



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**CALILA TEIXEIRA SANTOS**

**FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi: EXTRAÇÃO  
ATIVA, ESTUDO FITOQUÍMICO E INCORPORAÇÃO EM  
FILMES BIOATIVOS DE PECTINA**

Feira de Santana, BA

2017

**CALILA TEIXEIRA SANTOS**

**FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi: EXTRAÇÃO  
ATIVA, ESTUDO FITOQUÍMICO E INCORPORAÇÃO EM  
FILMES BIOATIVOS DE PECTINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da  
Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito  
parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Branco  
Coorientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Geany Peruch Camilloto

Feira de Santana, BA

2017

## BANCA EXAMINADORA

---

Dra Karine Hojo Rebouças  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano – *Campus* Senhor do  
Bonfim

---

Dra Fabiana Fumi Cerqueira Sasaki  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

---

Dra Tais Silva de Oliveira Brandão  
Universidade Estadual de Feira de Santana

---

Dr. Marcio Inomata Campos  
Universidade Estadual de Feira de Santana

---

Dr. Alexsandro Branco  
Universidade Estadual de Feira de Santana  
Orientador e Presidente da Banca

*DEDICO ESTE TRABALHO A TODOS OS  
MEUS FAMILIARES E IN MEMÓRIA A MINHA  
AMIGA JAQUELINE F MOREAU CRUZ.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela benção da vida e pelo amparo em todos os momentos principalmente nos mais difíceis não deixando que desanimasse.

Aos Bons Amigos Espirituais que sempre estiveram ao meu lado, nos momentos de alegrias e aprendizagem.

Agradeço à minha mãe, Ivonete, pela oportunidade da vida e de poder estar aqui hoje. Aos meus irmãos, Fabrine, Vincci, Emmanuel, Edmilson, Mateus aos meus sobrinhos Fabiane, Thiago e Maria Isabel pelo apoio carinho e torcida, e pelas boas recordações que aliviam a distância e que me motiva a continuar. Ao meu Tio Waldir pelo incentivo, acolhida no início dessa jornada.

Agradeço ao meu companheiro, amigo, namorado, noivo, marido e incentivador Franklin Matos Correia pela compreensão, apoio, torcida, carinho e afeto sempre constante.

Ao meu orientador Alexsandro Branco pela oportunidade, apoio, dedicação confiança e auxílio. E a minha coorientadora Geany Peruch Camilloto pela confiança, auxílio e dedicação dispensados a minha pessoa. À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-Biotec), pela oportunidade concedida. Ao IFBAIANO *Campus* Senhor do Bonfim, pela compreensão e apoio.

Aos amigos e companheiros dos Laboratórios de Fitoquímica, Controle de Qualidade e Toxicologia, Isabella, Patrícia, Renata, Fernanda, Thais, Kelly, Saraí, Rodrigo, Matheus, Verônica, Raquel, Letícia, Dayse, Jenner, Júlia pelos momentos agradáveis, auxílio e trocas de conhecimentos, em especial a Lissandra pela dedicação, apoio, organização e empenho.

Aos amigos de ontem, de hoje e de sempre que muitas vezes se encontram distantes, mas que nem por isso deixaram de me dá apoio, carinho e afeto.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

*(...) todo mundo ama um dia todo mundo  
chora, um dia a gente chega, no outro vai  
embora. Cada um de nós compõe a sua história,  
cada ser em si carrega o dom de ser capaz, de ser  
feliz.*

**(Almir Sater)**

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo principal obter extratos bioativos dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (STF), com ação antioxidante e antimicrobiana, para incorporação em uma embalagem bioativa para alimentos, além de inibição da acetilcolinesterase. O processo de extração foi realizado por micro-ondas focalizado (EAMF) e ultrassom (EAU). A comparação entre os métodos de extração foi monitorada pelas atividades biológicas desses extratos. Os resultados mostraram que para o rendimento não teve diferença significativa. Para os ensaios de EAMF o melhor valor de fenólico ( $5950 \pm 1,4$  mgGAE/g) e flavonoides totais ( $1750 \pm 3,2$  mgEQ/g) foi no tempo de extração de 25 minutos, na temperatura de  $51^\circ\text{C}$  e com 75% de etanol. Para os ensaios obtidos por EAU o melhor teor de fenólicos totais foi ( $92,2 \pm 0,8$  mgGAE /g) no ensaio EAU 10 (tempo de extração de 30 minutos, na temperatura de  $42^\circ\text{C}$  e com 50% de etanol) e de flavonoides ( $67,72 \pm 1,0$  mgEQ /g) no ensaio EAU 12 (tempo de extração de 17,5 minutos, na temperatura de  $60^\circ\text{C}$  e com 50% de etanol). Os melhores valores para a percentagem de inibição (%SRL) foi de 87,3% (EAMF 8) e 31,3% (EAU 12). A análise por espectrometria de massa mostrou a presença de compostos fenólicos e terpenos. Em relação à atividade antimicrobiana dos extratos obtidos por EAMF, a CIM para *S. aureus* foi de 0,5 mg/ml, para *E. coli* 0,25 mg/ml, enquanto que o extrato de EAU apresentou CIM de 0,5 mg/ml para os dois microrganismos analisados. No estudo fitoquímico foi possível isolar 7 substâncias: agatisflavona, tetrahidrorobustaflavona, ácido masticadienoico (Z), ácido masticadienoico (E), schinol, ácido gálico e o esqualeno, além de uma mistura com perfil de ácidos graxos insaturados e uma mistura com característica de trissacarídeos. Sendo suas estruturas químicas determinadas por métodos espectrométricos tais como RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , UV e EM. Selecionou-se 2 dos 17 extratos EAMF, os mesmos foram incorporados em um filme ativo, à base de pectina de alta metoxilação, denominados “Extrato 2” e “Extrato 8” em concentrações diversas (0, 1, 3 e 5%). Os filmes apresentaram espessura médias de 0,007 mm para todas as concentrações dos extratos testados. Observou-se em relação as propriedades mecânicas que houve uma interação dos componentes polifenólicos dos extratos com os materiais utilizados na produção dos filmes. Os filmes foram mais permeáveis ao vapor d’água (6,18–7,80 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa) do que o filme controle (5,12 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa). Os filmes de ambos extratos mostraram uma boa estabilidade térmica independente da concentração testada. Os filmes produzidos neste estudo apresentaram atividade antioxidante, sendo que os filmes adicionados do extrato 8 apresentaram os melhores valores de %SRL (54,45 e 67,08, respectivamente). Todos os filmes obtiveram halo de inibição contra os micro-organismo testados. Diante dos resultados encontrados pode-se inferir que os STF têm potencial antioxidante, atividade antimicrobiana e alta inibição de acetilcolinesterase podendo ser utilizados em cosméticos, produtos nutracêuticos e na indústria alimentar, além de uma alternativa promissora na produção de filmes ativos.

**Palavras-chaves:** Terpenoides. Pimenta rosa. Embalagens ativas. Biflavonoide. Antioxidante.

## ABSTRACT

The present study had as main objective to obtain bioactive extracts of the fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi (STF), with antioxidant and antimicrobial action, for incorporation in a bioactive package for foods, besides inhibition of acetylcholinesterase. The extraction process performed by focussed microwave (EAMF) and ultrasound (UAE). The comparison between extraction methods was monitored by the biological activities of these extracts. The results showed that for the yield there was no significant difference. For the EAMF assays, the best value of phenolic ( $5950 \pm 1.4$  mgGAE / g) and total flavonoids ( $1750 \pm 3.2$  mgEQ / g) was at the extraction time of 25 minutes at  $51^\circ\text{C}$  and with 75% ethanol. For the assays obtained by EAU, the best total phenolic content was ( $92.2 \pm 0.8$  mgGAE / g) in the EAU 10 test (extraction time of 30 minutes at  $42^\circ\text{C}$  and 50% ethanol) And flavonoids ( $67.72 \pm 1.0$  mgEQ / g) in the UAE 12 assay (extraction time of 17.5 minutes at  $60^\circ\text{C}$  and 50% ethanol). The best values for percent inhibition (% SRL) were 87.3% (EAMF 8) and 31.3% (UAE 12). Mass spectrometry analysis showed the presence of phenolic compounds and terpenes. In relation to the antimicrobial activity of extracts obtained by EAMF, the MIC for *S. aureus* was 0.5 mg / ml for *E. coli* 0.25 mg / ml, whereas the extract of EAU presented MIC of 0.5 mg / ml for the two microorganisms analyzed. In the phytochemical study, it was possible to isolate 7 substances: agasthi flavone, tetrahydrorobust flavone, masticadienoic acid (Z), masticadienoic acid (E), schinol, gallic acid and squalene, as well as a mixture with unsaturated fatty acid profile and a mixture with trisaccharide characteristics. Their chemical structures being determined by spectrophotometric methods such as  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, UV and MS. Two of the 17 EAMF extracts were selected, which were incorporated into an active high-methoxylation pectin-based film called "Extract 2" and "Extract 8" in various concentrations (0, 1, 3 and 5%). The films had a mean thickness of 0.007 mm for all concentrations of the extracts tested. It was observed in relation to the mechanical properties that there was an interaction of the polyphenolic components of the extracts with the materials used in the production of the films. The films were more permeable to water vapor (6.18-7.80 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa) than the control film (5.12 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa). The films of both extracts showed good thermal stability independent of the concentration tested. The films produced in this study presented antioxidant activity, and the films added from extract 8 presented the best % SRL values (54.45 and 67.08, respectively). All films obtained inhibition halo against the microorganisms tested. In view of the results, it can be inferred that FTS have antioxidant potential, antimicrobial activity and high inhibition of acetylcholinesterase and can be used in cosmetics, nutraceuticals and food industry, as well as a promising alternative in the production of active films.

**Keywords:** Terpenoids. Pink pepper. Biflavonoid. Antioxidant. Active packaging..

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

<b>Figura 1</b>	Frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	<b>23</b>
<b>Figura 2</b>	Biflavonoides isolados dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	<b>24</b>
<b>Figura 3</b>	Triterpenos isolados em frutos <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	<b>24</b>
<b>Figura 4</b>	Ilustração do perfil de aquecimento de amostras sob irradiação de micro-ondas	<b>26</b>
<b>Figura 5</b>	Micro-ondas focalizado Discover system (CEM)	<b>27</b>
<b>Figura 6</b>	Fenômeno da cavitação	<b>29</b>
<b>Figura 7</b>	Tipos de ultrassom	<b>30</b>
<b>Figura 8</b>	<i>Escherichia coli</i>	<b>36</b>
<b>Figura 9</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>37</b>
<b>Figura 10</b>	Método de incorporação de substâncias ativas no alimento	<b>43</b>
<b>Figura 11</b>	Esquema de permeação de vapor d'água através de filmes poliméricos	<b>46</b>

### Capítulo 2

<b>Figura 1</b>	Local georeferenciado da coleta	<b>63</b>
<b>Figura 2</b>	Diagrama de Pareto do rendimento de extração no EAMF e EAU	<b>69</b>
<b>Figura 3</b>	Superfície de Resposta e gráficos de contornos dos fenólicos totais dos extratos etanólico de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi utilizando EAMF	<b>73</b>
<b>Figura 4</b>	Superfície de Resposta e gráficos de contornos dos fenólicos totais dos extratos etanólico de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi por EAU	<b>74</b>
<b>Figura 5</b>	Superfície de Resposta e gráficos de contornos dos flavonoides totais dos extratos etanólico de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi por EAMF	<b>75</b>
<b>Figura 6</b>	Superfície de Resposta e gráficos de contornos dos flavonoides totais dos extratos etanólico de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi por EAU	<b>76</b>
<b>Figura 7</b>	Superfície de Resposta e gráficos de contornos da %SRL dos extratos etanólico de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi por EAMF	<b>78</b>
<b>Figura 8</b>	Superfície de Resposta e gráficos de contornos da %SRL dos extratos etanólico de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi por EAU	<b>79</b>
<b>Figura 9</b>	Principal efeito padronizado diagrama de Pareto do FT, FLT e %SRL dos métodos de extração estudados	<b>81</b>
<b>Figura 10</b>	Cromatograma LC-MS do extrato etanólico dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> . Raddi	<b>86</b>

### Capítulo 3

<b>Figura 1</b>	Fluxograma dos procedimentos utilizados para obtenção dos compostos presente no extrato dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	<b>96</b>
<b>Figura 2</b>	Substâncias identificadas no extrato etanólico dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (EEFST)	<b>98</b>
<b>Figura 3</b>	Espectro de massas por CG-EM do pico com $t_R$ de 30.258 min., da Substância I	<b>99</b>
<b>Figura 4</b>	Espectro de RMN $^1H$ da substância I obtida do EEFST (500 MHz, MeOD)	<b>99</b>
<b>Figura 5</b>	Espectro de RMN DEPTQ 135 da substância I obtida do EEFST (500 MHz, MeOD)	<b>100</b>

<b>Figura 6</b>	Cromatograma obtido por CLAE-DAD da Fração 4 do EEFST	<b>102</b>
<b>Figura 7</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da Fração 4 do extrato etanolico dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (500 MHZ, MeOD)	<b>103</b>
<b>Figura 8</b>	Espectro de RMN DEPTQ 135 da Fração 4 obtida do EEFST (500 MHZ, MeOD)	<b>104</b>
<b>Figura 9</b>	Sinais característicos encontrados no RMN <sup>13</sup> C de óleos vegetais	<b>105</b>
<b>Figura 10</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H das substâncias II, III e IV obtidas do EEFST (500 MHZ, MeOD).	<b>106</b>
<b>Figura 11</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C das substância II, III e IV obtidas do EEFST (500 MHZ, MeOD).	<b>107</b>
<b>Figura 12</b>	Cromatograma por CLAE-DAD da Fração SF11-14 e espectro UV do pico no tempo 22,11min.	<b>108</b>
<b>Figura 13</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da Substância V obtida do EEFST (500 MHZ, MeOD)	<b>109</b>
<b>Figura 14</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância VI obtida do EEFST (500 MHZ, MeOD)	<b>109</b>
<b>Figura 15</b>	Espectro de RMN DEPT da substância VI obtida do EEFST (500 MHZ, MeOD)	<b>110</b>
<b>Figura 16</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da Fração 57 obtida do EEFST (500 MHZ, MeOD)	<b>111</b>
<b>Figura 17</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C da Fração 57 obtida do EEFST (500 MHZ, MeOD)	<b>112</b>
<b>Figura 18</b>	Cromatograma por CLAE-DAD: A- substância VII e espectro no ultravioleta do pico no tempo 9,22; B- Padrão Acido Gálico e seu espectro no ultravioleta.	<b>113</b>

#### **Capítulo 4**

<b>Figura 1</b>	As células com os filmes.	<b>120</b>
<b>Figura 2</b>	Câmara dessecadora	<b>121</b>
<b>Figura 3</b>	Curvas de TGA e DTG para o filme controle e para os filmes incorporados de extrato 2.	<b>128</b>
<b>Figura 4</b>	Curvas de TGA e DTG para o filme controle e para os filmes incorporados de extrato 8.	<b>129</b>

#### **APÊNDICE**

<b>Apêndice 1</b>	Tabelas da ANOVA	<b>141</b>
<b>Apêndice 2</b>	Cromatograma de íons totais por CLAE-EM/EM (modo positivo) do extrato etanolico dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (EEFST)	<b>142</b>
<b>Apêndice 3</b>	Ampliação 1 do espectro de RMN DEPTQ 135 da Substância 1 do EEFST	<b>147</b>
<b>Apêndice 4</b>	Ampliação 2 do espectro de RMN DEPTQ 135 da Substância 1 do EEFST	<b>147</b>
<b>Apêndice 5</b>	Ampliação 1 do espectro de RMN 1H das Substâncias II, III e IV do EEFST	<b>148</b>
<b>Apêndice 6</b>	Ampliação 2 do espectro de RMN 1H das Substâncias II, III e IV do EEFST	<b>148</b>
<b>Apêndice 7</b>	Ampliação 3 do espectro de RMN 1H das Substâncias II, III e IV do EEFST	<b>149</b>
<b>Apêndice 8</b>	Ampliação 4 do espectro de RMN 1H das Substâncias II, III e IV do EEFST	<b>149</b>
<b>Apêndice 9</b>	Ampliação 5 do espectro de RMN 1H das Substâncias II, III e IV do EEFST	<b>150</b>
<b>Apêndice 10</b>	Ampliação 1 do espectro de RMN 13C das Substâncias II, III e IV do EEFST	<b>150</b>

<b>Apêndice 11</b>	Ampliação 2 do espectro de RMN <sup>13</sup> C das Substâncias II, III e IV do EEFST	<b>151</b>
<b>Apêndice 12</b>	Ampliação 3 do espectro de RMN <sup>13</sup> C das Substâncias II, III e IV do EEFST	<b>151</b>
<b>Apêndice 13</b>	Ampliação 4 do espectro de RMN <sup>13</sup> C das Substâncias II, III e IV do EEFST	<b>152</b>
<b>Apêndice 14</b>	Ampliação 5 do espectro de RMN <sup>13</sup> C das Substâncias II, III e IV do EEFST	<b>152</b>
<b>Apêndice 15</b>	Ampliação 6 do espectro de RMN <sup>13</sup> C das Substâncias II, III e IV do EEFST	<b>153</b>
<b>Apêndice 16</b>	Ampliação 1 do espectro de RMN <sup>1</sup> H da Substância V do EEFST	<b>153</b>
<b>Apêndice 17</b>	Ampliação 2 do espectro de RMN <sup>1</sup> H da Substância V do EEFST	<b>154</b>
<b>Apêndice 18</b>	Ampliação 3 do espectro de RMN <sup>1</sup> H da Substância V do EEFST	<b>154</b>
<b>Apêndice 19</b>	Ampliação 4 do espectro de RMN <sup>1</sup> H da Substância V do EEFST	<b>155</b>
<b>Apêndice 20</b>	Ampliação 5 do espectro de RMN <sup>1</sup> H da Substância V do EEFST	<b>155</b>
<b>Apêndice 21</b>	Ampliação 1 do espectro de RMN <sup>1</sup> H da Substância VI do EEFST	<b>156</b>
<b>Apêndice 22</b>	Ampliação 2 do espectro de RMN <sup>1</sup> H da Substância VI do EEFST	<b>156</b>
<b>Apêndice 23</b>	Ampliação 3 do espectro de RMN <sup>1</sup> H da Substância VI do EEFST	<b>157</b>
<b>Apêndice 24</b>	Ampliação 1 do espectro de RMN DEPTQ 135 da Substância VI do EEFST	<b>157</b>
<b>Apêndice 25</b>	Ampliação 2 do espectro de RMN DEPTQ 135 da Substância VI EEFST	<b>158</b>

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

<b>Tabela 1</b>	Valores reais e codificados das variáveis independentes em diferentes níveis para DCCR	<b>64</b>
<b>Tabela 2</b>	Gradiente dos solventes utilizados para CLAE-ESI-EM <sup>n</sup>	<b>68</b>
<b>Tabela 3</b>	Valores de rendimento de extração	<b>68</b>
<b>Tabela 4</b>	ANOVA para o rendimento para os métodos de extração estudado.	<b>69</b>
<b>Tabela 5</b>	Equações dos modelos e R <sup>2</sup>	<b>70</b>
<b>Tabela 6</b>	Valores de, fenólicos totais (FT), flavonoides totais (FLT) e sequestro de radicais livres (%SRL) dos extratos de etanol de frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.	<b>71</b>
<b>Tabela 7</b>	Valores da inibição da acetilcolinesterase (%Inibição ACHE) dos extratos de etanol otimizados de frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	<b>82</b>
<b>Tabela 8</b>	Valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de etanol otimizados de frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	<b>84</b>
<b>Tabela 9</b>	Atribuição de pico, tempo de retenção (Rt), dados de espectrometria de massa dos compostos detectados no extrato do fruto de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	<b>87</b>

### Capítulo 3

<b>Tabela 1</b>	Fracionamento do extrato etanólico dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi por cromatografia em coluna aberta e frações obtidas.	<b>97</b>
<b>Tabela 2</b>	Gradiente dos solventes utilizados para CLAE-DAD	<b>97</b>
<b>Tabela 3</b>	Atribuições das análises de RMN de <sup>1</sup> H e DEPTQ 135, do composto escaleno e comparação com dados da literatura.	<b>101</b>
<b>Tabela 4</b>	Sinais de RMN de <sup>1</sup> H de amostras de óleos vegetais descritos na literatura	<b>102</b>

### Capítulo 4

<b>Tabela 1</b>	Médias ( $\pm$ desvio padrão) das análises de caracterização das formulações de biofilmes e controle (0). $\delta$ (mm); PVA, (g.mm/m <sup>2</sup> .h.kPa), parâmetros mecânicos: AR(%) e RTM (MPa) e AA (%SRL)	<b>125</b>
<b>Tabela 2</b>	Eventos térmicos e perda de massa dos extratos 2 e 8, do filme controle (FC) e dos filmes com concentrações variadas.	<b>128</b>
<b>Tabela 3</b>	Efeito da incorporação de diferentes concentrações do extrato 2 do extrato 8 na atividade antimicrobiana dos microrganismos testados.	<b>132</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%SRL	Porcentagem de Sequestro de Radical Livre
AA	Ácido Ascórbico
Abs	Absorbância
AChE	Acetilcolinesterase
ACTI	iodeto de acetiltiocolina
ANOVA	Análise de Variância
BSA	Albumina de soro bovino
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCMB	Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência a Espectrometria de Massas
DAD	Detector de arranjo de diodo
DETPQ	<i>Distorsionless enhancement by polarization transfer including the detection of quaternary nuclei</i>
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTG	derivada termogravimétrica
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EAG	Equivalente ácido gálico
EAMF	Extração Assistida por Micro-ondas Focalizado
EAU	Extração assistida por ultrassom
EESTF	Extrato etanólico dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.
EQ	Equivalente quercetina
ESI	Ionização por Eletrospray (do inglês, Electrospray Ionization)
FC	Filme controle
FLT	Flavonoides Totais
Fr	Fração

FT	Fenólicos Totais
GRAS	Reconhecido geralmente como seguro ( do Inglês Generally Recognized as Safe)
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória de 50% da Atividade
<i>m/z</i>	Relação massa carga
MeOD	Metanol deuterado
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
NCLL	National Committe for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanômetros
O <sub>2</sub>	Oxigênio
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
STF	Frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi
TGA	Análise Termogravimétrica
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico em ppm
λ <sub>máx</sub>	Comprimento de onda (nm) de absorção máxima
μL	Microlitro

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	16
CAPÍTULO 1 .....	20
1 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi – UMA BREVE REVISÃO .....	21
2. OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS .....	23
3 COMPOSTOS BIOATIVOS: OBTENÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL .....	30
4 ANTIOXIDANTES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	31
5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	34
6 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ACETILCOLINESTERASE .....	37
7 FILMES BIOATIVOS .....	39
CAPÍTULO 2 .....	58
1 INTRODUÇÃO .....	60
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	61
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
4 CONCLUSÃO .....	87
CAPÍTULO 3 .....	91
1 INTRODUÇÃO .....	93
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	93
3 RESULTADO E DISCUSSÃO .....	97
CAPÍTULO 4 .....	115
1 INTRODUÇÃO .....	117
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	119
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	123
4 CONCLUSÃO .....	132
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	137
APÊNDICE .....	139

## INTRODUÇÃO GERAL

A *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida como aroeira-vermelha e pimenta-rosa, é uma árvore de folhas perenes, originária da América do Sul, especialmente do Brasil, Paraguai e Argentina. Os frutos são do tipo drupa e têm coloração verde no início e depois se tornam vermelhos. A semente é única, marrom escura e mede cerca de 0,3 milímetros de diâmetro (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ, PRADO, 2005).

Este pequeno fruto inscreve-se entre as muitas especiarias existentes e que são utilizadas essencialmente para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária mundial. O sabor suave e levemente picante do fruto da *Schinus terebinthifolius* Raddi, bem como sua bonita aparência, de uso decorativo, permite o seu emprego em diversas preparações, podendo ser utilizada na forma de grãos inteiros ou moídos. No entanto, a aroeira é especialmente apropriada para a confecção de molhos que acompanham as carnes brancas, de aves e peixes, por não abafar o seu gosto sutil (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ, SANTOS, 2004).

O extrato de aroeira contém catecóis, taninos, terpenos, flavonoides e saponina. Sobre os flavonoides já foi descrito potencial mutagênico e propriedade antioxidante. Um estudo fitoquímico do extrato em etanol das folhas de *S. terebinthifolius*, com potencial anti-radicalar, foi realizado e conduziu ao isolamento dos compostos fenólicos: galato de etila, miricetrina, quercitrina, galato de metila e miricetina (CERUKS et al., 2007). Em relação aos frutos já foram identificados: ácido gálico (SANTOS, 2009), dois flavonoides apigenina (BERNARDES, 2010; DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ, PRADO, 2005) e naringina (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ, SANTOS, 2004), e os biflavonoides agathisflavona, robustaflavona e tetrahidrorobustaflavona (KASSEM, et al. 2004), além de alguns triterpenos.

As matérias-primas *in natura* disponíveis em frutas, vegetais em geral e condimentos podem conter numerosos compostos bioativos como por exemplo: compostos nitrogenados, carotenoides, ácido ascórbico e tocoferóis. Muitos destes apresentam significativa capacidade antioxidante e são associados à baixa incidência e baixa mortalidade de câncer em seres humanos (YILDIRIM et al., 2001; ZHENG e WANG, 2001; BIRCH et al., 2001; WATANABE, 1998; VINSON et al., 2001).

As pesquisas em ciência e tecnologia de alimentos estão focadas no desenvolvimento e aprimoramento de métodos e técnicas de preservação. Tendo como objetivo principal dessa área a obtenção de produtos sensorialmente atrativos, microbiologicamente estáveis e com elevado conteúdo nutricional. A utilização de coberturas e filmes com propriedades funcionais é uma tecnologia em ascensão nesta área e também vem sendo aplicada com sucesso a frutas

ou a alimentos com alta perecibilidade, como os minimamente processados, a fim de lhes proporcionar uma maior estabilidade ao longo do armazenamento.

Os extratos de frutas são compostos naturais comumente incorporados a estes revestimentos (AKHTAR et al., 2012, SUPAPVANICH et al., 2012). Considerados como uma alternativa de substituição interessante para substituição dos antioxidantes sintéticos, tradicionalmente utilizados, principalmente devido à forte relação entre o consumo de compostos naturais, através da ingestão de alimentos, como frutas, vegetais e cereais, e a saúde humana (HARRISON & MAY, 2009; ALI et al., 2008; LIU, 2003; KAUR and KAPOOR, 2001; SCALBERT & WILLIAMSON, 2000). O consumo destes produtos pode gerar benefícios que são atribuídos diretamente ao elevado conteúdo de vitaminas, carotenoides, compostos fenólicos dentre outros compostos fitoquímicos (BAGCHI, 2000).

A adição destes compostos aos revestimentos busca proporcionar um incremento na sua função protetora, ao conferir benefícios adicionais ao produto recoberto, de forma direta (enriquecendo nutricionalmente o produto, pela difusão de compostos) ou de forma indireta (pela proteção superficial contra processos oxidativos).

Gonçalves (2010) observou que a aplicação de coberturas de pectina e de alginato aditivadas com ácido ascórbico, ácido cítrico e suco de uva à fatias de carambola previamente ao processo de secagem, promoveu uma proteção adicional ao produto, de forma a impedir a degradação de parte considerável dos compostos fenólicos, carotenoides e vitamina C da fruta.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi utilizar extratos hidroetanólico de frutos de *Schinus terebinthifolius Raddi*, do semiárido baiano, com ação antioxidante, antimicrobiana e anticolinesterásica para incorporação em uma embalagem biodegradável para alimentos.

## REFERÊNCIAS

- AKHTAR, M. J. et al. Antioxidant Capacity and Light-Aging Study of HPMC Films Functionalized with Natural Plant Extract. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 89, n. 4, p. 1150-1158, 2012.
- BAGCHI, D. et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, v. 148, p. 187–197, 2000.
- BERNARDES, N. R. *Estudo da Composição Química e dos Efeitos Imunofarmacológicos do Extrato dos Frutos da Aroeira (Schinus terebinthifolius Raddi)*. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – 131 p, 2010.
- BIRCH, A.E., FENNER, G.P.; WATKINS, R.; BOYD, L.C. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago, v.49, p. 4502-4507, 2001.
- CARVALHO, M.C.R.D.; de BARCA, F.N.T.V.; AGNEZ-LIMA, L. F.; de MEDEIROS, S.R.B. Research Article Evaluation of mutagenic activity in extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Environ. Mol. Mutagen.* V. 42, p. 185-191, 2003.
- CERUKS, C. H. et al. 2007. Constituintes Fenólicos Polares de *Schinus terebinthifolius* RADDI (ANACARDIACEAE). *Química Nova*, v. 30, n. 3, 597-599. 2007.
- DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N., PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciência e Agrotecnologia*, 29(3), 617–622, 2005.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J. Atividade Antioxidante de Extrato de Fruto de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Visão Acadêmica, Curitiba*, v. 5, n. 2, p. 83-90, 2004.
- FERREIRA, M.P.F. *Embalagens ativas para alimentos: caracterização e propriedades*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 138p., 2012.
- GONÇALVES, J. A. (2010). *Secagem de carambolas (Averrhoa carambola l.): desenvolvimento e aplicação de coberturas comestíveis aditivadas com agentes antioxidantes naturais para conservação de suas propriedades funcionais*. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP, 2010.
- HARRISON, F. E. AND MAY, J. M. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 46, p. 719–730, 2009.
- KASSEM, M. E.; EL-DESOKY, S.; SHARAF, M. Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. *Chemistry of Natural Compounds*, p. 40, p. 447-50, 2004.
- KAUR, C., AND KAPOOR, H. C. Antioxidant in fruitd and vegetables – The millennium’s health. Review. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 36, p. 703-725, 2001.

SANTOS, L. M. Avaliação dos constituintes químicos polares e da atividade alelopática de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado. Campos dos Goytacazes-RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 90 p., 2009

SCALBERT, A. AND WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*. v. 130, p. 2073S–2085S, 2000.

SUPAPVANICH, S.; PRATHAAN, P.; TEPSON, R. Browning Inhibition in Fresh-Cut Rose Apple Fruit cv. Taaptimjaan Using Konjac Glucomannan Coating Incorporated with Pineapple Fruit Extract. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 73, p. 46-49, 2012.

VINSON, J.A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago, v.49, p. 5315-5321, 2001.

WATANABE, M. J. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moech). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago, v. 46, n. 3, p. 839-845, 1998.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago, v.49, p. 4083-4089, 2001.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Chicago, v.49, p. 5165-5170, 2001.

# **CAPÍTULO 1**

## **REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

## 1 *Schinus terebinthifolius* Raddi – UMA BREVE REVISÃO

*Schinus terebinthifolius* Raddi é uma árvore de pequeno a médio porte, que possui propriedades adstringentes, antissépticas e anti-inflamatórias (BIAVATTI et al., 2007; AGRA, FRANÇA, BARBOSA-FILHO, 2007; AGRA et al., 2008). Segundo Lorenzi (2000), esta planta é comumente encontrada em beiras de rios, córregos e em várias várzeas úmidas de formação secundária, entretanto, desenvolve-se também em terrenos pobres e secos. É muito utilizada na arborização de cidades, como árvore ornamental, apresentando caule um pouco tortuoso e casca escura e fissurada.

A espécie possuir diversos nomes populares entre eles podemos destacar: aroeira, aroeira-da-praia, aroeira-de-capoeira, aroeira-do-campo, aroeira-mansa, aroeira-vermelha, pimenta brasileira ou pimenta-rosa (CLEMENTE, 2006).

Compostos presentes nessa espécie são comumente causadores de dermatites de contato, tanto que algumas pessoas, quando entram em contato com a planta, podem desenvolver irritações na pele, prurido, urticárias, febre e transtornos visuais (BERTOLDI, 2006). Apesar disto, Ruiz et al. (1996) testou o extrato hidro alcoólico da pimenta rosa e verificou que o mesmo não apresentou efeito tóxico ou genotóxico.

Aos frutos atribui-se propriedade diurética (CORRÊA, 1984; BALBACH, 1986). Entretanto, a maior aplicabilidade dos frutos se encontra na culinária, sob a forma desidratada, conhecidos como “pimenta rosa”. As principais características morfo-histológicas e químicas da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, com vistas ao seu reconhecimento laboratorial como droga, são referentes às partes da planta utilizada e sua relação à presença de classes de metabólitos secundários (JORGE e MARKMANN, 1996). O interesse científico-tecnológico, por esta espécie se deve ao seu potencial terapêutico (RIBAS et al., 2006); atividade antioxidante (DEGÁSPARI et al., 2004; CERUKS et al., 2007); atividade antimicrobiana (DEGÁSPARI et al., 2005; SOARES et al., 2007); aproveitamento de seus óleos essenciais em aplicações farmacêuticas (SILVA et al., 2011; ARAUJO, 2010), propriedades sensoriais, entre outras.

No cenário nacional as potencialidades em aplicações nutricionais e biotecnológicas ainda não foram difundidas, mas sua aplicação como condimento denominado pimenta rosa, é muito apreciada nas exigentes culinárias internacionais para temperar carnes brancas, salames e massas, e conferir sabores exóticos a bebidas e doces, como coquetéis e chocolate (BERTOLDI, 2006).

Na culinária nacional é utilizada sob a forma desidratada e comercializada, na maioria das vezes, a granel (BERTOLDI, 2006). Apesar do sistema de produção ainda rudimentar, percebe-se grande perspectiva de mercado e potencial para o manejo sustentável, o que garantirá a complementação de renda para comunidades tradicionais que têm na colheita da aroeira fonte de emprego e renda nos períodos de safra, além de produtores e industriais que identifiquem a aroeira com opção rentável de negócio (GOMES et al, 2013).



**Figura 1:** Frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi

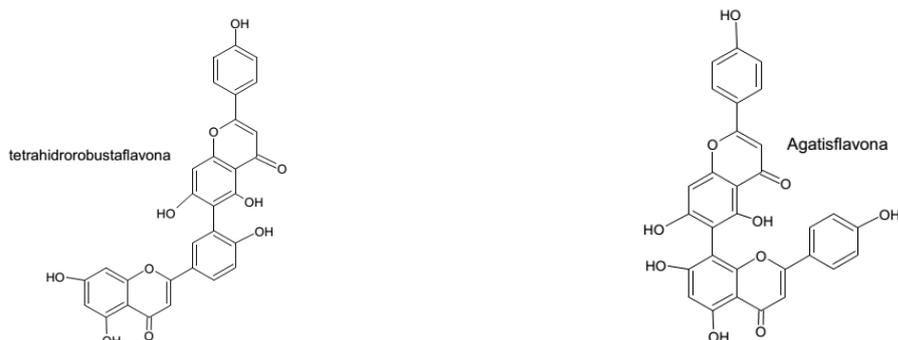
Estudos fitoquímicos e biológicos realizados com a espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi evidenciaram a presença de metabólitos secundários como fenóis, flavonoides, esteroides, triterpenos, antraquinonas, saponinas, ácidos graxos e substâncias terpênicas, bem como os métodos utilizados para elucidação desses compostos.

DEGÁSPARI et al. (2005) analisaram a atividade antimicrobiana de extratos aquoso e alcoólico obtidos de frutos da aroeira, diretamente ligados à quantidade de compostos fenólicos existentes nestes. Pelos testes, verificou-se que o extrato alcoólico apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, já o extrato aquoso não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento dos microrganismos testados. O extrato alcoólico mostrou-se com quantidade significativa da flavona apigenina, além de ácido elágico, ao passo que no extrato aquoso foi observada a presença da flavanona naringina.

Ceruks et al. (2007) descrevem a ocorrência de componentes de baixa e média polaridade da espécie *S. terebinthifolius*, em acetato de etila, oriunda do extrato etanólico das folhas da espécie, com potencial anti-radicalar, através de ensaio em CCD/DPPH, o qual conduziu ao isolamento de galato de etila, miricetrina, quercitrina, galato de metila e miricetina.

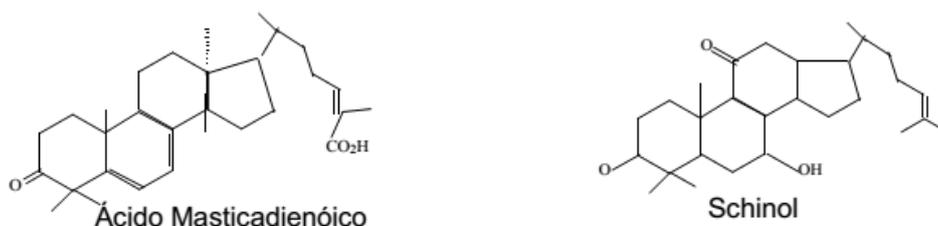
No estudo de OLIVEIRA (2012), o processo de isolamento e purificação do extrato bruto etanólico dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, permitiu o isolamento a partir da fração acetato de etila, de dois biflavonoides que foram devidamente identificados por técnicas

espectroscópicas e espectrométricas como sendo a tetrahydroamentoflavona e a agathisflavona (Figura 2)



**Figura 2:** Biflavonoides isolados dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Estudos com extrato de acetato de etila dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi dois triterpenos (ácido masticadienoico e o álcool schinol) foram isolados, sendo caracterizados como inibidores específicos da fosfolipase A<sub>2</sub> (JAIN et al. 1995).



**Figura 3:** Triterpenos isolados de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Com relação aos frutos, alvo deste estudo, já foram identificados: o ácido gálico (SANTOS, 2009), apigenina (BERNARDES, 2010) e naringina (DEGÁSPARI, et al. 2004), e os biflavonoides amentoflavona, agathisflavona, robustaflavona e tetrahidrorobustaflavona (KASSEM, et al. 2004; FEUEREISEN, et al., 2014.).

## 2. OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

O aproveitamento adequado dos princípios ativos de uma planta exige o preparo correto para cada parte a ser usada, grupo do princípio ativo a ser extraído ou doença a ser controlada (SHARAPIN et al., 2000). A escolha do método de extração depende dos tipos de compostos

presentes no extrato e do tipo de análise, sendo que os procedimentos de extração são desenvolvidos com o objetivo de se obter um extrato enriquecido com todos os compostos de interesse, e livre de componentes interferentes, como carboidratos e lipídeos (BERTOLDI, 2006).

A escolha do solvente utilizado na extração dos compostos é de grande importância, pois bioextratos com solubilidade limitada e outros fatores tais como efeitos sinérgicos e modificações químicas durante a extração podem comprometer a veracidade dos dados obtidos, além de alterar a atividade de certas substâncias (BENAVENTE-GARCIA, 2000; CHAVAN, SHAHIDI e NACZK, 2001).

O tempo de extração é outro fator que afeta a ressuspensão de polifenóis, devendo ser otimizado para evitar a oxidação de compostos causada por períodos prolongados de extração. Períodos entre 1 e 24 horas são encontrados na literatura (SHAHIDI e NACZK, 1995).

A extração dos compostos bioativos da matriz constitui uma das etapas mais importantes do processo de análise, pois ela deve promover o maior rendimento possível dessas substâncias, além de se ter como alvo a especificidade, ou seja, eliminar todos os compostos considerados interferentes da matriz.

Métodos tradicionais de extração são bastante utilizados para a obtenção de extratos de diversas matrizes vegetais. Porém, essas técnicas geralmente envolvem uma alta temperatura de processo, o que pode ocasionar a destruição de compostos termossensíveis e, além disso, os solventes orgânicos utilizados podem ser prejudiciais à saúde e/ou ao ambiente, havendo a necessidade de separá-los do extrato posteriormente (WANG et al., 2008).

