanólico dos frutos maduros de *C. chinense*, avaliar seu potencial antioxidante *in vitro*, realizar a incorporação deste extrato vegetal aos filmes de amido de araruta e, por fim, verificar as propriedades físico-químicas dos biofilmes preparados.

## **4.2 Materiais e métodos**

### **4.2.1 Preparo da amostra**

Os frutos maduros de *C. chinense* (apenas os vermelhos) foram comprados em feiras no município de Santa Helena de Goiás e Rio Verde – GO, levados para o Laboratório de Química de Produtos Naturais do IF Goiano - Campus Rio Verde, onde foram higienizados com água destilada. Em seguida foram secos com papel absorvente e retirados os seus pedúnculos. Os frutos foram pesados e desidratados em estufa com circulação de ar a 40°C por 96 horas. Após desidratados os mesmos foram triturados, acondicionados em um recipiente vedado e armazenados na geladeira até o preparo do extrato bruto etanólico.

## 4.2.2 Extração e obtenção do extrato etanólico

A extração foi feita utilizando 5.0 g da amostra com 100 mL de etanol, que permaneceu sob agitação magnética permanente por 2 horas. O contato entre o solvente e a matéria-prima foi mantido durante quatro dias à temperatura ambiente (26°C), protegido da luz, e com agitação manual diária. A mistura resultante da extração foi separada por filtração, seguida por evaporação do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se desta forma o extrato etanólico seco dos frutos maduros de *C. chinense* (EECC) de consistência xaroposa.

## 4.2.3 Rendimento da extração EECC

O teor do EECC, foi determinado com base na seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa do extrato}}{\text{massa da amostra}} \times 100$$

## 4.2.4 Caracterização de compostos fenólicos por CL-EM

A análise de EECC foi realizada no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – CRTI da Universidade Federal de Goiás – UFG. Os equipamentos utilizados foram Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000, Thermo Scientific, com coluna Agilent - C18 (4.6 x 100mm; 3µm), acoplado ao espectrômetro de Massas de Alta Resolução Q-Exactive, Thermo Scientific, com fonte H-ESI, operando em modo positivo e negativo, utilizando voltagem do spray 3.5 kV, gás de bainha 30, gás auxiliar 10, temperatura do capilar 350°C, temperatura de gás auxiliar 250°C, tube lens 55 e faixa de massas  $m/z$  150-700. A análise por HPLC foi realizada com água deionizada acidificada com 0.1 % de ácido fórmico (Fase móvel A, v/v) e metanol acidificado com 0.1 % ácido fórmico (Fase móvel B – v/v). A programação gradiente realizada iniciou com 93:07 (A:B %), 70:30 (A:B %) em 10 minutos, 50:50 (A:B %) em 5 minutos, 30:70 (A:B %) em 3 minutos, 20:80 (A:B %) em 2 minutos, 100 (B %) em 3 minutos, permanecendo por 3 minutos, 93:07 (A:B %) em 2 minutos, permanecendo por 2 minutos. O tempo de corrida foi de 33 minutos com fluxo de 0.3 mL/min, volume injeção 10 µL e temperatura da coluna 20 °C. Para o estudo de fragmentação foi utilizado o experimento PRM (Parallel Reaction Monitoring – Monitoramento de Reações Paralelas) com energias de colisão igual a 15 e 30 (NCE). Para identificar compostos fenólicos utilizou

uma solução estoque com padrões em metanol na concentração de 1 mg/mL. A partir das soluções estoque foi preparada a solução da mistura dos padrões na concentração de 50 µg/mL. A análise para mistura dos padrões foi realizada nas mesmas condições das amostras. Os padrões de compostos fenólicos utilizados foram: ácido gálico, ácido protocatequínico, ácido gentísico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido elágico, catequina, epicatequina, rutina, quercetina, naringenina, luteolina e kampeferol. Os dados foram processados no software Xcalibur™.

#### **4.2.5 Fenólicos Totais**

Para a quantificação de compostos fenólicos totais, 200 µL de EECC foi adicionado de 1,9 mL do reagente Follin-Ciocalteau em água destilada (1:9). Para neutralizar a mistura, 1,9 mL da solução aquosa de carbonato de sódio (60 g/L) foi utilizada. A reação foi mantida sob as seguintes condições de ausência de luz e temperatura ambiente, e após 120 minutos, mediu-se a absorbância em 725 nm. O cálculo foi realizado utilizando a curva padrão e os resultados expressos em mg de ácido gálico/100 g de EECC (Arbos et al., 2010).

#### **4.2.6 Avaliação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP**

A atividade antioxidante de EECC foi investigada por três métodos bastante conhecidos na literatura, o DPPH, ABTS e FRAP, seguindo a metodologia descrita por Mardigan et al., (2019).

#### **4.2.7 Preparação dos filmes com EECC**

Os filmes biodegradáveis foram obtidos pela técnica de *Casting*, utilizando a metodologia proposta por Issa et al., (2017), com modificações. Para obtenção de cada filme, foi dissolvido 5 g de fécula de araruta comercial em 100 mL de água deionizada, agitando moderadamente a temperatura ambiente (26°C). Posteriormente, essa solução foi aquecida a 70°C, sob agitação constante, durante 30 minutos. Após a gelatinização do amido, foi adicionado glicerol como plastificante (30 % p/p), e essa dispersão foi agitada por mais 5 minutos. No momento em que a solução filmogênica atingiu a temperatura de 50°C, uma solução filmogênica foi preservada sem a incorporação do EECC e chamada de FAP1, enquanto nas demais foram adicionadas as doses de 250 µL (FAP2), 500 µL

(FAP3), 750 µL (FAP4) e 1000 µL (FAP5) do EECC, em constante agitação por 15 minutos. É importante mencionar que o EECC em sua consistência xaroposa, foi melhor solubilizado da seguinte forma: 200 mg de EECC para 1 mL de Tween 80 a 5 %. Todas as soluções filmogênicas foram vertidas em placas de poliestireno e submetidas a secagem em estufa com circulação de ar (30°C) por aproximadamente 48 horas.

## **4.2.8 Morfologia por microscopia eletrônica de varredura**

Os filmes foram fixados sobre porta amostras de latão e recobertos com ouro como material condutor. As imagens foram obtidas com um microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL JSM-IT300 em alto vácuo no modo de detecção de elétrons secundários com tensão de aceleração de elétrons de 7 kV.

## **4.2.9 Caracterização dos filmes incorporados com EECC**

### **4.2.9.1 Espessura dos filmes**

A espessura dos filmes foi aferida com o auxílio de um paquímetro digital, com precisão de 0.01 mm. As medidas foram realizadas em 10 pontos de cada filme, então foi calculada a média da espessura.

### **4.2.9.2 Teor de umidade**

Os filmes foram pesados inicialmente e depois submetidos a secagem em estufa a 105°C por 24h. Foram utilizadas três repetições por tratamento de filme segundo descrito por Rambabu et al., (2019).

### **4.2.9.3 Solubilidade em água**

Os filmes com cerca de 2 cm<sup>2</sup> foram secos em estufa, a 105°C por 3 horas e então pesados para determinar a massa inicial (Mi). Esses filmes foram então imersos em 50 mL de água destilada, e mantidos sob constante agitação, a 26°C, durante 24 horas. Após esse período, as soluções contendo os filmes foram filtradas em papel de filtro, previamente pesados. Os papéis contendo os filmes foram secos a 105°C por 24 horas e pesados resultando na massa final (Mf) de acordo com a metodologia descrita por Jahed et al., (2017). Cada tratamento foi analisado em triplicata. A solubilidade dos filmes (%) foi calculada usando a equação:

$$\text{Solubilidade em água(\%)} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100$$

#### 4.2.9.4 Biodegradabilidade

A análise foi realizada utilizando a metodologia de Martucci & Ruseckaite (2009), com modificações. As amostras de filme (2 x 2 cm) foram secas até peso constante para obtenção da massa inicial ( $M_i$ ). As amostras foram então colocadas em pacotes de polietileno abertos, permitindo que os microrganismos e umidade tenham acesso as amostras. As amostras foram então enterradas em solo orgânico, previamente preparado, mantendo-se a umidade e a temperatura ambiente constantes. Trinta dias após a montagem do experimento, os pacotes contendo as amostras foram retiradas do solo, lavadas com água destilada e secas até peso constante ( $M_f$ ). A biodegradabilidade (%) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Biodegradabilidade (\%)} = \frac{M_f - M_i}{M_i} \times 100$$

#### 4.2.9.5 Taxa de transmissão de luz (UV-VIS)

A transmissão de luz ultravioleta (UV) e visível dos filmes foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis (Modelo LAMBDA 750, PerkinElmer). As amostras de filme foram cortadas e colocadas em cubetas, e a transmitância foi medida em comprimentos de onda selecionados entre 250 e 850 nm (Hosseini et al., 2015a).

#### 4.2.9.6 Análise de cor

A análise de cor dos filmes foi realizada em colorímetro Color Quest II (HunterLab, Reston, EUA) e os parâmetros avaliados foram  $L^*$  (luminosidade) e parâmetros de cromaticidade ( $a^*$  e  $b^*$ ). As medições foram realizadas em 9 posições aleatórias do filme. A diferença de cor ( $\Delta E$ ) foi calculada de acordo com a seguinte equação (1):

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

Sendo que  $\Delta E$  foi relacionado pela média de cinco medições por filme.

### 4.3 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata e calculado os seus respectivos desvios padrão. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o *software* Sisvar 5.6.