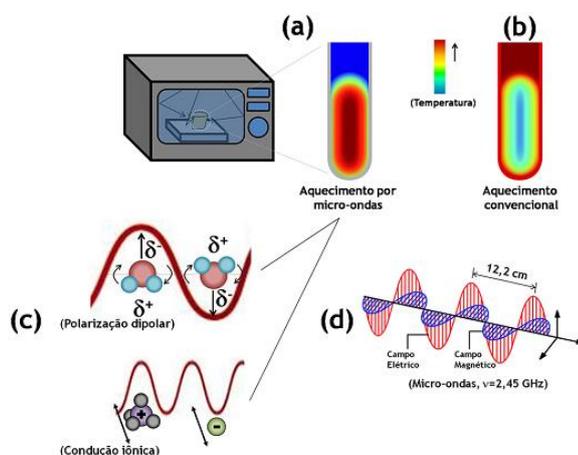
Os métodos modernos de extração são mais rápidos, utilizam menos solventes, dentre estes os mais utilizados são o ultrassom, micro-ondas focalizada e a extração supercríticas.

## 2.1 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDOS POR MICRO-ONDAS

A extração com solvente utilizando o forno micro-ondas pode ser realizada em sistema fechado (sob pressão controlada) ou aberto (sob pressão atmosférica) (CAMEL, 2000; KORNILOVA; ROSELL-MELE, 2003). O sistema aberto é conhecido como extração assistida por micro-ondas focalizada onde a amostra é aquecida de forma homogênea utilizando as micro-ondas focalizadas do sistema (CAMEL, 2000).

O aquecimento por micro-ondas pode ser obtido por dois mecanismos principais: polarização dipolar e condução iônica. A interação do componente campo elétrico com a matriz é chamada de mecanismo de polarização dipolar (Figura 4). O mecanismo se dá de forma que seja necessário que a molécula possua um momento dipolar, para que seja capaz de gerar calor

quando irradiada. O mecanismo por condução iônica envolve a perda por fricção, que ocorre através da migração de íons dissolvidos quando sob a ação de um campo eletromagnético. Estas perdas dependem do tamanho, da carga, da condutividade dos íons dissolvidos e interação destes últimos com o solvente empregado (CAMEL, 2000).



**Figura 4:** Ilustração (a) do perfil de aquecimento de amostras sob irradiação de micro-ondas em comparação ao (b) perfil de aquecimento convencional (condução/convecção), e (c) representação dos mecanismos de aquecimento (polarização dipolar e condução iônica) envolvidos nos processos químicos induzidos pelas micro-ondas, descritas figurativamente em (d). Fonte: FILHO e SERRA, 2015.

O forno de micro-ondas focalizadas (Figura 5) caracteriza-se por incidir uniformemente, mas não de maneira contínua as micro-ondas e por possuir um dispositivo que mede a temperatura no interior do mesmo. Pelo painel de controle, localizado na parte externa do forno, é possível programar e monitorar a temperatura e o tempo desejados para cada processo (MATSUI, 2006). Possui um magnetron que propaga as ondas geradas por meio de um guia de ondas até a cavidade. A quantidade de energia das micro-ondas incidentes é controlada pela abertura de fendas posicionadas em cada cavidade. A potência e o tempo de abertura de cada fenda são estabelecidos pela temperatura selecionada na programação do equipamento. Sensores de infravermelho posicionados abaixo de cada frasco reacional possibilitam o controle de temperatura (OUFNAC et al., 2007).



**Figura 5:** Micro-ondas focalizado Discover system (CEM)

Durante a extração assistida por micro-ondas focalizada, a radiação eletromagnética é aplicada diretamente na mistura solvente-amostra e é convertida em calor. O aquecimento dielétrico, chamado também de aquecimento por micro-ondas, é dependente da capacidade do material específico para absorver a energia de micro-ondas e converter em calor (por exemplo, solvente ou reagente) (BARBOZA et al., 2001; KAPPE; DALLINGER; MURPHREE, 2009).

Trabalhos com o emprego de micro-ondas geralmente é considerado eficiente e satisfatório no que diz respeito ao tempo de reação, menor consumo de solvente de extração e capacidade de extração das substâncias desejadas como: na extração de pigmentos em alimentos por micro-ondas, que possibilitou um rendimento em até 50% a mais que o processo de extração convencional (JUN e CHUM, 1998); na extração de antocianinas de espiga de milho roxo por micro-ondas, possibilitou a identificação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de seis tipos de antocianinas em apenas 19 minutos de extração (YANG e ZHAI, 2010).

Segundo Kappe, Dallinger e Murphree (2009), a maioria dos trabalhos em micro-ondas resultou na redução do tempo de reação, aumento de rendimento e aumento da pureza do produto pela redução de reações indesejáveis comparado com o método de aquecimento convencional.

Kerem, German-Shashoua e Yarden (2005) compararam a eficiência de extração por Soxhlet e assistida por micro-ondas na remoção de saponinas de grão de bico e verificou-se que os perfis de extratos lipídicos obtidos após 20 minutos utilizando o processo por micro-ondas foram semelhantes aos observados após 3 horas de extração por Soxhlet. Recentemente diversos estudos têm sido feitos com a aplicação das micro-ondas para extração de compostos naturais, tais como: saponinas do ginseng (KWON, BÉLANGER e PARÉ, 2003), óleos essenciais (GOMEZ e WITTE, 2001) e antocianinas (SUN et al., 2008).

Entretanto nenhum estudo utilizando esse método foi encontrado para a extração de compostos bioativos dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

## 2.2 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDOS POR ULTRASSOM

A maceração assistida por ultrassom é uma técnica relativamente nova, que se baseia na utilização de energia das ondas sonoras (vibrações mecânicas) transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana. Apesar de, inicialmente, ter sido desenvolvida para limpeza de materiais, atualmente vem sendo empregada numa ampla variedade de produtos, devido à simplicidade da técnica e do equipamento.

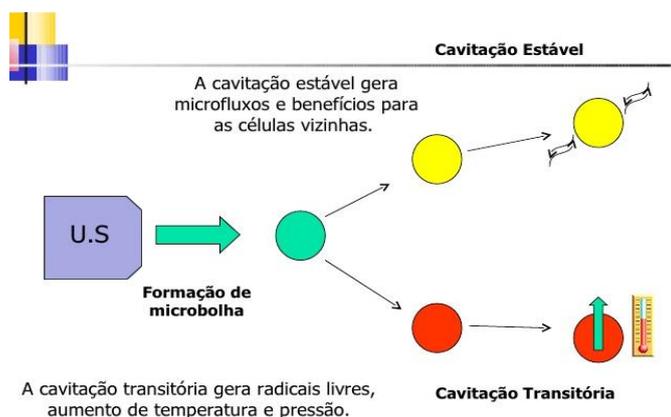
Na última década, sua aplicação analítica teve um crescimento significativo, particularmente na preparação de amostras, por favorecer e acelerar a liberação de compostos, reações químicas e transformações físicas, como a emulsificação (FREITAS, 2007; MELECCHI, 2005; MA et al., 2008; OROZCO-SOLANO et al., 2010).

Na indústria, dificilmente é aplicado como um processo isolado, mas, geralmente, como um coadjuvante, que auxilia no desempenho de outros processos para homogeneização e emulsificação de amostras, aceleração de reações, rompimento de estrutura celular e, conseqüentemente, tratamento de água e extração de substâncias, transesterificação para obtenção de biodiesel, dispersão de tinturas na indústria de tintas e pigmentos (OLIVEIRA, 2010).

O ultrassom é uma onda mecânica que se diferencia do som audível pelos seres humanos por apresentar frequências maiores que 20 kHz (CASTRO; CAPOTE; MOLINA, 2011; CHEMAT et al., 2011) e propaga-se em meios sólidos, líquidos e gasosos (CASTRO e CAPOTE, 2007; SERRADILLA, CAPOTE e CASTRO, 2007).

Um dos fenômenos produzidos quando o ultrassom se propaga nos líquidos é o fenômeno de cavitação (ESCLAPEZ et al., 2011). A cavitação (Figura 6) ocasiona a formação de cavidades, para onde os gases dissolvidos no sistema migram, formando microbolhas, que aumentam e diminuem de tamanho, gerando ciclos de expansão e compressão até que as bolhas

implodem, liberando grande quantidade de calor e exercendo elevadas pressões próximas a região da implosão (CASTRO e CAPOTE, 2007; CARCEL et al., 2012; VEILLET et al., 2010).



**Figura 6:** Fenômeno da cavitação

Fonte: <http://pt.slideshare.net/savagner/ultra-som>

A presença de materiais sólidos no sistema provoca uma implosão assimétrica das microbolhas, gerando jatos que colidem com as superfícies sólidas e também ocasiona a circulação de líquidos, devido à turbulência gerada (CASTRO e CAPOTE, 2007; SHIRSATH et al., 2012). Essas colisões fazem com que células vegetais sejam rompidas, facilitando a difusão do solvente extrator para o interior da matriz (CASTRO e CAPOTE, 2007). Somando-se a isso, o calor liberado pelas implosões aumenta a solubilidade dos analitos, favorecendo o aumento da eficiência da extração (VEILLET et al., 2010). Assim, é possível ao mesmo tempo agitar a mistura e extrair os compostos em um tempo muito mais curto que aqueles utilizados pelos métodos tradicionais de extração, utilizando uma quantidade pequena de solventes (CHEMAT et al., 2011; VILKHU et al., 2008).

Em alguns casos, pode ocorrer ruptura da parede celular, causando a saída dos compostos aromáticos da célula, além de aumentar a eficiência da extração e/ou redução do tempo de extração, e aumentar a área de contato entre o sólido e a fase líquida. Contudo, o efeito do ultrassom no processo de extração depende da frequência e da potência do equipamento e do tempo empregado para a extração (LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2003; MELECCHI, 2005; MA et al., 2008).

Existem, basicamente, dois tipos de aparelhos geradores de ondas ultrassônicas (Figura 7): banho e sonda. Apesar de os banhos serem mais utilizados, sua principal desvantagem se dá ao fato de o gerador de frequência ser preso no fundo de uma cuba e a onda se propagar em um líquido, gerando muita dispersão da energia ultrassônica e, conseqüentemente, menor influência nos sistemas reacionais. Nas sondas ultrassônicas o transdutor encontra-se fixado em sua

extremidade, focando a energia na região do meio que contém a amostra, promovendo, assim, uma cavitação mais eficiente no líquido. Em ambos os aparelhos, a energia ultrassônica é produzida por uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas - transdutor piezoelétrico (LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2003).



**Figura 7:** Tipos de ultrassom: A - Banho ultrassônico; B – Sonda de ultrassom  
Fonte: IMAGENS DA INTERNET.

Entre as vantagens do uso do ultrassom para a obtenção de extratos naturais destacam-se: simplicidade do equipamento e economia no custo inicial; redução do tempo e da temperatura de extração; possibilidade de usar diferentes solventes e misturas assim como uma ampla gama de tamanhos de amostra; redução da quantidade de reagentes; seletividade e favorecimento de reações que não ocorrem em condições normais, com consequente aumento de rendimento. Como desvantagens podem ser citadas sua inabilidade de renovação do solvente durante o processo, fazendo com que a capacidade de extração seja limitada pelo equilíbrio de fases, e a necessidade de filtração após a extração o que aumenta o tempo do processo e o perigo de perda ou contaminação do extrato durante a manipulação (FREITAS, 2007; MELECCHI, 2005).

### 3 COMPOSTOS BIOATIVOS: OBTENÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

As técnicas tradicionais de elucidação de classes de compostos (fenóis, taninos, saponinas, alcaloides, esteroides livres e outros), mesmo tendo rapidez de análise, apresentam o inconveniente de serem pouco sensíveis e inespecíficas, pois várias classes de metabólitos secundários são comuns a diferentes espécies vegetais. Portanto, tais técnicas mostram-se mais úteis como métodos químicos preliminares (ARAÚJO, CUNHA e VENEZIANI, 2010).

Os métodos cromatográficos envolvem desde técnicas simples até técnicas mais avançadas de separação. Os mesmos são aplicados na fitoquímica convencional, com o objetivo de isolar marcadores químicos. Entre estes, a cromatografia em coluna aberta ou flash são extensamente utilizadas, porém o alto consumo de solventes orgânicos, o trabalho minucioso e demorado e, não raro, apresentam baixa produtividade e pureza (HOSTETTMANN, QUEIROZ e VIEIRA, 2003)

A cromatografia em camada delgada (CCD) representa uma técnica de análise simples, rápida e de baixo custo que aliado a reveladores globais e/ou específicos torna-se um procedimento útil como método químico preliminar (FUCHS et al,2008). Outra técnica amplamente utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que possibilita tanto quantificação de marcadores químicos, estabelecimento de perfis cromatográficos como a identificação on-line de compostos químicos (WOLFENDER, MARTI e QUEIROZ, 2010; ZHENG et al, 2011).

O isolamento de metabólitos secundários, seguido da elucidação estrutural por técnicas espectroscópicas, possibilitam a ampliação do conhecimento quimiotaxônomico de espécies vegetais, a descoberta de novas substâncias químicas, produzem grandes avanços em pesquisas de atividade biológica (SIMÕES et al, 2007).

O acoplamento da cromatografia líquida a técnicas espectroscópicas como ultravioleta (UV), espectrometria de massa (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido utilizado por diversos pesquisadores, pelo fato de constituírem ferramentas muito úteis na caracterização de misturas complexas (RAUH, M.,2010).

A CLAE com o arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD), é amplamente utilizado em laboratórios de pesquisa por fornecer dados importantes sobre determinadas classes de substâncias, somente os dados de absorvância são insuficientes para elucidação estrutural.

Contudo, o acoplamento a espectrometria de massa (EM) apresenta como vantagens o grande poder de separação de espectros de massas e a possibilidade de elucidação estrutural sem a necessidade de isolamento e purificação dos compostos. Apresenta também a capacidade

de seleção de íons precursores, fragmentação dos mesmos e isolamento dos íons fragmentos, o que possibilita a detecção e quantificação de diversas substâncias, inclusive se as mesmas apresentarem o mesmo tempo de retenção durante a eluição cromatográfica (KALLENBACH, BALDWIN e BONAVENTURE, 2009).

A técnica de RMN é uma das principais ferramentas para elucidação estrutural. HPLC-RMN apresenta como desvantagem a pequena sensibilidade, especialmente em experimentos mais sofisticados como COSY, NOESY, HMQC.

A identificação dos constituintes fitoquímicos que compõe a classe dos metabólitos secundários, presentes em insumos ativos vegetais e sua elucidação estrutural é um passo importante para o estudo das atividades biológicas atribuídas a esta classe, como atividades antioxidante, antifúngica e anticolinesterásica.

#### **4 ANTIOXIDANTES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Durante a produção, o processamento, a distribuição e o armazenamento ocorrem várias reações de deterioração envolvendo microrganismo e processos químicos. Estes últimos são representados pela oxidação enzimática e não enzimática de lipídios e de substâncias fenólicas, promovendo alterações indesejáveis no *flavor*, na aparência, nas características físicas, no valor nutritivo e na formação de compostos tóxicos (ARAÚJO, 2011).

Os antioxidantes quando presentes em pequenas concentrações retardam a oxidação de óleos e gorduras nos alimentos, que pode causar odor e *off-flavours*. Portanto, os antioxidantes preservam a cor, sabor, evitam a perda de nutrientes, mantem a qualidade nutricional, sensorial e conferem segurança alimentar (BERTOLDI, 2006).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (SOARES, 2002).

Os mecanismos de atuação dos antioxidantes podem ser diferenciados. Consistem na inativação de radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução de hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres ou produtos de decomposição (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários e sinérgicos. Os antioxidantes primários incluem os compostos fenólicos, e atuam bloqueando a ação dos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio ou elétrons. Os

sinérgicos agem na remoção do oxigênio, como o ácido ascórbico e sulfito, ou como agentes complexantes de íons metálicos, como o ácido cítrico e EDTA (ARAÚJO, 2011).

A capacidade antioxidante está associada à diminuição dos processos oxidativos, impedindo danos ao DNA e as macromoléculas, que pode culminar em doenças cardíacas, câncer e cataratas (KUSKOSKI et al., 2005). Os polifenóis apresentam atividade antioxidante principalmente devido às suas propriedades redutoras, doando hidrogênio, neutralizando os radicais de oxigênio (ATOUI et al., 2005). Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAN, 1996; SOARES, 2002; CHUN et al., 2005). Melo et al. (2011) citam, ainda, a existência de antioxidantes naturais bioativos, como os organosulfurados, fenólicos e terpenos, constituintes de diversos alimentos.

Algumas frutas podem potencialmente conter maior teor de fitoquímicos antioxidantes na semente e pele muito mais do que na polpa, isto pode ser comprovado pelo extrato metanólico de acerola que evidenciam a presença compostos fenólicos de alta capacidade antioxidante. Esta ação antioxidante tem sido atribuída à presença de compostos fitoquímicos bioativos, assim como nos frutos de aroeira que contêm níveis significativos destes elementos químicos, que auxiliam nas funções fisiológicas e bioquímicas, beneficiando a saúde humana assim como a acerola, supracitada (GUO et al. 2003).

Diversos trabalhos relacionam a capacidade antioxidante com a quantidade de compostos fenólicos totais e antocianinas (ROBERTS e GORDON, 2003; PINELO et al., 2004). Kuskoski et al. (2005) relataram grande relação entre a quantidade de fenólicos totais e a ação antioxidante entre os métodos por DPPH e ABTS em polpas de frutas.

A diversidade de métodos colorimétricos para avaliação do potencial antioxidante se deve ao fato de se tratar de substratos muito complexos, cujo conteúdo de dezenas de compostos apresenta diferentes grupos funcionais, polaridades e comportamento químico (MORELLI, 2010).

Diversos compostos cromóforos como ABTS, DPPH•, e FRAP, são utilizados para determinar a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes em frutos baseando-se na captura dos radicais livres gerados, operando, dessa forma, contra os efeitos prejudiciais dos processos de oxidação que levam à formação de espécies reativas do oxigênio (EROS) (ARNOUS, MAKRRIS e KEFALAS, 2002; SELLAPPANS, AKOH e KREWER, 2002).

Outros métodos, tais como o sistema beta-caroteno/ácido linoléico, apresentam mecanismo de co-oxidação, ou seja, se oxidando preferencialmente aos compostos presentes no sistema.

O método DPPH é um dos mais utilizados entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade de um composto em capturar radicais livres, por ser considerado prático, rápido e estável (ESPIN et al., 2000). O DPPH (1,1-difenil-2-pictrazil) é um radical livre estável devido à possibilidade de deslocamento de seus elétrons na molécula. Esse deslocamento confere a ele uma intensa coloração púrpura, com comprimento de onda de absorção ao redor de 520 nm (SZABO et al., 2006). Nesse método, o antioxidante reage com o radical DPPH, doando a ele um átomo de hidrogênio e convertendo-o em sua forma reduzida (DPPH-H). Nesta reação, a solução metanólica de DPPH, inicialmente de coloração violeta intensa, torna-se amarelada e o grau deste descoramento indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre (BRAND-WILLIAMS et. al., 1995; HUANG e PRIOR, 2005).

Alves, Pizzolatti e Brighente (2003) avaliaram a atividade antioxidante das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e aquosa, todas obtidas a partir do extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *Schinus mole*. A atividade antioxidante, determinada pelo ensaio com DPPH, foi encontrada apenas no extrato bruto e nas frações acetato de etila e n-butanólica, o que pode estar relacionada a presença de flavonoides apenas nestas frações, evidenciada por teste analítico com magnésio metálico e ácido clorídrico concentrado.

Degáspari, Waszczynskyj e Santos (2004) determinaram a atividade antioxidante das frações etanólica e aquosa, extraídas do extrato etéreo dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, cujas concentrações de polifenóis foram de 98,76 e 73,24 µg de catequina/mL extrato, respectivamente.

Resultados conflitantes de atividade antioxidante de certos compostos puros e extratos têm sido encontrados na literatura (CATUNDA et al., 2003). Diversos fatores são responsáveis por essas diferenças como o método analítico utilizado, a estrutura física do sistema testado, a natureza do substrato para oxidação, presença de componentes interferentes, a maneira como a oxidação foi iniciada e o mecanismo de ação do antioxidante.

Os métodos *in vitro* são avaliações potenciais da atividade antioxidante de um determinado composto puro ou extrato, já que a interação fisiológica entre o organismo e o antioxidante não é estudada, como ocorre nos métodos *in vivo*. Para a utilização de antioxidantes em alimentos, para fins tecnológicos, a avaliação *in vitro*, se bem conduzida, fornece uma estimativa importante do potencial antioxidativo do composto em análise.

## 5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A deterioração de alimentos por micro-organismos é um grande problema nas indústrias alimentícias, dessa forma, a fim de minimizar esse problema, os fabricantes utilizam os chamados aditivos químicos, para conservar e aumentar o prazo de validade desses produtos. A deterioração do alimento é inevitável, e o uso de conservantes poderá aumentar a vida útil do alimento, entretanto, esses conservantes químicos poderão apresentar toxicidade. A história do uso de substâncias antimicrobianas na prática médica é muito mais antiga que a descoberta de espécies microbianas, pois há citações que Hipócrates (470-399 a.C.) já recomendava a lavagem dos ferimentos com vinho, a fim de impedir a propagação do processo infeccioso. Há relatos datados de 2.500 a 3.000 anos atrás, que alguns povos, como os chineses e os indianos, já utilizavam mofos e papa de soja para tratamentos de lesões infectadas e dos processos inflamatórios (SANCHES, 2004).

Lima (2001) descreve que os vegetais têm sido empregados tanto como alimentos, quanto como medicamentos em diversas enfermidades na forma de chás, sucos, tintura, banhos, cataplasma e unguentos. O mesmo autor cita que os povos antigos da China, Egito, Ásia e Roma já utilizavam numerosas espécies vegetais, para uso medicinal, com base em seus conhecimentos empíricos. Embora não seja um fato recente o conhecimento sobre a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores, a busca destas substâncias teve um grande impulso após a descoberta da penicilina.

Ainda hoje existem muitas comunidades e grupos étnicos, principalmente os de rendas mais baixas, que utilizam as plantas medicinais como o principal, senão o único medicamento para o tratamento de suas enfermidades (CAETANO et al., 2002).

Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados ainda são procedentes de plantas (O'HARA et al., 1998).

Weniger (1991) relata que o conhecimento popular, embora empírico, fornece indícios de plantas portadoras de propriedades curativas, representando deste modo a etapa inicial para projetos de pesquisa. Esse mesmo autor destaca que a atuação dos primeiros médicos, em sua maioria de origem portuguesa que vieram ao Brasil no período pré-descobrimento, foram influenciados pela convivência com a cultura indígena aqui presente, e posteriormente, sofreram influência africana.

Melo Junior et al. (2000) estudaram o extrato da casca de pimenta rosa, e observaram que dentre as dezessete plantas medicinais pesquisadas, esta foi uma das que apresentou maiores

halos de inibição no teste de difusão em ágar, contra micro-organismos Gram-positivos, como *Enterococcus*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus* não do grupo A, B, D e bacilo Gram-positivo corineforme, porém, não observaram atividade em micro-organismos Gram-negativos como *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* e *Escherichia coli*.

Martinez Guerra et al. (2000) estudaram a atividade do extrato etanólico de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (etanol a 80%) utilizando cepas dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo), *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativo) além da levedura *Candida albicans*, pelo método de difusão em ágar. Observaram que os extratos nas concentrações 80, 60, 40, 30, 15,5 e 1% apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os micro-organismos testados.

Existem muitos estudos com diversos micro-organismos testados como alvo visando verificar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas.

Segundo Tortora, Funke e Case (2000) o gênero *Escherichia* compreende bacilos Gram-negativos, sendo a espécie de maior importância, *Escherichia coli*. É uma bactéria anaeróbia facultativa, que faz parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente, portanto, quando está presente na água e nos alimentos é um indicativo da contaminação de origem fecal recente. É um bacilo, não esporulado, catalase-negativo, oxidase-negativo, pertencente à família.

O significado da presença de *E. coli* em um alimento deve ser observado em dois aspectos. A *E. coli*, por ser uma enterobactéria (Figura 8), uma vez detectada no alimento, indica que esse alimento tem uma contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, está em condições higiênicas inadequadas. O segundo é que diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e para os animais (FRANCO e LANDGRAF, 2008).



A



B

**Figura 8:** *Escherichia coli*- a) Imagem de microscopia eletrônica e b) Coloração de Gram  
 Fonte: a) <http://weesblog.com/what-is-e-coli-about/>; b) <http://www.bacteriainphotos.com>

Os sintomas causados por esta bactéria são diarreia acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre com duração de 6 horas até três dias, apresentando um período de incubação variando de 17 a 72 horas (FRANCO E LANDGRAF, 2008). Bertoldi (2006), em seu trabalho cita vários autores, que observaram atividade antimicrobiana, atribuída à presença de substâncias fenólicas presentes na *Schinus*, contra uma série de micro-organismos, inclusive a *E.coli*.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não esporulados, imóveis, com maior crescimento, sob condições aeróbias na qual produzem catalase. Pertencentes à família *Micrococcaceae*, aparecem como forma de cacho de uva, ocorrem isolados, aos pares e em aglomerados (FRANCO e LANDGRAF, 2008). São bactérias mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7 °C a 47,8 °C, produtores de enterotoxinas entre 10 °C e 46 °C, com ótimo entre 40 °C e 45 °C. Os surtos de intoxicação alimentar são provocados por alimentos que permaneceram neste intervalo de temperatura por tempo variável, de acordo com o nível de inóculo e temperatura de incubação. São encontrados em lesões de pele e nas vias aéreas do homem. Essa espécie é a que está associada mais frequentemente às doenças estafilocócicas, quer sejam de origem alimentar ou não (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Segundo Franco e Landgraf (2008), a presença de números elevados de *S.aureus* indica perigo à saúde humana, devido ao fato de *S. aureus* produzir uma toxina chamada enterotoxina estafilocócica, bem como à sanificação (é realizada quando se reduz os microrganismos a um número considerado isento de perigo) questionável, principalmente quando o processamento envolve manipulação do alimento.

*S. aureus* pode estar presente no ar, na poeira, em esgoto, na água, em alimentos, equipamentos processadores de alimentos, nas superfícies expostas aos ambientes, nos seres humanos e nos animais (Figura 9).



**Figura 9:** *Staphylococcus aureus* - A) Imagem de microscopia eletrônica e B) Colônias

Fonte: <http://www.bacteriainphotos.com/>

Os homens e os animais são os reservatórios principais, podendo portar essa bactéria no nariz, garganta, cabelo e pele (FORSYTHE, 2005). Freire (2008) e Santos et al. (2004 b), destacam que os sintomas são caracterizados por períodos curtos de incubação (2 a 4 horas), náuseas, vômitos, dores abdominais e prostração, podendo também levar a diarreias. A recuperação, geralmente, ocorre entre 1 a 2 dias. Os sintomas e a duração da doença podem variar, dependendo da suscetibilidade do hospedeiro, do tipo de toxina, da quantidade de alimento contaminado ingerido, da quantidade de toxina presente nos alimentos. Bertoldi (2006) cita vários autores reportando que a atividade antimicrobiana da pimenta rosa se deva provavelmente à presença de substâncias fenólicas contra a bactéria *S. aureus* e inclusive contra algumas bactérias Gram-negativas e também contra a levedura *Candida albicans*.

## **6 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ACETILCOLINESTERASE**

A doença de Alzheimer (DA), caracterizada pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1907, é uma afecção neurodegenerativa progressiva e irreversível de aparecimento insidioso, que acarreta perda da memória e diversos distúrbios cognitivos. Em geral, a DA de acometimento tardio, de incidência ao redor de 60 anos de idade, ocorre de forma esporádica, enquanto que a DA de acometimento precoce, de incidência ao redor de 40 anos, mostra recorrência familiar (HARMAN, 1996). A patologia inicia-se silenciosamente e se agrava com o passar dos anos, prejudicando até mesmo o desempenho de tarefas corriqueiras (RIEDEL, 2014). A exata causa da DA ainda não foi elucidada, no entanto, atualmente é considerada uma doença multifatorial (KONRATH et al., 2013).

Os principais sintomas associado a DA envolve deficiência orgânica cognitiva, principalmente perda de memória. Outras características associadas com os estágios avançados de DA inclui déficit na linguagem, depressão, problemas de comportamento, inclusive agitação, alterações de humor e psicose (BARBOSA FILHO et al., 2006).

Na atualidade, os tratamentos disponíveis para a DA tentam minimizar sintomas cognitivos e comportamentais, por meio de medicação e técnicas cognitivas de reabilitação, melhor estruturação do ambiente bem como por meio de grupos informativos para pacientes e familiares. Entre os diferentes tipos de medicamentos que podem modificar a transmissão colinérgica, a única classe que apresenta eficiência no tratamento sintomático da DA são os inibidores acetilcolinesterase (SILVA, 2009).

A descoberta outras substâncias com maior seletividade pela AChE e baixa toxicidade, poderia contribuir na melhoria da qualidade de vida de pacientes que virão a desenvolver a doença, visto que a terapia atual está longe de ser satisfatória e os medicamentos disponíveis para o tratamento da DA têm eficácia limitada o que sugere a necessidade de novas estratégias para o tratamento da doença (STANDAERT E YOUNG, 2010). Compostos que, atuam diminuindo a quebra bioquímica da acetilcolina e teoricamente prolongam a neurotransmissão colinérgica, têm ocorrência recorrente em plantas tradicionalmente usadas para tratar falhas na memória e outros declínios cognitivos associados à terceira idade (HOUGHTON *et al.*, 2004).

Em uma triagem de 17 espécies de plantas da Mata Atlântica brasileira analisando os extratos brutos etanólico de folhas e galhos para as atividades antifúngica, reparo do DNA e inibição da acetilcolinesterase, entre as espécies analisadas os extratos de *Tetrastylidium grandifolium* (galhos) e *Sloanea guianensis* (folhas e galhos) apresentaram atividade anticolinesterásica maiores que 50% no ensaio quantitativo (YOUNG *et al.*, 2008)

Trevisam e colaboradores (2003) realizaram um estudo de extratos (aquoso, hidroalcoólico, etanólico, metanólico, acetato de etila, clorofórmico, hexânico) de 58 plantas pertencentes a vários gêneros e famílias, os melhores resultados de inibição foram encontrados nos extratos etanólicos das espécies *Amburana cearensis* (casca do caule), *Auxemma glazioviana* (caule), *Lippia sidoides* (folhas), com percentuais de inibição de 100, 100 e 77%, respectivamente.

Os extratos das raízes de *Stephania suberosa* Forman e *Tabernaemontana divaricata* (L.) na concentração de 0.1 mg/ml inibiram mais de 90% a atividade da enzima. (INGKANINAN *et al.*, 2003).

Adsersen e colaboradores (2006) fizeram uma triagem pelo método colorimétrico de Ellman para identificar a atividade anticolinesterásica em 11 espécies de plantas utilizadas popularmente para melhoria da cognição e memória. Foram analisados os extratos aquosos e metanólicos destas espécies e os resultados obtidos indicaram uma significativa inibição da enzima para os extratos metanólicos de *Corydalis cava*, *Corydalis intermedia*, *Corydalis solida ssp. laxa* e *Corydalis solida ssp. slivenensis*.

Os resultados podem ser expressos em IC50 e outros em percentual de inibição. Quando se obtém resultados maiores que 50% de inibição da enzima os extratos testados são considerados com atividade anticolinesterásica potente, moderada quando os percentuais variam entre 30 – 50% e baixa ou nenhuma inibição, resultados abaixo de 30% (STEENKAMP; ADEWUSI, 2011).

Motivados por esses estudos que buscam novas alternativas terapêuticas para a doença de Alzheimer no mundo e analisando a rica variedade de metabólitos dos frutos da *Schinus terebinthifolius* Raddi este trabalho analisou a percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase por extratos desses frutos.

## **7 FILMES BIOATIVOS**

Tradicionalmente, os materiais de embalagens eram selecionados no sentido de ter a mínima interação com o alimento que acondicionam, constituindo assim barreiras inertes. Entretanto diversos sistemas de embalagem têm sido desenvolvidos com o objetivo de interagir de forma desejável com o alimento. As embalagens ativas surgem como uma saída para disponibilizar, ao mesmo tempo, um produto mais saudável e com maior vida útil. Baseadas na liberação gradual de substâncias, elas conferem ao alimento a manutenção da qualidade com menos conservantes químicos, atendendo assim as expectativas do consumidor (AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000; ROONEY, 1995).

O interesse pelo desenvolvimento de filmes bioativos e/ou comestíveis a partir de materiais biológicos, que protege os alimentos dos elementos externos tem aumentado, visto que esses são capazes de deterioração rápida e não poluente, ao contrário dos materiais não renováveis das embalagens para alimentos (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO., 2008). As macromoléculas biológicas mais estudadas para este fim são as proteínas e os polissacarídeos, polímeros capazes de formar matrizes contínuas e, que através de diversas técnicas de produção, podem ser transformados em filmes e revestimentos comestíveis e/ou biodegradáveis.

O uso de polissacarídeos como materiais de revestimento para a proteção de alimentos tem crescido amplamente nos últimos anos, estes sistemas são concebidos aproveitando as suas propriedades de barreira contra impactos mecânicos, reações químicas, e invasão microbiológica. Além disso, o uso de polissacarídeos apresenta vantagens tais como: disponibilidade, baixo custo e biodegradabilidade. Este último, em particular, é de grande interesse, uma vez que conduz a uma redução das grandes quantidades de materiais de embalagem sintéticos não biodegradáveis. Além disso, os polissacáridos podem ser facilmente modificados para melhorar as suas propriedades físico-químicas (HAN, 2005).

Tendo à capacidade de formar géis insolúveis quando reagem com cátions multivalentes, a pectina é um biopolímero adequados para uso em filmes e revestimentos, além de ser reconhecido como seguros pela Food and Drug Administration (FDA) e largamente usados na indústria de alimentos. Diversos trabalhos têm proposto o uso desse biopolímero na formação de filmes e na imobilização de substâncias ativas, podendo ser aplicados de maneira isolada ou

como co-polímeros, inclusive com a adição de agentes antimicrobianos, que possuem a função de impedir a contaminação e a deterioração dos alimentos.

### 7.1 MATRIZ POLIMÉRICA

A pectina é um polissacárido aniônico complexo composto de resíduos de ácido  $\beta$ -1-4, D-galacturônico, onde os ácidos carboxílicos de ácido urônico são totalmente (pectina de alta metoxilação) ou parcialmente (pectina de baixo metoxilação) metil esterificado. A pectina de alta metoxilação forma excelentes filmes. A pectina de baixo metoxilação, derivada de desesterificação controlada, forma géis na presença de íons de cálcio e pode também ser utilizada para desenvolvimento de películas comestíveis. As misturas de pectina e amido podem ser usadas para fazer filmes fortes e autossustentáveis. A pectina tem sido utilizada na produção de canudos biodegradáveis em que as substâncias colorantes e aromatizantes incorporadas a pectina são liberadas quando os líquidos passam através do canudo. As misturas plastificadas de pectina cítrica proporcionam películas fortes e flexíveis, que são termicamente estáveis até 180 °C (HAN, 2005).

A importância da pectina na tecnologia e no processamento de alimentos, bebidas e fármacos está relacionada a sua função de conferir firmeza, retenção de sabor e aroma, assim como ao seu papel de hidrocoloide na dispersão e estabilização de diversas emulsões. A formação de gel é a principal característica funcional da pectina e depende essencialmente das características do meio: pH, teores de sólidos solúveis e cátions divalentes, além de depender da concentração da pectina e do seu grau de metoxilação (PAIVA et al., 2009)

Embora os revestimentos de pectina não tenham uma boa barreira a umidade, podem retardar a perda de água dos alimentos, agindo como um agente secante. Os revestimentos de pectina foram investigados pela sua capacidade de retardar a perda de umidade e a migração de lipídios (BRAKE e FENNEMA, 1993), e melhorar o manuseio e a aparência dos alimentos. No entanto, a adição de lipídios pode aumentar a sua resistência à transmissão do vapor de água (HAN, 2005).

Por ser considerado um componente alimentar, devem cumprir uma série de requisitos tais como, boas qualidades sensoriais, alta barreira e eficiência mecânica, estabilidade bioquímica, físico-química e microbiana, atóxico e não poluente, além de apresentar um baixo custo (CUTTER, 2006). Os benefícios do uso de filmes bioativos são: a) inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas; b) ajudar a controlar a umidade do alimento, evitando alterações de textura, sabor, cor e peso do produto; c) melhorar o aspecto do produto; d) evitar ou diminuir a oxidação dos lipídios; e) manter a umidade.

A adição de um agente plastificante é necessária para superar a fragilidade dos filmes, que ficam quebradiços devido às extensivas forças intermoleculares. Os plastificantes reduzem essas forças, suavizam a rigidez da estrutura do filme e aumentam a mobilidade entre as cadeias biopoliméricas, melhorando as propriedades mecânicas do filme (VEIGA-SANTOS et al., 2005).

O glicerol é um dos agentes plastificantes mais utilizados na composição de soluções filmogênicas, devido a sua estabilidade e compatibilidade com as cadeias biopoliméricas dos biofilmes (CHILLO et al., 2008). É um composto orgânico, pertencente à classe dos polióis. É líquido à temperatura ambiente, higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. Encontra-se presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal na sua forma combinada, ou seja, ligado a ácidos graxos tais como o ácido esteárico, oleico, palmítico, láurico formando a molécula de triacilglicerol (BOBBIO E BOBBIO, 2003).

Alves e colaboradores (2007) avaliando os efeitos do glicerol e da amilose nas propriedades de filmes de amido de mandioca, verificaram que à medida que a proporção de glicerol foi aumentada, a permeabilidade ao vapor d'água, tensão de ruptura, módulo de Young e força de perfuração foram reduzidos.

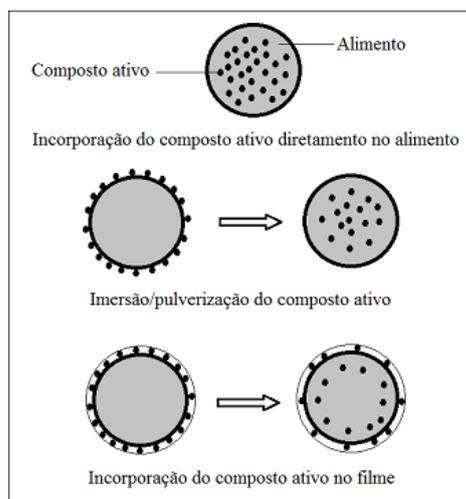
Ghasemlou et al. (2011) estudaram o efeito dos plastificantes sorbitol e glicerol em filmes a base de kefiran e determinaram o glicerol como o plastificante mais adequado, para este tipo de filme, em relação às propriedades físicas, mecânicas, de barreira e térmicas. Os autores concluíram que os plastificantes podem ter um importante papel para adequação dessas propriedades, de acordo com aplicações específicas dos filmes.

## 7.2 PREPARO DO FILME

A aplicação de películas comestíveis pode ser realizada de maneira direta e indireta. Para a aplicação direta certo número de métodos tem sido utilizado, como por exemplo, aplicação de espuma, pulverização, imersão. Na maioria dos casos, após a aplicação, o excesso de revestimento é eliminado por gotejamento, e o material remanescente solidifica-se envolvendo o produto, sendo necessário em algumas situações o uso de uma fonte de aquecimento para acelerar o processo (CUTTER, 2006).

Um dos processos mais amplamente utilizados na elaboração de filmes é a técnica denominada “*casting*”, que compreende o preparo de uma solução coloidal da macromolécula adicionada ou não de aditivos, aplicação dessa solução num suporte adequado, seguida de secagem em condições estritamente controladas (MONTERREY- QUINTERO e SOBRAL, 2000).

Na Figura 10, podem-se observar algumas formas de incorporação de compostos ativos ao produto (diretamente no alimento, por imersão ou pulverização e no material da embalagem).



**Figura 10:** Método de incorporação de substâncias ativas no alimento.

**Fonte:** COMA, 2008.

Os filmes ativos podem apresentar propriedades funcionais, como capacidade antioxidante e antimicrobiana. Diversas pesquisas vêm sendo realizadas, visando-se avaliar a estabilidade de produtos alimentícios embalados com esses filmes à base de fontes renováveis aditivados com substâncias ativas. Segundo Lee (2011), a liberação de antioxidante para a superfície do alimento pode inibir a oxidação química e/ou reações enzimáticas durante o armazenamento do produto e a liberação de composto antimicrobiano reduz o crescimento microbiano.

Alves et al. (2010) verificaram as propriedades de barreira de filmes a base de blendas de pectina e kappa carragena com incorporação de flocos de mica e observaram uma diminuição da permeabilidade ao vapor de água, e também dos gases CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> em relação aos filmes sem a incorporação dos flocos de mica. Silva et al. (2009) avaliaram o efeito da concentração do plastificante em filmes de pectina e alginato reticulados com íons de cálcio e concluíram que o aumento da concentração do plastificante (glicerol) diminuiu a resistência à tração dos filmes compostos e aumentou a solubilidade em água, a umidade e o alongamento desses filmes.

Batista et al. (2005), estudaram o efeito da adição de ácidos graxos sobre as propriedades dos filmes de pectina e observaram que a utilização da mistura desses componentes na preparação dos filmes aumentou os valores de tensão da ruptura e da elongação, no entanto não diminuiu a permeabilidade ao vapor de água em relação aos filmes produzidos com a adição

dos ácidos graxos individualmente. Também nesse estudo foi observada a alta solubilidade dos filmes produzidos e os autores sugerem que filmes com essa característica podem ser utilizados para cobertura de sementes agrícolas que necessitem de rápida germinação no campo ou como carreadores de aditivos necessários ao crescimento das mesmas.

### 7.3 PROPRIEDADES DOS FILMES

Os filmes biodegradáveis para aplicação como embalagens para alimentos devem atender a alguns requisitos como a espessura, a permeabilidade a gases (Ex: O<sub>2</sub>), capacidade de alongamento, ruptura, entre outras. Então ao se elaborar um filme biodegradáveis deve-se realizar sua caracterização em relação as suas propriedades mecânicas (propriedades de tração, porcentagem de alongamento e módulo de Young), suas propriedades térmicas, propriedades óticas e suas propriedades de barreiras.

A espessura dos filmes é influencia suas propriedades, sendo o seu controle muito importante para avaliar a uniformidade desses materiais, a repetibilidade da medida de suas propriedades e a validade das comparações entre filmes. Em produção de filmes, com a técnica tipo *casting* é muito importante controlar o nível do local onde o suporte com a solução filmogênica será mantido durante o processo de secagem, para evitar diferenças na espessura desses filmes (CUQ et al.,1996; GENNADIOS et al., 1993).

Sobral e colaboradores, 2002, observaram que a obtenção de filmes pela metodologia casting podem gerar filmes não homogêneos e de diferentes espessuras, podendo dar lugar a respostas diferentes com relação aos testes mecânicos.

As propriedades de tração expressam a resistência do material à deformação por alongamento quando submetido à tração.

Existem análises para determinar a tensão na ruptura, a porcentagem de alongamento na ruptura e o módulo elástico dos filmes utilizados como embalagem. Valores destas propriedades mecânicas podem servir como base de comparação do desempenho mecânico dos diferentes filmes, assim como para a avaliação dos efeitos decorrentes da modificação do polímero-base (CANEVAROLO JR., 2003).

O ensaio para determinação das propriedades de tração de um filme flexível envolve a separação, a uma velocidade constante, de duas garras que prendem as extremidades de um corpo-de-prova, registrando-se ao longo do ensaio a força ou a resistência que o material oferece à deformação (elongação) (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Coffin e Fishman (1994), verificaram que filmes a base de pectina e amido adicionados de glicerol sofreram redução na resistência à tração e aumento no alongamento.

Análise térmica representa um conjunto de técnicas que permite medir as mudanças de uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação em função da temperatura e do tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura. Com base nesta definição três critérios devem ser considerados para que a técnica seja considerada termo analítica, primeiro que uma propriedade física deve ser medida, segundo, que a medida deve ser expressa em função da temperatura e, por último, que a medida deve ser realizada com um programa controlado de temperatura (HORN, 2012).

A termogravimetria (TGA) é uma técnica de análise térmica, na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que começam a se decompor, acompanhar o andamento da desidratação e de reações de oxidação, combustão, decomposição, etc. (CANEVAROLO Jr., 2002). Em materiais poliméricos, a TGA tem sido largamente utilizada para avaliação da estabilidade térmica, determinação do conteúdo de umidade e aditivos, estudos de cinética de degradação, análise de sistemas de copolímeros, estabilidade à oxidação e temperaturas de degradação.

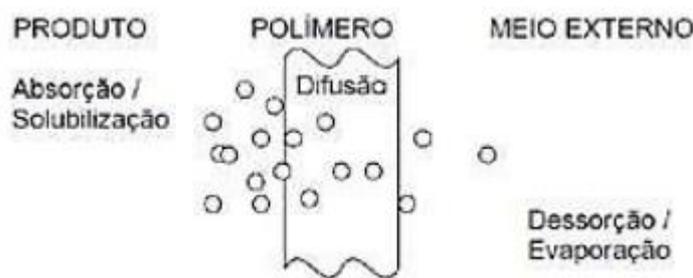
Segundo Sarantópoulos (2002) as propriedades de barreira são definidas como a capacidade em resistir à absorção ou à evaporação de gases e vapores, resistir à permeação de lipídeos e à passagem de luz.

A permeabilidade é resultado dos efeitos combinados da difusão e solubilidade, representando a taxa de transporte da molécula permeante. É definida como uma propriedade do par filme/permeado (vapor de água, oxigênio e gás carbônico), em condições definidas de temperatura, umidade relativa, espessura e diferença de pressão parcial (MCHUGH; KROCHTA, 1994; DUFRESNE; MATHEW, 2002).

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) é considerada uma das propriedades de barreira de materiais. O seu conhecimento é imprescindível para eventuais aplicações dos filmes em embalagens, porém não é uma propriedade restritiva. Um material muito permeável ao vapor de água poderá ser indicado para embalagens de vegetais frescos, enquanto um filme pouco permeável poderá ser indicado para produtos desidratados, por exemplo (SOBRAL; OCUNO, 2000).

A permeabilidade através de um filme indica a facilidade com que um soluto migra de uma face em contato com uma parte do filme, em relação à outra face de contato com a outra parte do filme. A norma ASTM E-96 (American Society for Testing and Materials) define que

a permeabilidade é a taxa de transmissão de vapor d'água por unidade de área através de um filme com espessura conhecida, induzida por uma diferença de umidade relativa. A transferência de água em filmes poliméricos ocorre por difusão molecular conforme apresentado na Figura 11.



**Figura 11**– Esquema de permeação de vapor d'água através de filmes poliméricos.

#### 7.4 PROPRIEDADES ATIVAS DE FILMES

Os filmes podem atuar no alimento como carreadores de agentes com função específica como antioxidante, antimicrobiana, aromática, entre outras. Diversas pesquisas têm mostrado o potencial do uso dos filmes incorporados com agentes ativos na manutenção e prolongamento da vida útil de alimentos, sendo eles de origem vegetal ou animal (SOARES et al., 2009).

Diversas propostas demonstram a utilização destes compostos em diversos alimentos, utilizando-se de substâncias antimicrobianas as mais variadas como, por exemplo, ácidos orgânicos (acético, propiônico, benzoico, láctico, etc.), sorbato de potássio, bacteriocinas, extratos de especiarias (timol,  $\rho$  cimeno, cinamaldeído), antibióticos, fungicidas, agentes quelantes, etc. podem ser adicionados aos filmes comestíveis para reduzir micro-organismos (DUTTA et al., 2011).

Filmes ativos com propriedades antioxidantes tem sido muito estudados, uma vez que são uma das alternativas mais promissoras às embalagens tradicionais, nas quais os antioxidantes são incorporados ou adicionados para reduzir a oxidação do alimento, uma das principais causas de deterioração dos mesmos (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012). Esse sistema consiste na incorporação de substâncias antioxidantes em filmes, papéis ou sachês, que serão liberadas para proteger os alimentos da degradação oxidativa, inibindo as reações de oxidação ao reagirem com radicais livres e peróxidos e, conseqüentemente, estendendo a sua vida de prateleira (TOVAR et al., 2005). A oxidação lipídica é uma das mais importantes reações químicas, responsável pela deterioração da qualidade dos alimentos, estando relacionada com o

desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis, causadas por complexas reações de oxidação, hidrólise, polimerização, pirólise, dentre outras, sofridas pelos ácidos graxos insaturados, resultando na formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos, impróprios para o consumo. Além de comprometer a biodisponibilidade de vitaminas, proteínas e pigmentos, reduzindo o valor nutricional dos alimentos (TAWFIK e HUYGHEBAERT, 1997).

Granda-Restrepo et al. (2009) desenvolveram películas de polietileno com múltiplas camadas incorporadas com tocoferol para embalagem de leite em pó, as quais retardaram a oxidação dos lipídios do produto. Gómez-Estaca et al. (2010) conseguiram retardar a oxidação lipídica de sardinhas defumadas a partir do uso de uma película a base de gelatina incorporada com extratos aquosos de alecrim e orégano.

## REFERÊNCIAS

- ADSERSEN, A. et al Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 104, 418–422, 2006.
- AGRA, M. F, FRANÇA P.F, BARBOSA-FILHO J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn* 17:114-140.2007.
- AGRA, M. F. et al. Survey of Medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev. Bras Farmacogn** 18: 472-508.2008.
- ALISSANDRAKIS, E. et al. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. *Food Chemistry*, v. 82, p. 575-582, 2003.
- ALVES, L. O.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Efeito antioxidante de extratos e frações de *Schinus molle*. *XI ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL*, Pelotas, RS Nov/2003.
- ALVES, V.D. et al. Effects of glycerol and amylose enrichment on cassava starch films properties. *Journal of Food Engineering*, vol. 78, n. 2, p. 941-946, 2007.
- ALVES, V.D.; COSTA, N.; COELHO, I.M. Barrier properties of biodegradable composite films based on kappa-carrageenan/pectin blends and mica flakes. *Carbohydrate Polymers*, v.79(2), p. 269–276, 2010.
- ARAÚJO, J.M.A. *Química de Alimentos: teoria e prática* 5. ed. Viçosa: MG Editora da UFV, 416p. 2011.
- ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 31 (2): 205-209, 2010.
- ARNOUS, A.; MAKRRIS, D.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Comp. Anal.*, 15, 655-665, 2002.
- ATOUI, A.K. et al. Tea and herbal infusion: their antioxidant. Activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, v.89, n.1, p.27-39, 2005.
- AZEREDO, H. M.; FARIA, J. A. F.; AZEREDO, A. M. C. Embalagens ativas para alimentos. *Food Science and Technology* (Campinas), 20(3), 337-341, 2000.
- BALBACH, A. *A flora nacional na medicina doméstica*- 23. ed., v. II. Ed. A Edificação do Lar São Paulo- S.P. 919p. 1986.
- BATISTA, J. A.; TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Efeito da adição de ácidos graxos em filmes à base de pectina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, p. 781-788, 2005.

BARBOSA FILHO, J.M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 16, p.258-285, 2006.

BARBOZA, A. C. R.N. et al. Aquecimento em forno de micro-ondas/desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais. *Química Nova*, v.24, p.901-904, 2001.

BENAVENTE-GARCIA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry* n.68 p.457-462, 2000.

BERTOLDI, M. C. *Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleoresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (Schinus terebinthifolius Raddi)*. Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 96p, 2006.

BIAVATTI, M., MARENSI, V., LEITE, S.N., REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Rev. Bras. Farmacogn* 17: 640-653.2007.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. *Introdução à química de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003. 238 p.

BRAKE, N. C.; FENNEMA, O. R. Edible coatings to inhibit lipid migration in a confectionery product. *J Food Sci.* 58, 1422, 1422-1425, 1993.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *L. W. T.* n. 28, v. 1, p. 25-30, 1995.

CAETANO, N. et al. Determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v.12, supl. p.132-135,2002.

CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends Anal. Chem*, v. 19(4), p. 229-247, 2000.

CANEVAROLO JR., S. V. *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. São Paulo: Artliber Editora, 2003.

CANEVAROLO JR., S.V. *Ciência dos Polímeros – Um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. São Paulo: Ed. Artliber, 183 p., 2002.

CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F. P. Analytical applications of ultrasound. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, v. 26, 413 p. 2007.

CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F.; MOLINA, A. P. The role of ultrasound in analytical derivatizations. *Journal of Chromatography B*, v. 879, p.1189–1195, 2011.

CATUNDA, P. H. A. et al. Influência do teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo. *Rev. Bras.Sementes*, v.25, n.1 Pelotas, 2003.

- CERUKS, C. H. et al. Constituintes Fenólicos Polares de *Schinus terebinthifolius* RADDI (ANACARDIACEAE). *Quimica Nova*, v. 30, n. 3, 597-599. 2007.
- CHAVAN, U.D., SHAHIDI, F., NACZK, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry* n.75 p. 509-512, 2001.
- CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18 p. 813–835, 2011
- CHILLO, S. et al. M.A. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, vol.88, p. 159-168, 2008.
- CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem.*, v. 40, p. 809-816, 2005.
- CLEMENTE A.D. *Composição química e atividade biológica do óleo essencial da pimenta-rosa (Schinus terebinthifolius Raddi)* 2006. 50p. (Dissertação de Mestrado em Agroquímica) – Viçosa, Minas Gerais.
- COFFIN, D. R.; FISHMAN, M. Physical and mechanical properties of highly plasticized pectin/starch films. *Journal of Applied Polymer Science*, v.54, n.9, p.1311-1320, 1994.
- COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, Barking, v. 78, p. 90-103, 2008.
- CORRÊA, M.P. *Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. 6v. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p.170-171, 1984.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein based biopackaging as affected by film thickness. *Journal of Food Science*, 61 (3), p.580-584, 1996.
- CUTTER, C.N. Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. *Meat Science*, vol. 74, p. 131–142, 2006.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Visão Acadêmica*, v. 5, n. 2, p. 83-89, 2004.
- DEGÁSPARI, C. H; WASZCZYNSKYJ, N; PRADO, N. R. M. Atividade Antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, V. 29, n. 3, p. 617-622, maio/jun., 2005.
- DUFRESNE, A.; MATHEW, A.P.; Morphological investigation of nanocomposites from sorbitol plasticized starch and tunicin whiskers. *Biomacromolecules*, Washington, v 3, p. 609-617, 2002.

DUTTA, J.; TRIPATHI, S.; DUTTA, P.K. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food Science and Technology International*, vol. 18, n. 1, p. 3–34, 2011.

DZIEZAK, J. D. Preservative Systems in Foods: Antioxidants and Antimicrobial Agents. *Food Technology*, v. 40, n. 9, p.40, 94-136, 1986.

ESCLAPEZ, M. D. et al. Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, v. 3, p.108–120, 2011.

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

FEUEREISEN, M. M., et al. A. Characterization of phenolic compounds in Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) exocarp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(26), 6219–6226, 2014.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre, RS: Artmed, 424p. 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 182p. 2008.

FREIRE, J.M. *Óleos essenciais de canela, manjerona e anis estrelado: caracterização química e atividade biológica Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Aspergillus flavus e Aspergillus parasiticus*. 2008, 68p. Dissertação de mestrado, Lavras, Minas Gerais- Brasil.

FREITAS, L. S. *Desenvolvimento de Procedimentos de Extração do Óleo de Semente de Uva e Caracterização Química dos Compostos Extraídos*. Tese de Doutorado. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, 2007.

FREITAS, S.P. et al. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-brasil com etanol. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Vol.27 suppl. 1. 2007.

FUCHS, B. et al. MALDI-TOF-MS Directly Combined with TLC: A Review of the Current State. *Chromatographia*, 69 (S1): 95- 105, 2008.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Property modification of edible wheat, gluten-based films. *Transactions of the ASAE, St. Joseph*, v. 36, n. 2, p. 465-470, 1993.

GHAFFARI, A.; NAVAEI, K.; OSKOU, M.; BAYATI, K.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit intended for sigmoidal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 67, p. 175–186, 2007.

GHASEMLOU, M.; KHODAIYAN, F.; OROMIEHIE, A. Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefiran. *Carbohydrate Polymers*, 84, 477–483, 2011.

GOMES, L.J. et al. *Pensando a biodiversidade: aroeira (Schinus terebinthifolius Raddi.)*. São Cristóvão: Editora UFS, 372 p, 2013.

GÓMEZ-ESTACA, J et al. Biodegradable gelatin chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, vol.27, p. 889-896, 2010.

GOMEZ, N. E., WITTE, L. A Simple method to extract essential oils from tissue samples by using microwave radiation. *Journal of Chemical Ecology*, v. 27, n. 11, p.2351–2359, 2001.

GRANDA-RESTREPO, D. M. et al. Migration of  $\alpha$ -tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. *Food Research International*, vol. 42, p. 1396–1402, 2009.

GUO, C. et al. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, v.23, p.1719-1726, 2003.

HAN, Jung H. (Ed.). *Innovations in food packaging*. Academic Press, 2005.

HARMAN, D. A hypothesis on the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Annals N.Y. A. of Sciences* 1996; 786:152-68.

HASLAM, E.; Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59(2), 205-215,1996.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 1, p. 231-240, 2008.

HORN, M. M. *Blendas e filmes de quitosa/amido: estudo da influência da adição de polióis, oxidação do amido e razão amilose/amilopectina nas suas propriedades*. 147 p, 2012. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo – São Carlos.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. *Princípios ativos de plantas superiores*. São Carlos, SP, ed.UFSCar, 152 p., 2003.

HOUGHTON, P. J.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEGBULUGBE, A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. *Phytochem.*, 65, 2893-2896. 2004

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 53, p 1.841-1.856, 2005.

INGKANINAN, K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, v.89, p. 261-264, 2003.

JAIN, M. K. et al. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase a 2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*. 39:537-547, 1995.

JIANYONG, W.; LIDONG, L.; FOO-TIM, C. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 8, p. 347-352, 2001.

JORGE, L.I.F.; MARKMANN, B.E.O. Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). *Revista Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, 17, p. 139-145, 1996.

JUN, S. J.; CHUN, J. K. Design of u-column microwave-assisted extraction system and its application to pigment extraction from food. *Institution of Chemical Engineers*, v.79, p.231-236, 1998.

KALLENBACH, M.; BALDWIN, I. T.; BONAVENTURE, G. A rapid and sensitive method for the simultaneous analysis of aliphatic and polar molecules containing free carboxyl groups in plant extracts by LC-MS/MS. *Plant Methods*, 5: 17, 2009.

KAPPE, C.O.; DALLINGER, D.; MURPHREE, S. S. Practical microwave synthesis for organic chemists. *Wiley-VCH: Weinheim, Alemanha*, 2009.

KASSEM, M. E.; EL-DESOKY, S.; SHARAF, M. Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 40, p. 447-50, 2004.

KEREM, Z.; GERMAN-SHASHOUA, H.; YARDEN, O. Microwave-assisted extraction of bioactive saponins from chickpea *Cicer arietinum* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 85, n. 3, p. 406–412, 2005.

KONRATH, E.L. et al. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, London, v. 65, n. 12, p. 1701-1725, 2013.

KORNILOVA, O.; ROSELL-MELE, A. Application of microwaveassisted extraction to the analysis of biomarker climate proxies in marine sediments. *Org. Geochem*, v. 34, p. 1517-1523, 2003.

KUSKOSKI, E.M. et al. Aplicacion de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidant em pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.25, n. 4, p.726-732,2005.

KWON, J. H.; BÉLANGER, J. M. R.; PARÉ, J. R. J. Optimization of microwave assisted extraction (MAP) for ginseng components by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 7, p. 1807–1810, 2003.

LEE, D. S. Active Packaging. In: SUN, D. W. *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*. Boca Ranton: CRC Press, Cap. 37, p. 819-836, 2011.

LIMA, L.M.O. *Estudo do aproveitamento dos bagaços de frutas tropicais, visando a extração de fibras*. 108f.,2001. Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C. et al. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chemistry*, vol. 131, p. 1376–1384, 2012.

LORENZI H. *Árvores brasileiras Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil* 3 ed. Nova Odessa Instituto Plantarum, v.1, 8p, 2000.

LUQUE-GRACIA, J.L; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 1, 2003.

MA, Y. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Sastsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc) peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 5682- 5690, 2008.

MARTINEZ GUERRA, M.J. et al. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal), Ver. *Cubana Plant Med (Habana)*, 5(1); 23-25, 2000.

MATSUI, K. N. *Inativação das enzimas presentes na água de coco verde (cocos nucifera L.) por processo térmico através do micro-ondas*. 2006. 139. f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MCHUGH, T. A.; KROCHTA, J. M. Sorbitol vs glycerol plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Washington, v. 42, p.841-846, 1994.

MELECCHI, M.I.S. et al. Optimization of the sonication extraction method of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 13, p. 242-250, 2006.

MELO JUNIOR, E. J. M. et al. Estudo de plantas medicinais com atividade antimicrobiana sobre micro-organismos presentes na alveolite. *Revista da ABO Nacional*, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 220-226, 2000.

MELO, C.M.T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de pimenta *Capsicum chinense* (bode), *Capsicum baccatum* variedade praetermissum (cumari) e *Capsicum frutescens* (malagueta) - Universidade Federal de Uberlândia, *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, n.12;2011.

MELO, E. A.L. et al. Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 44, n. 2, abr./jun., 2008.

MONTERREY-QUINTERO, E. S. SOBRAL, P. J. A. Preparo e Caracterização de Proteínas Miofibrilares de Tilápia-Do-Nilo para Elaboração de Biofilmes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, vol.35, n°.1, p.179-189. Jan. 2000.

MORELLI, L.L.L. *Avaliação de compostos fenólicos majoritários em geleia de uva produzida com a variedade IAC-138-22 (Máximo)*. 2010.133f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciência de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, 2010.

O'HARA, M.A.; KIEFER, D.; FARREL, K., KEMPER, K. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Archives of Family Medicine*, Chicago, v.7, 1998.

OLIVEIRA, D.A. *Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (vitis vinifera) das variedades Merlot e Syrah*. Florianópolis, SC, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 211p. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

OLIVEIRA, D.M. *Estudo químico e biológico de Frutos de Plantas de interesse econômico: Punica granatum e Schinus terebinthifolius*. 135f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2012.

OROZCO-SOLANO, M.; RUIZ-JIMÉNEZ, J.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 1227-1235, 2010.

OUFNAC, D. S. et al. Extraction of antioxidants from wheat Bran using conventional solvent and microwave-assisted methods. *Cereal Chem*, v. 84, n. 2, p. 125-129, 2007.

PAIVA, E. P.; LIMA, M.S.; PAIXÃO J.A. Propriedades químicas de las Pectinas. *Revista Iberoamericana de Polímero*, p. 196-211, 2009.

PINELO, M. et al. Interaction among phenolics in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1177-1180, 2004.

RAUH, M. Steroid measurement with LC-MS/MS. Application examples in pediatrics. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 121 (3-5): 520-527, 2010.

RIBAS, M. O. et al. A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi Sobre o Processo de Reparo Tecidual das Lesões Ulceradas Induzidas na Mucosa Bucal do Rato. *Revista Odonto Ciência*. São Paulo: FAC. 2006.

RIEDEL, W.J. Preventing cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Current Opinion in Pharmacology*, Oxford, v. 14, p. 18-22, Feb. 2014.

ROBERTS, W.G.; GORDON, M.H. Determination of the antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1486-1493, 2003.

ROONEY, M.L. Overview of active food packaging. In: ROONEY, M.L. *Active food packaging*. Glasgow: Chapman & Hall, p. 1-37, 1995.

RUIZ, A.R. et al. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.52, p.123-127, 1996.

SANCHES, A. C. C. *Estudo farmacognóstico das cascas de Stryphnodendron abovatum Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos*.

Araraquara, 2004. 214f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2004.

SANTOS, S.C. et al. Antifungal activity of *Eugenia uniflora* L. fractions against *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v.7, n.1, p.30-33, 2004.

SARANTÓPOULOS, C. G. L. et al. *Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades*. Campinas: CETEA/ITAL, 2002.

SELLAPPANS, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 50, p 2432-2438, 2002.

SERRADILLA, J. A. P; CAPOTE, F. P.; CASTRO, M. D. L. Simultaneous ultrasound-assisted emulsification-extraction of polar and nonpolar compounds from solid plant samples. *Analytical Chemistry*, v. 79, p. 6767-6774, 2007.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. *Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications*. Lancaster: Technomic, 331p., 1995.

SILVA, L. T. *Desenvolvimento e avaliação de embalagens biodegradáveis com ação antioxidante contendo café e cacau*. 2009. 148p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimento) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA.

SILVA, M. A. et al. Óleo essencial de aroeira-vermelha como aditivo na ração de frangos de corte. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.41, n.4, p.676-681,2011.

SILVA, M. S. S. "*Alcaloides de Plantas da Família Amaryllidaceae: Isolamento Caracterização e Testes de Inibição de Acetilcolinesterase*". Tese de doutorado. Departamento de Química Orgânica. Universidade Estadual de Campinas. Campinas SP. 2009.

SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, RS; Florianópolis, SC, Editora da UFSC, Editora da UFRGS, 2007.

SOARES, D. G. S. et al Atividade antibacteriana in vitro da tintura de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na descontaminação de escovas dentais contaminadas pelo *S. mutans*. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 7, n. 3, João Pessoa. 2007.

SOARES, N. de F.F. et al. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. *Revista Ceres*, vol.56, n. 4, p. 370-378, 2009.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOBRAL, P. J. do A.; OCUNO, D. Permeabilidade ao vapor de água de biofilmes à base de proteínas miofibrilares de carne. *Brazilian Journal of Food Technology*, vol. 3, n. 3, p. 11-16, 2000.

SOBRAL, P.J.A.; MONTERREY-QUINTERO, E.S.; HABITANTE, A.M.Q.B. Glass transition of Nile tilapia myofibrillar protein films plasticized by glycerin and water. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 67, n.2, p.499-504, 2002.

STANDAERT, D. G.; YOUNG, A. B. Treatment of central nervous system degenerative disorders. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. cap. 22. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12<sup>a</sup> ed. Editora McGraw-Hill., 2010.

STEENKAMP, V.; ADEWUSI, E.A. *In vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. p. 829-835, 2011.

SUN, Y. Z. et al. Optimization of microwaveassisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *European Food Research Technology*, v. 225, n. 3-4, p. 511–523, 2008.

SZABO, M.R. et al. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chem Pap*. 61(3) 204-216, 2007.

TAWFIK, M.S.; HUYGHEBAERT, A. Interaction of packaging materials and vegetable oils: oil stability. *Food Chemistry*, vol. 64, p. 451- 459, 1997.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 807p. 2000.

TOVAR, L.; SALAFRANCA, J.; SÁNCHEZ, C.; NERÍN, C. Migration studies to assess the safety in use of a new antioxidant active packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, p. 5270-5275, 2005.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de alzheimer. *Quím. Nova*. v 26 (3) , p.301-304, 2000.

VEIGA-SANTOS, P.; OLIVEIRA, L.M.; CEREDA, M.P.; ALVES, A.J.; SCAMPARINI, A.R.P. Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch-gum films: effect of additives and deacetylated xanthan gum. *Food Hydrocolloids*. vol. 19, p.341 - 349, 2005.

VEILLET, S.; TOMAO, V.; CHEMAT, F. Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatization of olive oil with basil. *Food Chemistry*, v. 123, p. 905–911, 2010.

VILKHU, K. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 9, p. 161–169, 2008.

WANG, J. et al. Optimization of ultrasounded-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106, 804-810, 2008.

WENIGER, B. Interest and limitation of a global ethnopharmacological survey. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 32, n. 1-3, p. 37-41, 1991.

WOLFENDER, J. L.; MARTI, G.; QUEIROZ, E. F. Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication, Quality Control and Metabolomics. *Current Organic Chemistry*, 14 (16): 1808-1832, 2010.

YANG, A.; ZHAI, W. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocianins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC-MS. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.11, p.470-476, 2010.

YOUNG, M. C. M. et al. Screening for antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest - Ilha do Cardoso State Park. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18 (Supl.): 655-660, dez. 2008

ZHENG, Z. et al. Isolated perfused lung extraction and HPLC-ESI- analysis for predicting bioactive components of *Saposhnikovia Radix*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54 (3): 614-618, 2011.

# CAPÍTULO 2

## COMPARAÇÃO DE PROCESSO EXTRATIVO DE FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi UTILIZANDO MICRO-ONDAS FOCALIZADAS VERSUS ULTRASSOM

Calila T Santos<sup>1,2</sup>; Lissandra C. A. Reis<sup>1</sup>; Isabela M. A. Reis<sup>1</sup>; Geany Peruch Camiloto<sup>3</sup>;

Alexsandro Branco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Saúde, Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.*

<sup>2</sup>*Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia Baiano, Campus do Senhor do Bonfim, Brasil.*

<sup>3</sup>*Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.*

**RESUMO:** O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de comparar a extração assistida por micro-ondas (EAMF) e por ultrassom (EAU) dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Os parâmetros de extração: o tempo, a temperatura e a composição da mistura de solventes (etanol: água) foram avaliados e comparados usando uma abordagem estatística de projeto experimental. Foram também avaliados os teores fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, a atividade antimicrobiana, a inibição da acetilcolinesterase e a análise de CLAE-ESI. Para os teores de fenólicos e flavonoides para os ensaios obtidos por EAMF os parâmetros ótimos foram: tempo de extração de 25 minutos, temperatura de 51 °C e composição de etanol 75% em água com valores de  $5950 \pm 1,4$  mgGAE/g (fenólicos) e  $1750 \pm 3,2$  mgEQ/g (flavonoides). Para os ensaios obtidos por EAU temos os parâmetros de 30 minutos, 42 °C e etanol 50% em água para o melhor valor de fenólicos ( $897,3 \pm 1,9$  mgGAE/g) e os parâmetros 17,5 minutos, 60 °C e etanol 50% em água para o melhor valor de flavonoides ( $67,72 \pm 1,0$  mgEQ/g). A atividade antioxidante mostrou percentagem de inibição igual a 87,3% (EAMF 8) e 31,3% (EAU 12). Em relação à atividade antimicrobiana do extrato obtido por EAMF, a CIM para *S. aureus* foi de 0,5 mg/ml, para *E. coli* 0,25 mg/ml, enquanto que o extrato de EAU apresentou CIM de 0,5 mg/ml para todos os microrganismos analisados. Em relação a inibição de acetilcolinesterase (AChE), a EAMF mostrou inibição moderada, enquanto que os extratos de EAU apresentaram uma inibição potente tendo o ensaio EAU 12 76,69% inibição da AChE. A espectrometria de massa (CLAE-ESI-MS<sup>n</sup>) mostrou a presença de compostos fenólicos e terpenos. Este estudo mostra que o EAMF é adequado como um procedimento eficiente para a extração de metabólitos dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi e que EAU é muito efetiva na inibição da AChE.

**PALAVRAS CHAVES:** Pimenta Rosa. DPPH. CLAE-ESI.

## 1 INTRODUÇÃO

*Schinus terebinthifolius* Raddi é nativa da América do Sul e é encontrado principalmente na costa brasileira (BARBOSA et al., 2007) e popularmente conhecida como pimenta vermelha, pimenta rosa, aroeira, aroeira da praia, entre outros.

Os frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (STF) são utilizados como especiarias na culinária, e popularmente utilizado como anti-inflamatório e antifebrífuga. Estudos têm demonstrado uma grande variedade de metabolitos secundários na família Anacardiaceae tornando-se um promissor candidato na busca de substâncias bioativas naturais.

A análise fitoquímica da *Schinus terebinthifolius* Raddi revelou que a mesma contém taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas esteroidais, esteróis, terpenos, e uma quantidade grande de óleo essencial (CARVALHO et al., 2003).

O apreço e especialmente a consequente difusão na culinária francesa ajudaram a elevar o status da pimenta rosa como ingrediente para um nível superior na conotação dos consumidores finais em todo o mundo. A sua comercialização é recente (cerca de 6-7 anos) e existem ainda poucas informações a respeito dos mercados interno e externo do produto no Brasil. Não há dados oficiais a respeito da produção total nacional das sementes de aroeira, no entanto, estimativas partem de uma produção total de 300 toneladas por ano. Deste total, aproximadamente 90% são destinados ao mercado externo, especialmente para a Europa, e somente 10% são consumidos internamente. (BANDES, 2008).

A maioria dos estudos de bioatividade dos compostos fenólicos está relacionada com suas propriedades antioxidantes, atribuídas principalmente às propriedades redox de seus grupos hidroxil, dependentes das características estruturais das moléculas como a presença ou ausência de moléculas de glicosídeos nos polifenóis, número e posição das hidroxilas esterificadas e livres, dentre outros e das relações estruturais entre partes diferentes de sua estrutura química (BENAVENTE-GARCIA et al., 2000; ROBARDS, 2003).

O número e a diversidade destes compostos necessitam de eficientes métodos de determinação e análise. A escolha do método de extração depende dos tipos de compostos presentes no extrato e do tipo de análise, sendo que os procedimentos de extração são desenvolvidos com o objetivo de se obter um extrato enriquecido com todos os compostos de interesse, e livre de componentes interferentes, como carboidratos e lipídeos (BERTOLDI, 2006).

O desenvolvimento de procedimentos de extração que possibilitem a utilização de solventes menos agressivos ao meio ambiente e que sejam usados em menor quantidade tem

sido proposto como uma alternativa para o desenvolvimento da chamada —química verde (RODRÍGUEZ-ROJO et al., 2012). Para tanto, os procedimentos convencionais vêm sendo substituídos ou modificados de acordo com o surgimento de procedimentos alternativos, tais como a extração assistida por micro-ondas (EAM) (JAPÓNLUJÁN et al., 2006b), extração com fluido supercrítico (EFS), extração com fluido pressurizado (EFP) (XYNOS et al., 2012) e extração assistida por ultrassom (US) (JAPÓN-LUJÁN et al., 2006a).

As publicações sobre o fruto de *Schinus terebinthifolius* Raddi (STF), se referem sempre ao extrato obtido por maceração e utilizando o metanol como solvente, no presente estudo entretanto foi utilizado como solvente de extração o etanol, a água e a mistura de ambos, cada um destes solventes pode ser classificado como solvente geralmente reconhecido como seguro, (GRAS). Considerando uma extração sustentável e segura, além do que o etanol é menos tóxico que o metanol o que pode facilitar a utilização deste extrato em formulações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias sem risco ao consumidor.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito dos métodos de extração assistida por micro-ondas focalizada e ultrassom na obtenção de extratos hidroetanólicos de STF monitorando-os através das atividades biológica (antioxidante, antimicrobiana e inibição da acetilcolinesterase).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 REGENTES E EQUIPAMENTOS

Para preparação do material botânico foi utilizado estufa, moinho de facas, metanol P.A, funil de Buchner e rotaevaporador.

Para a espectrometria de massas utilizou equipamento Esquire 3000 Plus-Bruker Daltonics, capilar de 4000V, nebulizador a 40 psi, gás seco de 9 litros/min e temperatura a 300°C, solução aquosa de H<sub>2</sub>O/H<sub>3</sub>P0<sub>4</sub>, metanol grau analítico e coluna C18 (fase reversa).

A otimização no micro-ondas focalizado foi feita em um micro-ondas focalizado Discover system (CEM), operando com a potência máxima de 300 W. Já no ultrassom foi feito em um Sonicador Ultrassônico USC2800 com 9, 5 liters – Unique.

O teste antioxidante foi realizado com DPPH, padrão de rutina (Sigma Aldrich®), etanol P.A (Cromoline®) e leitora de microplacas Multiskan FC (Fisher Scientific). Para análise de polifenóis e flavonoides totais foi utilizado reagente de Folin Ciocalteu's, padrão de ácido gálico, padrão de quercetina (Sigma Aldrich®), carbonato de sódio e cloreto de alumínio (Fmaia®) e leitora de microplacas já mencionada.



### 2.3 PLANEJAMENTO FATORIAL

Para o experimento utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), contendo 4 pontos axiais, 10 pontos ortogonais e 3 pontos centrais, totalizando 17 formulações. Os valores reais e codificados para as variáveis  $X_1$  tempo (min),  $X_2$  concentração de etanol (%) e  $X_3$  temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) encontram-se na Tabela 2. As faixas de variação entre os limites inferior e superior de cada variável independente foram estabelecidas a partir de dados da literatura e de testes preliminares realizados.

**Tabela 1:** Valores reais e codificados das variáveis independentes em diferentes níveis para DCCR

Ensaio	Variáveis (Valores reais e codificados)		
	Tempo (Min) $X_1$	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) $X_2$	Concentração de Etanol (%) $X_3$
1	10 (-1)	34(-1)	25(-1)
2	10(-1)	34(-1)	75(+1)
3	10(-1)	51(+1)	25(-1)
4	10(-1)	51(+1)	75(+1)
5	25(+1)	34(-1)	25(-1)
6	25(+1)	34(-1)	75(+1)
7	25(+1)	51(+1)	25(-1)
8	25(+1)	51(+1)	75(+1)
9	5(-1,68)	42(0)	50(0)
10	30(+1,68)	42(0)	50(0)
11	17,5(0)	25(-1,68)	50(0)
12	17,5(0)	60(+1,68)	50(0)
13	17,5(0)	42(0)	0(-1,68)
14	17,5(0)	42(0)	100(+1,68)
15	17,5(0)	42(0)	50(0)
16	17,5(0)	42(0)	50(0)
17	17,5(0)	42(0)	50(0)

O planejamento experimental e a análise dos resultados foram realizados utilizando-se o Software *Statistica 7.0*, avaliando-se como resposta o rendimento da extração (%), o teor de flavonoides e fenólicos totais, a capacidade antioxidante, a inibição da enzima acetilcolinesterase. Os dados gerados foram tratados pela ANOVA para identificar se as alterações nos parâmetros avaliados foram significativas ao nível de 95% de significância.

### 2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

#### **2.4.1 Extração assistida por micro-ondas focalizada**

Os experimentos foram realizados conforme o delineamento descrito na Tabela 1. A extração assistida por micro-ondas foi realizada colocando 3 g de amostra em 30 mL de solvente de extração num balão de fundo plano equipado com um sistema de condensação para reação no forno micro-ondas (REIS et al, 2015). Depois de cada reação, cada extrato foi filtrado utilizando papel filtro, e concentrou-se e armazenou-se sob refrigeração até posterior utilização.