#### 4.4 Resultados e discussões

O EECC apresentou rendimento médio de extração de  $8.42 \pm 0.35$  %, os extratos de pimentas *Capsicum* preparados com solventes polares apresentam maior rendimento em relação aos extratos produzidos com solventes apolares. Em estudos feitos por Aguiar et al., (2014), analisou o rendimento de extração da pimenta-biquinho com diferentes métodos e solventes, verificou que solventes polares apresentaram maior rendimento de extração em relação aos solventes apolares, concluindo que a pimenta-biquinho deve apresentar maior concentração de substâncias com alta polaridade, tais como compostos fenólicos, açúcares e vitaminas.

Entre os 15 compostos fenólicos padrões utilizados para caracterização química do extrato vegetal, 10 foram identificados no EECC (Tabela 1). São eles, o ácido protocatecuico, ácido gentísico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, quercetina, naringenina, luteolina e kaempferol. Apesar da pimenta-biquinho apresentar baixa pungência também foram identificados dois prováveis capsaicoides, capsaicina e di-hidrocapsaicina (Tabela 2), utilizando como referência apenas a massa molecular destes compostos, pela falta de padrões comerciais no momento da análise.

**Tabela 1.** Substâncias identificadas no EECC por LC-MS  $[[M - H]^-]$  (modo negativo)].

Tempo de Retenção (TR) (min)	TR Padrão (min)	Substâncias	Fórmula molecular	Massa molecular	Massa Detectada	Massa Calculada	Erro (ppm)	Fragmentos <i>m/z</i>
$[M - H]^-$ (modo negativo)								
16.23	16.23	Ácido Protocatecuico	$C_7H_6O_4$	154.02661	153.01830	153.01879	0.424	109.02827
19.84	19.84	Ácido Gentísico	$C_7H_6O_4$	154.02661	153.01828	153.01879	0.293	109.02824
20.80	20.66	Ácido cafeico	$C_9H_8O_4$	180.04226	179.03407	179.03432	1.032	135.04399
20.67	20.67	Ácido vanílico	$C_8H_8O_4$	168.04226	167.03403	167.03444	0.867	152.01044 123.04396 108.02041
22.82	22.82	Ácido <i>p</i> -cumárico	$C_9H_8O_3$	164.047345	163.03906	163.03896	0.548	119.04904



22.96	22.96	Ácido ferúlico	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194.05791	193.04985	193.05009	1.630	178.02625 149.05972 134.03618
25.68	25.82	Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302.042655	301.03552	301.03483	3.524	273.04034 151.00262
25.97	25.97	Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	272.068475	271.06113	271.06065	1.777	151.00259
26.24	26.24	Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.04774	285.04037	285.03992	1.604	133.00544
26.78	26.78	Kaempferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.04774	285.04041	285.03992	1.744	187.03900 143.05045

**Tabela 2.** Substâncias identificadas no EECC por LC-MS  $[[M + H]^+$  (modo positivo)].

Tempo de Retenção (TR) (min)	Substância provável	Fórmula molecular	Massa molecular	Massa Detectada	Massa Calculada	Erro (ppm)	Fragmentos <i>m/z</i>
$[M + H]^+$ (modo positivo)							
28.49	Capsaicina	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	305.19909	306.20637	306.20692	3.658	137.05941
29.11	Di-hidrocapsaicina	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	307.21474	308.22202	308.22257	3.181	137.05951

Dentre as substâncias encontradas, os alcaloides capsaicina e di-hidrocapsaicina, e os flavonoides kaempferol, quercetina e luteolina são os predominantes nas pimentas *Capsicum* (Morales-Soto et al., 2013; Nascimento et al., 2014). A importância da capsaicina e di-hidrocapsaicina se deve a diversos fatores, mas principalmente, ao fato de ser o princípio ativo que representa as propriedades organolépticas e farmacêuticas, e confere a sensação de ardor às pimentas (Domenico et al., 2012). Em trabalho recentemente publicado, Guillen et al., (2018) reporta que os frutos de pimenta podem conter outros componentes capsaicinoides, como nordihidrocapsaicina, norcapsaicina, homocapsaicina I, homodihidrocapsaicina I, homocapsaicina II, homocapsaicina II, homodihidrocapsaicina II e nonivamida.

A capacidade antioxidante e o conteúdo fenólico de amostras de extratos vegetais podem variar por diversos fatores, como a polaridade do solvente utilizado na extração, o método de extração e a concentração do material. Além disso, existem diversos métodos para medir a capacidade antioxidante de uma amostra, fundamentados em parâmetros de transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio (Oldoni et al., 2019). Desta maneira foram usados os métodos FRAP (Ferric reducing antioxidant

power), DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) e ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) para avaliar o potencial antioxidante do EECC.

Os resultados da atividade antioxidante estão apresentados na Tabela 3. O EECC apresentou ação antioxidante para todos os métodos avaliados, sendo os métodos ABTS e DPPH baseados na transferência de átomos de hidrogênio e o método FRAP na transferência de elétrons. De acordo com Morales-Soto et al., (2013), maior parte da ação antioxidante apresentada pelas pimentas do gênero *Capsicum* é justificada pela presença dos compostos fenólicos totais presentes (Tabela 1 e 2). A promissora atividade antioxidante também se deve principalmente aos capsaicinoides como a capsaicina e di-hidrocapsaicina (Nascimento et al., 2014).

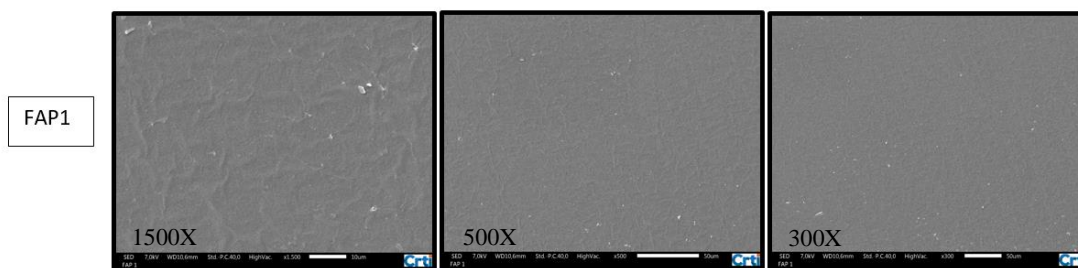
**Tabela 3.** Teor de fenólicos totais (FT) e atividade antioxidante do EECC, esta última avaliada pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP (in  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

	FT	DPPH	ABTS	FRAP
EECC	277.62 $\pm$ 12.06*	18.04 $\pm$ 2.79b	25.33 $\pm$ 2.84	128.58 $\pm$ 2.75

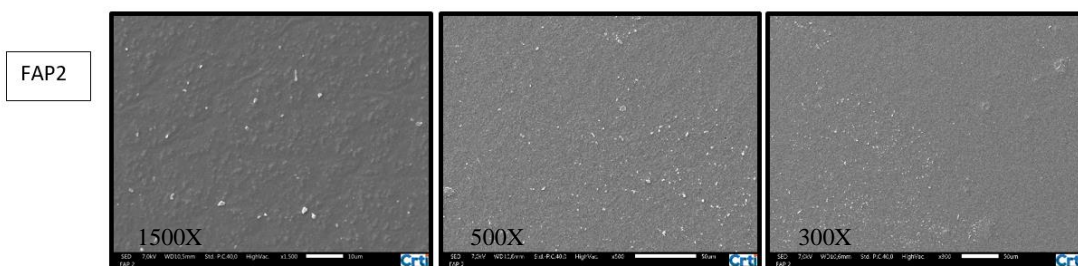
Os valores médios com letras diferentes, na mesma coluna, para o mesmo método de análise, são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ). Controle positivo: ácido gálico ( $\text{IC}_{50} = 12.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). \* Miligramas de ácido gálico/100 g de EECC.

Os filmes de amido incorporados com diferentes doses de EECC (250-1000  $\mu\text{L}$ ) foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o intuito de analisar a morfologia dos filmes, que estão relacionadas com as propriedades físicas dos mesmos. A área superficial de cada filme foi aproximada 1500x, 500x e 300x. Todos os filmes apresentaram na área superficial uma estrutura granulada e leve rugosidade que aumentaram exponencialmente com aumento da concentração do EECC adicionado. Estas características estão relacionadas aos fatores como o tipo de plastificante, o amido utilizado e a relação de tempo e temperatura no preparo do filme (Thakur et al., 2019).

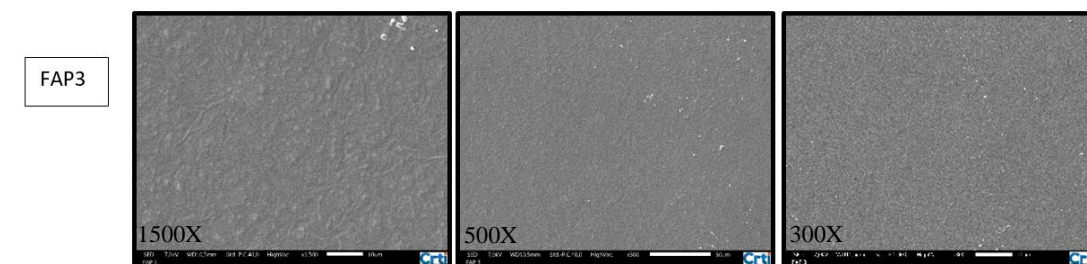
Um aspecto positivo é que os filmes não apresentaram fraturas e separação de fase, indicando que o EECC adicionado em diferentes doses foi incorporado de maneira uniforme na solução filmogênica. As micrografias dos filmes estão apresentadas nas figuras 1, 2, 3, 4 e 5.