#### **2.4.2 Extração assistida por ultrassom**

Os experimentos foram realizados conforme o delineamento descrito na Tabela 1. 4 g de amostra foi dissolvida em 40 mL de solvente de extração. Após a extração, as amostras foram retiradas do banho resfriadas e filtradas. Os extratos foram secos e armazenado sob refrigeração até posterior utilização.

### **2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

#### **2.5.1 Teor de fenólicos totais (FT)**

O teor de fenólicos totais foi determinado de acordo com a metodologia de Jarzycka e colaboradores (2013) com modificações. Foi preparada uma solução estoque a 100 µg/mL em metanol, onde 10 µL do extrato foi misturado a 50 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 em água) mais 40 µL do carbonato de sódio 7,5% (p/v). Após 8 minutos em ambiente escuro e em temperatura ambiente (25 °C), sua absorbância foi lida a 620 nm em leitora de microplacas. Para o branco foi utilizado todos os reagentes na mesma proporção, retirando-se o extrato a ser avaliado. A concentração de polifenóis foi mensurada a partir construção da curva de calibração de ácido gálico ( $R^2 = 0,989$ ) e os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG mg/g de extrato). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **2.5.2 Teor de flavonoides totais (FLT)**

O teor de flavonoides total foi realizado por espectrofotometria de acordo com o método descrito por Duarte-Almeida et al. (2006), com adaptações. Em microplacas de 96 poços foram colocadas em 50 µL de amostra e 50 µL de  $AlCl_3$ , deixou-se em repousar durante 30 minutos e, em seguida, a absorbância foi lida em leitora de microplacas a 405 nm. O conteúdo total de flavonoides foi determinado através da curva de calibração, construída com quercetina ( $R^2 = 0,985$ ), e os resultados expressos em mg de equivalente em quercetina por g de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 2.4.3 Determinação de antioxidante por DPPH

Para avaliar a atividade antioxidante do extrato de STF foi utilizado o método de capacidade de captura *in vitro* do radical livre DPPH (2,2, difenil-2-picrilhidrazil), de acordo com Brand-Williams et al. (1995) e Kim et al, 2012, com modificações. O comprimento de onda utilizado foi de 492 nm. Como padrões foi utilizado a rutina e o ácido ascórbico (AA).

A partir dos extratos obtido, foram preparadas diluições em diferentes concentrações. A cada poço adicionou-se 20 µL das amostras, em concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL para reagir com 80 µL da solução de DPPH. O branco foi feito usando 20 µL das concentrações das amostras citadas com 80 µL de metanol. A leitura foi efetuada depois de 10 minutos, mantendo-se a placa em um ambiente escuro à temperatura de 22°C. Todas as concentrações foram preparadas em triplicata. O controle negativo foi feito em três repetições, colocando-se 20 µL de metanol e 80 µL de DPPH, a leitura foi feita imediatamente. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A porcentagem de sequestro de radicais livres (%SRL) foi calculada de acordo com a equação abaixo, onde Ac é igual a absorbância do controle, Aa é a absorbância das amostras:

$$\text{Equação 1: \%SRL} = 100 \times [(Ac - Aa) / Ac]$$

### 2.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE

Avaliação da atividade da acetilcolinesterase foi realizada de acordo com Atta-Ur-Rahman et al. (2001), com modificações. Para a realização do teste os extratos foram diluídos em tampão de fosfato para se obter uma concentração de caldo de 100 mg/mL., em cada poço da microplaca (96 poços) foram adicionados: 140µL de tampão fosfato 0,1M contendo BSA (0,1%); 20µL das frações, controle positivo (eserina 50µM), controle negativo (etanol 10%) e branco (tampão fosfato 0,1 M); 20µL da enzima AChE. As placas foram homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 10µL de DTNB (10mM) e 10µL de ACTI (14mM). Foram obtidas as absorbâncias nos tempos 0 e 30 minutos após a adição do substrato, em leitor de microplacas à 405nm. Todas as amostras foram testadas em triplicata em cada experimento. O percentual da atividade enzimática foi calculado conforme as fórmulas descrita por Santos et al. (2012):

$$\text{Equação 2: \%A} = (T_{30} - T_0) \text{ amostra} \times 100 / (T_{30} - T_0) \text{ branco}$$

$$\text{Equação 3: \%I} = 100\% - \%A$$

Onde: %A é a porcentagem da atividade enzimática,  $T_0$  corresponde ao tempo logo após o início da reação,  $T_{30}$  corresponde ao tempo de 30 min após a primeira leitura, %I é a porcentagem de inibição.

## 2.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada segundo o método padrão NCLL (NCLL,2008) em microplacas de 96 poços dispostas em colunas 12 (1 a 12) e 8 linhas (A-H). As cepas utilizadas foram *S. aureus* (CCMB 285) e *Escherichia coli* (1110033 Fiocruz). Os extratos etanólico/hidroetanólico foram diluídos em DMSO em uma concentração de 2 mg/mL considerada a solução-padrão inicial. Para obter a concentração mínima inibidora da solução-padrão inicial foi realizada diluição em placas micro diluição com 96 cavidades dispostas em colunas 12 (1 a 12) e 8 linhas (A-H). Em cada uma das cavidades da linha A das placas de micro diluição, foram colocados 100  $\mu$ L de caldo de Mueller-Hinton duplamente concentrado nas demais linhas foram inserido 100 $\mu$ L de caldo Mueller-Hinton concentração simples. Em seguida, foi inserido 100  $\mu$ L da solução padrão para se obter a concentração inicial de 50% (1mg/mL) na primeira linha da placa subsequentemente foi realizada diluição seriada. A partir da concentração inicial de 50% (1 mg/mL - Linha A) a 0,078% (linha G) por transferência de 100  $\mu$ L do conteúdo para a linha subsequente. Nos poços da linha G, 100  $\mu$ L do conteúdo foi dispensado para corresponder ao volume total das outras cavidades. Depois inseridos 10  $\mu$ L da suspensão de microrganismos ( $1,5 \times 10^6$  UFC/ml) em cada poço, exceto na linha de controle de esterilidade do caldo. As placas foram incubadas na incubadora bacteriológica a 37°C durante 24 horas e submetidos a leitura em leitora de microplaca no comprimento de onda em 620 nm. A CIM corresponde a última diluição dos extratos em que não foram observadas a presença de crescimento de microrganismo.

## 2.7 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS POR CLAE-ESI-EM<sup>n</sup> DAS FRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO DOS STF

Os ensaios por espectrometria de massas com ionização por eletro spray foram efetuados pela central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP). Utilizando coluna C-18 (250x4.6 mm – 5 $\mu$ m), temperatura do forno de 40°C com fluxo de 1ml/min. Sua fase móvel foi composta por solução aquosa de H<sub>2</sub>O/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 0,1% e metanol, na forma de gradiente, conforme Tabela 2.

**Tabela 2** – Gradiente dos solventes utilizados para CLAE-ESI-EM<sup>n</sup>

TEMPO (MIN)	SOLVENTE	
	H <sub>2</sub> O/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1%	MeOH
0-19	75	25
20-24	0	100
25-35	75	25

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS FOCALIZADO VERSUS ULTRASSOM

O rendimento para cada conjunto de condições de extração é apresentado na Tabela 3. Os resultados mostram que o rendimento (%) de extração varia 11,67- 44,1 no EAMF e de 24.6 a 43.7 no EAU.

**Tabela 3** - Valores de rendimentos de extração (massa do extrato otimizado/massa da amostra x100).

Ensaio	Rendimento de extração (%)	
	EAMF	EAU
1	32,53±2.5	30.1±2.1
2	34,90±1.8	28.3±5.8
3	31,64±10	33.6±5.0
4	40,52±2.8	35.4±2.3
5	38,23±3.5	39.3±10.9
6	41,59±1.4	39.9±1.6
7	38,72±1.8	29.1±10
8	39,93±4.2	39.8±1.2
9	32,26±2.2	33.9±5.2
10	26,00±9.8	35.1±3.9
11	33,30±4.7	35.8±0.4
12	39,00±4.6	43.7±2.6
13	34,35±2.2	37.2±0.8
14	31,00±4.0	24.6±1.6
15	38,46±1.7	36.4±5.0
16	33,73±2.0	30.9±3.4
17	36,12±1,9	33,65±4,2

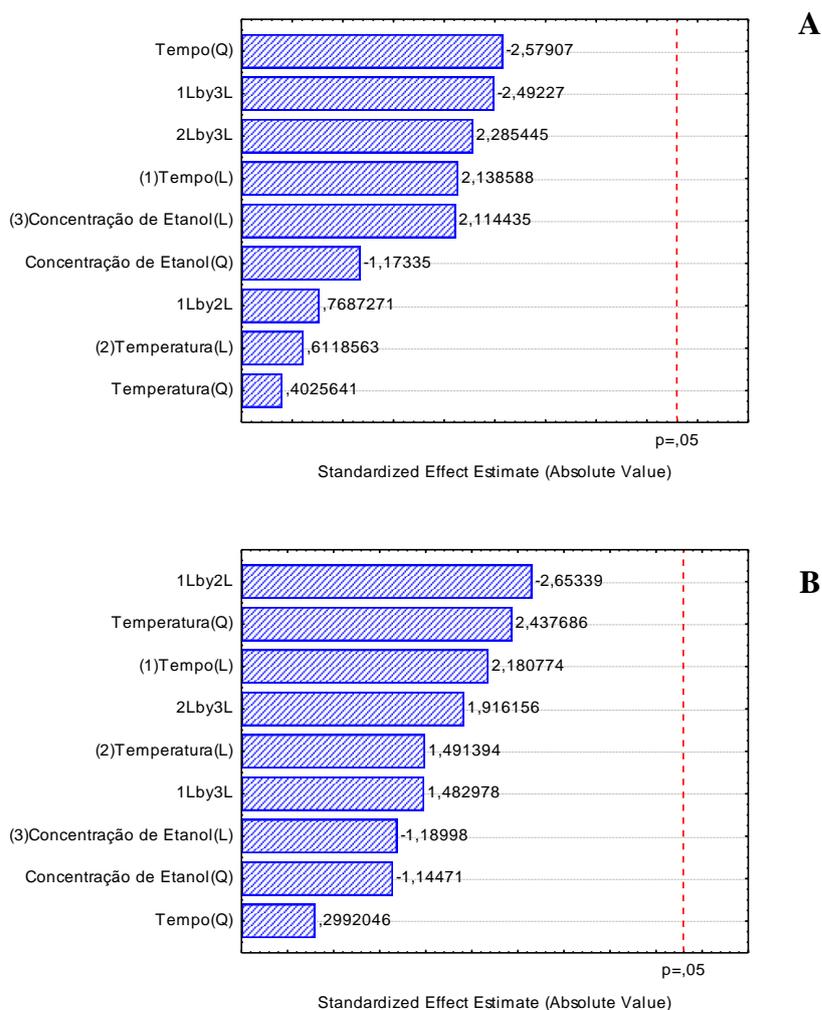
O teste de falta de ajuste através da ANOVA deu significativo ( $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ ), o que significa que os modelos de regressão não foram significativos (Tabela 4). A significância dos efeitos relacionados às variáveis estudadas foi avaliada através da ANOVA e para nenhum dos métodos de extração estudados foi percebido diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ ) dentro do domínio experimental estudado.

**Tabela 4:** ANOVA do rendimento para os métodos de extração estudado.

Método	Coefficiente de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Grau de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F <sub>calc</sub> *	F <sub>f. de ajuste</sub> **	R <sup>2</sup>
EAMF	Regressão	169,5	9	18,8	0,5	9,4	0,4
	Resíduo	275,5	7	39,4			
	Total (SS)	445,00	16				
EAU	Regressão	245,9	9	27,3	1,4	3,2	0,6
	Resíduo	132,8	7	19,0			
	Total (SS)	377,9	16				

\* F<sub>tab</sub> (9,7; 0,95) = 3,6 \*\* F<sub>tab</sub> (5,2; 0,95) = 19,30

Com relação aos efeitos estimados através dos gráficos de Pareto (Figura 2) nota-se que nenhum dos fatores dentro da faixa analisada, apresentaram significância estatística ( $p > 0,5$ ).



**Figura 2:** Principal efeito padronizado diagrama de Pareto do rendimento de extração no EAMF (A) e EAU (B), respectivamente. A linha vertical no gráfico indica uma confiança de 95%.

### 3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O conteúdo do FT, FLT e percentagem de sequestro de radicais livres (%SRL) são apresentados na Tabela 6.

O valor do FT variou de 412,1-5950,0 mgEAG/100g na EAMF e 92,2-897,3 mg EAG/100g na EAU. Já os valores de FLT ficou entre 83,6-1750,0 mgEQ/100g na EAMF e 547,1-677,2 mgEQ/100g na EAU. O melhor valor de FT foi 5950,0  $\pm$  1,4 mgEAG/100g e FLT no valor de 1750,0  $\pm$  3,2 mg EQ/100g, representado pelo tempo de extração de 25 minutos, 75% de etanol e 51 °C de temperatura, relacionado com EAMF 8. Os ensaios utilizando ultrassom em sua maioria apresentou menores níveis de compostos fenólicos e flavonoides, a melhor condição foi EAU 10 (FT) com 897,3  $\pm$  1,9 mg EAG/100g e EAU 12 (FLT) com 67,72  $\pm$  1,0 mgEQ/100g. Observa-se que as concentração de fenóis totais na EAMF nos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi são próximos de outras frutas como no caso da jabuticaba - polpa congelada 1405,79  $\pm$  35,97 mg de EAG/100g de amostra e polpa liofilizada 5198,11  $\pm$  410,92 mg de EAG/100g de amostra (REZENDE,2010) e do morangos polpa úmida que apresentou variação de 1586 mg catequina/100g -2892 mg catequina/100g (CORDENUNSI et al. 2002).

O resultado da EAU corrobora com os trabalhos de Oliveira, 2009, que demonstrou que não há nenhuma correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico de extratos de diferentes plantas.

Os modelos obtidos para as respostas avaliadas estão apresentados na Tabela 5, apenas com os termos estatisticamente significativos, obtidos através dos coeficientes de regressão.

**Tabela 5:** Equações do modelo e R<sup>2</sup> (coeficiente de determinação) para a as respostas FL e FLT nas condições de extração, X<sub>1</sub>= tempo, X<sub>2</sub>= temperatura, X<sub>3</sub>= concentração do solvente etanol.

Parâmetros	Equação	R <sup>2</sup>
	<b>EAMF</b>	
<b>FL</b>	$Y = 950,9 - 206,6 X_1 + 576,4 X_2 + 477,4 X_3 + 630,9 X_1^2 - 79 X_2^2 + 216,4 X_3^2 + 266,7 X_1 X_2 + 215,2 X_1 X_3 + 929,3 X_2 X_3$	57
<b>FLT</b>	$Y = 246,1 + 125,4 X_1 + 98,2 X_2 + 6,3 X_3 + 91,2 X_1^2 + 36,3 X_3^2 + 165,9 X_1 X_2 - 35,2 X_1 X_3 + 93,3 X_2 X_3$	70
	<b>EAU</b>	
<b>FL</b>	$Y = 128,2 + 85,3 X_1 - 39,1 X_2 + 23,3 X_3 + 131,6 X_1^2 + 50,5 X_2^2 + 92,7 X_3^2 - 25,3 X_1 X_2^2 - 163,1 X_1 X_3 - 35,0 X_2 X_3$	61
<b>FLT</b>	$Y = 58,5 + 2,2 X_2 + 1,9 X_1 X_3$	88

O coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) sugere um ajuste razoável para os fenólicos métodos de extração e bom para o teor de flavonoides de ambos.

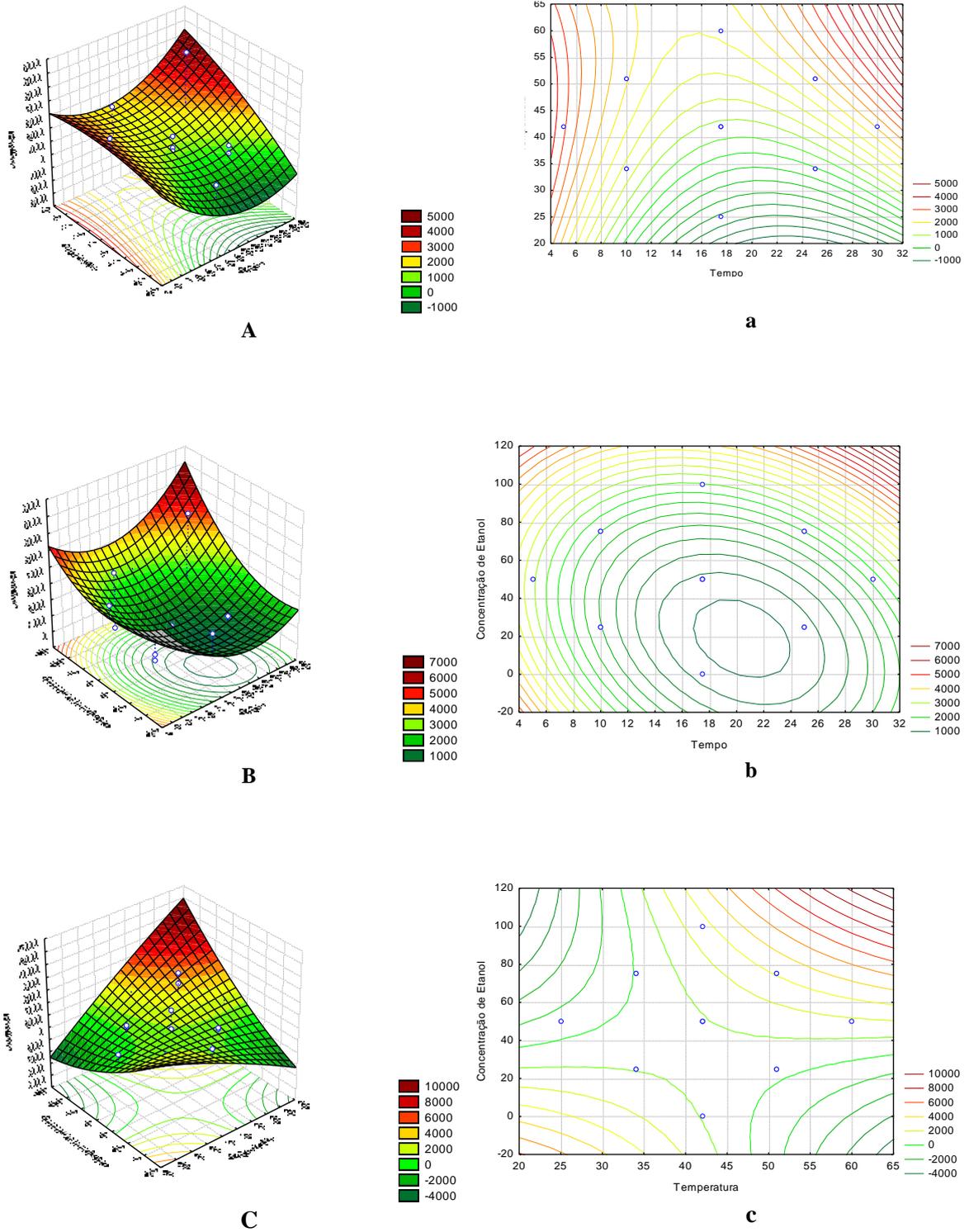
**Tabela 6** - Valores de fenólicos totais (FT), flavonoides totais (FLT) e sequestro de radicais livres (%SRL) dos extratos de etanol de frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi,

Ensaio	FT (mgEAG/100g de extrato)	FLT (mgEQ/100g de extrato)	% SRL
<b>EAMF</b>			
1	591,0 ± 5,0	340,5 ± 0,5	39,1 ± 3,3
2	887,8 ± 4,3	290,8 ± 2,0	45,3 ± 3,0
3	971,4 ± 3,0	164,5 ± 1,9	38,4 ± 1,9
4	4283,3 ± 5,7	525,2 ± 1,2	40,7 ± 0,9
5	434,8 ± 1,9	361,8 ± 2,6	21,3 ± 0,6
6	1041,0 ± 2,5	217,1 ± 0,3	50,1 ± 1,8
7	1225,5 ± 0,9	889,1 ± 0,1	47,2 ± 0,1
8	5950,0 ± 1,4	1750,0 ± 3,2	87,2 ± 0,1
9	3817,5 ± 1,7	209,5 ± 1,1	32,3 ± 2,9
10	934,1 ± 4,3	470,7 ± 4,9	34,5 ± 2,0
11	436,8 ± 5,5	151,1 ± 0,5	27,2 ± 0,0
12	412,1 ± 5,6	187,3 ± 0,6	40,5 ± 1,1
13	2013,2 ± 2,0	350,0 ± 3,4	30,7 ± 0,0
14	1143,9 ± 1,6	207,9 ± 0,8	28,0 ± 3,4
15	805,6 ± 4,5	192,1 ± 0,8	21,1 ± 1,7
16	591,0 ± 2,1	200,7 ± 1,9	20,2 ± 1,7
17	832,66 ± 3,3	196,38 ± 0,5	20,6 ± 1,7
<b>EAU</b>			
1	113,4 ± 0,8	54,71 ± 0,3	27,3 ± 0,1
2	573,2 ± 5,0	55,31 ± 0,2	26,5 ± 5,2
3	237,7 ± 2,9	59,67 ± 0,6	29,5 ± 4,5
4	731,7 ± 8,3	57,28 ± 0,1	32,4 ± 4,5
5	350,3 ± 2,5	55,27 ± 0,2	31,8 ± 5,2
6	344,2 ± 4,1	59,04 ± 0,5	25,2 ± 4,9
7	584,1 ± 5,1	56,32 ± 0,4	20,4 ± 3,0
8	239,0 ± 0,7	66,16 ± 0,3	24,5 ± 1,2
9	113,4 ± 0,1	56,96 ± 0,2	20,5 ± 5,3
10	897,3 ± 1,9	57,98 ± 0,5	26,4 ± 3,6
11	603,9 ± 4,7	57,47 ± 0,2	27,6 ± 6,8
12	92,2 ± 0,8	67,72 ± 1,0	31,3 ± 0,9
13	561,3 ± 4,7	56,56 ± 0,7	21,0 ± 6,7
14	454,3 ± 2,7	59,11 ± 0,4	29,5 ± 6,4
15	126,6 ± 1,6	57,61 ± 0,1	26,4 ± 2,9
16	139,9 ± 0,1	59,59 ± 0,2	27,8 ± 2,4
17	133,26 ± 0,8	58,60 ± 0,0	27,1 ± 2,6
<b>Padrões</b>	<b>Ácido Ascórbico</b>		73,7 ± 0,39
	<b>Rutina</b>		66,3 ± 0,34

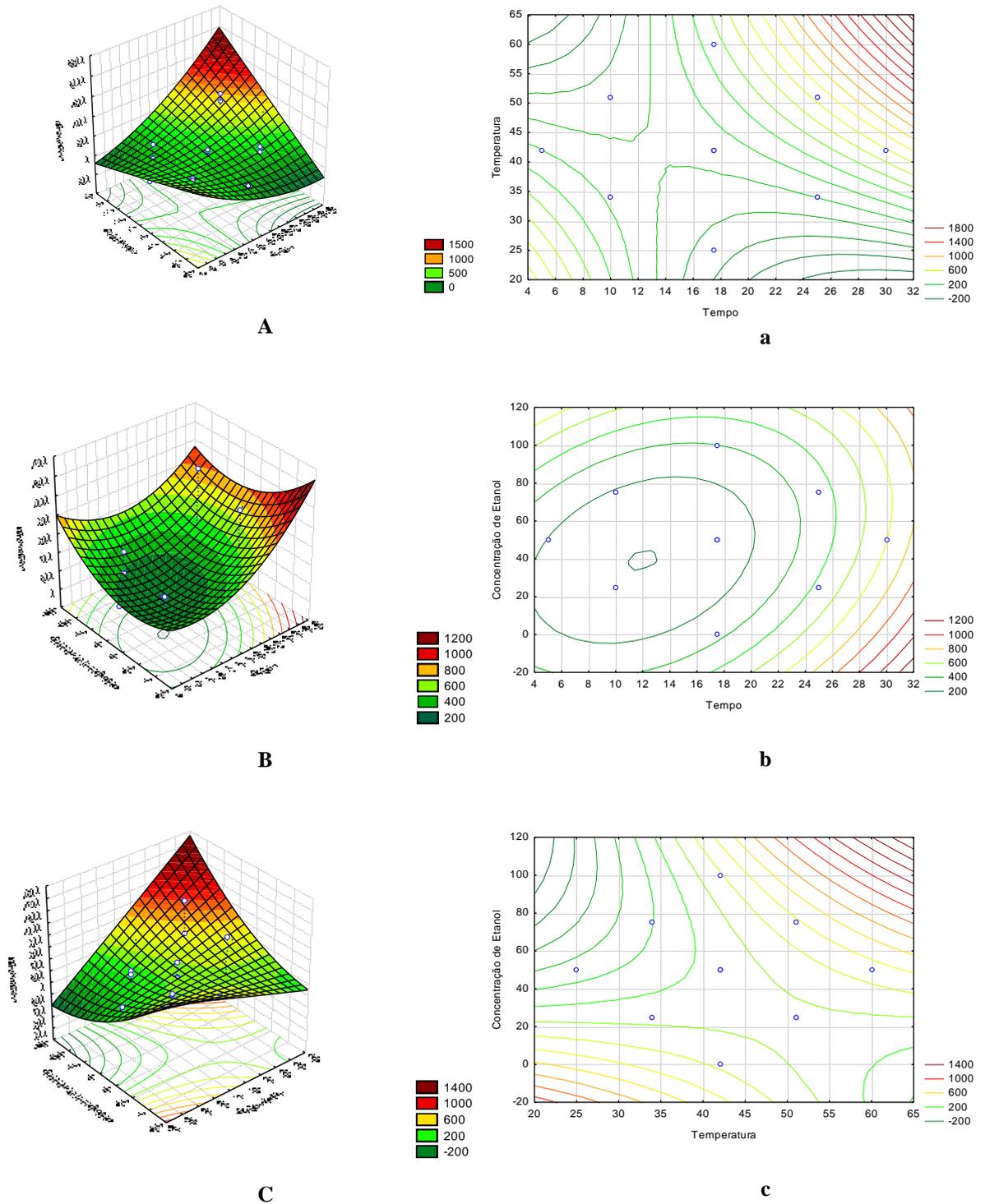
A superfície de resposta gráfica e seus respectivos gráficos de contorno não p mostrados nas Figuras 3 e 8. Duas variáveis experimentais são descritas em porções de superfície em 3D, enquanto a outra variável é mantida constante. As formas das curvas de nível, circulares ou elípticas indica as interações mútuas entre as variáveis foram significativas ou não.

No geral, a análise estatística apoiou o bom ajuste dos valores experimentais e previstos e disponibilidade deste modelo polinomial para uma melhor otimização, tomados em conjunto, a análise de superfície de resposta, assim como a análise estatística mostrou que o teor de polifenóis foi significativamente influenciado pelo aumento da concentração de etanol e temperatura, ao passo que foi observado um efeito relativamente pequeno sobre o tempo de extração.

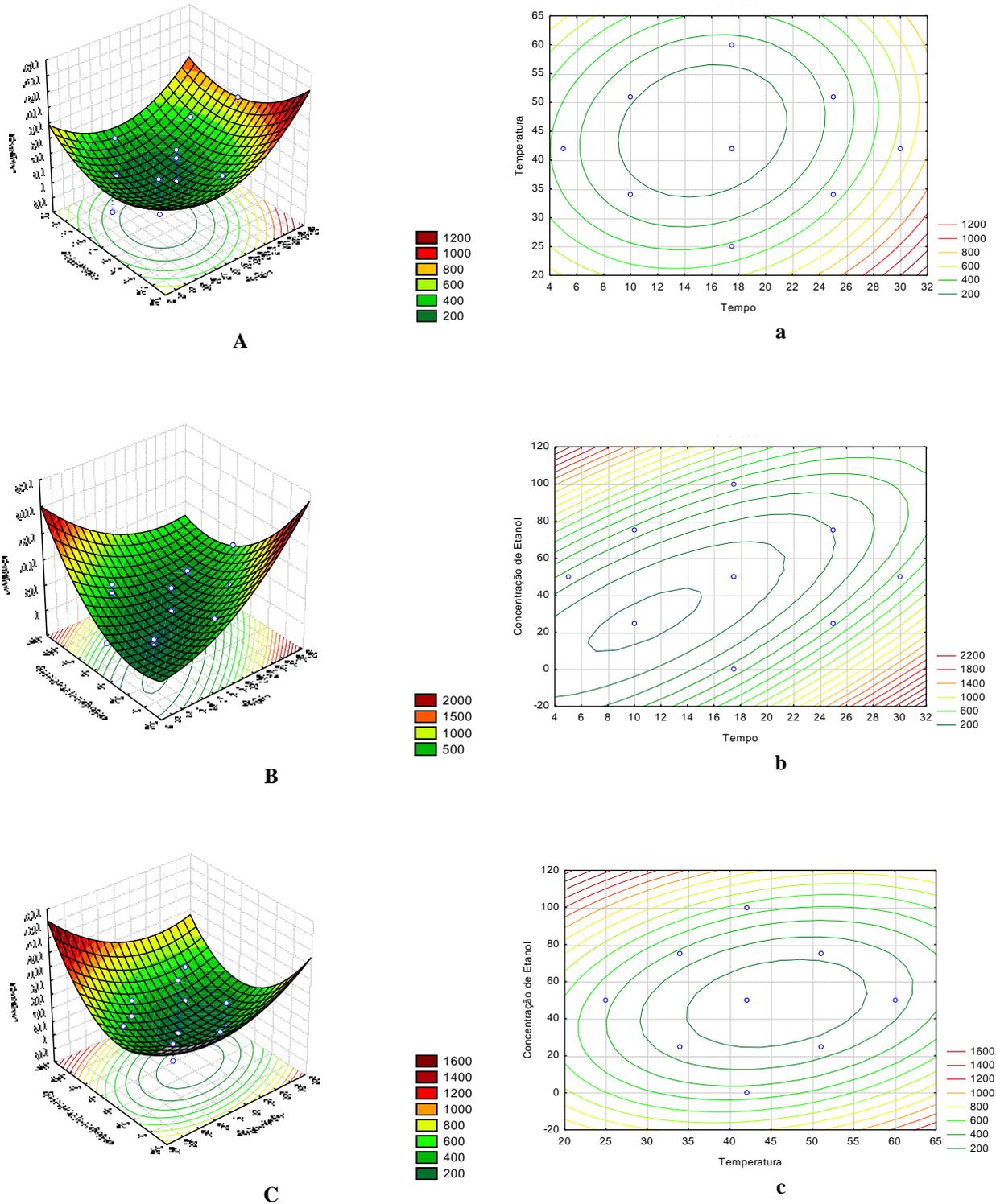
Comparando EAMF 13 (100% de água) e EAMF 14 (100% etanol), observou-se que a presença de etanol é importante na extração de compostos fenólicos, quando comparado com água. Para o EAMF 13 e EAMF 14 os valores de FT são: 2013,2 mgEAG/100g e 1143,9 mgEAG/100g, respectivamente. Quando se analisa os valores de FLT observamos que a presença de etanol favorece uma redução de  $350 \pm 3,4$  mgEQ/100g (EAMF 13) para  $207,9 \pm 0,8$  mg EQ/100g (EAMF 14). Comparando-se os ensaios EAU 13 (100% de água) e EAU 14 (100% etanol) a presença de etanol reduz o teor de fenólicos de  $561,3 \pm 4,7$  mg EAG/100g para  $454,3 \pm$  mgEAG/100g, respectivamente. Em relação ao teor de flavonoides a presença doo etanol não influenciou já que EAU 13 apresentou o valor de  $56,56 \pm 0,7$  mg EQ/100g enquanto que EAU 14  $59,11 \pm 0,4$  mg EAU 14 EQ/100g.



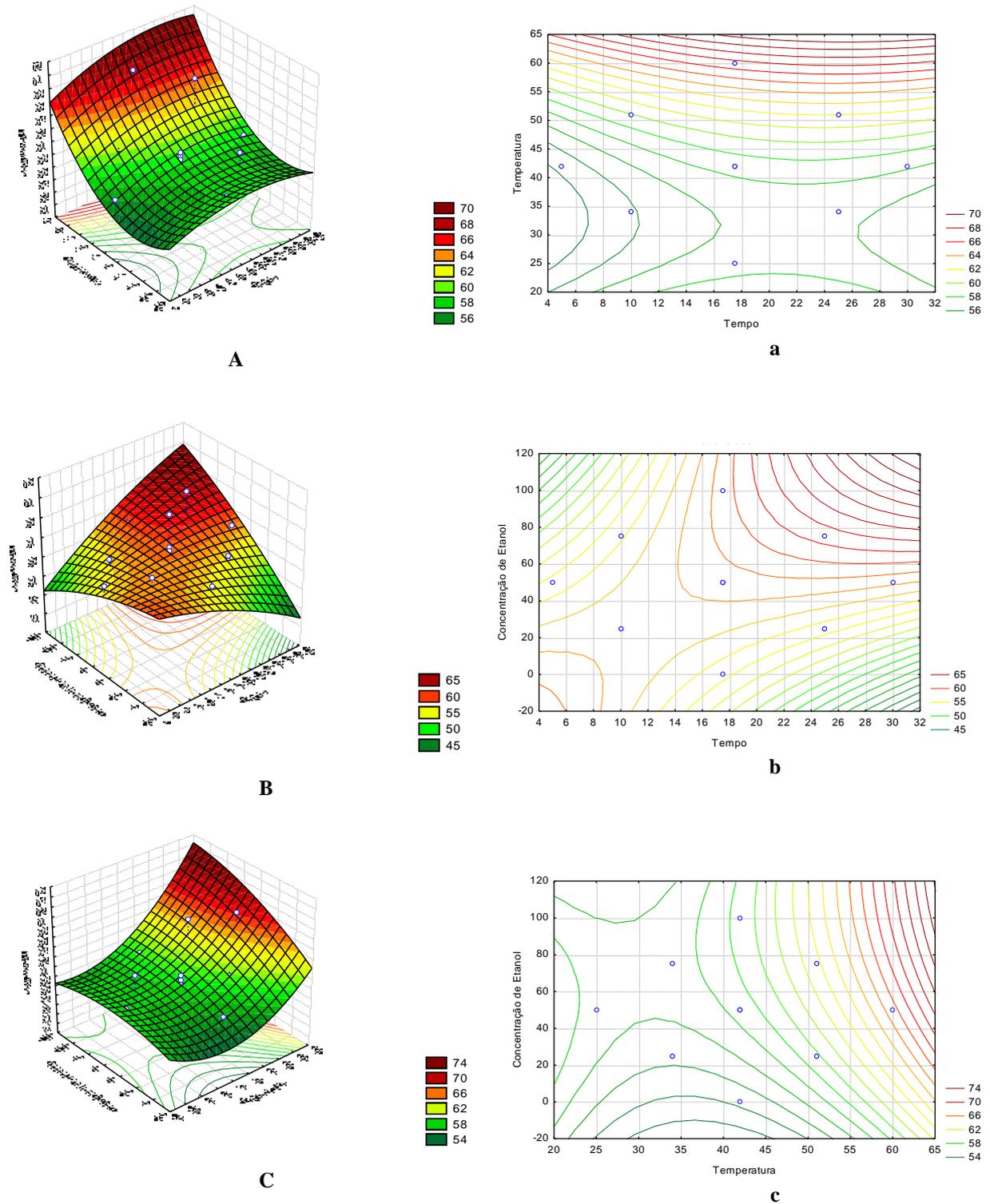
**Figura 3:** Superfície de Resposta e gráficos de contornos dos fenólicos totais dos extratos etanolico de *Schinus terebinthifolius Raddi* utilizando EAMF em função da temperatura e tempo (A, a), da concentração de etanol e tempo (B, b) e da concentração de etanol e temperatura.



**Figura 4:** Superfície de Resposta e gráficos de contornos dos flavonoides totais dos extratos etanolico de *Schinus terebinthifolius Raddi* utilizando EAMF em função da temperatura e tempo (A, a), da concentração de etanol e tempo (B, b) e da concentração de etanol e temperatura.



**Figura 5:** Superfície de Resposta e gráficos de contornos dos fenólicos totais dos extratos etanolico de *Schinus terebinthifolius Raddi* utilizando EAU em função da temperatura e tempo (A, a), da concentração de etanol e tempo (B, b) e da concentração de etanol e temperatura.



**Figura 6:** Superfície de Resposta e gráficos de contornos dos flavonoides totais dos extratos etanólico de *Schinus terebinthifolius Raddi* utilizando EAU em função da temperatura e tempo (A, a), da concentração de etanol e tempo (B, b) e da concentração de etanol e temperatura.

Quando se compara os valores percentuais de sequestro de radicais livres (% SRL) dos extratos com os padrões, pode-se ver que os extratos por micro-ondas focalizado mostrou forte atividade antioxidante, com a percentagem de sequestro de radicais de DPPH acima de 50% para uma concentração de 100 µg/ml. Já no ultrassom, os extratos apresentaram valores abaixo de 50%, com baixa porcentagem de sequestro de radicais livres.

O melhor valor da % SRL encontra-se no ensaio EAMF 8 com  $87,3 \pm 0,33\%$ , este ensaio apresentou valor maior que os padrões de ácido ascórbico (AA) e rutina que em média tiveram os valores de  $73,7\% \pm 0,39$  e  $66,3\% \pm 0,34$ , respectivamente. Esse mesmo ensaio apresentou valor de EC<sub>50</sub> de  $\pm 40$  µg/ml valor próximo ao encontrado para os padrões que foram: 45,1 µg/ml (AA) e 41,5 µg/ml (rutina). Para os demais ensaios não foi possível determinar o valor de EC<sub>50</sub> nas condições usadas neste estudo.