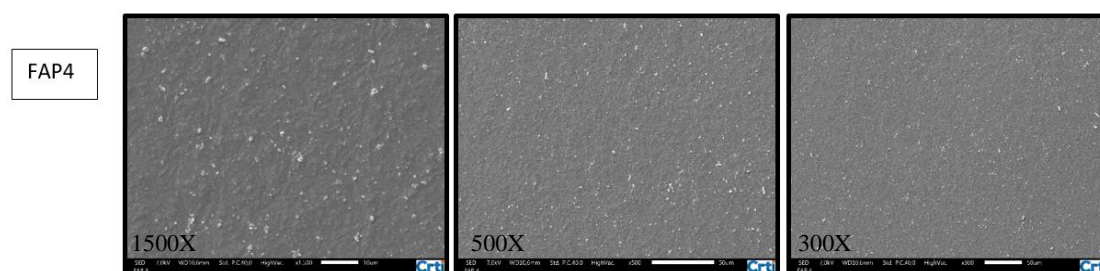
**Figura 1.** Micrografias da área superficial do filme de amido sem adição de EECC (FAP1).



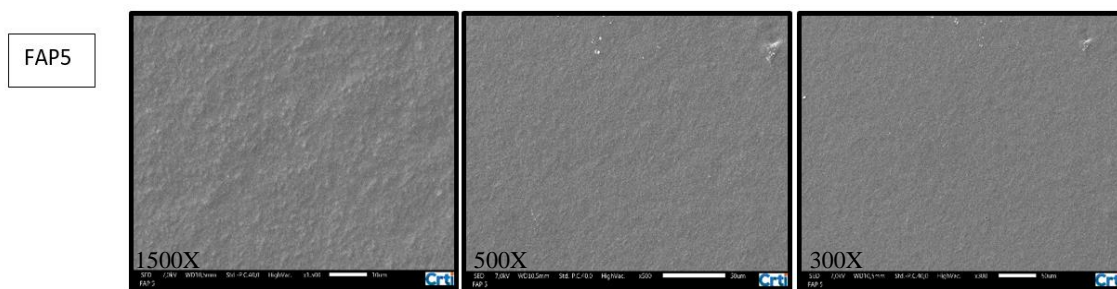
**Figura 2.** Micrografias da área superficial do filme de amido com adição de 250 µL de EECC (FAP2).



**Figura 3.** Micrografias da área superficial do filme de amido com adição de 500 µL de EECC (FAP3).



**Figura 4.** Micrografias da área superficial do filme de amido com adição de 750 µL de EECC (FAP4).



**Figura 5.** Micrografias da área superficial do filme de amido com adição de 1000 µL de EECC (FAP5).

A espessura obtida dos filmes depende dos fatores de secagem e o método de preparo utilizado. É importante medi-la pois ela afeta as propriedades mecânicas dos filmes, como a permeabilidade ao vapor de água (Adilah et al., 2018; Hosseini et al, 2015b). A Tabela 4 mostra os valores de espessura dos filmes. O filme controle (FAP1), apresentou a menor espessura e os demais aumentaram o valor da espessura conforme a dose de EECC era adicionada na solução filmogênica.

**Tabela 4.** Espessura, umidade e solubilidade dos filmes de araruta incorporados com EECC.

Filme	Espessura (mm)	Umidade (%)	Solubilidade (%)
FAP1	0.24±0.07c	10.94±1.73a	41.83±7.00a
FAP2	0.26±0.01bc	7.69±1.50b	34.11±6.24a
FAP3	0.29±0.02abc	9.43±0.03ab	33.27±10.02a
FAP4	0.30±0.02ab	7.82±0.70b	32.81±12.36a
FAP5	0.34±0.03a	11.44±0.65a	20.63±6.83a

Letras diferentes em uma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey; FAP1: Filme de amido de araruta sem EECC; FAP2: Filme de amido de araruta com 0,25% de EECC; FAP3: Filme de amido de araruta com 0,50% de EECC; FAP4: Filme de amido de araruta com 0,75% de EECC; FAP5: Filme de amido de araruta com 1% de EECC; ± Desvio padrão médio.

O amido de araruta possui alta concentração de amilose em seus rizomas, este polímero induz maior sensibilidade a umidade, e pode, posteriormente, também afetar as propriedades mecânicas dos filmes (Thakur et al., 2019). O teor de umidade dos filmes

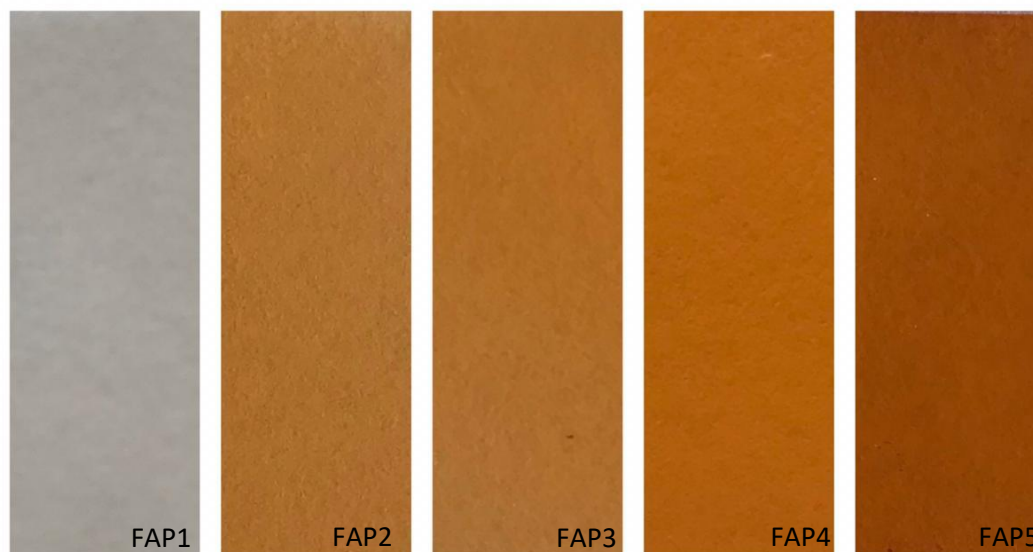
variou dependendo diretamente da quantidade de EECC adicionada. Entretanto, vale destacar que o filme com maior porcentagem de umidade 11.44 % (FAP5), ainda é considerado baixo em comparação com outros filmes (Hosseini et al., 2015b). Rambabu et al., (2019), aplicou diferentes concentrações de extrato de folha de manga em filmes de quitosana e o menor teor de umidade verificado nos filmes por eles avaliados foi de 15.84 %.

A solubilidade também é um parâmetro importante para ser analisada em filmes de amido. O nível ideal de solubilidade do filme, vai depender de qual será a sua aplicação final. De acordo com dados de solubilidade apresentados na Tabela 4, apesar de não diferirem estatisticamente entre si, a incorporação das diferentes doses de EECC nos filmes de araruta diminuíram a solubilidade dos filmes, sendo que o filme controle apresentou solubilidade de 41.83 %, enquanto o filme com maior dose de EECC apresentou solubilidade de 20.63 %.

O amido é um material hidrofílico, quando o filme de amido é exposto a água as suas moléculas poliméricas formam ligações de hidrogênio com a água causando a dissolução do filme (Bertuzzi et al., 2007; Kim et al., 2015). Deste modo, a diminuição da natureza hidrofílica dos filmes com adição de EECC, deve-se ao fato das moléculas poliméricas agora estarem interagindo com os polifenóis no extrato bruto, e desta forma, ao invés de fazerem ligação amido-água fazem agora ligação amido-polifenóis. Adilah et al., (2018), também verificou a diminuição da solubilidade de filmes de gelatina com a adição de extratos de casca de manga, pela formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas do extrato com a gelatina, limitando as ligações de hidrogênio com a água.

Após os 30 dias de análise, os pacotes de polietileno vazado que continham os filmes de amido de araruta com EECC foram retirados do solo, e, verificou-se a completa degradação dos filmes, não sendo possível pesar o material para quantificar a biodegradabilidade. Deste modo, pode-se concluir que a incorporação de EECC nos filmes, não diminui a biodegradabilidade do amido de araruta, podendo este ser considerado um material promissor para ser usado como embalagem biodegradável e ecologicamente correta.

As propriedades ópticas dos cinco filmes de amido de araruta foram avaliados do lado fosco e brilhante para cada filme. Os filmes incorporados com EECC apresentaram mais coloridos conforme o aumento da dose utilizada. A Figura 6, apresenta a imagem de cada filme produzido.



**Figura 6.** Filmes de amido de araruta incorporados com EECC. FAP1: Filme de amido de araruta sem EECC; FAP2: Filme de amido de araruta com 0,25% de EECC; FAP3: Filme de amido de araruta com 0,50% de EECC; FAP4: Filme de amido de araruta com 0,75% de EECC;

Os filmes foram analisados conforme os parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $\Delta E$ .  $L^*$  é a luminosidade do filme (claro/escuro);  $a^*$  coordenada vermelho/verde (+/-);  $b^*$  coordenada amarelo/azul (+/-). Os parâmetros de cores dos filmes estão apresentados na Tabela 5. Os resultados obtidos mostraram que a adição de EECC afetou a cor dos filmes. A incorporação de EECC nos filmes FAP2 e FAP5 não variou significativamente os valores de Luminosidade comparado ao filme sem extrato (FAP1), no entanto os filmes FAP3 e FAP4 variaram significativamente do filme controle.

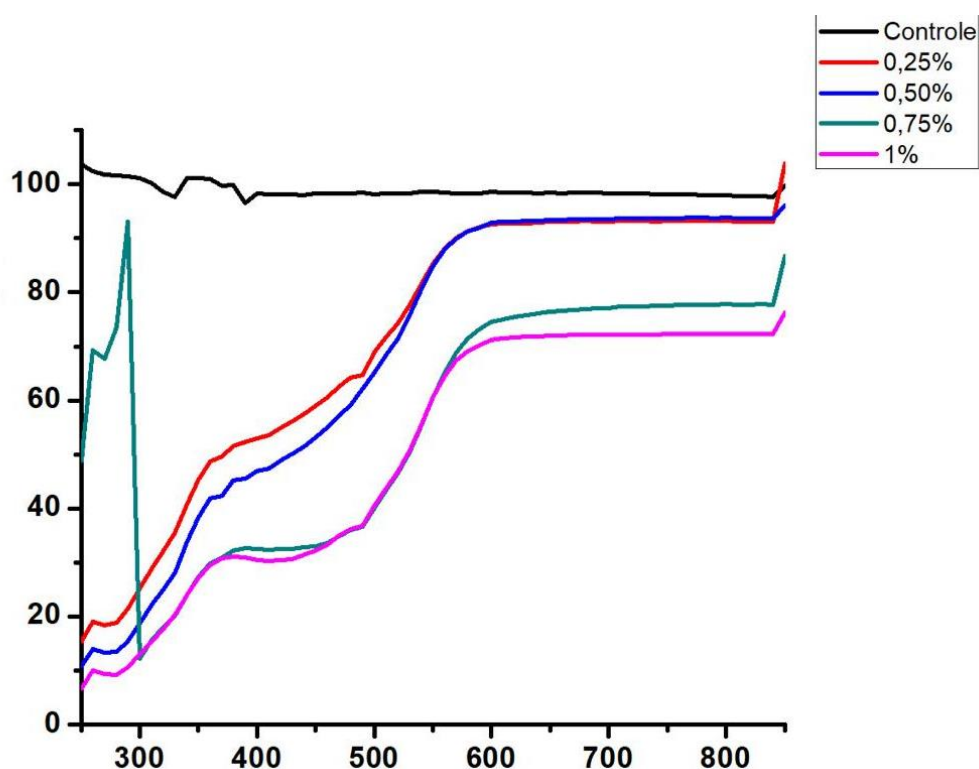
O filme controle apresentou valores negativos de cromaticidade  $a^*$  e  $b^*$  proporcionando assim tonalidade verde/azul. Enquanto os filmes com adição de 0.25 a 1% de EECC todos apresentaram valores positivos de cromaticidade  $a^*$  e  $b^*$  tendo coloração vermelho e amarelo. Já a diferença total das cores ( $\Delta E$ ), o filme controle (FAP1) apresentou a menor diferença e o filme com 1% de EECC (FAP5) apresentou a maior diferença de cor. Estes resultados já eram esperados, pois o EECC adicionado apresentava coloração vermelha/amarelo, possivelmente proveniente dos carotenoides capsantina e capsorubina, exclusivos das espécies *Capsicum*, conforme já mencionado por Neitzke et al., (2015).

**Tabela 5.** Medidas de cores dos filmes.

Filme	L*	a*	b*	$\Delta e$
FAP1	15.51±2.10a	-0.3±0.04d	-0.58±0.11c	4.00±0.23c
FAP2	15.00±1.00a	1.44±0.85c	5.88±3.68b	7.61±0.14b
FAP3	10.57±1.00b	2.26±1.16bc	7.17±3.26ab	7.03±0.14b
FAP4	10.79±1.11b	4.20±0.71a	9.14±1.33a	3.53±0.11c
FAP5	15.37±3.26a	3.02±1.94b	8.30±5.85ab	11.99±2.82 <sup>a</sup>

Letras diferentes em uma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey; Parâmetros CIE Lab de cor L\* (luminosidade), a\* e b\* (cromaticidade), e a diferença total de cor ( $\Delta e$ ) dos filmes de fécula de araruta incorporado com EECC; FAP1: Filme de amido de araruta sem EECC; FAP2: Filme de Amido de araruta com 0,25% de EECC; FAP3: Filme de amido de araruta com 0,50% de EECC; FAP4: Filme de amido de araruta com 0,75% de EECC; FAP5: Filme de amido de araruta com 1% de EECC.  $\pm$  Desvio padrão médio.

Em relação a cor dos filmes produzidos, na figura 7 é possível observar a redução na taxa de transmissão de luz dos filmes com adição das diferentes doses de EECC na região do visível (400 a 800 nm). A cor é um importante parâmetro a ser avaliado, pois influencia na aceitação dos consumidores. Os filmes utilizados como embalagens geralmente são transparentes para mostrar o produto embalado, no entanto filmes coloridos e opacos ajudam na proteção de alimentos expostos a luz visível e UV, principalmente em alimentos com alto teor de gordura, como as carnes, evitando sua degradação oxidativa (Rambabu et al., 2019; Romani et al., 2018).

**Figura 7.** Taxa de transmissão de luz Uv-vis de filmes de araruta incorporados com diferentes doses de EECC.

## 4.5 Conclusão

Este estudo revelou que o extrato etanólico dos frutos maduros de *C. chinense* apresenta grande potencial para aplicação no processo de fabricação de embalagens bioativas. A promissora atividade antioxidante exibida pelo EECC é principalmente pela sua alta concentração de compostos fenólicos. Todos os filmes de araruta incorporados com EECC apresentaram área superficial de estrutura granulada e levemente rugosa, entretanto, em todos os experimentos o EECC foi incorporado de maneira uniforme. Esta adição levou ao aumento da espessura, diminuição da solubilidade e alteração da cor conforme as doses empregadas eram aumentadas. Em suma, estes resultados revelaram o potencial biotecnológico dos frutos de *C. chinense*, e reforçando que novos estudos microbiológicos *in vitro* e *in vivo* são necessários para verificar a bioatividade dos filmes incorporados com EECC contra bactérias e fungos.

## 4.6 Referências Bibliográficas

- Adilah, A. N., Jamilah, B., Noranizan, M. A., & Hanani, Z. A. N. (2018). Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.01.006>.
- Antonious, G. F., Kochhar, T. S., Jarret, R. L., & Snyder, J. C. (2006). Antioxidants in hot pepper: variation among accessions. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 41(7), 1237–1243. <https://doi.org/10.1080/03601230600857114>.
- Arbos, K. A., Freitas, R. J. S., Stertz, S. C., Dornas, M. F. (2010). Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(2), 501-506. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000200031>.
- Bertuzzi, M. A., Armada, M., & Gottifredi, J. C. (2007). Physicochemical characterization of starch based films. *Journal of Food Engineering*, 82(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.016>.
- Castro Alves, V. C., Pinto, N. O. F., Penha, M. F. A., Gomes, B. L., Reifschneider, F. J. B., & Garruti, D. S. (2014). Aroma-Active Compounds of *Capsicum Chinense* Var. Biquinho. *Flavour Science*, 567–571. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-398549-1.00104-5>.
- de Aguiar, A. C., da Fonseca Machado, A. P., Figueiredo Angolini, C. F., de Morais, D.



- R., Baseggio, A. M., Eberlin, M. N., Junior, M. R. M., & Martínez, J. (2019). Sequential high-pressure extraction to obtain capsinoids and phenolic compounds from biquinho pepper (*Capsicum chinense*). *Journal of Supercritical Fluids*, 150, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.04.016>.
- de Aguiar, A. C., dos Santos, P., Coutinho, J. P., Barbero, G. F., Godoy, H. T., & Martínez, J. (2014). Supercritical fluid extraction and low pressure extraction of Biquinho pepper (*Capsicum chinense*). *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P2), 1239–1246. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.014>.
- de Oliveira Guilherme, D., Branco, F. P., Madeira, N. R., Brito, V. H., Oliveira, C. E. de, Jadoski, C. J., & Cereda, M. P. (2019). Starch Valorization From Corm, Tuber, Rhizome, and Root Crops. *Starches for Food Application*, 5, 167–222. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809440-2.00005-8>.
- Domenico, C. I., Coutinho, J. P., Godoy, H. T., & Melo, A. M. T. (2012). Caracterização agrônômica e pungência em pimenta de cheiro. *Horticultura Brasileira*, 30(3), 466–472. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362012000300018>.
- Domínguez, R., Barba, F. J., Gómez, B., Putnik, P., Bursac Kovačević, D., Pateiro, M., Santos, E. M., & Lorenzo, J. M. (2018). Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review. *Food Research International*, 113, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.073>.
- Guillen, N. G., Tito, R., & Mendoza, N. G. (2018). Capsaicinoids and pungency in *Capsicum chinense* and *Capsicum baccatum* fruits. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 48(3), 237–244. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632018v4852334>.
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2015a). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*, 67, 403–413. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.062>.
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2015b). Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 44, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.004>.
- Issa, A., Ibrahim, S. A., & Tahergorabi, R. (2017). Impact of Sweet Potato Starch-Based Nanocomposite Films Activated With Thyme Essential Oil on the Shelf-Life of Baby Spinach Leaves. *Foods*, 6(6), e43. <https://doi.org/10.3390/foods6060043>.
- Jahed, E., Khaledabad, M. A., Almasi, H., & Hasanzadeh, R. (2017). Physicochemical properties of *Carum copticum* essential oil loaded chitosan films containing organic