Entre as condições estudadas, o tempo de 17,5 min, concentração de solvente de 50% de etanol e 42 °C (EAMF 15) mostrou o menor %SRL, indicando que um tempo maior de extração, uma temperatura mais elevada e uma maior concentração de solvente resulta em um melhor resultado em comparação com EAMF 8 (25 min, 51 °C e 75% de etanol),

A alta atividade antioxidante e a significativa concentração de compostos fenólicos e flavonoides totais nas amostras indicam que possivelmente esses compostos são os responsáveis pela %SRL, O interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado muito, devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais são prejudiciais à saúde humana,

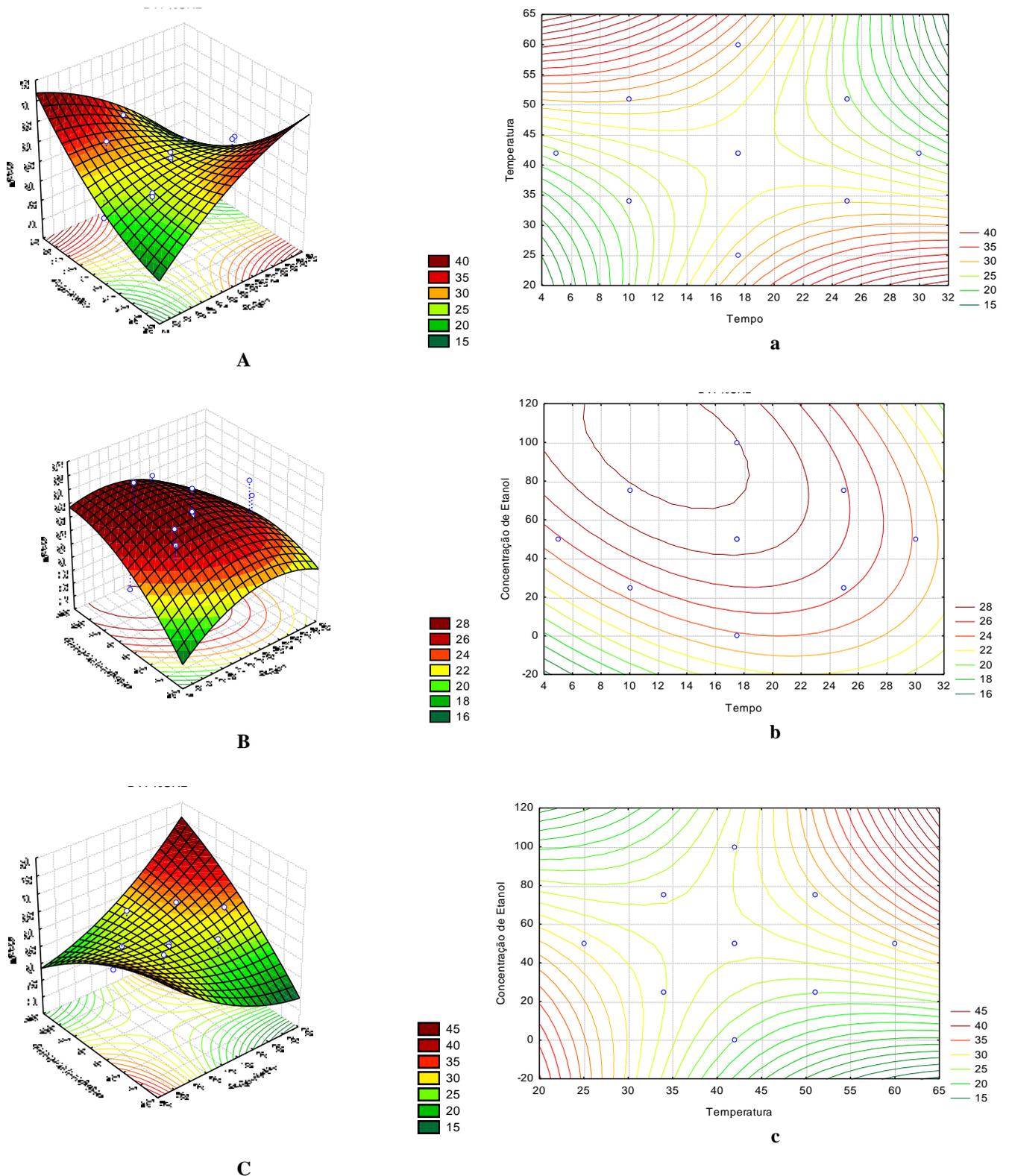
Chiari et al, (2012), afirmam que “existe a conexão entre essas grandezas, pois quanto maior a concentração de compostos fitoquímicos, maior a atividade antioxidante natural”, contudo, Melo et al, (2008) destaca que a capacidade antioxidante não pode ser esclarecida com base nos teores de fenólicos e flavonoides, pois a estrutura do composto ativo pode influenciar na eficácia da capacidade antirradicalar, porque, quanto maior a quantidade de grupos hidroxilas e suas posições na molécula, maior essa ação.

Os modelos obtidos para as respostas avaliadas estão apresentados apenas com os termos estatisticamente significativos, obtidos através dos coeficientes de regressão:

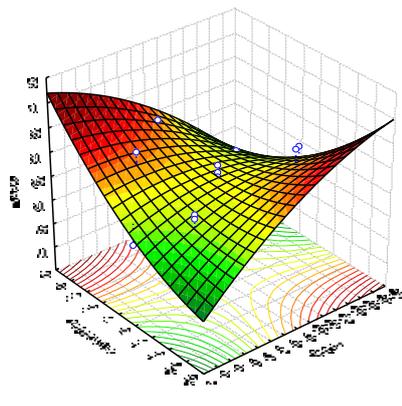
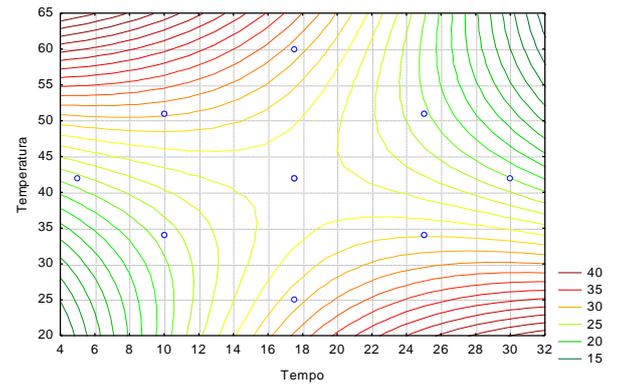
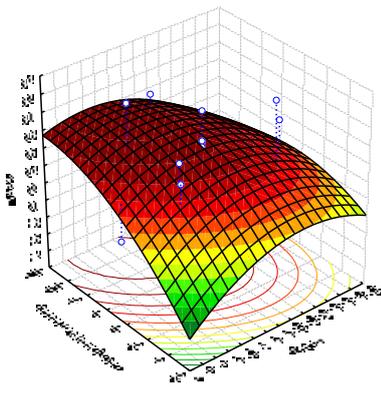
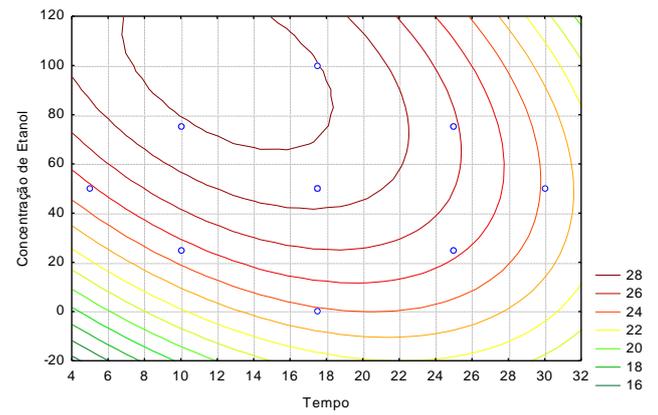
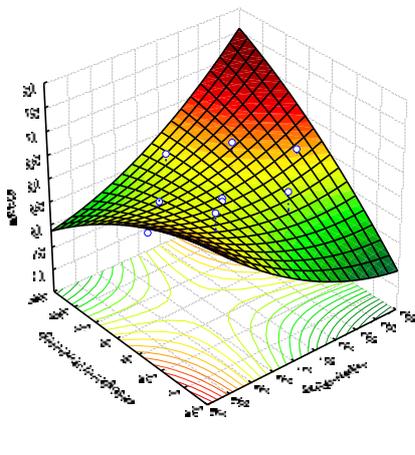
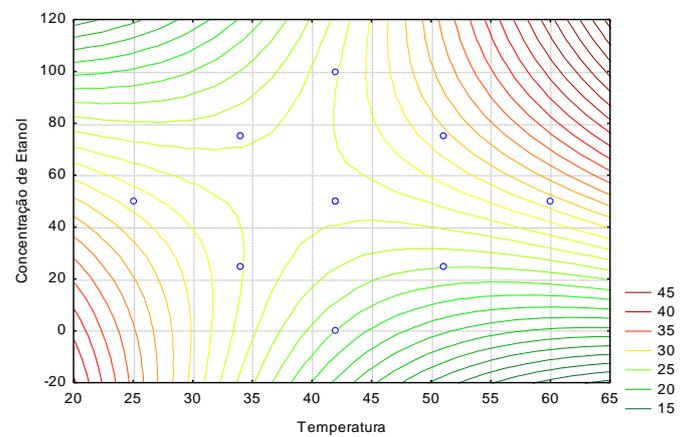
$$\text{EAMF: } Y = 24 + 3,6X_1 + 5,3 X_2 + 4,5 X_3 + 7,4 X_1^2 + 4 X_2^2 + 3,3 X_3^2 + 8,6 X_1X_2 + 7,5X_1X_3 + 1,2 X_2X_3 \quad (R^2 = 64\%)$$

$$\text{EAU: } Y = 27,4 + 1,1 X_3 - 1,1X_1^2 + 4 X_2^2 - 2,6 X_1X_2 + 1,7 X_2X_3 \quad (R^2 = 63\%)$$

A porcentagem de variação explicada pelo modelo matemático é de 64% para EAMF e 63% para EAU.



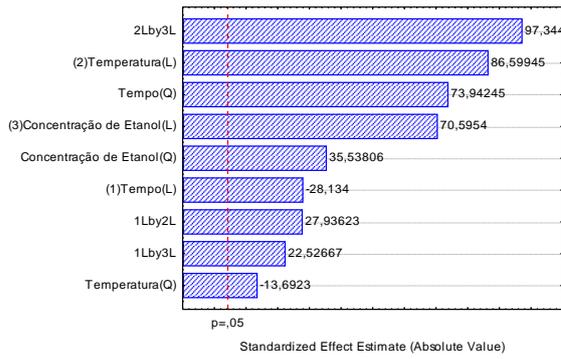
**Figura 7:** Superfície de Resposta e gráficos de contornos %SRL dos extratos etanólico de *Schinus terebinthifolius Raddi* utilizando EAMF em função da temperatura e tempo (A, a), da concentração de etanol e tempo (B, b) e da concentração de etanol e temperatura.

**A****a****B****b****C****c**

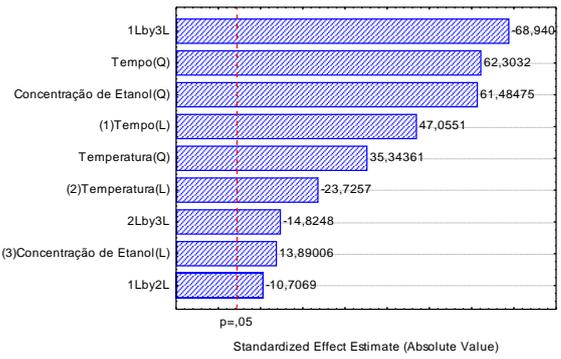
**Figura 8:** Superfície de Resposta e gráficos de contornos %SRL dos extratos etanólico de *Schinus terebinthifolius Raddi* utilizando EAU em função da temperatura e tempo (A, a), da concentração de etanol e tempo (B, b) e da concentração de etanol e temperatura.

Analisando os efeitos estimados para as respostas teor de fenólicos totais e flavonoides totais (Figura 9), para o teor de fenólicos totais (FT) na EAMF todos os efeitos afetaram significativamente dentro da faixa estudada, em relação aos flavonoides totais (FLT) somente o termo quadrático da temperatura não afetaram significativamente dentro da faixa estudada, com relação a atividade antioxidante (% SRL) todos os efeitos foram significativos.

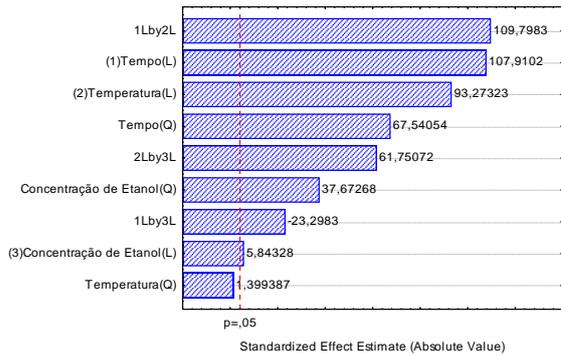
Nos extratos obtidos pelo ultrassom, para o teor de fenólicos totais (FT) F todos os efeitos afetaram significativamente dentro da faixa estudada, em relação aos flavonoides totais (FLT) somente o termo linear da temperatura e a interação entre o tempo e a concentração de etanol afetaram significativamente dentro da faixa estudada, com relação a atividade antioxidante (% SRL) todos os efeitos foram significativos.



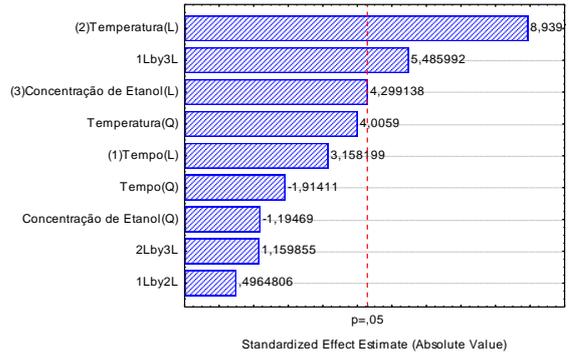
A – Gráfico de Pareto dos FT na EAMF



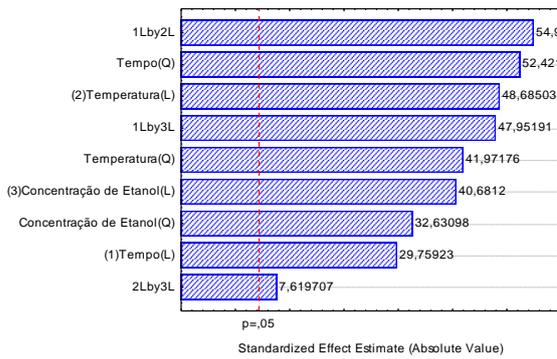
B - Gráfico de Pareto dos FT na EAU



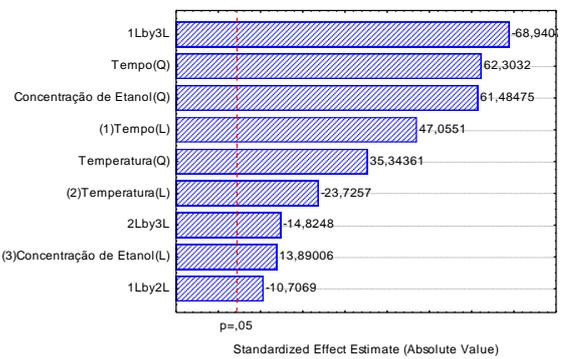
C - Gráfico de Pareto dos FLT na EAMF



D - Gráfico de Pareto dos FLT na EAU



E - Gráfico de Pareto %SRL EAMF



F- Gráfico de Pareto %SRL na EAU

**Figura 9:** Principal efeito padronizado diagrama de Pareto do FT, FLT e %SRL dos métodos de extração estudados, A linha vertical no gráfico indica uma confiança de 95%,

### 3,3 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Todos os extratos obtidos pelos dois métodos de extração (micro-ondas focalizada e ultrassom) foram testados na atividade de inibição da acetilcolinesterase, Os dados mostraram que nem todos os extratos foram capazes de influenciar na atividade enzimática da acetilcolinesterase de forma importante na concentração de 1mg/ml, Os valores de porcentagem de inibição variaram entre 0 a 76 % nos extratos obtidos pelo ultrassom e entre 0 a 54% nos extratos obtidos pelo micro-ondas focalizado, conforme observa-se na Tabela 7.

**Tabela 7** - Valores da inibição da acetilcolinesterase (%Inibição ACHE) dos extratos de etanol de frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Ensaio	Inibição da AChE (%)	
	EAMF	EAU
1	54,84±1,92	60,38±2,99
2	42,85±2,18	33,54±3,88
3	38,35±2,49	7,81±2,02
4	50,51±3,55	Não Inibiu
5	42,53±1,92	Não Inibiu
6	48,65±0,63	57,70±1,92
7	37,50±1,64	71,48±5,31
8	Não Inibiu	62,18±1,26
9	54,57±2,99	65,57±1,66
10	46,92±0,60	40,57±5,00
11	13,27±1,94	50,00±5,07
12	52,34±2,21	76,69±2,62
13	45,95±1,78	48,59±1,99
14	36,32±1,38	38,32±2,65
15	49,18±4,40	45,96±2,86
16	46,92±1,46	42,45±1,81
<b>Padrão</b>	Eserina	95,3

Eldeen et al, (2005) consideram, para testes com extratos, atividade anticolinesterásica moderadas inibições menores que 60%. Vinutha e colaboradores (2007) classificam a inibição da atividade acetilcolinesterásica como potente quanto a inibição for maior que 50%, moderada quando a inibição for de 30-50% e baixa quando a inibição for menor que 30%. Para este trabalho, os extratos foram considerados ativos quando a inibição da atividade

acetilcolinesterásica foi maior que 50%. Assim sendo os extratos mais ativos foram: EAMF 1 e EAMF 9 e os EAU 12 e EAU 7.

Estudos sobre o uso do STF são escassos em literatura, poucos artigos relatam sua composição fitoquímica, tornando difícil inferir que composto (s) são responsável (eis) pela sua atividade anticolinesterásica.

Em estudos com sálvia (*Salvia* sp), erva cidreira (*Melissa officinalis*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) apontam os terpenos como os principais integrantes do potencial para o aprimoramento cognitivo e/ou atividade anticolinesterásica (AHMED et al., 2013; MURRAY et al., 2013). Pesquisas recentes têm demonstrado que diversos compostos pertencentes a este grupo têm capacidade de exercer tanto forte como moderada atividade anticolinesterásica (MURRAY et al., 2013),

Nos extratos de STF além dos terpenos, outros fitoquímicos presentes podem ser responsáveis pelo efeito inibitório da atividade da AChE. Compostos fenólicos, flavonoides esteróis também são reconhecidos como agentes promissores no combate a DA ao possuírem atividade anticolinesterásica (HOUGHTON; REN; MURRAY et al., 2013; WILLIAMS; SORRIBAS; HOWES,2011).

#### 3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos testados sobre as cepas de *S. aureus* e *E. Coli* estão apresentados na Tabela 8. Foi realizado um controle positivo (Clorexidina 30 µg/ml) que não apresentou crescimento. Analisando os dados obtidos verifica-se que a *E. Coli* se mostrou o mais susceptível das duas bactérias estudadas frente a todos os extratos estudados.

Os resultados apontam os extratos do micro-ondas focalizada como os mais efetivos sobre *S. aureus* e *E. coli*. Em relação a *E. coli*. observa-se que o extrato EAMF 3 foi mais eficiente e para o *S. aureus* foi o extrato EAMF 15.

**Tabela 8** - Valores da concentração inibitória mínima (CIM- mg/mL) dos extratos de etanol de frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi para os micro-organismos testados

Micro-organismo	Ensaio	CIM (mg/mL)	
		EAMF	EAU
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0,5	0,25
	2	0,13	N
	3	0,5	N
	4	1	0,25
	5	N	1
	6	0,25	N
	7	0,5	N
	8	0,25	1
	9	1	N
	10	0,5	1
	11	1	1
	12	0,25	0,5
	13	0,5	0,5
	14	N	0,25
	15	0,06	N
	16	0,5	0,5
<i>Escherichia coli</i>	1	0,25	0,5
	2	0,25	0,25
	3	0,13	0,25
	4	0,5	0,5
	5	0,5	1
	6	N	0,5
	7	0,25	0,25
	8	0,5	0,5
	9	0,25	0,5
	10	0,25	0,25
	11	0,5	0,25
	12	0,25	0,5
	13	1	0,5
	14	0,5	1
	15	1	1
	16	0,25	0,25

A sensibilidade das bactérias pode também estar relacionada à presença de taninos, que são compostos fenólicos que precipitam proteínas, propiciando um efeito antimicrobiano (SIMÕES, 2007).

Dados da literatura confirmam a atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir de *Schinus terebinthifolius*. Degáspari, et al (2005) analisou a atividade antimicrobiana de extratos, tanto o aquoso quanto o alcoólico, obtidos a partir dos frutos de aroeira e verificaram que o extrato alcoólico apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *S. aureus* (ATCC 6538) e de *Bacillus cereus* (ATCC 11778), contudo, o extrato aquoso, não apresentou efeito inibitório sob o crescimento dos micro-organismos testados.

Estudos têm demonstrado que *S. aureus* também apresentou sensibilidade ao extrato etanólico de folhas e casca do caule de *S. terebinthifolius* Raddi (MARTINEZ GUERRA et al., 2000; LIMA et al 2006).

Lima et al. (2006), verificaram a atividade do extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* Raddi contra *S. aureus* e outras bactérias e fungos, encontrando atividade inibitória de crescimento desses microrganismos. Os autores inferem que esta atividade antibacteriana e antifúngica pode estar associada à presença de certos compostos químicos, em especial de taninos, além de compostos presentes em menor quantidade, como os alcaloides, esteroides e chalconas.

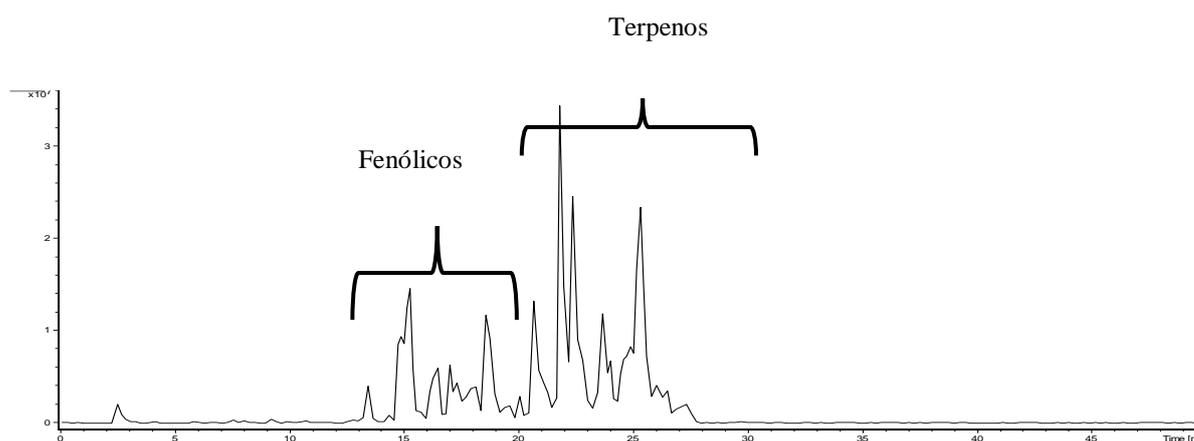
### 3.5 ANÁLISE POR CLAE-ESI-EM<sup>n</sup> DO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi,

A Figura 10 mostra o cromatograma por LC-MS<sup>n</sup> do extrato etanólico do STF. Os cromatogramas de íons totais dos extratos etanólicos das frutas revelaram a presença de compostos de média (10-25 minutos) e baixa (25-40 minutos) polaridade. Segundo Leite et al., 2012, os compostos de alta polaridade estão relacionados com a presença de possíveis alcaloides, de média polaridade sinaliza a presença de possíveis flavonoides e de baixa indica a possibilidade de triterpenos. As análises por LC-MS<sup>n</sup> do extrato revelaram a presença de duas regiões: uma região dos compostos fenólicos e outra de terpenos. O cromatograma de íons totais do extrato do fruto de *Schinus terebinthifolius* apresentou onze picos majoritários (Tabela 9). Sendo que a maioria se encontrou na região dos terpenos.

Na região dos fenólicos temos o composto 1 ( $t_R$ : 14,9 min) que apresentou o íon pseudo-molecular em  $m/z$  539  $[M+H]^+$ , O espectro MS<sup>2</sup> gerou os fragmentos em  $m/z$  419  $[M-120+H]^+$ , 403  $[M-136+H]^+$ , 377  $[M-162+H]^+$ . Esse perfil de fragmentação corresponde ao biflavonoide Agathisflavona (FEUEREISEN et al., 2014). O composto 2 ( $t_R$ : 15,3 min) apresentou íon pseudo molecular em  $m/z$  543  $[M+3H]^+$  e o espectro MS<sup>2</sup> íons em  $m/z$  423  $[M-120+H]^+$  e 297  $[M-246+H]^+$ , sugere-se que seja um derivado do biflavonoide I3',II8-binaringenin, ( $m/z$  543) previamente descrito em *Schinus terebinthifolius* Raddi (FEUEREISEN et al., 2017). O espectro de massas total do composto 3 ( $t_R$ : 16,5 min) apresentou íon pseudo molecular em  $m/z$  539  $[M+H]^+$  demonstrando ser um isômero do composto 1. Segundo Feuereisen et al. (2014) os isômeros Agathisflavona e Amentoflavona foram encontrados no exocarpo de *Schinus terebinthifolius* Raddi, sendo diferenciados pelos seus respectivos espectros de UV e tempos de retenção, a Agathisflavona com tempo de retenção inferior a Amentoflavona. Assim, sugere-se que o composto 3 seja o biflavonoide Amentoflavona.

Na região dos terpenos pode-se observar a presença de triterpenos pentacíclicos como os compostos 7-11 com  $t_R$ : 20, 21,8, 23,7 e 25,3 min sugere-se que possam ser isômeros do ácido masticadienoico já descrito em espécies de *Schinus*. Os compostos 4-6 não foram possíveis de serem identificados, no presente estudo. Os espectros de massa destas análises estão dispostos no Apêndice 2.

Esses resultados vêm ratificar os resultados das atividades biológicas estudadas no presente trabalho. Necessário se faz mais estudos para maiores esclarecimentos bem como quantificações dessas substâncias entres os extratos estudados.



**Figura 10:** Cromatograma obtido por CLAE-ESI-EM<sup>n</sup> do extrato etanólico dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi

**Tabela 9-** Atribuição de pico, tempo de retenção ( $t_R$ ), obtidos pela espectrometria de massa dos compostos detectados no extrato dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Pico	$t_R$ (min)	[M+H]	MS <sup>n</sup>	Composto	Ref,
1	14,9	539	MS <sup>2</sup> [539,0]: 419; 403; 377	Agathisflavona	FEUEREISEN et al., 2014,
2	15,3	543	MS <sup>2</sup> [543]: 423; 297	13',II8-binaringenin	FEUEREISEN et al., 2017,
3	16,5	539	-	Amentoflavona	FEUEREISEN et al., 2014,
4	17	561	MS <sup>2</sup> [561]: 515; 383; 341; 323; 305; 287	Não identificado	
5	18,6	565	MS <sup>2</sup> [565,0]: 547; 521; 375; 363; 343; 325; 307	Não identificado	
6	18,6	469	MS <sup>2</sup> [469]: 451; 439; 421,405,393,363,327,159	Não identificado	
7	20	467	MS <sup>2</sup> [467,0]: 449; 439; 431; 421; 325	Isômeros do ácido masticadienoico	CHEN Q, et al, 2011,
8	21,8	453,3	MS <sup>2</sup> [453,3]: 435; 417; 311	Isômeros do ácido masticadienoico	
9	22,4	471,1	MS <sup>2</sup> [471,0]: 453; 435; 407; 347;313;280;262;161;142	Isômeros do ácido masticadienoico	
10	23,7	455,1	MS <sup>2</sup> [932,8]: 477,1; 433 MS <sup>2</sup> [477]: 477; 460; 433; 270	Isômeros do ácido masticadienoico	
11	25,3	455	MS <sup>2</sup> [932,8]: 477,1; 433 MS <sup>2</sup> [455]: 437; 419; 363,2; 201; 173; 159,2	Isômeros do ácido masticadienoico	

#### 4 CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados podemos inferir que a EAMF é adequada como um procedimento de extração rápido e eficiente. Em relação ao rendimento os métodos utilizados (EAMF e EAU) não apresentaram diferença estatística. A temperatura de 51°C, a composição do solvente de 75% etanol e o tempo de extração de 25 min resultaram em uma maior % de SRL (87,2%). Os ensaios obtidos pela EAMF apresentaram melhores teores de fenólicos e flavonoides que os ensaios obtidos pela EAU. Os extratos de STF têm potencial para controlar os patógenos estudado, de ambos métodos. Os extratos obtidos por ultrassom assistido apresentaram inibição potente da acetilcolinesterase (76,69%).

Os frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi podem ser considerados como uma fonte potencial de antioxidantes, com atividade antimicrobiana e alta inibição da acetilcolinesterase, podendo serem utilizados em diversos campos, como nutracêuticos, cosméticos e indústria alimentar.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, H. H. et al. Possible therapeutic uses of *Salvia triloba* and *Piper nigrum* in Alzheimer's disease-induced rats. *Journal of Medicinal Food*, v.16 (5) p.437- 446, 2013.
- ATTA-UR-RAHMAN, et al, Acetyl and butyrylcholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus papillosa*, *Phytochemistry*, v.58, p. 963-968, 2001.
- BANDES, A cultura da aroeira em São Mateus e arredores: um pioneirismo que o Bandes deve apoiar. Estudos Bandes. Banco de Desenvolvimento do Espírito Santo, Vitória: Bandes, 39p. 2008.
- BARBOSA, L, C, A, et al, Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Química Nova*, v. 30 (8), p.1959-1965, 2007.
- BENAVENTE-GARCIA, O, et al, Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry* n. 68 p.457-462, 2000.
- BERTOLDI, M. C. *Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleoresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (Schinus terebinthifolius Raddi)*, Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV). 96p. 2006.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *L. W. T.* n. 28 (1), p. 25-30, 1995.
- CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 15(1), 158–169, 2003.
- CHEN, Q. et al. Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry, *Biomedical Chromatography : BMC*,v . 25 (12), p.1381–8, 2011.
- CHIARI, B. G. et al. Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava* L. fruits. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.4 (supl.5), p 331-336. 2012.
- CORDENUNSI, B. R. et al. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50(9), p. 2581-2586, 2002.
- DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N., PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciência e Agrotecnologia*, v.29(3), p.617–622, 2005.
- DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N., SANTOS, R. J. Atividade Antioxidante de Extrato de Fruto de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Visão Acadêmica, Curitiba*, v. 5(2), p. 83-90, 2004.

- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. *Cienc. Tecnol. Aliment*, v.26, p.446-452, 2006.
- ELDEEN, S. M. I.; ELGORASHI, E. E.; STADEN, J. Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 102, p. 457–464, 2005.
- FEUEREISEN, M. M. et al. Characterization of phenolic compounds in Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) exocarp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.62(26), p. 6219–6226, 2014.
- FEUEREISEN, M. M. et al. Pressurized liquid extraction of anthocyanins and biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi: A multivariate optimization. *Food Chemistry*, v. 214, p. 564–571, 2017.
- HOUGHTON, P. J., REN, Y., HOWES, M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, v.23 (2), p.181–199, 2006.
- JAPÓN-LUJÁN, R., LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M., CASTRO, M. D. L. Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.385 (4), p. 753–759, 2006 b.
- JAPÓN-LUJÁN, R., LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M., CASTRO, M. D. L. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography, A*, v. 1108(1), p. 76–82, 2006 a.
- JARZYCKA, A.; et al. Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, v.128, p. 50-57, 2013.
- KIM. J. et al. Antioxidant effects of ovotransferrin and its hydrolysates. *Poultry Science*, v.91 (11), p.2747–2754, 2012.
- LEITE, T. C. C. et al. Antimicrobial activity of *Marcetia* DC species (Melastomataceae) and analysis of its flavonoids by reverse phase-high performance liquid chromatography coupled diode array detector. *Pharmacognosy Magazine*, n. 31, v. 8, p. 209-214, 2012.
- LI, Y. et al. Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*, v. 129, p.570-576, 2011.
- LIMA, L. B. et al. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 126, p.468-473, 2009.
- LIMA, M. R. F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105(1), p. 137–147, 2006.
- MARTINEZ GUERRA, M.J. et al. Actividad antimicrobiana de um extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal), *Ver. Cubana Plant Med (Habana)*, 5(1); 23-25), 2000.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, v. 44(2), p. 193-201, 2008.

MURRAY, A.P, et al, Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy, *Current Neuropharmacology*, 11(4), 388-413, 2013.

NCCL, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Ninth informational supplement: NCCLS document M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Ed.) (9th ed.), 1999.

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

REIS. L.C.B. et al. Comparison of Conventional Microwave and Focused Microwave-assisted Extraction to Enhance the Efficiency of the Extraction of Antioxidant Flavonols from Jocote Pomace (*Spondias purpurea* L.). *Plant Foods Hum Nutr.* v. 70. p. 160-169. 2015.

REZENDE, L.C. *Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia*. Salvador - BA, Universidade Federal da Bahia, 2010, 118p. Tese de Doutorado em Química. Universidade Federal da Bahia (UFBA).

ROBARDS. K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A - Review*. n. 1000. p. 657–691. 2003.

RODRÍGUEZ-ROJO, S. et al. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, v.109, p. 98-103, 2012.

SANTOS. W. P. et al. In vitro and ex vivo anticholinesterase activities of *Erythrina velutina* leaf extracts. *Pharmaceutical Biology*. v.50 (7). P.919–24. 2012.

SIMÕES. C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre. RS; Florianópolis. SC. Editora da UFSC. Editora da UFRGS. 2007, 1104.

VINUTHA. B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. v.109 (2), p.359–363. 2007.

WILLIAMS. P.; SORRIBAS. A.; HOWES. M. J. R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Natural Product Reports*. v.28 (1), p. 48–77. 2011.

XYNOS. N. et al. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *Journal of Supercritical Fluids*. 67. 89-93. 2012.

# CAPÍTULO 3

## ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi

Calila T Santos<sup>1,2</sup>; Lissandra C. A. Reis<sup>1</sup>; Alexsandro Branco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Saúde. Faculdade de Farmácia. Universidade Estadual de Feira de Santana. Brasil.*

<sup>2</sup>*Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia Baiano. Campus do Senhor do Bonfim. Brasil.*

**RESUMO:** O presente capítulo teve como principal objetivo realizar o estudo químico do extrato bruto dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. O extrato etanólico foi obtido pelo método de maceração (1:3). Os compostos foram isolados e purificados por cromatografia em coluna de gel de sílica e algumas frações por Sephadex LX20 e as suas estruturas foram identificadas por métodos espectroscópicos tais como cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN). A cromatografia em coluna resultou 64 frações das quais foram identificadas 7 substâncias: agasthi flavona, tetrahidrorobusta flavona, ácido masticadienoico (Z), ácido masticadienoico (E), schinol, ácido gálico e o esqualeno, além de uma mistura com perfil de ácidos graxos insaturados e outra mistura com característica de monossacarídeos.

**PALAVRAS CHAVES:** Aroeira. Metabólitos. RMN. CLAE-DAD. Agathis flavona.

## 1 INTRODUÇÃO

*Schinus terebinthifolius* Raddi, pertencente à Família Anacardiaceae, é espécie pioneira e nativa, conhecida popularmente em todo o Brasil como aroeira (CORRÊA, 1984). É utilizada principalmente na medicina popular, no tratamento de doenças venéreas, reumatismo, diarreias, dores, gengivite e febre (NGOKWEY, 1995; STASI et al., 2002).

Segundo Santana e colaboradores (2012), fitoquimicamente os principais produtos da aroeira, são os ácidos graxos, terpenoides, e os derivados ácidos 3 $\alpha$ -masticadienoico (schinol) e masticadienoico. Porém sabe-se que a composição química da *Schinus terebinthifolius* Raddi é bem mais complexa. Alguns estudos fitoquímicos foram realizados com *Schinus terebinthifolius* Raddi e descrevem a ocorrência de ácidos graxos e derivados esterificados ou não de ácido gálico.

O fruto da *Schinus terebinthifolius* Raddi é muito utilizado como condimento em várias receitas no mundo. Seu sabor permite o emprego na preparação de diversos pratos, além de apresentar boa aparência no uso decorativo, podendo ser utilizado inteiro ou moído. É mais utilizado em pratos à base de carnes brancas. Alguns xaropes, vinagre e bebidas também são produzidos utilizando-se o fruto da aroeira, tais como na fabricação de vinhos chilenos e utilização na indústria de perfumes (KHALED et al., 2009).

Compostos fenólicos são encontrados no fruto da aroeira, o que tem sido explorado pelas indústrias, pois estes compostos contribuem para a estabilidade lipídica (MAESTRODURAN et al. 1994), além de tornar as cores em vinhos mais estáveis e com sabor característico (ZAMORA et al. 1995).

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, visando o isolamento, a elucidação estrutural e a identificação dos seus metabólitos secundários

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 REGENTES E EQUIPAMENTOS

Para preparação do material botânico foi utilizado estufa, moinho de facas, etanol P.A(Cromoline<sup>®</sup>), funil de Buchner, papel Watmann nº1 e rotaevaporador.

O fracionamento em coluna aberta foi feito utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh. VETEC) os solventes hexano, acetato de etila. Etanol, metanol PA (Cromoline<sup>®</sup>) e água destilada. As análises em CCD foram realizadas utilizando cromatofolhas de alumínio (Merck),

tolueno, acetato de etila PA. ácido sulfúrico PA. acético PA. ácido acético PA. clorofórmio PA todos da Cromoline<sup>®</sup>, óleo de mamona (comercial), câmara com lâmpada UV- 254 e 366 nm e placa de aquecimento (Tecnal).

As análises de CLAE-DAD foram realizadas em cromatógrafo líquido Thermo Scientific. Dionex Ultimate 3000, coluna ACE RP 18 (25 x 4.6 nm), utilizando metanol grau CLAE, ácido acético PA (Cromoline<sup>®</sup>) e água Milli-Q. As análises de CG-EM foram realizadas em cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC 17A. acoplado ao espectrômetro de massas CGMS QP5050A equipado com coluna capilar de sílica fundida DB- 5 (30m de comprimento x 0.25mm de diâmetro x 0.25µm de espessura de filme. Os espectros de RMN foram realizados em 300 e 500 MHz para RMN de <sup>1</sup>H e em 125 MHz para RMN de <sup>13</sup>C e DETPQ foram obtidos em espectrômetros Mercury-Varian 200. Bruker DPX-300 e DRX-500, respectivamente e o TMS foi utilizados como referência interna.

## 2.2 OBTENÇÃO DOS FRUTOS

Os frutos foram colhidos na região de Senhor do Bonfim-BA, altitude de 520m e 10° 26' 41.4'' Latitude Sul e 40° 08' 51.6'' Longitude Oeste medido no GPS de Navegação (marca Garmin / modelo Vista HCX) sendo sua exsicata depositada no Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco sob número de tombo 17432.

A colheita foi feita através da remoção do fruto maduro. Os frutos foram selecionados, limpos e. em seguida, colocados para secar em uma estufa com circulação de ar. à temperatura de 60 °C. depois de secos foram moídos em moinho de facas e embalado em sacos de polietileno e envolto em papel alumínio até o momento de uso.

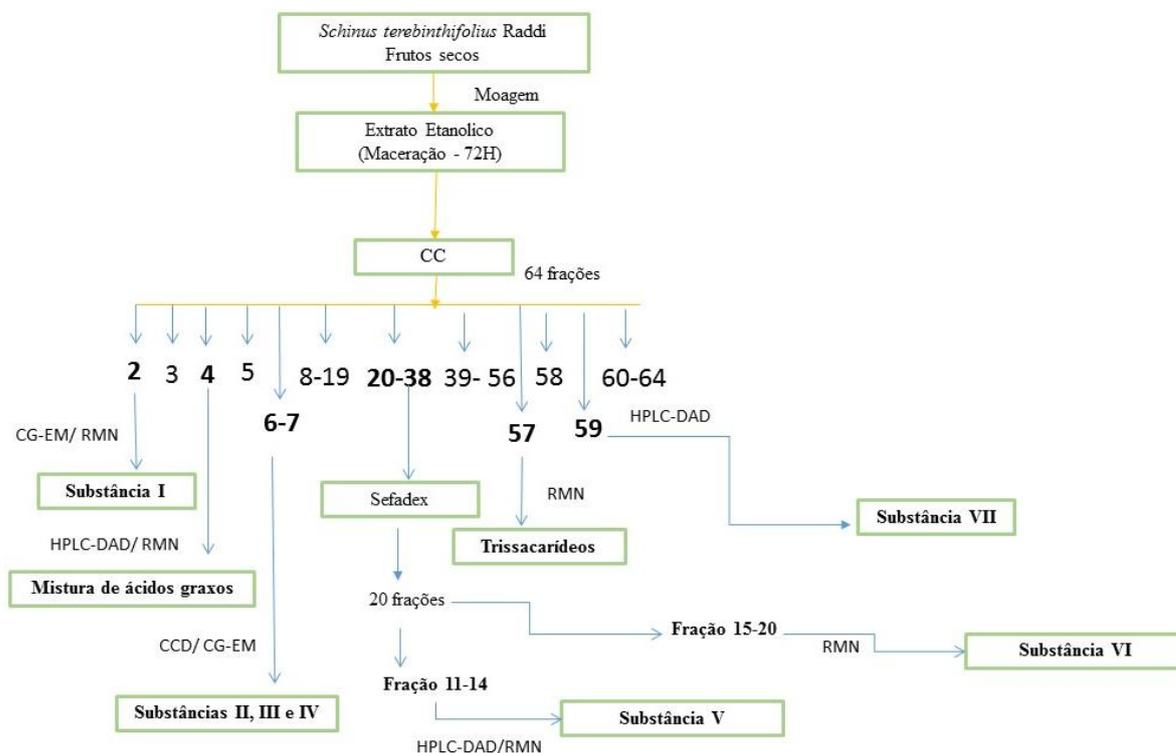
## 2.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

O extrato bruto foi elaborado com 1 kg do material moído em moinho de faca. Os constituintes químicos foram extraídos por maceração em etanol P.A 96% (1500 mL), por 72 horas à temperatura ambiente (25 °C). A mistura foi filtrada a vácuo e posteriormente o solvente foi removido em rotaevaporador à pressão reduzida e temperatura controlada de 60 °C, obtendo-se 400 g de extrato bruto final.