- nanoreinforcements. *Carbohydrate Polymers*, 164, 325–338. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.022>.
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012, August). Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2058–2076. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0835-4>.
- Kalpana, S., Priyadarshini, S. R., Maria Leena, M., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2019). Intelligent packaging: Trends and applications in food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.008>.
- Kim, S. R. B., Choi, Y. G., Kim, J. Y., & Lim, S. T. (2015). Improvement of water solubility and humidity stability of tapioca starch film by incorporating various gums. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.009>.
- Mardigan, L. P., Santos, V. J., Silva, P. T., Visentainer, J. V., Gomes, S. T. M., & Matsushita, M. (2019). Investigation of bioactive compounds from various avocado varieties (*Persea americana* Miller). *Food Science and Technology*, 39(Suppl. 1), 15-21. <http://dx.doi.org/10.1590/fst.34817>.
- Martucci, J. F., & Ruseckaite, R. A. (2009). Tensile properties, barrier properties, and biodegradation in soil of compression-Molded gelatin-dialdehyde starch films. *Journal of Applied Polymer Science*, 112(4), 2166–2178. <https://doi.org/10.1002/app.29695>
- Morales-Soto, A., Gómez-Caravaca, A. M., García-Salas, P., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). High-performance liquid chromatography coupled to diode array and electrospray time-of-flight mass spectrometry detectors for a comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in three pepper (*Capsicum annuum* L.) samples. *Food Research International*, 51(2), 977–984. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.022>.
- Neitzke, R. S., Vasconcelos, C. S., Barbieri, R. L., Vizzotto, M., Fetter, M. R., & Corbelini, D. D. (2015). Variabilidade genética para compostos antioxidantes em variedades crioulas de pimentas (*Capsicum baccatum*). *Horticultura Brasileira*, 33(4), 415–421. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620150000400002>.
- Nascimento, P. L. A., Nascimento, T. C. E. S., Ramos, N. S. M., Silva, G. R., Gomes, J. E. G., Falcão, R. E. A., Moreira, K. A., Porto, A. L. F., & Silva, T. M. S. (2014). Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of phenolics isolated from

- different extracts of *Capsicum frutescens* (pimenta malagueta). *Molecules*, 19, 5434-5447. <https://doi.org/10.3390/molecules19045434>.
- Nogueira, G. F., Fakhouri, F. M., & de Oliveira, R. A. (2018). Extraction and characterization of arrowroot (*Maranta arundinaceae* L.) starch and its application in edible films. *Carbohydrate Polymers*, 186, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.024>.
- Oldoni, T. L. C., Merlin, N., Karling, M., Carpes, S. T., Alencar, S. M. de, Morales, R. G. F., Silva, E. A., & Pilau, E. J. (2019). Bioguided extraction of phenolic compounds and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of extracts of *Moringa oleifera* leaves collected in Brazil. *Food Research International*, 125, 108647. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108647>.
- Piñeros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A., & Goyanes, S. (2017). Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 63, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.034>.
- Rambabu, K., Bharath, G., Banat, F., Show, P. L., & Cocoltzi, H. H. (2019). Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 1234–1243. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.196>.
- Romani, V. P., Hernández, C. P., & Martins, V. G. (2018). Pink pepper phenolic compounds incorporation in starch/protein blends and its potential to inhibit apple browning. *Food Packaging and Shelf Life*, 15, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.01.003>.
- Thakur, R., Pristijono, P., Scarlett, C. J., Bowyer, M., Singh, S. P., & Vuong, Q. V. (2019). Starch-based films: Major factors affecting their properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 1079–1089. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.190>
- Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762–769. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.026>.

## 5. CAPÍTULO III

### **Atividade antifúngica *in vitro* de extratos de *Capsicum chinense***

**Resumo:** As perdas de alimentos por contaminação de fungos são fator de grande impacto na agricultura, gerando altos prejuízos econômicos. Para evitar a perda de diversos produtos alimentícios são utilizados fungicidas sintéticos e naturais. As espécies do gênero *Capsicum* são usadas há muitos anos para auxiliar na conservação de alimentos por possuir substâncias química com ação antifúngica e antioxidante. O objetivo deste estudo foi analisar os extratos da pimenta-biquinho EHCC, EACC, EMCC, quanto ao rendimento e atividade antifúngica frente aos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Os extratos foram obtidos de forma sequencial, utilizando o procedimento de maceração, os solventes usados foram hexano, acetato de etila e metanol. Foi utilizado o procedimento de maceração e calculados os respectivos rendimentos. A análise antifúngica foi avaliada seguindo a metodologia de difusão em disco, nos volumes de 25 $\mu$ L, 50 $\mu$ L, 100 $\mu$ L e 200 $\mu$ L de cada extratos. Os resultados obtidos de rendimento mostraram que dentre os extratos da pimenta o EMCC possui o maior rendimento de extração. Quanto a atividade antifúngica, o EHCC apresentou o melhor percentual de inibição micelial, sendo os maiores volumes 100 $\mu$ L e 200 $\mu$ L que apresentaram os maiores percentuais.

**PALAVRAS CHAVE:** Pimenta biquinho; produtos naturais; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Rhizopus stolonifer*; *Colletotrichum gloeosporioides*.

## 5.1 Introdução

A população mundial tem cerca de 7,2 bilhões de habitantes. As previsões de crescimento populacional habitacional mostram que em menos de 60 anos a população dobrará para 14,4 bilhões. Muitos países como a China, a Índia e os Estados Unidos já estão passando por um rápido crescimento populacional. Para satisfazer uma população tão numerosa será necessário o aumento de recursos básicos essenciais, como alimentos, água e energia. No entanto, estes recursos não estão aumentando conforme o crescimento populacional. Já é frequente na atualidade problemas como a escassez de alimentos, mais de 66% de pessoas no mundo são relatadas como desnutridas. Deste modo, é necessário que medidas sejam tomadas no presente para evitar graves consequências no futuro (Pimentel and Burgess, 2018).

Um fator de grande impacto na agricultura que reduz a produção de alimentos, são as doenças ocasionadas por fungos que causam grandes prejuízos a agricultura. A contaminação de alimentos por fungos fitopatogênicos pode ocorrer em diversos momentos da cadeia produtiva, desde a produção, processamento, embalagem ou armazenamento. A deterioração causada por fungos explica cerca de 5 a 10% das perdas de alimentos em todas as fases da produção (Benedict et al., 2016).

Os cereais são o grupo alimentar mais comumente consumido em todo o mundo, tanto como alimento humano quanto como constituintes principais da alimentação animal. Eles representam cerca de 80% dos suprimentos de alimentos no mundo. No Brasil o processo de modernização da agricultura tem levado ao aumento da produção de alguns tipos de grãos como o milho, o trigo, a soja e a cevada (Baroni et al., 2017; Los et al., 2018; Pimentel and Burgess, 2018). Dentre estes se destaca a soja.

Conforme a Embrapa, o Brasil é o segundo maior produtor deste grão, ficando somente atrás dos Estados Unidos. Um grande problema para este cenário vem sendo as perdas na produção dessa cultivar, por causa de infestações pelo mofo branco. Avalia-se a presença do fungo em mais de seis milhões de hectares de soja no Brasil, reduzindo a produtividade em cerca de 60% (Juliatti et al., 2013).

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* causa a doença conhecida como mofo branco. Considerado um patógeno vegetal de importância mundial, pode ocorrer em regiões temperadas tanto quanto subtropicais e tropicais. Além da soja pode causar infecção em mais de 400 espécies de plantas (Cezar Juliatti et al., 2015; Huang et al., 2019).

Outra doença ocasionada por fungos é a podridão mole, causada pelo fungo *Rhizopus stolonifer*. É uma das principais doenças pós-colheita em frutos de morangos, tomates e outros, gerando grande perda destes frutos durante o armazenamento, transporte e comercialização (Kong et al., 2019; Oliveira et al., 2019).

O fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* também atinge várias culturas na pré-colheita e na pós-colheita, causando a doença conhecida como antracnose. Este fungo pode infectar mais de 1000 espécies, dentre elas estão os frutos cítricos, manga, abacate, cacau e maçã (Barrios-Roblero et al., 2019; Feng et al., 2019; Zhang et al., 2019)

Devido ao extensivo uso e a importância mundial dos grãos de cereais, frutas e outros diversos alimentos que podem ser contaminados por fungos, que a descontaminação e a preservação são de extrema importância para a agricultura e a segurança alimentar. Dessa forma, para tentar evitar e controlar a incidência de doenças em alimentos são utilizados principalmente defensivos agrícolas sintéticos. No entanto, apesar de apresentarem grandes benefícios econômicos estes produtos podem gerar impactos ambientais, riscos à saúde humana e com o frequente uso podem desenvolver a resistência de certos fungos (Los et al., 2018).

Pesquisas estão sendo realizadas para desenvolver métodos de controle alternativo para doenças causadas por fungos na pré-colheita e pós-colheita utilizando produtos naturais. Diversas plantas apresentam substâncias químicas em sua composição com ação antifúngica, devido a isto os seus óleos essenciais e extratos também podem apresentar estas propriedades. Outro método de controle de pós-colheita é a utilização de filmes biodegradáveis incorporados com substâncias ativas, que irão proteger os alimentos de doenças e aumentar o tempo de prateleira destes (Palou et al., 2016).

A pimenta-biquinho, *Capsicum chinense*, também conhecida como pimenta de bico ou pimenta-bico, é uma espécie apreciada por apresentar frutos doces, saborosos e aromáticos. As pimentas deste gênero possuem uma ampla variabilidade de espécies, cores, sabores e aromas. Seus frutos geralmente apresentam diversas propriedades nutricionais, antioxidantes, antimicrobianas entre outras (Jarret and Berke, 2008; Santos et al., 2010). Entretanto, apesar da diversidade de compostos presentes nas pimentas do gênero *Capsicum*, ainda há poucos estudos e aplicações para a pimenta-biquinho, além do seu uso comum no ramo alimentício. Deste modo, objetivo deste estudo foi analisar os extratos da pimenta-biquinho, quanto ao rendimento e atividade antifúngica frente aos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

## **5.2 Materiais e métodos**

### **5.2.1 Material vegetal**

Os frutos maduros da pimenta-biquinho foram comprados em feiras no município de Santa Helena de Goiás e Rio Verde – GO, levados para o Laboratório de Química de Produtos Naturais do IF Goiano - Campus Rio Verde, onde foram limpos com água corrente e água destilada, após secos foram retirados os seus pedúnculos, os frutos foram pesados, e desidratados em estufa com circulação de ar a 40°C por 96 horas. Após desidratados os mesmos foram triturados, acondicionados em um recipiente vedado e armazenados na geladeira até o preparo do extrato.

### **5.2.2 Obtenção dos extratos**

Os extratos foram obtidos de forma sequencial utilizando três tipos de solventes orgânicos. Os solventes foram hexano, acetato de etila e metanol. Foi feito o procedimento de maceração de acordo com de Aguiar et al., (2014) com modificações. Foram transferidos 5,0 g de amostra a 100 mL do solvente orgânico, que permaneceu sob agitação magnética permanente por 2 horas e depois o contato entre o solvente e a matéria-prima foi mantido durante quatro dias à temperatura ambiente, protegido da luz, e com uma agitação manual diária. A mistura resultante da extração foi separada por filtração, seguida por evaporação do solvente. O Resíduo do extrato foi novamente extraído de forma sequencial com o próximo solvente. Os extratos foram adquiridos em triplicata para cada solvente.

### **5.2.3 Rendimento de extração**

O teor dos extratos do fruto da pimenta-biquinho para cada solvente, foi determinado com base na seguinte fórmula:  $\text{Teor (\%)} = \frac{\text{Massa do extrato}}{\text{Massa da amostra total}} \times 100$ .

### **5.2.4 Ensaio antifúngico**

Para a análise da atividade biológica, realizou-se primeiramente um teste de solubilidade nos extratos secos de hexano, acetato de etila e metanol, consistindo em avaliar a solubilidades destes extratos em dimetilsulfóxido (DMSO) 40%, acetona 60% e tween 80 a 5%. Em seguida com o objetivo de avaliar a toxicidade do solvente frente aos fungos, foi feito um teste biológico com o Tween 80 a 5% (solvente escolhido), para

avaliar se este iria interferir no resultado da análise. A atividade antifúngica dos extratos de *C. chinense* foi avaliada seguindo a metodologia de difusão em disco descrita por Xavier et al., (2016). Foram pesados 200 mg de cada extrato seco e diluídos em 1mL de tween 80 a 5%, homogeneizados em agitador de tubos, e os volumes utilizados de extrato foram de 25 µL, 50 µL, 100 µL e 200 µL. Como controle negativo foram utilizadas placas sem adição de extrato (testemunha). Placas de Petri foram previamente esterilizadas e preparadas com meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar). Após a solidificação do meio, os extratos com diferentes volumes foram adicionados e espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski na superfície de toda a placa. Posteriormente, foram depositados discos de 5 mm de diâmetro de meio BDA contendo micélio no centro da placa. Foi acompanhado o crescimento micelial dos fungos diariamente e as medidas de crescimento micelial foram tomadas ao completo crescimento do fungo nas placas controle. O tratamento foi realizado em triplicata e a inibição do crescimento dos fungos foi determinada pela média das repetições para cada volume em relação ao crescimento da testemunha, utilizando valores de PIC (percentual de inibição de crescimento micelial) cuja fórmula é:

$$PIC = \frac{\text{crescimento do controle} - \text{crescimento do tratamento}}{\text{crescimento do controle}} \times 100$$

### 5.2.5 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata e calculado os seus respectivos desvios padrão. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o *software* Sisvar 5.6.

## 5.3 Resultados e discussões

### 5.3.1 Rendimento de extração

O rendimento de extração pode variar por diversos fatores, método de extração, parte do material vegetal utilizado, temperatura, tempo de extração e principalmente pelo tipo de solvente utilizado (Machado et al., 2013). Os extratos de *C. chinense* variaram significativamente entre si, sendo o extrato preparado com o solvente metanol que obteve o maior rendimento de extração, seguido pelo extrato de hexano e acetato de etila, conforme pode ser observado na Tabela 1.

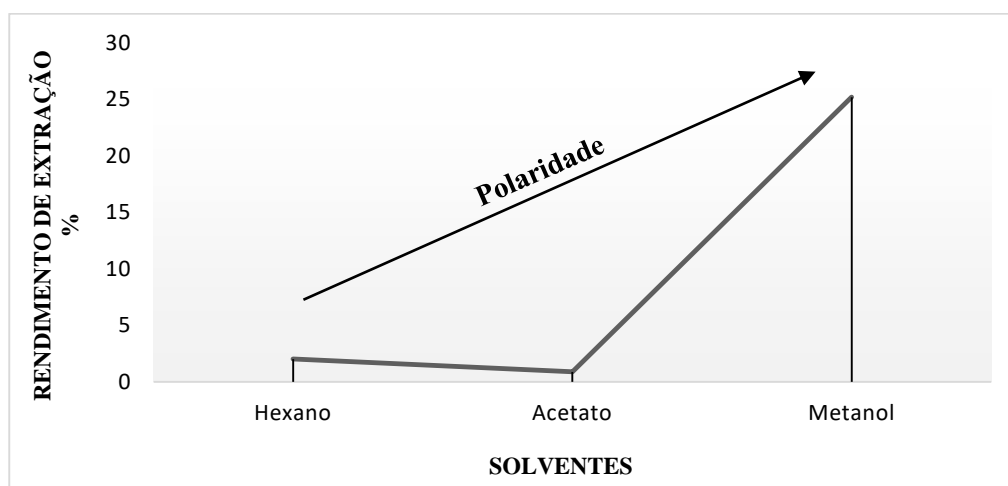


**Tabela 1.** Valores médios da massa e rendimento percentual dos extratos de *C. chinense*.

<i>Solventes</i>	<i>Massa de extrato seco (g)</i>	<i>Rendimento de extração (%)</i>
<i>Hexano</i>	0,10g	2,01b
<i>Acetato de etila</i>	0,04g	0,87c
<i>Metanol</i>	1,26g	25,2 <sup>a</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de de Tukey ( $p > 0,05$ ).

O rendimento da extração pode ser analisado pela polaridade do solvente utilizado. Conforme a Figura 1, o maior rendimento de compostos totais extraídos foi no extrato de alta polaridade, metanol, enquanto os extratos com solventes de baixa polaridade apresentaram rendimento inferior.

**Figura 1.** Rendimento de extração conforme a polaridade dos solventes.

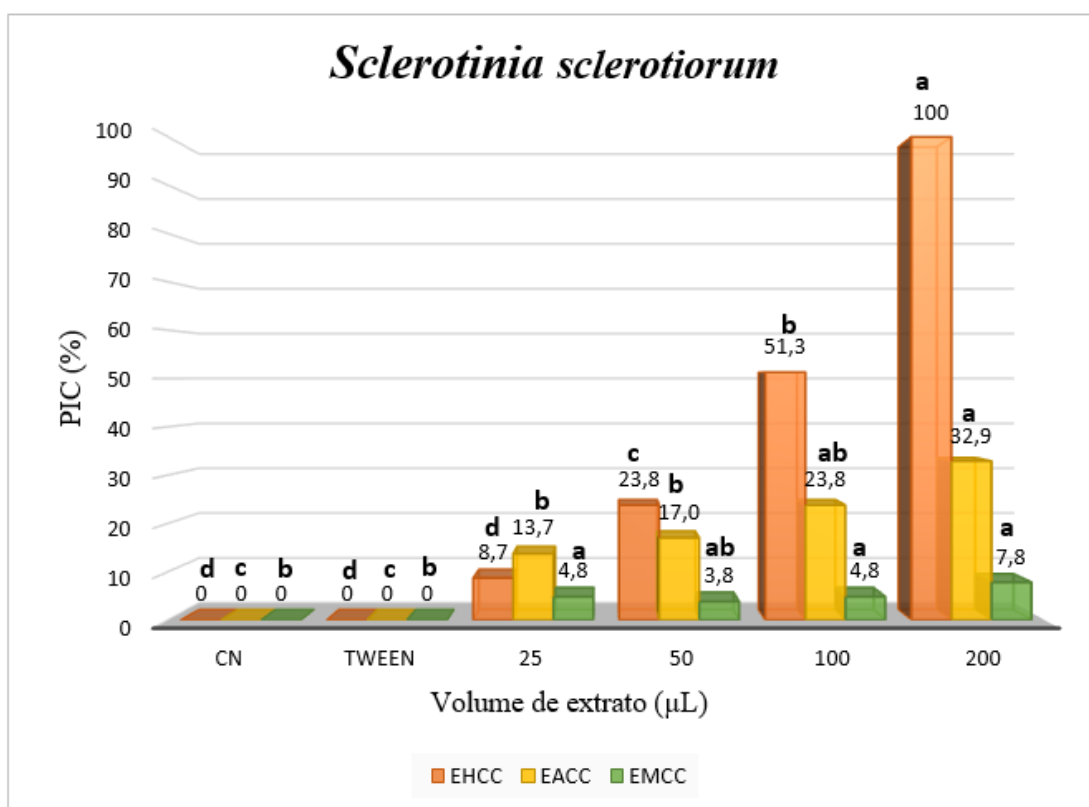
Solventes polares tendem a solubilizar solutos polares e solventes apolares tendem a solubilizar solutos de baixa polaridade. Conforme de Aguiar et al., (2014), os solventes mais polares resultam em maiores rendimento de extração da pimenta-biquinho, e indica a maior porcentagem de compostos contidos na matriz vegetal tem polaridade intermediária a alta. Podendo ser açúcares, vitaminas, polifenóis e saponinas (Azmir et al., 2013).