## 2.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi.

O extrato bruto dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi foi submetido à Cromatografia em Coluna (CC) aberta preenchida com sílica.

A Figura 1 apresenta a metodologia para obtenção das substâncias identificadas nesse presente estudo. O extrato bruto foi submetido ao fracionamento em coluca aberta e as frações obtidas foram monitoradas por CCD e CLAE-DAD.



**Figura 1-** Fluxograma dos procedimentos utilizados para obtenção dos compostos presente no extrato dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Foram utilizados os solventes hexano, acetato de etila, metanol e água combinados em ordem crescente de polaridade. As frações obtidas com a CC foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando como fase estacionária cromatofolhas de alumínio sílica gel. Para eluição, foram utilizados vários sistemas de solventes. As frações foram visualizadas com o auxílio de uma câmara cromatográfica com luz UV e por revelação das placas com solução de ácido sulfúrico em metanol (10%) seguido de aquecimento a 100 °C. As amostras de mesmo perfil químico foram unidas.

**Tabela 1-** Fracionamento do extrato etanólico dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi por cromatografia em coluna aberta e frações obtidas.

Frações	Sistema eluente
1	Hexano 100%
2	Hexano - acetato de etila (95:5%)
3	Hexano - acetato de etila (85:15%)
4	Hexano - acetato de etila (75:25%)
5	Hexano - acetato de etila (65:35%)
6. 7 e 8	Hexano - acetato de etila (60:40%)
9 e 10	Hexano - acetato de etila (50:50%)
11. 12.13. 14. 15 e 16	Hexano - acetato de etila (40:60%)
17. 18. 19.20 e 21	Hexano - acetato de etila (30:70%)
22. 23 e 24	Hexano - acetato de etila (20:80%)
25. 26.27.28.29 e 30	Hexano - acetato de etila (10:90%)
31 e 32	Acetato de etila (100%)
33. 34. 35 e 36	Acetato de etila – Etanol (90:10%)
37. 38. 39. 40. 41 e 42	Acetato de etila – Etanol (70:30%)
43. 44 e 45	Acetato de etila – Etanol (50:50%)
46. 47.48. 49 e 50	Acetato de etila – Etanol (30:70%)
51. 52. 53 e 54	Acetato de etila – Etanol (10:90%)
55e 56	Etanol 100%
57 e 58	Etanol – Metanol (50:50%)
59	Metanol 100%
60	Metanol- Água (50:50%)
61 e 62	100% Água
63. 64 e 65	Água – ácido acético (90:10%)

As amostras analisadas por CCD foram ressuspensas em metanol, para serem analisadas por CLAE-DAD em. Foram utilizados H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH 0.1% e metanol como fase móvel, segundo gradiente apresentado na Tabela 2. O tempo de corrida foi 45 minutos, o volume de injeção 20 µL e a temperatura do forno 30°C. A faixa de comprimento de onda foi de 200-800 nm, com aquisição em 280 nm.

**Tabela 2** – Gradiente dos solventes utilizados para CLAE-DAD

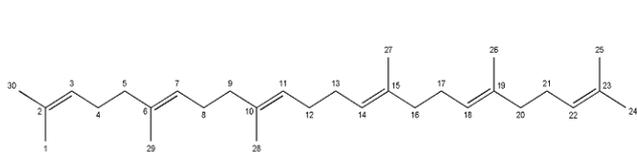
Tempo (min)	H <sub>2</sub> O/ CH <sub>3</sub> COOH 0.1%	MeOH
0	100	0
25	0	100
25-35	0	100
36	80	20
36-45	100	0

Algumas frações foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), pois apresentaram com características apolares. A temperatura inicial da coluna foi 80°C. variando de 80°C a 280°C em 10°C por minuto, permanecendo em 280°C por 40 minutos. A temperatura do injetor e da interface correspondeu a 280°C.

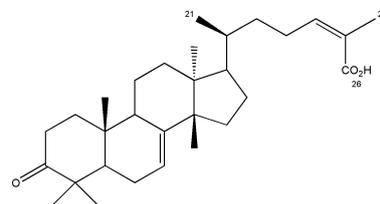
Após investigação por CLAE-DAD e CG-EM algumas frações foram selecionadas e submetidas à análise de RMN. Em todas as análises foi utilizado metanol deuterado (MeOD) como solvente.

### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

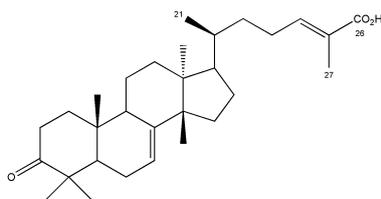
As substâncias identificadas no presente estudos são apresentadas na Figura 2. As ampliações dos RMN das substâncias identificadas encontram-se do Apêndice 3 ao 25.



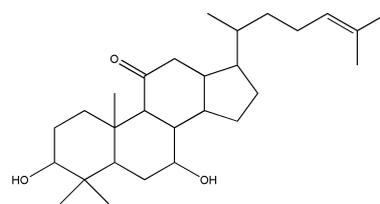
**Substância I:** *Esqualeno*



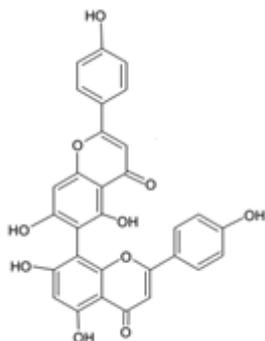
**Substância II:** *Ácido Masticadienoico (Z)*



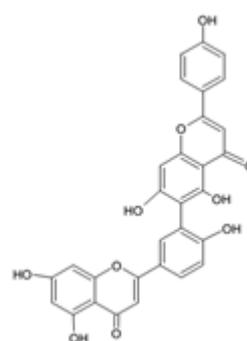
**Substância III:** *Ácido Masticadienoico (E)*



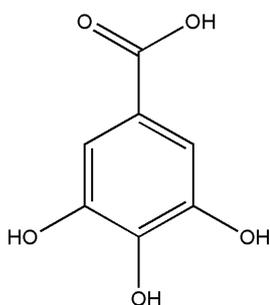
**Substância IV:** *Schinol*.



**Substância V:** *Agathisflavona*



**Substância VI:** *Tetrahidrorobustaflavona*

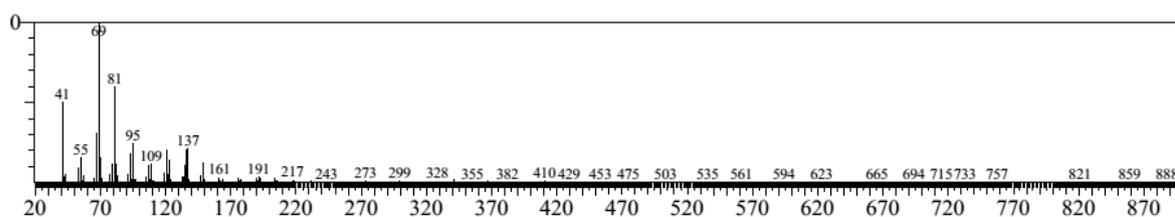


**Substância VII:** *Ácido Gálico*

**Figura 2-** Substâncias identificadas no extrato etanólico dos frutos de *Schinus terebenthifolius* Raddi (EEFST)

### Substância I: Esqualeno

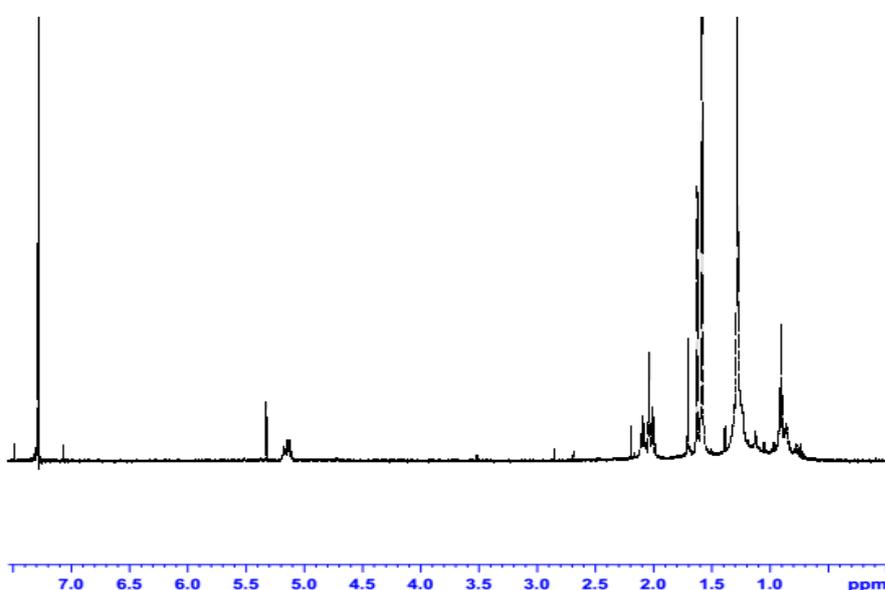
A substância 1 foi encaminhada para o CG-EM e RMN. Na análise por CG-EM apresentou-se com um pico majoritário com  $t_R$  de 30.26 min. representando 65.46 % da amostra. O espectro de massas desse composto (Figura 3) revelou os fragmentos com  $m/z$  em 137; 95; 81; 69; 55 e 41, indicando tratar-se do composto esqualeno, conforme dados registrados na literatura (SUN et al. 2005; OYUGI et al. 2011).



**Figura 3:** Espectro de massas por CG-EM do pico com  $T_r$  de 30.258 min. da Substância I

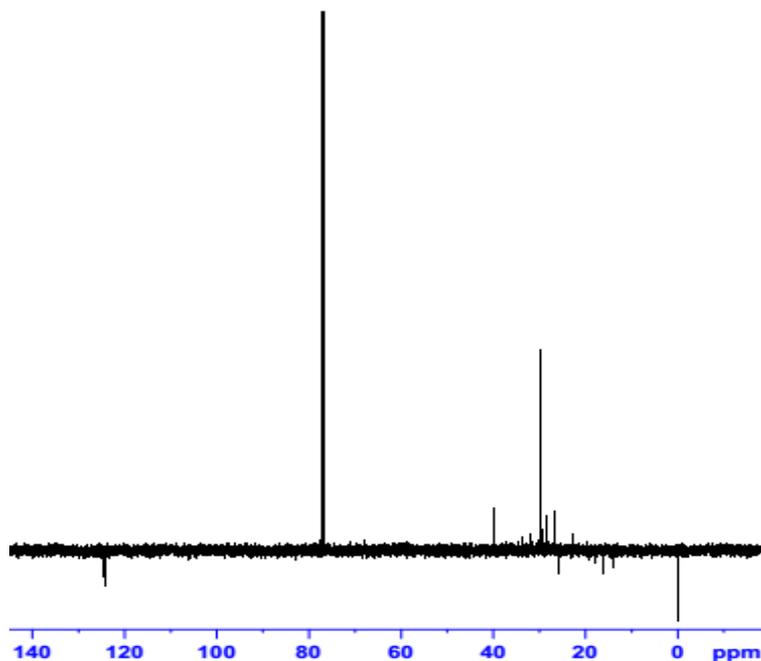
Esse resultado foi confirmado com as análises de RMN de  $^1H$  (Figura 4) e DEPTQ 135 (Figura 5) que permitiram a identificação deste composto.

No espectro de  $^1H$  o multipletto entre 5,20-5,10 ppm foi associado aos hidrogênios ligados aos carbonos terciários, enquanto que os multipletos entre 2,12 – 1,98 ppm são referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos secundários. O singletto em 1,71 ppm foi atribuído aos hidrogênios 24 e 30, sendo os demais hidrogênios ligados a carbonos primários associados aos singletos em 1.62 ppm.



**Figura 4:** Espectro de RMN  $^1H$  da substância I obtida do EEFST (500 MHz. MeOD)

No espectro de DEPTQ os carbonos terciários foram identificados com deslocamento em 124,12 e 124,28 ppm, e os carbonos secundários entre 26,64 e 39,76 ppm. Os carbonos primários se mostraram presente com deslocamento entre 16,00 e 26,00 ppm. Após a atribuição dos valores aos átomos de carbono e hidrogênio à estrutura do composto e comparação com dados da literatura foi possível confirmar a substância como esqualeno.



**Figura 5:** Espectro de RMN DEPTQ 135 da fração 2 do EEFST (500 MHz, MeOD)

O esqualeno é um triterpeno poli-insaturado contendo seis unidades de isopreno e é um precursor bioquímico do colesterol e outros esteroides (REDDY; COUVREUR. 2009), sendo também um intermediário chave na produção de diversos triterpenoídes em plantas, bactérias e fungos (SPANOVA; DAUM. 2011). Algumas plantas também acumulam o esqualeno como produto final, já que este pode ser liberado como composto volátil, agindo na defesa contra insetos ou atração de polinizadores (JIANG et al. 2015).

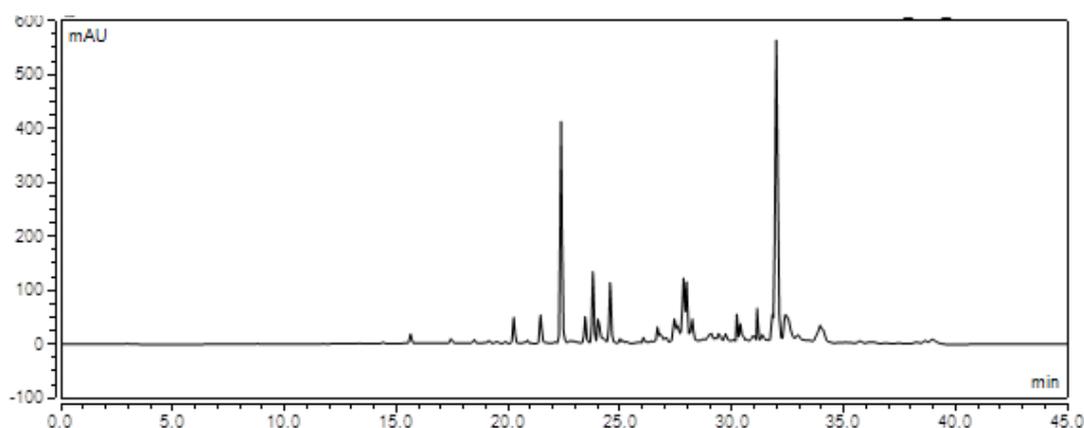
**Tabela 3.** Atribuições das análises de RMN de  $^1\text{H}$  e DEPTQ 135, do composto esqualeno e comparação com dados da literatura.

ESQUALENO			POGLIANI et al. (1993)	
C	$\delta$ C	$\delta$ H	$\delta$ C	$\delta$ H
3	124,41	5,20 – 5,10	125,45	5,11
7	124,28	5,20 – 5,10	124,30	5,13
11	124,28	5,20 – 5,10	124,34	5,17
14	124,28	5,20 – 5,10	124,34	5,17
18	124,28	5,20 – 5,10	124,30	5,13
22	124,41	5,20 – 5,10	125,45	5,11
<b>C<sub>2</sub></b>				
4	26,67	2,12 -1,98	26,79	2,08
5	39,73	2,12 -1,98	39,74	1,99
8	26,77	2,12 -1,98	26,66	2,1
9	39,76	2,12 -1,98	39,76	2,0
12	28,28	2,12 -1,98	28,28	2,03
13	28,28	2,12 -1,98	28,28	2,03
16	39,76	2,12 -1,98	39,76	2,0
17	26,77	2,12 -1,98	26,66	2,1
20	39,73	2,12 -1,98	39,74	1,99
21	26,67	2,12 -1,98	26,79	2,08
<b>C<sub>3</sub></b>				
1	14,13	1,62 (s)	17,60	1,61
24	25,7	1,71 (s)	25,63	1,69
25	14,13	1,62 (s)	17,60	1,61
26	16,00	1,62 (s)	15,93	1,61
27	16,05	1,62 (s)	15,98	1,62
28	16,05	1,62	15,98	1,62
29	16,00	1,62	15,93	1,61
30	26,00	1,71 (s)	25,63	1,69

### Mistura de ácidos graxos

A fração 4 apresentou característica oleosa com coloração amarelo intenso. Ao se realizado CCD com essa fração observou uma mancha escura, característica de óleo vegetal. Essa fração foi submetida a CLAE-DAD. CG-EM para sua devida identificação.

Na análise de CLAE-DAD (Figura 6) observou-se que a fração não se encontrava pura. Os picos apresentam espectros de compostos com alta polaridade.



**Figura 6:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da Fração 4

Os triacilgliceróis constituem uma importante reserva de energia em frutas e sementes, visto que contêm consideráveis quantidades de ácidos graxos insaturados, como oleico e linoleico. Os triacilgliceróis (TG) estão presentes em diversos óleos vegetais e seus métodos de análise têm atraído bastante atenção nas últimas décadas.

Óleos comestíveis são constituídos basicamente por triglicerídeos com diferentes padrões de substituição, comprimentos e graus de saturação das cadeias, e por outros componentes minoritários. Existem aqueles em que o grupo acil principal é o grupo oleico, linoleico ou o linolênico em proporção significativa.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de óleos vegetais comuns apresenta no mínimo nove sinais de intensidade significativa, e em alguns casos 10; estes sinais são devido aos hidrogênios dos principais componentes, os triglicerídeos (Tabela 4) (GUILLEN e RUIZ. 2003).

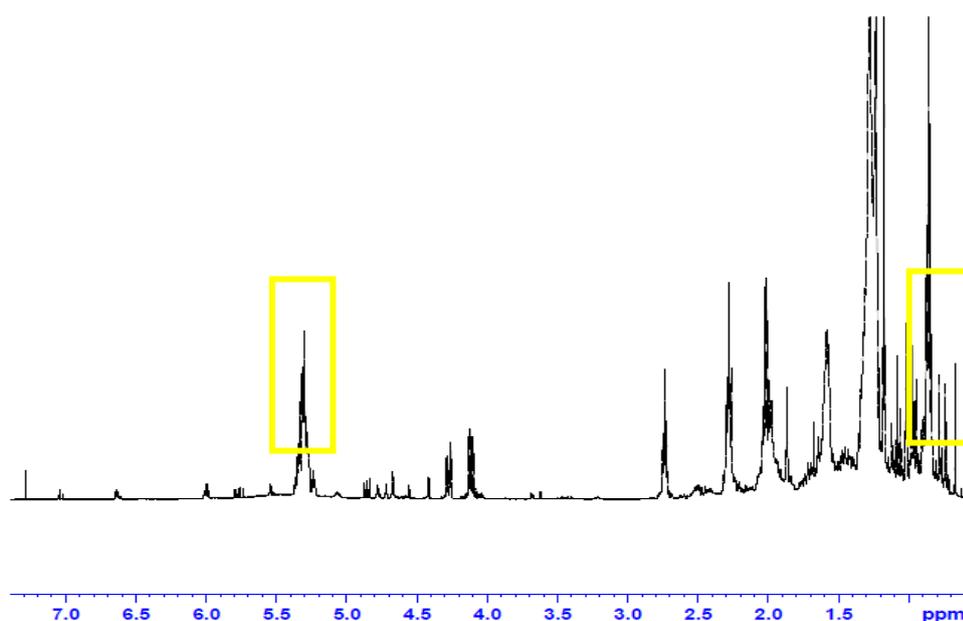
**Tabela 4-** Sinais encontrados de RMN de  $^1\text{H}$  de amostras de óleos vegetais descritos na literatura

Sinal	Deslocamento químico (ppm)	Grupo funcional
1	0.83-0.93	-(CH <sub>3</sub> ) (grupo acil saturado. oleico e linoleico)
2	0.93-1.03	-(CH <sub>3</sub> ) (grupo acil linolênico)
3	1.22-1.42	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> (grupo acil)
4	1.52-1.70	-OCO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - (grupo acil)
5	1.94-2.14	-CH <sub>2</sub> -CH=CH- (grupo acil)
6	2.23-2.36	-OCO-CH <sub>2</sub> - (grupo acil)
7	2.70-2.84	=HC-CH <sub>2</sub> -CH- (grupo acil)
8	4.10-4.32	-CH <sub>2</sub> OCOR (grupo gliceril)
9	5.20-5.26	>CHOCOR (grupo gliceril)
10	5.26-5.40	-CH=CH- (grupo acil)

Fonte: GUILLEN e RUIZ. 2003.

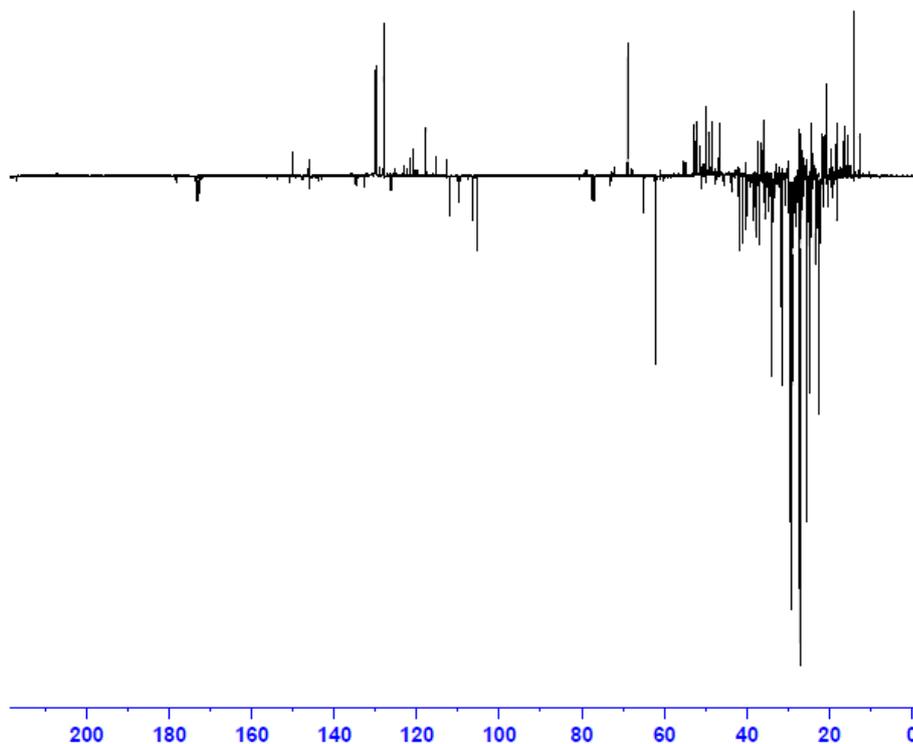
Ao submeter a fração a análises de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 7), permitiu concluir que se trata de uma mistura de triacilglicerídeos devido à presença de seus sinais característicos. Os sinais 0.80-0.99 são dos hidrogênios metílicos; sinal em 1.27 ppm referente aos hidrogênios dos grupos metilênicos ( $\beta$ -olefínicos ou  $\gamma$ -carbonílicos); sinal em 1.60 ppm referente aos

hidrogênios metilênicos  $\beta$ -carbonílicos; sinal em 2.03 ppm, referente aos hidrogênios alílicos; sinal em 2.31 ppm referente aos hidrogênios metilênicos  $\alpha$ -carbonílicos; sinal em 2.77 ppm correspondente aos hidrogênios bisalílicos; sinal em 4.22 ppm correspondente aos hidrogênios ligados aos carbonos do glicerol (C1 e C3); e o sinal em 4.32-4.10 são referentes aos hidrogênios ligados ao glicerol. O sinal entre 5.4 e 5.3, conforme literatura (COLZATO et al. 2008), se refere aos hidrogênios ligados aos carbonos que formam dupla ligações.



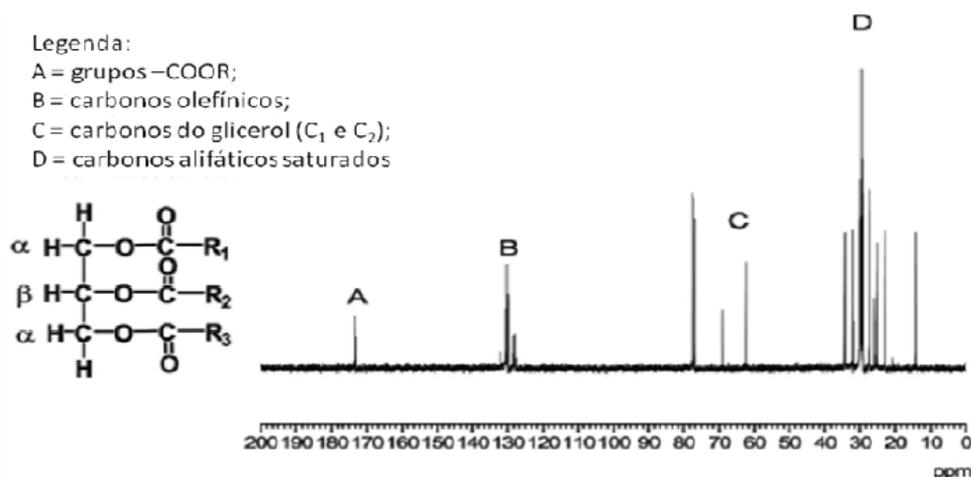
**Figura 7:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da **Fração 4** obtida do EEFST (500 MHz, MeOD).

O espectro de RMN DEPTQ 135 (Figura 8) ratificou a ideia inicial, de tratar-se de uma mistura de triacilglicerídeos. Observou-se sinais característicos de carbonos carboxílicos em  $\delta$  173.2 e  $\delta$  172.74; olefínicos em  $\delta$  130.05,  $\delta$  129.8 e em  $\delta$  128.01,  $\delta$  127.85, indicando a presença de ácido graxo poli-insaturado e os carbonos C1 e C2 do glicerol ( $\delta$  68.9 e 62.05). Deslocamentos químicos em  $\delta$  34.10 e 34.01 correspondem aos grupos  $\alpha$ -metilênicos em relação à carboxila; os grupos  $\text{CH}_2$  saturados encontram-se em 31.9-22.54 ppm; os  $\text{CH}_2$  alílicos externos à  $\text{C}=\text{C}$ , estão em  $\delta$  27.14; os  $\text{CH}_2$  olefínicos internos, são observados em  $\delta$  25.58; os carbonos  $\beta$ -carboxílicos são observados em  $\delta$  24.9 e as metilas foram observadas em  $\delta$  14.07 e  $\delta$  14.03.



**Figura 8:** Espectro de RMN DEPTQ 135 da **Fração 4** obtida do EEFST (500 MHz, MeOD).

Análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de um óleo vegetal (Figura 9) encontrado na literatura revela quatro regiões bem distintas no espectro:  $\delta$  173.3-172.8 ppm (A) região dos carbonos carboxílicos;  $\delta$  132.0-127.1 ppm (B), região dos carbonos olefínicos;  $\delta$  69.1-61.6 ppm, região dos carbonos do glicerol (C) [C1 e C2]; e  $\delta$  34 ppm (D), onde estão presentes os carbonos alifáticos saturados. Quando se analisa a região dos grupos carboxílicos, os substituintes nas posições 1 e 2 do glicerol podem ser distinguidos, porque mostram intensidades diferentes. Dentre os deslocamentos químicos mais característicos dos triglicerídeos, destacam-se aqueles em  $\delta$  34(C2) correspondentes aos grupos  $\alpha$ -metilênicos em relação à carboxila; os grupos CH<sub>2</sub> saturados encontram-se em  $\delta$  24(C3),  $\delta$  31( $\omega_3$ ) e  $\delta$  22( $\omega_2$ ); os CH<sub>2</sub> alílicos adjacente a dupla ligação, podem ser encontrados em  $\delta$  27; os CH<sub>2</sub> bis-alílicos, são observados em  $\delta$  26.0-25.0; os carbonos  $\beta$ -carbonílicos são observados em  $\delta$  25 e as metilas podem ser observadas em  $\delta$  14 ( $\omega_1$ ) (REDA e CARNEIRO. 2007).



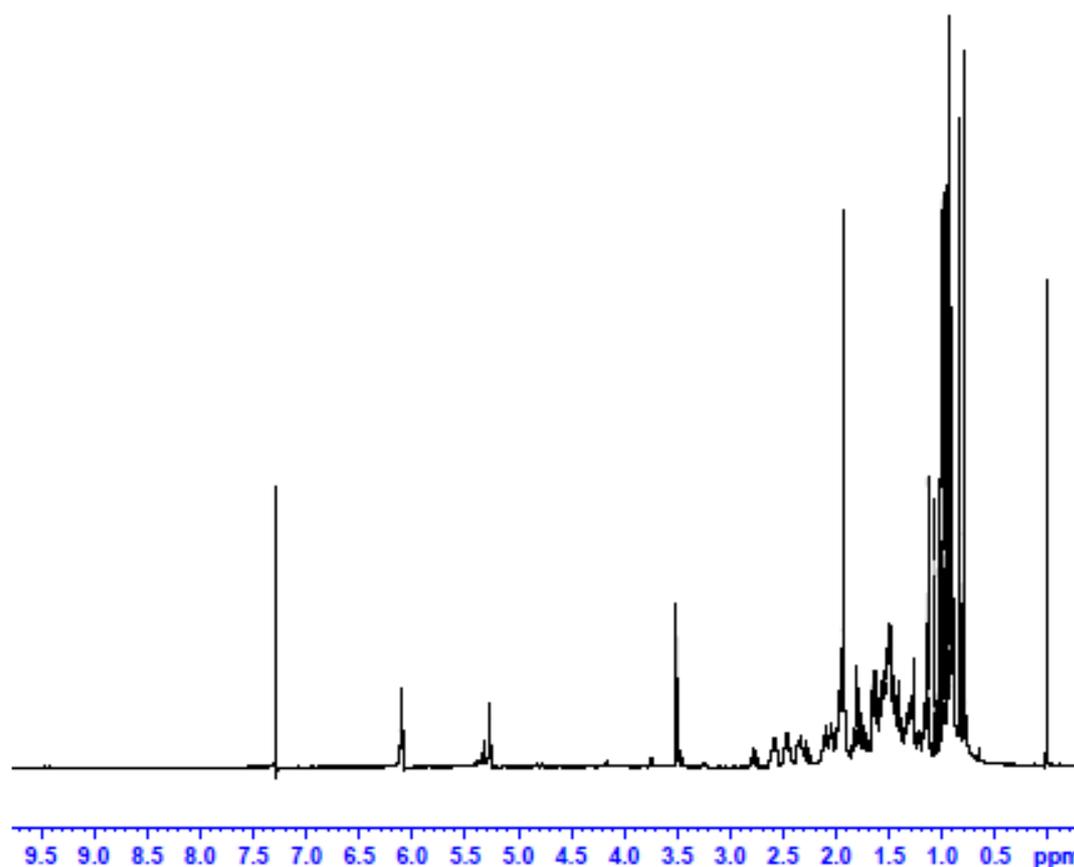
**Figura 9** - Espectro genérico de RMN <sup>13</sup>C de óleos vegetais  
 Fonte: REDA e CARNEIRO. 2007.

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de óleos contêm uma grande quantidade de informações que, convenientemente estudadas, permite discriminar entre óleos de diferentes composições. O estudo realizado por VLAHOV (1999) mostrou a aplicação das técnicas de RMN para avaliar óleos de oliva, tais como adulterações e matéria insaponificável

**Substância II: Ácido Masticadienoico (Z); Substância III: Ácido Masticadienoico (E); Substância IV: Schinol.**

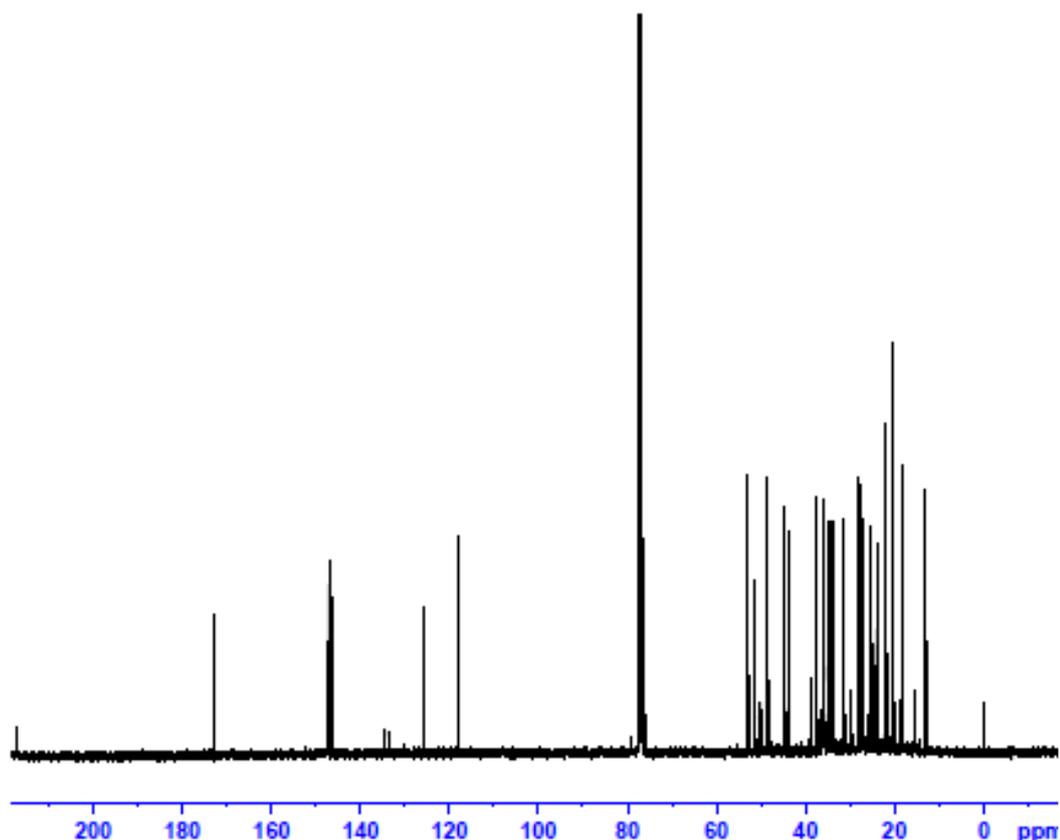
A fração 6 ao ser analisada em RMN percebeu que se tratava de uma mistura de triterpenos. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 10) apresentou singletos em 0.77; 0.81; 0.83; 0.88; 0.89; 0.90; 0.93 e 0.99 ppm, atribuído aos grupos metílicos das substâncias presentes na da mistura.

Entre 1.30 ppm e 2.56 ppm observamos multipletos, atribuídos aos hidrogênios dos grupos metínicos e metilênicos das substâncias.



**Figura 10:** Espectro de RMN H<sup>1</sup> da mistura dos triterpenos do EEFST 500 MHz. MeOD).

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 11) mostrou sinais que contribuíram na identificação dos três principais componentes da mistura: sinal em 217.2 ppm atribuído à carboxila em C-27 das substâncias III e IV; sinal em 172.8 ppm atribuído à carbonila em C-27 da substância V; sinais em 125.86; 36.06 e 36.10 ppm atribuídos aos carbonos olefínicos C-20 e C-25 do ácido masticadienoico (Z e E) e do Schinol; sinais entre 35.0 e 12.97 ppm, atribuídos aos outros carbonos metínicos, metilênicos e metílicos das substâncias presentes na mistura.

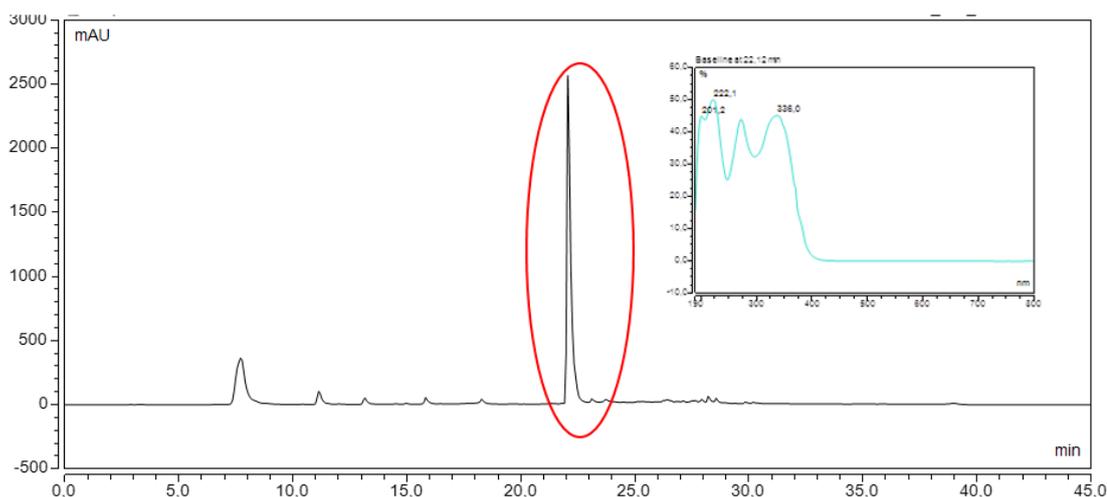


**Figura 11:** Espectro de RMN  $C^{13}$  dos triterpenos do EEFST (500 MHz, MeOD).

A análise dos dados de RMN  $^1H$  e de  $^{13}C$  e a comparação destes com a literatura (Morais et al. 2014)) permitiu a identificação em mistura do 3-Oxotirucalla-7.24Z-dien-27-oic acid (Z-masticadienoic acid); 3-Oxotirucalla-7.24E-dien-27-oic acid (E-masticadienoic acid) e o 3-Hydroxytirucalla-7.24Z-dien-27-oic acid (Z-schinol).

### **Substância V: Agathisflavona**

Após análise por CCD e CLAE-DAD, as frações de 20 a 38 foram unidas, pois apresentaram o perfil de dois dos biflavonoides comum a *Schinus terebinthifolius* Raddi (Amentoflavona e Agathisflavona). As frações unidas foram submetidas a purificação em coluna de Sephadex LH20, obtendo-se 20 frações. A fase móvel utilizada foi MeOH. As frações com  $R_f$  semelhantes em análise por CCD foram agrupadas. As frações também foram submetidas a análise por CLAE-DAD, onde se comparou a fração SF11-14 com o padrão Agathisflavona (Figura 12) e confirmou-se realmente deste biflavonoíde. A fração foi submetida a análise em RMN  $^1H$ .