### 5.3.2 Atividade antifúngica

A análise antifúngica dos extratos secos preparados com os solventes hexano (EHCC), acetato de etila (EACC) e metanol (EMCC) foram analisados frente aos fungos

*Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum gloesporioides* com diferentes volumes.

Todos os extratos apresentaram um percentual de inibição do crescimento para o fungo *S. sclerotiorum* (Figura 2). No entanto, o EHCC apresentou a melhor atividade antifúngica frente a este fungo quando comparado com os demais. Sendo que o volume de 200  $\mu\text{L}$  apresentou um PIC de 100% de inibição do fungo, e os demais volumes utilizados 100  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$  e 25  $\mu\text{L}$  apresentaram respectivamente os seguintes valores de PIC, 51,3%, 23,8%, 8,7%.



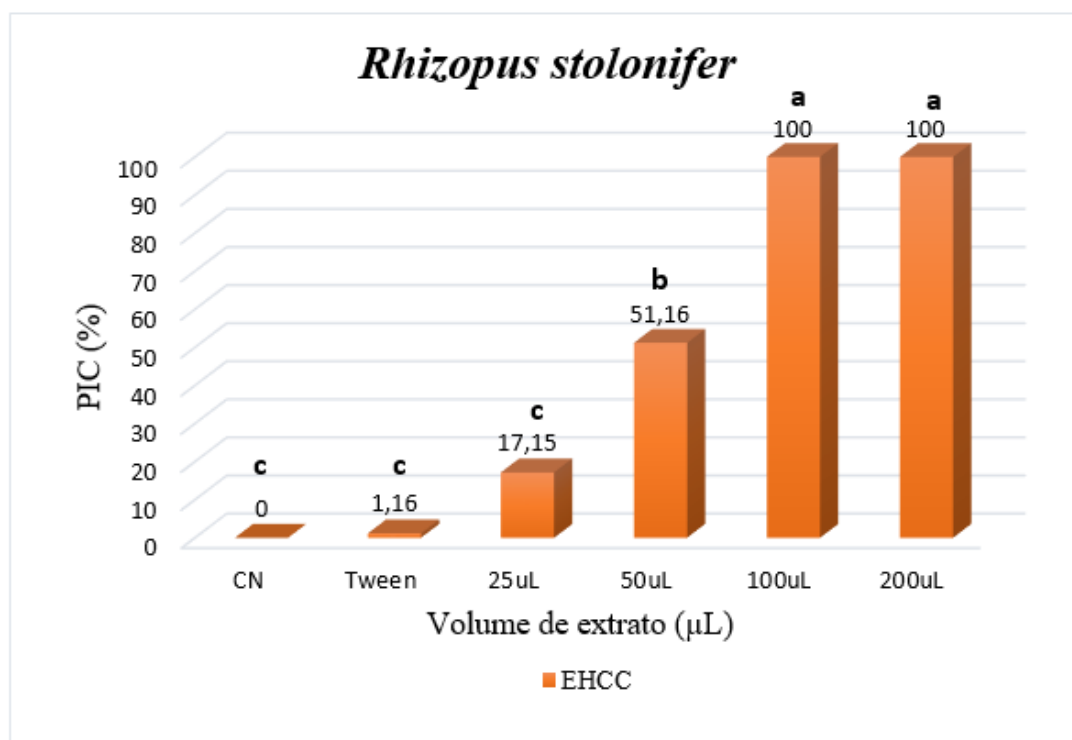
**Figura 2.** Percentual de inibição micelial dos extratos EHCC, EACC, EMCC frente ao fungo *S. sclerotiorum*.

CN: Ausência do extrato; EHCC: Extrato hexânico de *Capisicum chinense*; EACC Extrato acetato de etila de *Capisicum chinense*; EMCC: Extrato metanólico de *Capisicum chinense*; Tween: Solvente utilizado na diluição, tween 80 a 5%;

\* Os valores médios com letras diferentes, para o mesmo extrato analisado, são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).

O EACC também apresentou a melhor inibição com o maior volume utilizado, 200  $\mu\text{L}$ , obtendo PIC de 32,9% e os demais volumes de 100  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$  e 25  $\mu\text{L}$  apresentaram respectivamente os seguintes valores percentuais de inibição 23,8%, 17,0% e 13,7%. Já o EMCC apresentou os menores valores de PIC para o fungo *S. sclerotiorum*, e também não apresentaram aumento crescente da atividade antifúngica de acordo com o

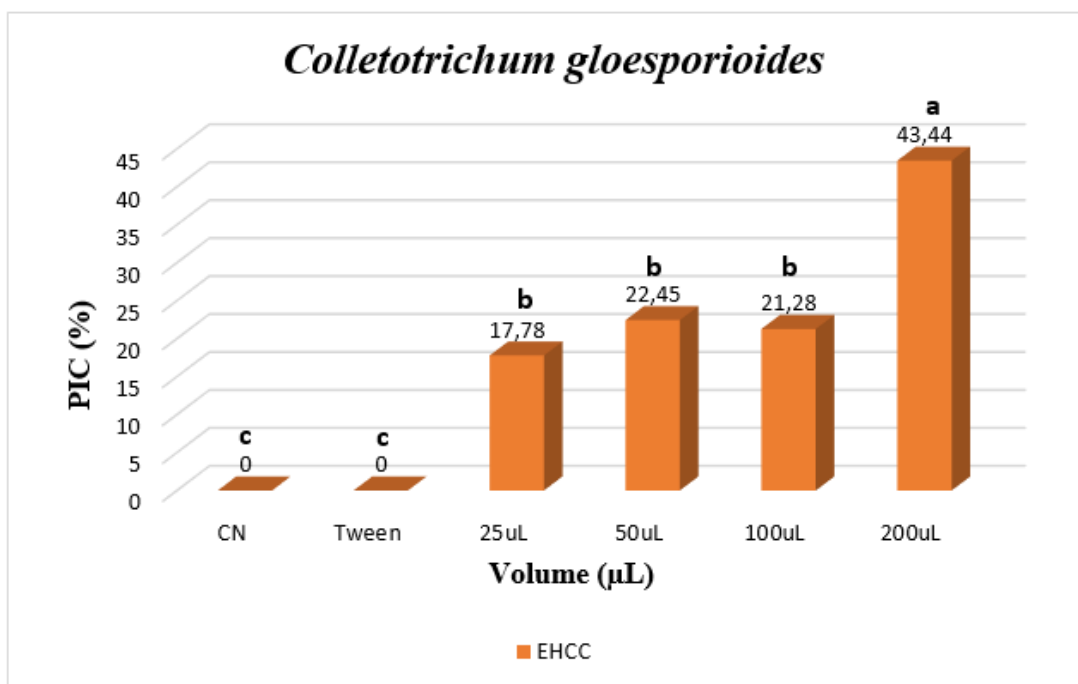
aumento do volume utilizado, sendo o volume de 200  $\mu\text{L}$  a melhor atividade verificada para este fungo, com 7,8% de inibição. Os demais volumes, 100  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$  e 25  $\mu\text{L}$  apresentaram respectivamente os seguintes valores de inibição micelial 4,8%, 3,8% e 4,8%. Também se verificou que o solvente utilizado, Tween 80 a 5%, não inibiu o crescimento do fungo *S. sclerotiorum*, não interferindo na análise.



**Figura 3.** Percentual de inibição micelial do extrato EHCC frente ao fungo *R. stolonifer*.

CN: Ausência do extrato; EHCC: Extrato hexânico de *Capisicum chinense*; EACC Extrato acetato de etila de *Capisicum chinense*; EMCC: Extrato metanólico; Tween: Solvente utilizado na diluição, tween 80 a 5%; \* Os valores médios com letras diferentes, para o mesmo extrato analisado, são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).

Para os fungos *R. stolonifer* e *C. gloeosporioides* apenas o EHCC apresentou inibição do crescimento micelial (Figuras 3 e 4). Frente ao fungo *R. stolonifer* o EHCC apresentou promissora atividade antifúngica, para os maiores volumes utilizados 200  $\mu\text{L}$  e 100  $\mu\text{L}$  o percentual de inibição do crescimento micelial foi de 100%. Para os volumes de 50  $\mu\text{L}$  e 25  $\mu\text{L}$  apresentaram PIC de 51,16% e 17,15% respectivamente. Já para o fungo *C. gloeosporioides*, o EHCC não apresentou inibição total do crescimento do fungo, no entanto apresentou valores satisfatórios nesta análise, sendo eles 43,44%, 21,28%, 22,45% e 17,78%. É importante destacar que para estas análises com os dois fungos o solvente utilizado também não apresentou interferência no crescimento dos fungos.