**Figura 12:** Cromatograma por CLAE-DAD da Fração SF11-14 e espectro UV do pico no tempo 22.11min.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 13) desta substância apresentou sinais característicos de duas unidades flavonóidicas. Este espectro mostrou um dubleto em  $\delta$  7.96 ( $J= 8.7$  Hz) e outro em  $\delta$  7.04 ( $J= 8.7$  Hz) indicativo de anel B 1.4 dissubstituído de uma unidade, além dos dubletos em  $\delta$  7.63 ( $J= 8.7$  Hz) e  $\delta$  6.84 ( $J= 8.7$  Hz) indicativos da presença do anel B 1.4 de outra unidade flavonoídica. Os singletos em  $\delta$  6.42 (H-6 da unidade II) e  $\delta$  6.63 (H-8 da unidade I) foram indicativos da presença de dois anéis aromáticos com 5 substituições cada. Os singletos em  $\delta$  6.80 e  $\delta$  6.68 são característicos de hidrogênios olefínicos (H-3) das unidades das flavonas. Assim, a substância foi identificada como agathisflavona. A pequena diferença observada em alguns valores, comparados com os da literatura, foi devido à diferença do solvente utilizado.

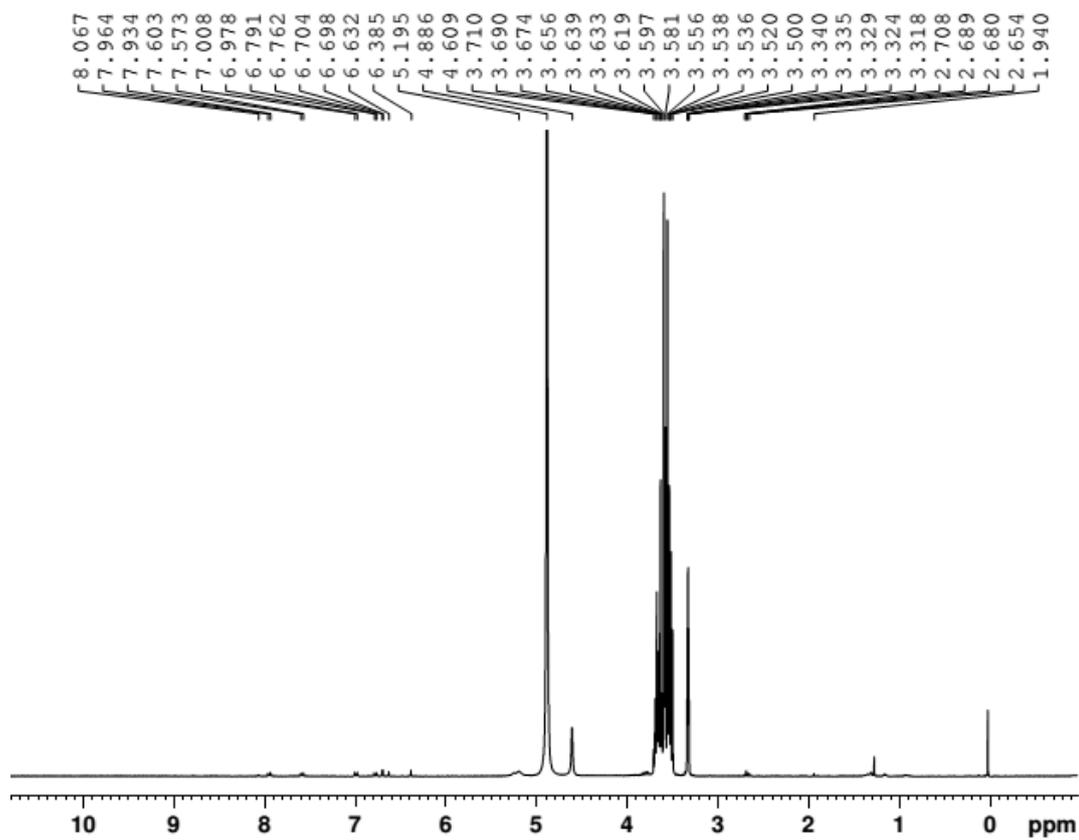


Figura 13: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da Substância V obtida do EEFST (500 MHz. MeOD)

### Substância VI: Tetrahidrorobustaflavona

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Substância VII (Figura 14) é bastante complicado devido à sobreposição dos sinais aromáticos.

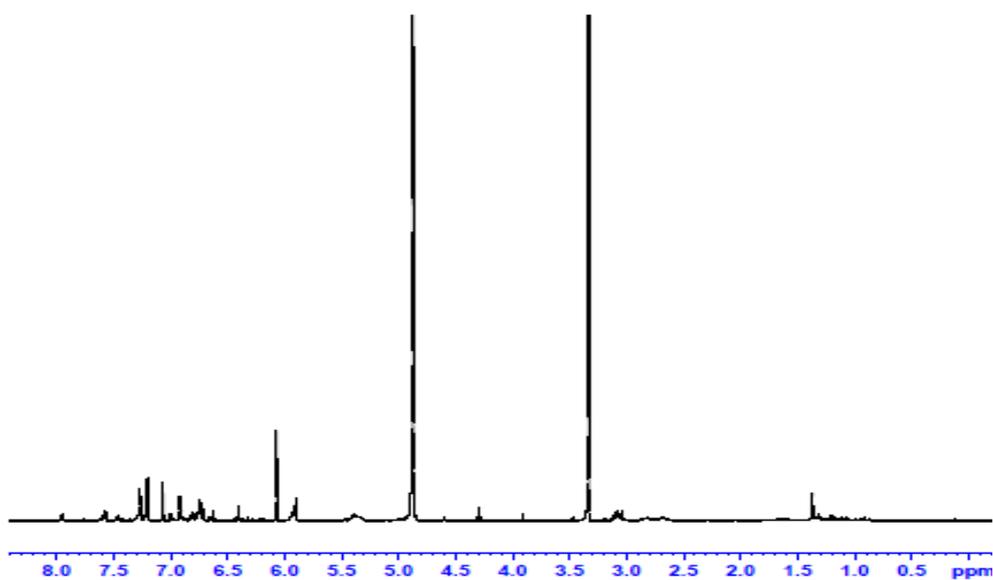
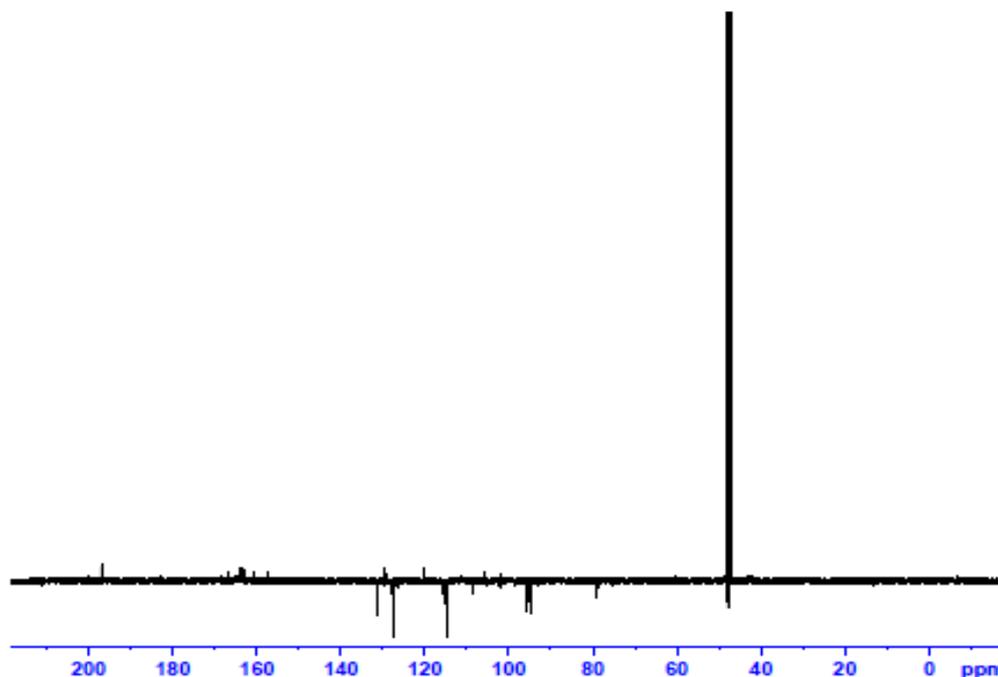


Figura 14: Espectro de RMN  $\text{H}^1$  da substância VI obtida do EEFST 500 MHz. MeOD)

O espectro de RMN DEPTQ (Figura 15) e a literatura (KASSEM; DESOKY E SHARAF. 2004) foram essenciais na confirmação da Substância VI.



**Figura 15:** Espectro de RMN DEPT da substância VI obtida do EEFST (500 MHz. MeOD)

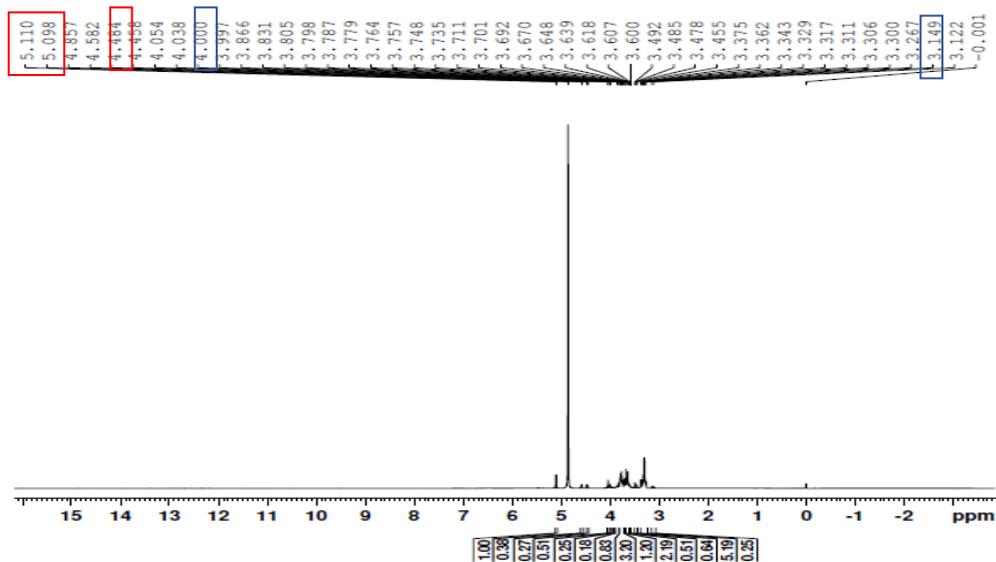
Observou-se a presença de quatro sinais, dois dos quais foram localizados em  $\delta$  78.74 e 77.88 para C-2.2", enquanto os outros dois carbonos foram observados em  $\delta$  41.49 e 42.37 para C-3.3". e o C -4.4" a  $\delta$  196.51 e 196.90. Os três sinais observados em  $\delta$  95.88. 95.60 e 95.06 foram atribuídos a C-8". 6" e C-8. Os dois sinais atribuídos para C-6 e C-3"" foram deslocados para baixo para  $\delta$  101.96 e 121.0. Estes deslocamentos são análogos aos relatados para os flavonoides com ligações do tipo C-C (AGRAWAL. 1989). A partir dos dados acima. a substancia VI foi identificado como tetrahidrorobustaflavona.

Há relatado que este biflavonoide possui atividade farmacológica (KASSEM; DESOKY E SHARAF. 2004). Logo, a presença de biflavonoides na planta motiva a consideração de sua atividade farmacológica e a possibilidade de sua nova aplicação.

### **Mistura de trissacarídeos**

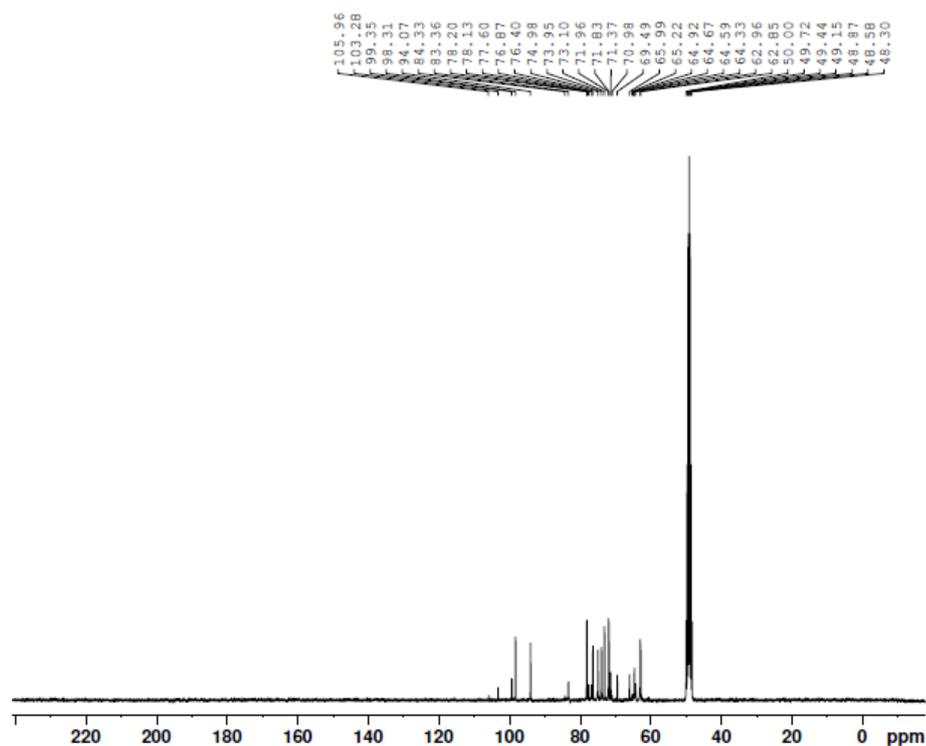
A presença de açúcares é um fato de ocorrência comum nas frações mais polares das plantas. Na análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  observou-se um perfil característico de carboidratos. Na região de hidrogênio anomérico, verifica-se sinais típicos de hidrogênios de carboidratos (entre  $\delta\text{H}$  3.2 e 4.0) além do hidrogênio anomérico em  $\delta\text{H}$  5.11. 5.09 e 4.48, que

se refere a sinais característico da  $\beta$ -arabinose,  $\alpha$ -xilose e a  $\beta$ -galactose (AGRAWAL, 1992) (Figura 16).



**Figura 16:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da Fração 57 obtida do EEFST (500 MHz. MeOD)

A análise do espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 17) apresentou na região do carbono anomérico sinais característicos de 94-105ppm. Os resultados espectroscópicos encontrados para essa fração concordaram com o descrito por Levi et al.,1980, que relataram que em RMN de  $^{13}\text{C}$  todos os átomos de carbono de açúcares ressonam entre duas faixas relativamente estreitas, entre  $\delta$  60-80 e 90-105ppm, esta última para os carbonos anoméricos.



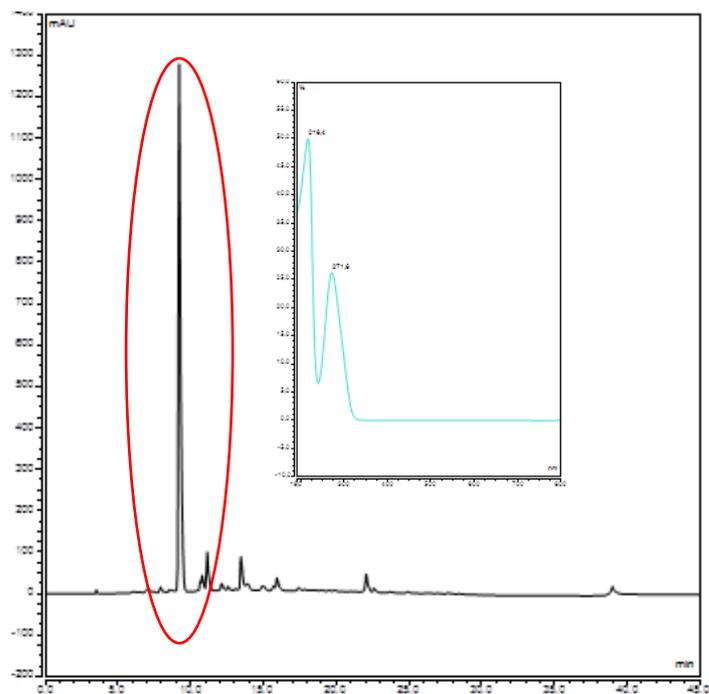
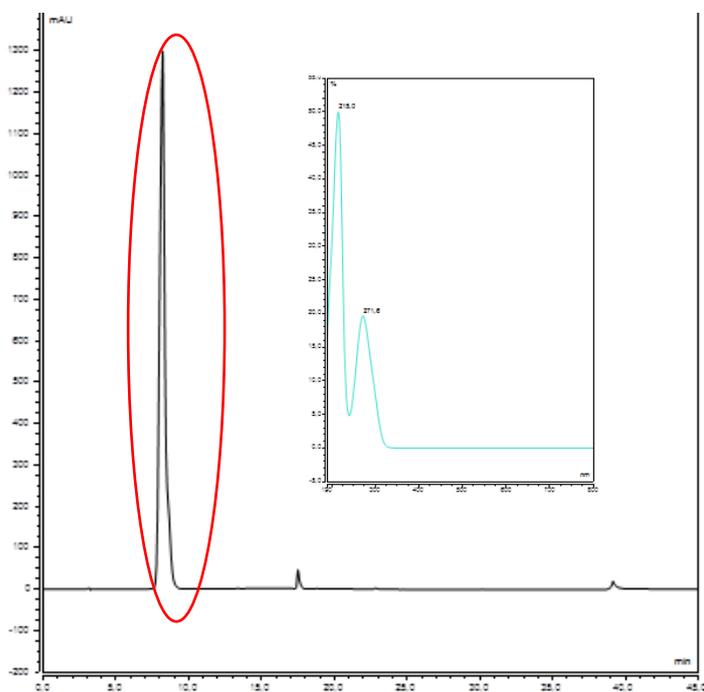
**Figura 17:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da Fração 57 obtida do EEFST (500 MHz, MeOD)

### Substância VII: Ácido Gálico

No cromatograma Substância VII (Figura 18), pode-se observar um pico bastante intenso no tempo de retenção em 9.22 minutos, possuem bandas de absorção máxima em torno de 216.4 e 271.6nm.

Através desses resultados pode-se concluir que a fração não apresenta as características para os flavonoides, mas sim para os ácidos fenólicos, pois apresentam bandas intensas nas faixas espectrais de 190-220 e 260-280 nm (MICHELYN. 2008; OLESZEK E BIALY. 2006). Para elucidação da mesma injetamos o padrão de ácido gálico (Sigma) no mesmo método. Ao compararmos os tempos e retenção e espectros de UV podemos inferir que o pico majoritário da Substância VII trata-se do ácido gálico.

Por ser uma substância bem conhecida a mesma não foi submetida a outras técnicas para elucidação.

**A****B**

**Figura 18:** Cromatograma por CLAE-DAD: **A**- Substância VII e espectro no ultravioleta (280nm) do pico no tempo 9.22; **B** – Padrão Acido Gálico e seu espectro no ultravioleta.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P.K. Nmr-Spectroscopy in the Structural Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry* 31(10), p. 3307-30, 1992.
- AGRAWAL. P.K. *Carbon-<sup>13</sup>NMR of Flavonoids*. Oxford. New York. 1989.
- COLOMBINI M.P., MODUGNO, F. Organic mass spectrometry in art and archaeology. John Wiley. Chinchester. 517 p. 2009.
- COLZATO. M. et al. Análise comparativa dos espectros de <sup>1</sup>H RMN de óleos comestíveis oxidados. *Embrapa Instrumentação Agropecuária*. Comunicado Técnico. 92. 2008.
- CORRÊA. M.P. *Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas* 6v. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. p.170-171.1984.
- FEUEREISEN. M. M. et al. A. Characterization of phenolic compounds in Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) exocarp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(26). 6219–6226. 2014.
- GUILLÉN. M. D.; RUIZ. A. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures. *European Journal of Lipid Science and Technology*. v. 105. p. 502-507. 2003.
- JIANG. Y. et al. Volatile squalene from a nonseed plant *Selaginella moellendorffii*: Emission and biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 96. p. 1-8. 2015.
- KASSEM. M. E.; EL-DESOKY. S.; SHARAF. M. Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. *Chemistry of Natural Compounds*. p. 40. p. 447-50. 2004.
- KHALED F. et al. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *J. Agric. Food Chem.* 57: 5265. 2009.
- LEVI. G.C. & et al. *Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy*. 2 nd. New York: John Wiley and Sons. 1980.
- MAESTRODURAN, R., CABELLO, R.L., GUTIERREZ, V.R. Phenolic compounds from olive (*Olea europaea*). *Grasas y Aceites*. 45(4): 265-269. 1994.
- MICHELIN. D. C. *Estudo Químico-Farmacológico de Operculina macrocarpa L. Urb. (Convolvulaceae)*. Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas. UNESP. 144 p. 2008.
- MORAIS. T. et al. Antiparasitic activity of natural and semi-synthetic tirucallane triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): Structure/Activity Relationships. *Molecules*. 19(5). 5761–5776. 2014.
- NGOKWEY. N. Home remedies and doctors' remedies in Feira (Brazil). *Social Science e Medicine*. v.40. n. 8. p. 1141-1153. 1995.

OLESZEK. W. E BIALY. Z. Chromatographic determination of plants saponins – An update (2002-2005). *J. Chromat. A*. 1112(1-2): 78-79. 2006.

OYUGI. D. A. et al. Biological activity and mass spectrometric analysis of Vernonia amygdalina fractions. *Journal of Bioscience and Technology*. v. 2. n. 3. p. 287-304. 2011.

POGLIANI. L. et al. An NMR and molecular mechanics study of squalene and squalene derivatives. *Chemistry and physics of lipids*. v. 70. n. 1. p. 21-34. 1994.

REDA. S. Y.; CARNEIRO. P. I. B. A Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 na análise de óleos vegetais termo-oxidados. *Revista Analytica*. n. 31. 2007.

REDDY. L. H.; COUVREUR. P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 61. n. 15. p. 1412-1426. 2009.

SANTANA. J.S. et al. Essential oils from *Schinus terebinthifolius* leaves - chemical composition and *in vitro* cytotoxicity evaluation. *Pharmaceutical Biology*. v.50. n.10. p.1248-1253, 2012.

SPANOVA. M.; DAUM. G. Squalene–biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*. v. 113. n. 11. p. 1299-1320. 2011.

STASI. L.C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*. n. 73 p. 69-91. 2002.

SUN. S. et al. The combination effects of phenolic compounds and fluconazole on the formation of ergosterol in *Candida albicans* determined by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*. v. 336. n. 1. p. 39-45. 2005.

VLAHOV G. Application of NMR to the Study of Olive Oils. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*.v. 35. p.341-357. 1999.

ZAMORA. F. et al. Effect of drawing off on colour and phenolic compounds composition of red wine. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Alim*. v.34 (6): 663-671. 1995.

# CAPÍTULO 4

## **FILME ATIVO DE PECTINA DE ALTA METOXILAÇÃO INCORPORADO COM EXTRATO DE *Schinus terebinthifolius* Raddi.**

Calila T Santos<sup>1,2</sup>; Lissandra C. A. Reis<sup>1</sup>; Alessandro Branco<sup>1</sup>; Geany Peruch Camiloto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Saúde. Faculdade de Farmácia. Universidade Estadual de Feira de Santana. Brasil.*

<sup>2</sup>*Instituto Federal de Ciência. Educação e Tecnologia Baiano. Campus do Senhor do Bonfim. Brasil.*

<sup>3</sup>*Departamento de Tecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana. Brasil.*

**RESUMO:**

No presente estudo, o objetivo foi o desenvolvimento de filmes à base de pectina de alta metoxilação, incorporados com extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi, com propriedades físicas e funcionais para seu emprego como embalagens bioativas. Avaliou-se os parâmetros mecânicos, de permeabilidade e térmicos dos filmes de pectina de alta metoxilação plastificados com glicerol incorporado com extratos de frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Dos 17 extratos extraídos por micro-ondas focalizado escolheu-se 2, “Extrato 2” e “Extrato 8” em concentrações diversas (0, 1, 3 e 5%). Os filmes apresentaram espessura médias de 0.007 para todas as concentrações dos extratos testados. Em relação as propriedades mecânicas podem-se observar que houve uma interação dos componentes polifenólicos dos extratos com os materiais utilizados na produção dos filmes, já que a adição dos extratos provocou efeito de aumento e diminuição das propriedades de tração dos filmes. Os filmes produzidos no presente estudos foram mais permeáveis ao vapor d’água (6.18 – 7.80 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa) do que o filme controle (5.12 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa). Os filmes de ambos extratos mostraram uma boa estabilidade térmica independente da concentração testada, ou seja, a incorporação dos extratos 2 e 8 não influenciaram a estabilidade térmica do polímero. Os filmes produzidos neste estudo apresentaram atividade antioxidante, sendo que os filmes adicionados do extrato 8 apresentaram os melhores valores de %SRL nas concentrações de 3 e 5% (54.45 e 67.08% respectivamente). A medida que as concentrações de extratos aumentaram, maior a inibição dos micro-organismos testados, para ambos extratos. De maneira geral, os filmes incorporados com o extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi tiveram boas propriedades de tração, térmicas e propriedades antioxidante e antimicrobiana podendo ser considerados como uma alternativa na produção de filmes ativos.

**PALAVRASCHAVE:** Bioativos. Propriedades mecânicas. Pimenta rosa.

## 1 INTRODUÇÃO

A deterioração de alimentos decorre de diversos fatores, entre eles estão os danos causados pela autoxidação de lipídios (rancidez oxidativa) e pela contaminação microbiana.

A deterioração microbiana ocorre devido aos alimentos terem uma grande quantidade de nutrientes e substratos metabolizáveis, reunindo por isso, condições ideais para o crescimento de micro-organismos, para minimizar isso a indústria utiliza de conservantes ou agentes antimicrobianos.

A rancidez oxidativa é a principal responsável pela deterioração de alimentos ricos em lipídios, porque resulta em alterações indesejáveis de cor. Sabor, aroma e consistência do alimento. A oxidação se dá, basicamente, pela ação dos radicais livres que reagem com os lipídeos presentes nos alimentos. Para diminuir a ação desses radicais livres podem-se utilizar agentes antioxidantes (CHEN et al., 2012). Os antioxidantes são substâncias que podem prevenir a ação desses radicais impedindo a oxidação de alimentos que podem acarretar no desenvolvimento de sabores estranhos, alterações de cor e sabor e perdas nutricionais (MARCOS et al., 2014).

A indústria de alimentos tem se adaptado aos crescentes requerimentos do consumidor, que tem se mostrado mais preocupado com a segurança alimentar e mais exigente com relação aos níveis de qualidade dos alimentos. Muitos métodos de conservação de alimentos têm sido modificados para reduzir a severidade de técnicas mais extremas, com o objetivo de melhorar a qualidade dos produtos obtidos e, conseqüentemente, aumentar sua aceitação no mercado consumidor. Além dessas técnicas modificadas, algumas novas têm surgido, basicamente com o mesmo objetivo.

Os filmes bioativos surgem como uma técnica nova de conservação dos alimentos. Isto porque além de funcionarem muito bem como barreiras parciais de vapor e de gases, podem ser ótimos carreadores de aditivos, tais como, agentes antioxidantes, antimicrobianos, aromatizantes, corantes e outras substâncias funcionais, os quais auxiliam na manutenção da qualidade e melhoram o valor nutricional dos alimentos (MARTÍN-BELLOSO, ROJAS-GRAÜ e SOLIVA-FORTUNY, 2009; OLIVAS e BARBOSA-CÁNOVAS, 2009). A busca por materiais de embalagem biodegradáveis produzidos a partir de fontes renováveis, visando a redução de problemas ambientais, têm aumentado a cada dia. Sabe-se que os filmes à base de biopolímeros podem ser considerados uma alternativa aos materiais sintéticos (KROCHTA, 2002; TORRES, 1994). Aliado a isso, nos últimos anos, tem havido uma demanda por

embalagens que ofereçam melhorias sobre a vida útil de alimentos, sendo que, o principal fator apontado como causador da perda de qualidade é a oxidação (HONG; KROCHTA, 2006; LI et al., 2014).

Entre os biopolímeros utilizados na produção de embalagens biodegradáveis temos o amido, a quitosana, pectina, as proteínas. A pectina é um dos principais componentes da parede celular da planta, constituída quimicamente por ácidos poli  $\alpha$  1- 4galacturônicos. De acordo com o seu grau de esterificação com metanol, a pectina pode ser classificada como pectina de alta metoxilação (ATM) ou pectina de baixa metoxilação (BTM) (SILA et al., 2009). Na indústria de alimentos, a pectina está listada como geralmente reconhecida como segura (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA, 2013) e é usada como agente gelificante, estabilizador ou espessante em produtos alimentares tais como compotas, bebidas de iogurte, bebidas de leite com sabor e sorvete (LAURENT e BOULENGUER, 2003). Devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, comestibilidade e propriedades químicas e físicas versáteis (tais como gelificação, permeabilidade seletiva aos gases, etc.), a pectina é uma matriz polimérica adequada para a elaboração de filmes comestíveis destinados a embalagens alimentares ativas (ESPITIA et al., 2013).

Considerando a quantidade e o baixo custo da pectina produzida como subproduto da agricultura e da indústria alimentar, bem como uma boa propriedade de formação de filme, torna-se um candidato digno para ser usado em embalagens de alimentos baseadas em biopolímeros.

Considerando a quantidade e o baixo custo da pectina produzida como subproduto da agricultura e da indústria alimentar, bem como uma boa propriedade de formação de filme, torna-se um candidato digno para ser usado em embalagens de alimentos baseadas em biopolímeros.

Agentes antioxidantes oriundos de fontes naturais, como extratos de plantas, surgem como uma possível alternativa à substituição dos agentes sintéticos e sua adição em filmes à base de biopolímeros possibilita a produção de embalagens ativas (BITENCOURT et al., 2014). Atualmente as pesquisas sobre embalagens biodegradáveis de alimentos, tem focado na utilização de agentes antioxidantes de fontes naturais, como extratos de plantas. Devido ao uso de antioxidantes sintéticos, como o BHA (butil-hidroxi-anisol) ou BHT (butil-hidroxi-tolueno), ser questionado, sobretudo em relação à sua toxicidade (DEL RÉ; JORGE, 2012; LI et al., 2014; MARCOS et al., 2014).

Vários estudos sobre filmes ativos têm sido realizados com antioxidantes naturais, principalmente compostos fenólicos presentes em extratos de vegetais. Gómez-Guillén et al.

(2007) estudaram a adição de extrato aquoso de murta (*Ugni molinae Turcz*) em filmes de gelatina de peixe, Moradi et al. (2012) e Cerqueira et al. (2010) produziram filmes ativos a base de quitosana aditivado com extrato de semente de uva, e filmes de galactomanana com extrato de semente de acácia, respectivamente. Norajit, Kim e Ryu (2010) desenvolveram filmes ativos a base de alginato contendo extrato aquoso de ginseng. Li et al. (2014) estudaram a adição de outros extratos em filmes de gelatina de peixe, como o extrato de semente de uva e o extrato de gengibre. Bitencourt et al. (2014) estudaram a produção de filmes ativos de gelatina adicionados de extrato de cúrcuma. Todos eles declaram que os filmes produzidos pelos mesmo possuíam atividades antioxidantes.

Os frutos de *Schinus terebinthifolius* pertencente à Família Anacardiaceae, originária da América do Sul, especialmente do Brasil, Paraguai e Argentina, ainda não foram empregados em estudos sobre filmes com atividade antioxidante/antimicrobiana. É utilizada principalmente na medicina popular, no tratamento de doenças venéreas, reumatismo, diarreias, dores, gengivite e febre (NGOKWEY, 1995; STASI et al., 2002). Na literatura, é possível encontrar muitas informações sobre suas substâncias bioativas relacionadas às propriedades antioxidantes e antimicrobiana (VELAZQUEZ et al., 2003; SCHMOURLO et al., 2005; KASSEM, et al., 2004; EL-MASSRY, et al., 2009), podendo ser, portanto, uma boa fonte de antioxidantes naturais a ser aplicada em filmes bioativos.

Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar filmes de pectina de alta metoxilação incorporados com extrato hidroetanólico otimizado por micro-ondas focalizado de frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL E REAGENTES**

Na produção dos filmes utilizou-se pectina de alta metoxilação (grau de metoxilação =) em pó doada pela empresa CPKelco Brasil. Como plastificante, foi utilizado o glicerol (Synth, Brasil). Cloreto de cálcio granulado (Ecibra, São Paulo, Brasil). Cloreto de sódio (Synth, Diadema, Brasil). Turrax (IKA® RW 20 digital). Micrômetro manual (Mitutoyo, modelo MDC-25S, resolução 0,01 mm, Japão). Texturômetro T.A. XT Plus (Stable Micro System SMD, Inglaterra), TGA, PerkinElmer, modelo 4000, USA.

### **2.2 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE PECTINA DE ALTA METOXILAÇÃO (ATM)**

Preparou-se suspensões aquosas de pectina de alta metoxilação (5% m/v) e glicerol (30% m/m pectina) sob agitação de 1500 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente com auxílio do equipamento Turrax. As suspensões foram incorporadas com extrato hidroetanólico otimizado de frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi em diferentes concentrações (0, 1, 3 e 5 % g/g pectina). Escolheu-se dois dos 17 extratos do micro-ondas focalizado para serem estudados denominados “Extrato 2” (a melhor atividade antimicrobiana) e “Extrato 8” (melhor atividade antioxidante).

Espalhou-se as soluções filmogênicas sobre placa de vidro (30 x 40 cm) com auxílio de um bastão de vidro. Fita crepe adesiva foi enrolada nas pontas do bastão para controlar a espessura dos filmes. Deixou-se as placas sobre uma superfície plana em temperatura ambiente por 24 horas. Após os filmes secos, foram retirados das placas e alocados em sacos plásticos, para proteção de agentes externos. Os filmes obtidos foram condicionados em refrigerador à temperatura de 10°C.

## 2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES ATIVOS

### 2.3.1 Espessura. $\delta$

A espessura dos filmes foi obtida pela média aritmética dos valores de dez medidas aleatórias em diferentes pontos para os filmes com o Extrato 2 e Extrato 8 nas concentrações estudadas. Utilizou-se para obter a espessura um micrômetro manual, resolução 0.01 mm.

### 2.3.2 Propriedades mecânicas

As propriedades de resistência máxima à tração a tensão (RMT) e alongamento na ruptura (AR) foram avaliadas por meio do ensaio de tração em texturômetro seguindo o método padrão D-882 (ASTM, 2009), com separação entre as garras de 100 mm e com velocidade de 5 mm/min. Doze amostras de filmes (para cada formulação) com dimensões de 10 x 2 cm tiveram a espessura pré-determinada pela média aritmética em pontos aleatórios nos filmes. Um microcomputador foi utilizado para registrar as curvas de tensão-deformação. A RMT foi determinada a partir da Equação 1, na qual a força máxima no rompimento é dividida pela área da seção transversal (espessura x largura). O AR foi determinado pela Equação 2 que relacionada a distância final da separação das garras pela distância inicial da separação.

$$\text{Equação 1: } RMT = \frac{F_m}{A_s}$$

$$\text{Equação 2: } AR = \frac{d}{d_0} \times 100$$

Onde: RMT é a tensão na ruptura [MPa]

$F_m$  é a força máxima [N]

$A_s$  é a seção transversal da amostra do filme [ $m^2$ ]

AR é o alongamento na ruptura [%]

$d$  é a distância final de separação das garras [cm]

$d_0$  é a distância inicial de separação das garras [cm].

### 2.3.3 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada gravimetricamente segundo teste ASTM E96 (ASTM. 2010). Os filmes, em forma de disco com 4.4 cm de diâmetro, foram colocados em célula (Figura 1) contendo cloreto de cálcio granulado (15 g), formando uma membrana de modo a garantir que a difusão de umidade ocorra exclusivamente através dos filmes.



**Figura 1-** As células com os filmes.

A célula foi colocada dentro de uma câmara dessecadora (Figura 2) contendo uma solução saturada de cloreto de sódio (para manter o ambiente a 75% UR). A célula foi pesada em balança analítica com precisão de 0.0001 g. a cada 12 h. durante 9 dias consecutivos. O ensaio foi realizado em triplicata para todas as formulações em estudo.



**Figura 2** - Câmara dessecadora.

A permeabilidade foi calculada por meio da Equação 3, é expressa como g.mm/m<sup>2</sup>h.KPa.

$$\text{Equação 3: } PVA = \frac{TPVA \cdot e}{(P_e - P_i)}$$

Em que: PVA é a permeabilidade ao vapor de água (g.mm/m<sup>2</sup>hKPa) e= espessura (mm);  
 $P_e$  = Pressão de vapor fora da cápsula (Pa);  $P_i$  = Pressão de vapor dentro da cápsula (Pa)

#### 2.3.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica e a degradação dos filmes foram analisadas por análise termogravimétrica (TGA). Amostras pesando aproximadamente 8 – 10 mg foram aquecidas de 25 a 600 °C a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup>. Sendo analisado uma única amostra de cada formulação. As curvas de TGA e DTG (derivada termogravimétrica) foram utilizadas na interpretação dos dados.

#### 2.3.5 Atividade antioxidante pela captura de radicais livres com o teste de DPPH

Pesou-se aproximadamente 100 mg de filme em um béquer e adicionou-se 2 mL de etanol, deixou-se sob agitação por 3 horas à temperatura ambiente (~25°C) e protegido da luz, isso foi realizado para todas as formulações testas em triplicata.

A atividade antioxidante dos filmes foi medida usando o radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH). Após a preparação da amostra, separou-se 500 µL de sobrenadante em outro recipiente e adicionou-se 2 mL de solução etanólica do radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) 0.06 mM. A mistura foi agitada por 30 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. O DPPH remanescente foi determinado por absorvância a 517 nm usando leitora de microplacas. O controle usado foi 500 µL de solução etanólico de DPPH (0.06mM) sem a presença do filme e para o branco utilizou-se apenas etanol. A percentagem de sequestro de radicais livres (%SRL) foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$\text{Equação 4: } \%SRL = 100 \times [ (Ac - Aa) / Ac ]$$

Onde: Ac é a absorvância do controle. Aa é a absorvância das amostras.

### 2.3.6 Atividade antibacteriana

O método de difusão em ágar foi executado como teste qualitativo para verificar a atividade antibacteriana dos filmes. Esta análise foi conduzida segundo Rojas-Graü et al. (2006) com algumas adaptações. Foram assepticamente cortados discos de 1cm de diâmetro e submetidos a radiação UV por 30 minutos de cada lado, sendo posteriormente colocados em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. As culturas das bactérias foram inoculadas por espalhamento nas placas com auxílio de uma alça de Drigalski, num volume de 200 µL ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Testou-se cepas de *Staphylococcus aureus* (CCMB 263), *Escherichia coli* (CCMB261). O teste foi realizado em triplicata, para todas as formulações estudadas, e os resultados foram expressos em centímetros pela média aritmética dos valores dos halos obtidos nas três repetições.

## 2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Utilizou-se um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) para a produção dos filmes com 3 repetições para cada concentração de cada extrato. O programa Statistica® (Microsoft. USA) foi usado para análise dos dados, os quais foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Tukey.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filmes resultantes apresentaram boa aparência visual, superfície contínua, homogênea e livre de bolhas.