**Figura 4.** Percentual de inibição micelial dos extratos EHCC frente ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

CN: Ausência do extrato; EHCC: Extrato hexânico de *Capisicum chinense*; EACC Extrato acetato de etila de *Capisicum chinense*; EMCC: Extrato metanólico. Tween: Solvente utilizado na diluição, tween 80 a 5%;

\* Os valores médios com letras diferentes, para o mesmo extrato analisado, são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).

De modo geral, os extratos preparados com solventes de baixa polaridade (EHCC e EACC) apresentaram as melhores atividades antifúngicas. Sendo assim, pode-se dizer que os compostos da pimenta-biquinho responsáveis por apresentarem ação antifúngica são compostos apolares. Os solventes apolares podem extrair compostos lipofílicos como lipídios, ceras, pigmentos e terpenos (Azmir et al., 2013; de Aguiar et al., 2014).

Garruti et al., (2013) identificou 32 compostos na pimenta-biquinho, sendo 5 deles terpenos. Os terpenos são alcenos naturais e não contêm uma função química específica, abrange as principais funções como álcoois, hidrocarbonetos, fenóis entre outros (Felipe and Bicas, 2017). São largamente distribuídos na natureza em ampla variedade de compostos vegetais e dotados de potencial atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos (Medeiros et al., 2015).

## 5.4 Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a pimenta-biquinho (*C. chinense*) tem substâncias químicas com potencial atividade antifúngica. Em relação ao rendimento dos extratos produzidos, o extrato polar, EMCC, apresentou maior rendimento de extração em relação aos extratos menos polares, EHCC e EACC, sugerindo que grande parte das substâncias químicas da pimenta são de alta polaridade. No entanto, os extratos apolares, principalmente o de hexano, apresentam atividade antifúngica superior as substâncias químicas polares presentes na pimenta-biquinho. Portanto, ainda é importante analisar quais são as substâncias químicas presentes em *C. chinense* para sugerir possíveis aplicações da mesma.

## 5.5 Referências Bibliográficas

- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* 117, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Baroni, G., Benedeti, P., Seidel, D., 2017. Cenários prospectivos da produção e armazenagem de grãos no Brasil. *Rev. Thema* 14, 55–64. <https://doi.org/10.15536/thema.14.2017.55-64.452>
- Barrios-Roblero, C., Rosas-Quijano, R., Salvador-Figueroa, M., Gálvez-López, D., Vázquez-Ovando, A., 2019. Antifungal lactic acid bacteria isolated from fermented beverages with activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Food Biosci.* 29, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.03.008>
- Benedict, K., Chiller, T.M., Mody, R.K., 2016. Invasive Fungal Infections Acquired from Contaminated Food or Nutritional Supplements: A Review of the Literature. *Foodborne Pathog. Dis.* <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2108>
- Cezar Juliatti, F., de Andrade Figueiró, A., Ávila Garcia, R., Bosco dos Santos, J., da Cruz Machado, J., Ampélio Pozza, E., Lobo Junior, M., Antônio Civardi, E., José Paula Júnior, T., Faria Vieira, R., da Silva Lehner, M., Cardoso Lima, R., de Sousa Jaccould Filho, D., 2015. *Sclerotinia sclerotiorum* e Mofo branco: Estudos básicos e aplicados.

- de Aguiar, A.C., dos Santos, P., Coutinho, J.P., Barbero, G.F., Godoy, H.T., Martínez, J., 2014. Supercritical fluid extraction and low pressure extraction of Biquinho pepper (*Capsicum chinense*). *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 1239–1246.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.014>
- Felipe, L.O., Bicas, J.L., 2017. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais 39, 120–130. <https://doi.org/10.21577/0104-8899.20160068>
- Feng, G., Zhang, X.S., Zhang, Z.K., Ye, H.C., Liu, Y.Q., Yang, G.Z., Chen, C., Chen, M., Yan, C., Wang, L.Y., Zhang, J.X., Zhang, J., 2019. Fungicidal activities of camptothecin semisynthetic derivatives against *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro and in mango fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 147, 139–147.  
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.09.019>
- Garruti, D. dos S., Pinto, N. de O.F., Alves, V.C.C., Penha, M.F.A. da, Tobaruela, E.D.C., Araújo, Í.M. da S., 2013. Perfil de voláteis e qualidade sensorial de novas variedades de pimentas *Capsicum chinense*. *Food Sci. Technol.* 33, 102–108.  
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000500016>
- Huang, X. ping, Luo, J., Li, B. xing, Song, Y. fei, Mu, W., Liu, F., 2019. Bioactivity, physiological characteristics and efficacy of the SDHI fungicide pydiflumetofen against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pestic. Biochem. Physiol.*  
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.017>
- Jarret, R.L., Berke, T., 2008. Variation for Fruit Morphological Characteristics in a *Capsicum chinense* Jacq. Germplasm Collection in: *HortScience* Volume 43 Issue 6 (2008).
- Juliatti, Fernando Cezar, Crato, F.F. do, Juliatti, Fernanda Cristina, Couto, K.R., Juliatti, B.C.M., 2013. Escala diagramática para avaliação da severidade de mofo branco em soja. *Biosci. J.* 29, 676–680.
- Kong, J., Zhang, Y., Ju, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Quek, S.Y., Yao, W., 2019. Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes. *Food Chem.* 285, 380–388.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.099>
- Los, A., Ziuzina, D., Bourke, P., 2018. Current and Future Technologies for

- Microbiological Decontamination of Cereal Grains. *J. Food Sci.*  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14181>
- Machado, M.T.C., Mello, B.C.B.S., Hubinger, M.D., 2013. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. *J. Food Eng.* 117, 450–457.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.007>
- Medeiros, V.P.B. de, Silva, G.S., de Oliveira, E.L., de Oliveira PEREIRA, F., 2015. Identificação da microbiota fúngica anemófila em uma indústria de polpas de frutas e susceptibilidade antifúngica a terpenos Identification of the airborne fungal microbiota in a fruit pulp industry and antifungal susceptibility to terpenes.
- Oliveira, J., Parisi, M.C.M., Baggio, J.S., Silva, P.P.M., Paviani, B., Spoto, M.H.F., Gloria, E.M., 2019. Control of *Rhizopus stolonifer* in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethylcellulose. *Int. J. Food Microbiol.* 292, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.014>
- Palou, L., Ali, A., Fallik, E., Romanazzi, G., 2016. GRAS, plant- and animal-derived compounds as alternatives to conventional fungicides for the >control of postharvest diseases of fresh horticultural produce. *Postharvest Biol. Technol.* 122, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.017>
- Pimentel, D., Burgess, M., 2018. World Human Population Problems ☆, in: *Encyclopedia of the Anthropocene*. Elsevier, pp. 313–317.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809665-9.09303-4>
- Santos, L., Kasper, R., Sardiñas, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2010. Effect of Capsicum carotenoids on growth and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from paprika and chilli. *Food Microbiol.* 27, 1064–1070.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.010>
- Soja - Portal Embrapa [WWW Document], n.d. URL  
<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1> (accessed 1.20.20).
- Xavier, M.N., Alves, J.M., Carneiro, N.S., Souchie, E.L., Silva, E.A.J., Martins, C.H.G., Ambrósio, M.A.L. V., Egea, M.B., Alves, C.C.F., Miranda, M.L.D., 2016. *Composição Química do Óleo Essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schltdl.*

(Annonaceae) e suas Atividades Antioxidante, Antibacteriana e Antifúngica |  
Xavier | Revista Virtual de Química.

Zhang, F., Wang, F., Yang, S., Zhang, Y., Xue, H., Wang, Yangshu, Yan, S., Wang, Yan, Zhang, Z., Ma, Y., 2019. MdWRKY100 encodes a group I WRKY transcription factor in *Malus domestica* that positively regulates resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* infection. *Plant Sci.* 286, 68–77.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.06.001>



## 6. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O OE-Ed apresentou rendimento de 1,5%. Os constituintes principais foram limoneno (16,0%), óxido de cariofileno (15,0%), citral (9,0%), trans-cariofileno (8,0%) e 1,8-cineol (7,3%).
- OE-Ed também apresentou atividade eficaz contra os parasitas *Trypanosoma cruzi* e patógenos orais como *Streptococcus mutans*, além de atividade moderada contra as outras bactérias do gênero *Streptococcus* testadas.
- Os extratos de *C. chinense* produzidos apresentaram rendimento variável de acordo com a polaridade do solvente utilizado. Os extratos apolares (EHCC e EACC) obtiveram rendimento inferior aos extratos polares (EECC e EMCC).
- No EECC foram identificados 10 compostos fenólicos e 2 possíveis capsaicinoides. O mesmo também apresentou promissora atividade antioxidante de acordo com os testes realizados.
- Os filmes de araruta incorporados com EECC apresentaram área superficial de estrutura granulada, levemente rugosa e uniforme. A adição do EECC aos filmes de araruta, levou ao aumento da espessura, diminuição da solubilidade e alteração da cor conforme a concentração do extrato.
- EHCC, EACC e EMCC apresentaram percentuais de inibição micelial para o fungo *S. sclerotiorum*, no entanto, os extratos apolares exibiram as melhores atividades. Para os fungos *R. stolonifer* e *C. gloeosporioides* apenas o EHCC apresentou atividade.