Apesar de importante para uniformidade dos filmes e para confiabilidade das medidas realizadas, o controle da espessura de filmes é difícil, sobretudo no processo de produção do tipo *casting* (SOBRAL. 2000). Os diferentes filmes obtidos apresentaram espessura média de 0.07 mm ± 0.03.

Mesmo o processo sendo manual conseguiu-se uma pequena variação na espessura. Entre os fatores de variação não foi controlado a força aplicada na elaboração dos filmes, sendo assim não se pode comparar os tratamentos. Bitencourt et al. (2014), trabalhando com filmes de gelatina com extrato de cúrcuma, também não observaram efeito da adição do extrato na

espessura dos filmes. Isso reforça a hipótese de que o extrato não influencia na espessura dos filmes ativos.

Batista e colaboradores, 2005, trabalhando com filmes de pectina/cálcio incorporados de ácidos graxos apresentaram espessura média de  $0,066 \pm 0,005$  mm valor bem próximo dos filmes elaborados nesse trabalho.

Analisando-se os resultados de AR para o extrato 2 (Tabela 1), observa-se que todos os tratamentos difeririam entre si ( $p < 0,05$ ) sendo que o filme com 5% do extrato apresentou o maior percentual de alongação dentre as formulações (21,60%).

Nos filmes incorporados com extrato 8 observou-se que as concentrações de 1 e 3% diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) do controle. A concentração de 5% não apresentou diferença significativa com o controle e a o filme com 3% de extrato. O filme com 1% de extrato apresentou a maior medida de alongação (24,14%).

**Tabela 1** - Médias ( $\pm$  desvio padrão) das análises de caracterização das formulações de biofilmes e controle (0),  $\delta$  (mm); PVA (g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa), parâmetros mecânicos: AR(%) e RTM (MPa) e atividade antioxidante (%SRL)

EXTRATO 2					
%	$\delta$	AR	RTM	PVA	%SRL
0	0,06 $\pm$ 0,00	20,23 <sup>b</sup> $\pm$ 0,39	90,69 <sup>b</sup> $\pm$ 1,66	5,12 <sup>b</sup> $\pm$ 0,27	27,62 <sup>b</sup> $\pm$ 5,28
1	0,07 $\pm$ 0,01	14,80 <sup>d</sup> $\pm$ 0,78	96,14 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,23	7,27 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,31	25,87 <sup>b</sup> $\pm$ 1,07
3	0,07 $\pm$ 0,00	18,48 <sup>c</sup> $\pm$ 0,36	98,95 <sup>a</sup> $\pm$ 1,63	7,80 <sup>a</sup> $\pm$ 0,53	26,70 <sup>b</sup> $\pm$ 0,55
5	0,06 $\pm$ 0,01	21,60 <sup>a</sup> $\pm$ 0,37	75,32 <sup>c</sup> $\pm$ 4,51	7,43 <sup>a</sup> $\pm$ 0,97	47,66 <sup>a</sup> $\pm$ 2,35
EXTRATO 8					
0	0,06 $\pm$ 0,00	20,23 <sup>b</sup> $\pm$ 0,39	90,69 <sup>a</sup> $\pm$ 1,66	5,12 <sup>b</sup> $\pm$ 0,27	27,62 <sup>b</sup> $\pm$ 5,28
1	0,07 $\pm$ 0,00	24,14 <sup>a</sup> $\pm$ 0,32	77,12 <sup>c</sup> $\pm$ 2,94	6,18 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,51	30,66 <sup>b</sup> $\pm$ 5,20
3	0,06 $\pm$ 0,00	18,15 <sup>c</sup> $\pm$ 0,83	83,43 <sup>b</sup> $\pm$ 1,37	6,42 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,23	54,45 <sup>a</sup> $\pm$ 3,74
5	0,07 $\pm$ 0,00	19,17 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,38	89,03 <sup>a</sup> $\pm$ 1,35	7,21 <sup>a</sup> $\pm$ 0,83	67,08 <sup>a</sup> $\pm$ 6,20

Valores que apresentam a mesma letra, numa mesma coluna, não apresentam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) pelo Teste de Tukey a 95% de confiança.

Bitencourt et al. (2014) trabalharam com filmes de gelatina plastificados com sorbitol e adicionados de extrato etanólico de cúrcuma e constataram aumento na tensão na ruptura e alongação na ruptura dos filmes adicionados do extrato.

Em relação a resistência a tração observa-se que os filmes adicionados do extrato 2 a concentração de 1% não difere do controle e da concentração de 3%. Enquanto que o filme com 5% de extrato difere significativamente dos demais. Assim sendo podemos inferir que a incorporação dos extratos promove alteração de maneira geral nos percentuais deste parâmetro nos filmes. Na literatura, podem ser encontrados dados diferentes sobre o efeito de extratos de plantas sobre a resistência mecânica de películas biopoliméricas.

A adição de extrato de orégano (em concentrações 0.03 e 1% p/v) não teve efeito sobre resistência a tração de filmes de isolado de proteína de soja (PRUNEDA et al., 2008). Por sua vez, a adição de extratos de chá verde (2 e 20% p/v) reforçou filmes de quitosana (SIRIPATRAWAN e HARTE. 2010).

Li et al. (2014), analisando as propriedades mecânicas de filmes de gelatina de pele de peixe e glicerol adicionados de extratos de chá verde, de folhas de “gingko”, de gengibre e de semente de uva, concluíram que a incorporação destes extratos, na maioria das vezes, causou uma diminuição significativa na tensão e alongação na ruptura e, raramente, não interferiu significativamente em tais resultados.

Dessa forma, pode-se supor que houve uma interação dos componentes polifenólicos dos extratos dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi com a pectina ATM e glicerol, já que a adição dos extratos provocou efeito de aumento e/ou diminuição das propriedades de tração dos filmes.

Os resultados apresentados na Tabela 1 indicam que para os filmes incorporados com os extratos houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle na PVA.

A adição dos extratos em baixas concentrações (1%) já promove um aumento nos valores de permeabilidade ao vapor de água, que para o extrato 2 variou de 7,27 a 7,8 g.mm/m<sup>2</sup>h.kPa e de 6,18 a 7,21 g.mm/m<sup>2</sup>h.kPa, para o extrato 8, quando comparadas com o controle (4,48 g.mm/m<sup>2</sup>h.kPa).

Pela análise dos dados podemos inferir que a incorporação dos extratos, tanto o 2 quanto o 8, tornaram os filmes mais permeáveis ao vapor d'água. Porém quando analisamos as concentrações testadas, as mesmas não diferem entre si ( $p < 0,05$ ) para cada extrato.

Lim et al. (2010) relataram que a permeabilidade ao vapor de água das películas de *Gelidium corneum* (GC) aumentou com a adição de extrato de semente de uva ou timol. Este aumento da permeabilidade ao vapor de água pode ser devido à perda de interações intermoleculares entre a rede GC e aumento do tamanho do poro do filme por adição de extrato de semente de uva.

Kowalczyka e Biendlb (2016) estudando a incorporação de extrato etanólico de lúpulo em várias bases para películas observaram um aumento da permeabilidade do vapor de água em filmes baseados em polissacáridos enquanto não teve qualquer efeito sobre os filmes à base de proteínas. Os autores justificaram que o extrato etanólico de lúpulo afetou a estabilidade das emulsões filmogênicas de diferentes formas ou que o extrato etanólico de lúpulo interferiu com a formação da rede de gel de polissacarídeo, aumentando o volume livre e a permeabilidade do filme.

Souza e colaboradores (2010) afirmam que filmes à base de polissacarídeos, normalmente, são transparentes e oferecem moderada barreira contra oxigênio e dióxido de carbono sendo bastante compatíveis com outros materiais, entretanto possuem alta permeabilidade ao vapor de água e alta solubilidade em água, além de baixas propriedades mecânicas.

A percentagem de sequestro de radicais livre (%SRL) dos filmes produzidos com as diferentes concentrações dos extratos analisados são apresentados na Tabela 2. Analisando os resultados observa-se que no extrato 2 a maior concentração foi quem apresentou um melhor %SRL, sendo a única que diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ). Analisando os resultados para o extrato 8 pode-se inferir que os valores de %SRL foram melhores, sendo que as concentrações 0 e 1% não diferiram entre si ( $p < 0,05$ ) assim como as concentrações 3 e 5%.

Moradi et al. (2012) afirmaram que o poder antioxidante do filme é proporcional à quantidade de aditivos antioxidantes adicionados, isso pode justificar os resultados obtidos, quanto maior a quantidade de extrato, maior foi o percentual de inibição do radical DPPH. Noronha et al. (2014) obteve filmes a base de metil celulose com adição de  $\alpha$ -tocoferol com porcentagens de inibição próximas às obtidas neste trabalho (entre 30 e 60%).

A incorporação de extratos de chá verde, folhas de murta e borragem em quitosana e películas à base de gelatina resultou em atividade antioxidante aumentada. A atividade antioxidante nos extratos foi fortemente correlacionada com a presença de compostos fenólicos (WANG et al., 2012).

Os filmes produzidos neste estudo apresentaram, de forma geral, atividade antioxidante, sendo que os filmes adicionados do extrato 8 não diferiram entre si para os valores de %SRL nas concentrações de 3 e 5% (54,45 e 67,08, respectivamente).

A análise termogravimétrica tem sido aplicada a filmes biodegradáveis com objetivo de fornecer informações sobre a sua estabilidade térmica.

O comportamento da pectina, dos extratos 2 e 8, do filme controle (FC) e dos filmes incorporados com diferentes concentrações de extrato estão ilustrados nas Figuras 3 e 4 e os eventos e as respectivas perdas de massa descritos na Tabela 2.

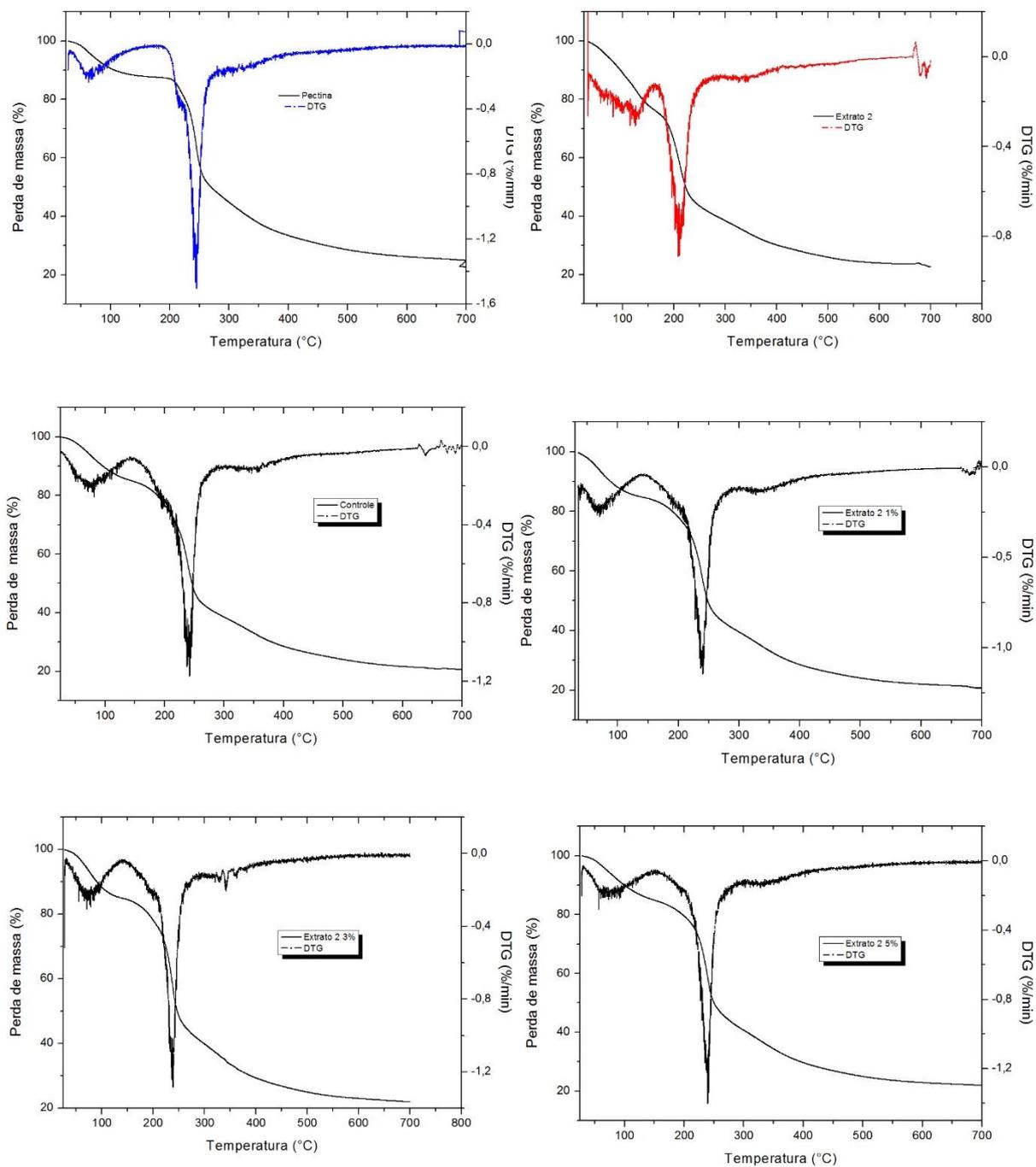
Através da análise das curvas de TG e DTG da pectina ATM (Figura 3) observou dois estágios térmicos, o primeiro entre 32- 62°C relativo a perda de água e outro entre 208- 274°C que pode ser considerado como a degradação da pectina.

De acordo com Ghaffari e colaboradores (2007), a pectina pura tem o primeiro evento térmico com perda de peso de até 10% na faixa de 50-100°C, relacionada à evaporação da água na amostra.

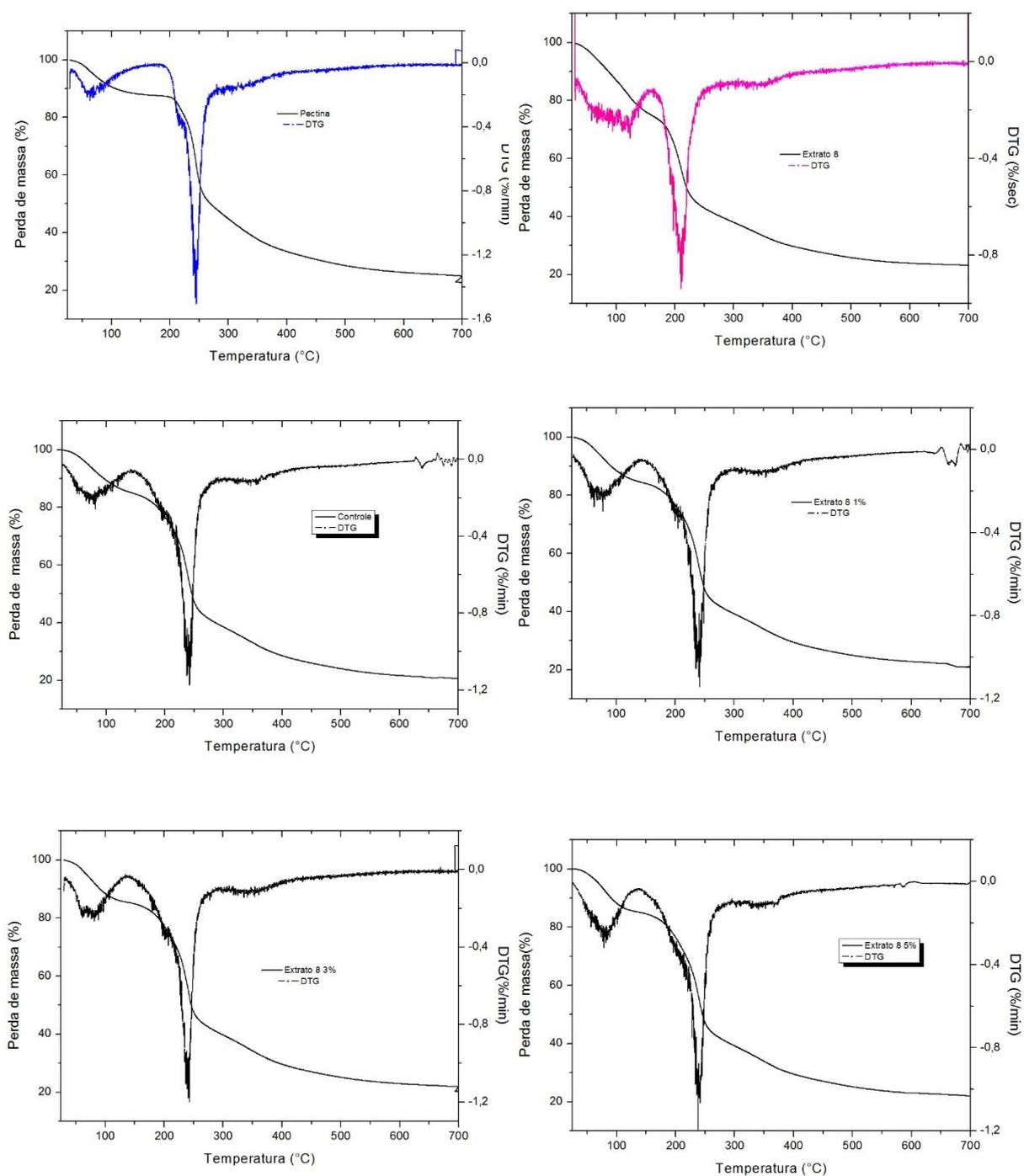
**Tabela 2-** Eventos térmicos e perda de massa dos extratos 2 e 8, do filme controle (FC) e dos filmes com concentrações variadas.

Material	Evento 1		Evento 2		Evento 3	
	T <sub>p1</sub> (°C)	P <sub>1</sub> (%)	T <sub>p2</sub> (°C)	P <sub>2</sub> (%)	T <sub>p3</sub> (°C)	P <sub>3</sub> (%)
<b>Pectina</b>	62	3,77	257	46,33		
<b>Extrato 2</b>						
<b>Extrato</b>	122	15,92	238	54,84	347	65,99
<b>FC</b>	108	11,84	257	55,51	349	66,88
<b>1%</b>	117	13,85	264	55,32	367	68,70
<b>3%</b>	104	12,3	246	50,01	353	66,77
<b>5%</b>	104	10,69	252	50,4	346	65,25
<b>Extrato 8</b>						
<b>Extrato</b>	112	15,98	228	53,26	359	67,55
<b>FC</b>	108	11,84	257	55,51	349	66,88
<b>1%</b>	105	12,15	257	55,51	358	66,92
<b>3%</b>	97	11,28	250	52,50	348	65,60
<b>5%</b>	96	11,11	248	52,33	362	67,50

T<sub>p</sub>: temperatura no pico de degradação em cada evento; P (%): perda de massa observado a cada evento térmico.



**Figura 3:** Curvas de TGA e DTG para o filme controle e para os filmes incorporados de Extrato 2.



**FIGURA 4:** Curvas de TGA e DTG para o filme controle e para os filmes incorporados de Extrato 8.

As TG e DTG dos extratos 2 e 8 e das formulações (independente do extrato e da concentração), apresentaram 3 estágios de perda de massa bem definidos.

Para o extrato 2 o primeiro estágio ocorre no intervalo de 44-122°C. com perda de massa de 15,92%. Para os filmes incorporados com concentrações variadas desse extrato o primeiro estágio ocorre no intervalo de 41-117°C para 1%, perda de 13,85%; para a concentração de 3%

o intervalo é de 37-104°C perda de 12,3% e na concentração de 5% entre 46-104°C com perda de massa de 10,69%. Nesse primeiro estágio geralmente a perda de massa verificada é atribuída ao início da evaporação da água livre ou da água fracamente ligada aos demais componentes (SU et al., 2010; GUERRERO et al., 2011; MARTINS et al., 2012). O segundo estágio ocorre em temperaturas próximas a degradação da pectina (em torno de 250°C) e o terceiro estágio segue o perfil de degradação do extrato puro, conforme a Tabela 2. Quando analisou as TG e DTG do extrato 8 e de seus respectivos filmes, com concentrações diversas observamos que perda de água se apresenta no intervalo de 30-104°C para a contração de 1% (perda de massa de 12,15%), entre 36 a 97°C na concentração de 3% com perda de massa de 11,28% e em 44-96°C para os filmes com adição de 5% de extrato, tendo uma perda de massa de 11,11%, valores bem próximos.

GIANCONE e colaboradores (2011) estudaram a estabilidade térmica de filmes comestíveis de pectina de alta metoxilação com diferentes densidades de superfície por meio de TGA. Curvas TGA de filmes desenvolvidos apresentaram dois estados: o primeiro passo, entre 30 ° C e 150 ° C. devido à perda de água; A segunda etapa estava acima de 250 ° C. causada pela degradação térmica das amostras.

Em estudos sobre a preparação e avaliação físico-química de filmes ternários a base de quitosana/poli (vinil álcool) /pectina, encontraram nas análises termogravimétricas, valores para a degradação desses filmes ternários entre 250 e 350 °C e consideraram como satisfatório o resultado obtido para aplicação em embalagens de alimentos (TRIPATHI et al. .2010)

Analisando os dados podemos inferir que os filmes produzidos nesse estudo independente do extrato ou da concentração testada apresentaram boa estabilidade térmica e a incorporação dos extratos 2 e 8 não influenciaram a estabilidade térmica do polímero.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do efeito dos filmes estudados contra as bactérias Gram positivas e Gram negativas que podem fazer parte da microbiota de alimentos.

Verificou-se que o filme controle (sem adição de extrato) não apresentou atividade inibitória contra as bactérias testadas, o que indica que a pectina não apresenta atividade antimicrobiana.

**Tabela 3-** Efeito da incorporação de diferentes concentrações do extrato 2 do extrato 8 na atividade antimicrobiana dos microrganismos testados.

	Concentração	<i>E. coli</i> (cm)	<i>S. aureus</i> (cm)
<b>Extrato 2</b>	0%	0,00 <sup>c</sup> ±0,0	0,00 <sup>c</sup> ±0,0
	1%	0,50 <sup>b</sup> ±0,0	0,50 <sup>b</sup> ±0,0
	3%	0,45 <sup>b</sup> ±0,07	0,50 <sup>b</sup> ±0,0
	5%	0,90 <sup>a</sup> ±0,14	1,00 <sup>a</sup> ±0,0
<b>Extrato 8</b>	0%	0,00 <sup>c</sup> ±0,0	0,00 <sup>b</sup> ±0,0
	1%	0,30 <sup>bc</sup> ±0,0	0,45 <sup>b</sup> ±0,07
	3%	1,00 <sup>a</sup> ±0,0	0,95 <sup>a</sup> ±0,07
	5%	1,25 <sup>a</sup> ±0,35	1,35 <sup>a</sup> ±0,21

Nas placas inoculadas com *E. coli* houve variação de 0,45 -0,90 no extrato 2 e entre 0,30-1,25 para o extrato 8. Nos filmes adicionados do extrato 2 a concentração de 5% diferiu dos demais e também foi o maior halo de inibição desse extrato para o micro-organismo Gram – negativo. Nos filmes com o extrato 8 a concentração 3% não diferiu da concentração 5%, ambas porém diferem das demais concentrações.

Nas placas inoculadas com *S. aureus*, foi observada inibição de crescimento em todas as concentrações avaliadas com formação de halos de 1 e 0,5 cm para o extrato 2 e entre 0,45-1,35 cm para o extrato 8, nas concentrações testadas. Sendo que para o extrato 2 a concentração de 5% difere significativamente ( $p < 0.05$ ) das demais concentrações e possui o maior halo de inibição do micro-organismo testado. E para os filmes adicionados do extrato 8 repete-se o comportamento observado nas placas inoculadas com *E. coli*.

Quando analisada a interferência da concentração podemos inferir que a medida que as concentrações de extratos aumentaram os halos de inibição são maiores, ou seja quando mais extrato mais inibição. Sendo que o extrato 8 para ambos microrganismos apresentou os maiores valores dos halos de inibição.

Wang e Rhim (2016) analisando películas de polietileno de baixa densidade (LDPE) e poli (lactido) (PLA) com extrato de semente de toranja incorporado de amido termoplástico utilizando métodos de extrusão por sopro e extrusão, observou que as películas apresentaram uma boa atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *Listeria monocytogenes*.

Du et al. (2009) testou três óleos essenciais (pimenta, alho ou orégano) em filmes comestíveis à base de pectina e purê de tomate e testaram sua atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *Salmonella enterica* e *L. monocytogenes*, os resultados indicaram que os filmes comestíveis desenvolvidos apresentaram atividade antimicrobiana contra patógenos testados.

Ahmad et al. (2012) e Bodini et al. (2012) estudando filmes à base de gelatina não observaram nenhuma zona de inibição significativa contra *Staphylococcus aureus*.

Fabra et al (2014) incorporaram lisozima como agente antimicrobiano em filmes de proteína de ervilha e em filmes de amido de milho e comprovaram a eficácia dos filmes contra *Listeria monocytogenes* (bactéria gram-positiva).

#### **4 CONCLUSÃO**

Os filmes a base de pectina de alta metoxilação plastificados com glicerol, adicionados de extratos dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi apresentaram-se homogêneos, com características mecânicas, térmicas e de barreira satisfatórias. Os resultados demonstraram uma ótima interação entre os constituintes dos filmes.

Nos testes *in vitro*, os filmes apresentaram efeito inibitório sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Filmes com maior concentração de extrato apresentaram maiores halos de inibição, evidenciando que os extratos incorporados são os responsáveis pela ação antimicrobiana do filme.

## REFERÊNCIAS

- AHAMAD. M. et al. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids*. v. 28. p. 189-199. 2012.
- ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In: *Annual book of American Standard Testing Methods*. D882-09. Philadelphia. PA. 2009.
- \_\_\_\_\_. Standard test method of water vapor transmission of materials. In: *Annual book of American Standard Testing Methods*. E96-10. Philadelphia. PA. 2010.
- BITENCOURT. C.M. et al. Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. *Food Hydrocolloids*. v. 40. p. 145-152. 2014.
- BODINI. R. B. et al. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. *Food Science and technology*. v. 51. n. 1. p. 104-110, 2012.
- BONILLA. J.; SOBRAL. P. J.A. Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. *Food Bioscience*. v.16. p. 17-25. 2016
- CERQUEIRA. M.A. et al. (2010) Seed extracts of *Gleditsia triacanthos*: Functional properties evaluation and incorporation into galactomannan films. *Food Research International*. v. 43. p. 2031-2038.
- CHEN. T. et al. The isolation and identification of two compounds with predominant radical scavenging activity in hempseed (seed of *Cannabis sativa* L.). *Food Chemistry*. London. v.134. p. 1030–1037. 2012.
- DEGÁSPARI. C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciência e Agrotecnologia* (online). v. 29(3), 617–622.2005.
- DEL RÉ. P.V.; JORGE. N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. Botucatu. SP. v.14, n.2. p 389-399, 2012.
- DU, W. X. et al. Physical and Antibacterial Properties of Edible Films Formulated with Apple Skin Polyphenols. *Journal of Food Science* (online). v.76 (2), p.149-155, 2012.
- EL-MASSRY. K. F.; EL-GHORAB. A. H.; SHAABAN. H. A.; SHIBAMOTO. T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (online). v. 57. p. 5265-70, 2009.
- ESPITIA. P. J. P. et al. Edible films from pectin: physical-mechanical and antimicrobial properties-a review. *Food Hydrocolloids* (online). v. 35. p. 287-296.2014.

FABRA, M. J.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHIRALT, A. Lysozyme release from isolate pea protein and starch based films and their antimicrobial properties. *LWT-Food Science and Technology* (online). v. 55(1). p. 22-26. 2014.

FDA. Part 184d Direct food substances affirmed as generally recognized as safe. Subpart B- Listing of specific substances affirmed as GRAS. 184.1588-pectins. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=184.1588> . Acessado em 10.01.2017

GHAFFARI, A. et al. Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit intended for sigmoidal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 67. p. 175–186.2007

GIANCONE, T. et al. Effect of surface density on the engineering properties of high methoxyl pectin based edible films. *Food and Bioprocess Technology*. 4(7). 1228 e 1236. 2011.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. et al. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food Hydrocolloids*. v.21. p. 1133–1143. 2007.

GRISI, C. V. B.; SILVA, L. T.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E. C.; DRUZIAN, J. I. Evaluation of the viability of incorporating natural antioxidants in biobased packagings. Nova Science Publishers - *Food Chemistry Research Developments*. v. 1. p. 1-11. 2008.

HONG, S. I.; KROCHTA, J. M. Oxygen barrier performance of whey-proteincoated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. *Journal of Food Engineering*. v.77. p. 739-745. 2006.

KASSEM, M. E.; EL-DESOKY, S.; SHARAF, M. Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. *Chemistry of Natural Compounds*. p. 40. p. 447-50. 2004.

KESTER, J. J. and Fennema, O. Resistance of lipid films to oxygen transmission. *J. Am. Oil Chem. Soc.* v. 66. p.1129-1138. 1989.

KOWALCZYKA, D.; BIENDLB, M. Physicochemical and antioxidant properties of biopolymer/candelilla wax emulsion films containing hop extract – A comparative study. *Food Hydrocolloids*. v. 60. p.384–392. 2016

KROCHTA, J.M. Chapter 1. Proteins as Raw Materials for Films and Coatings: Definitions. Current Status and Opportunities. In: GENNADIOS, A. *Protein-Based Films and Coatings*. 2002.

LAURENT, M. A.; BOULENGUER, P. Stabilization mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin. *Food Hydrocolloids*. 17(4). 445-454. 2003.

LI, J.-H. et al. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*. v.37. p. 166-173. 2014.

- LIM, G.-O., JANG, S. A., SONG K.B. Physical and antimicrobial properties of Gelidium corneum/nano-clay composite film containing grapefruit seed extract or thymol. *J. Food Eng.*, v. 98:415–420. 2010.
- MARCOS, B. et al. Development of biodegradable films with antioxidant properties based on polyesters containing  $\alpha$ -tocopherol and olive leaf extract for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*. v. 1. p. 140-150. 2014.
- MCHUGH, T. H. Effects of macromolecular interactions on the permeability of composite edible films. In *Macromolecular Interactions in Food Technology*. Parris, N., Kato, A., Creamer, L., Pearce, J. (eds.). *American Chemical Society*. pp. 134-144. 1996.
- MORADI, M. et al. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT – Food Science and Technology*. v. 46. n. 2, p. 477-484, 2012.
- MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water barrier of starch-based films. *Food hydrocolloids*. v.23. n.9. p. 1328-1333. 2009.
- NGOKWEY, N. Home remedies and doctors' remedies in Feira (Brazil). *Social Science e Medicine*. v.40. n. 8. p. 1141-1153. 1995.
- NORAJIT, K.; KIM, K.M.; RYU, G.H. Comparative studies on characterization and antioxidante properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*. v. 98. n. 3. p. 377-384. 2010.
- NORONHA, C. M. et al. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with  $\alpha$ -tocopherol nanocapsules. *Food Chem.*, v.159, p. 529-535, 2014.
- PRUNEDA, E. et al. Water vapor permeability, mechanical properties and antioxidant effect of Mexican oregano-soy based edible films. *Journal of Food Science*, 73, 2008.
- ROJAS-GRAU, M.A. et al. Browning inhibition in fresh-cut 'Fuji' apple slices by natural antibrowning agents. *Journal of Food Science*, vol. 71, p. 59-65, 2006.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. *Food Engineering Reviews*, v.3 (1), p. 1-16, 2011.
- SCHMOURLO, G. et al. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p. 563-8. 2005.
- SILA, D. N. et al. Pectins in processed fruits and vegetables: part II - structure - function relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 8(2). 86-104. 2009.
- SIRIPATRAWAN, U., HARTE, B. R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770 e 775, 2010.

- SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 35(6), p. 1-14, 2000.
- SOUZA, A.C. et al. Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. *LWT - Food Science and Technology*, v. 46, pp 110-117, 2012.
- SOUZA, A.C.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C.C. Chapter 17: Biodegradable Films Based on Biopolymers for Food Industries. In: PASSOS, M.L.; RIBEIRO, C.P. (Ed.). *Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products*. CRC Press. p. 511-537. 2010.
- SRINIVASA, P. C.; RAMESH, M. N.; THARANATHAN, R. N. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*. v. 21(7), p. 1113-1122. 2007.
- TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly (vinyl alcohol)/pectin ternary film for food-packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 79. n. 3, p.711–716, 2010.
- VELAZQUEZ, E. et al. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*. v. 74. p. 91-7. 2003.
- WANG, L.-F., RHIM, J.-W. Grapefruit seed extract incorporated antimicrobial LDPE and PLA films: Effect of type of polymer matrix. *LWT - Food Science and Technology*. 2016.
- WANG, S. et al. Fortification of dietary biopolymers-based packaging material with bioactive plant extracts. *Food Research International*. 49(1). 80–9, 2012.
- WRONA, M et al. Development and characterization of HPMC films containing PLA nanoparticles loaded with green tea extract for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 156, p. 108-117, 2017.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho contribuiu cientificamente para o estudo fitoquímico e biológico de frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi oriundos do semiárido baiano, visando conhecer seu potencial antioxidante, antimicrobiano e inibidor da acetilcolinesterase. Além de melhorar o processo de extração dos seus constituintes químicos comparando dois métodos de extração. Este estudo demonstra que EAMF é adequado como um processo de extração rápida e eficiente.

As análises de atividade antioxidante sinalizou que o extrato que apresentou mais próximo do padrão (ácido ascórbico e Rutina) foi o extrato EAMF 8, tendo como parâmetros temperatura de 51°C, composição de etanol a 75% e no tempo de extração de 25 min.

Os extratos dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi apresentou potencial para controlar os patógenos estudados, sendo que o melhor extrato pode ser considerado o extrato EAMF 2. Os extratos obtidos por ultrassom assistida apresentaram melhor inibição de acetilcolinesterase, destacando o EAU 12.

Através nas análises de CLAE-DAD, CLAE-ESI-EM/EM, CG-ESI-EM e RMN pode-se identificar as seguintes substâncias: agathisflavona, tetrahidrorobustaflavona, ácido masticadienoico (Z), ácido masticadienoico (E), schinol, ácido gálico, esqualeno, além de uma mistura com perfil de ácidos graxos insaturados e outra mistura com perfil de trissacarídeos.

Dos 17 extratos no micro-ondas focalizado escolheu-se 2, denominados “Extrato 2” e “Extrato 8” em concentrações diversas (0, 1, 3 e 5%) para serem incorporados em uma embalagem ativa a base de pectina de alta metoxilação plastificada com glicerol, avaliando os parâmetros mecânicos, de permeabilidade e térmicos, atividade antioxidante e antimicrobiana da mesma. De maneira geral extratos dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi incorporados aos filmes de pectina, melhoram as propriedades dos mesmos.

Podemos inferir que os filmes apresentaram características satisfatórias e demonstraram potencial antimicrobiano e antioxidante. Entretanto existe a necessidade de estudos adicionais, que avaliem a ação desses filmes em matrizes alimentares, onde as condições de armazenamento, juntamente com as características dos produtos e suas possíveis interações com os filmes, irão demonstrar a eficácia real da embalagem ativa.

Os frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi pode ser considerado como uma fonte potencial de antioxidantes, com atividade antimicrobiana e alta inibição de acetilcolinesterase podendo ser utilizada em vários campos, tais como cosméticos, produtos nutracêuticos e na indústria alimentar.

Como trabalho futuro sugere-se aprofundar a caracterização dos filmes através de análises de solubilidade, isotermas de sorção, permeabilidade ao oxigênio, testes de perfuração, DSC, entre outras; escolher a melhor concentração das variáveis estudadas através de análise estatística para posterior aplicação do filme em um alimento e dessa forma estudar a interação entre o filme e o produto; aplicar em queijos e derivados cárneos prato e verificar o seu comportamento. E em relação aos extratos otimizar a inibição da acetilcolinesterase dos extratos obtidos por ultrassom, com o intuito de melhorar ainda mais os resultados obtidos.

# APÊNDICE

## APÊNDICE 1 – TABELAS DA ANOVA

**Tabela 1:** ANOVA para as respostas Compostos Fenólicos Totais. Flavonoides Totais e Percentagem de Sequestro de Radical Livre nas diferentes condições de extração por micro-ondas focalizado (EAMF), obtida a partir dos valores codificados das variáveis independentes.

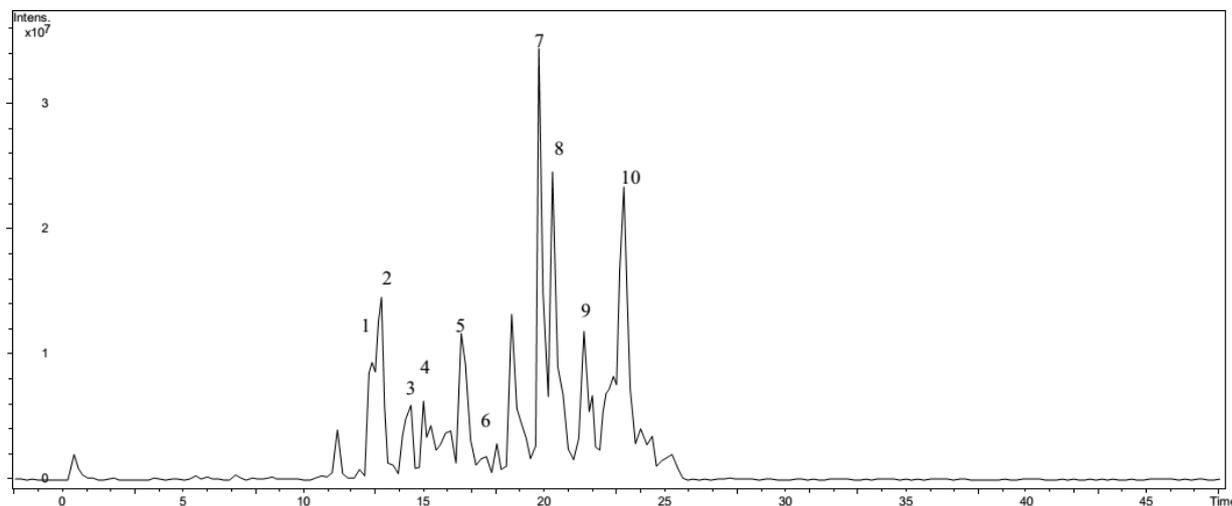
EAMF							
Parâmetros	Coefficiente de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Grau de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F <sub>calc</sub> *	F <sub>f. de ajuste</sub> **	R <sup>2</sup>
Fenolicos Totais	Regressão	22977621.1	9	2872202.6	1.01	2.0	0.57
	Resíduo	17129467.5	7	2854911.3			
	Total (SS)	40107089	16				
Flavonoides Totais	Regressão	763257.7	9	84806.4	1.8	3.6	0.70
	Resíduo	329444.0	7	47063.4			
	Total (SS)	2805932.0	16				
%Sequestro de Radical Livre	Regressão	2693.8	8	336.7	1.3	1.5	0.64
	Resíduo	1499.3	7	249.9			
	Total (SS)	3918.2	15				

**Tabela 2:** ANOVA para as respostas Compostos Fenólicos Totais. Flavonóides Totais e Percentagem de Sequestro de Radical Livre nas diferentes condições de extração por ultrassom (EAU) obtida a partir dos valores codificados das variáveis independentes

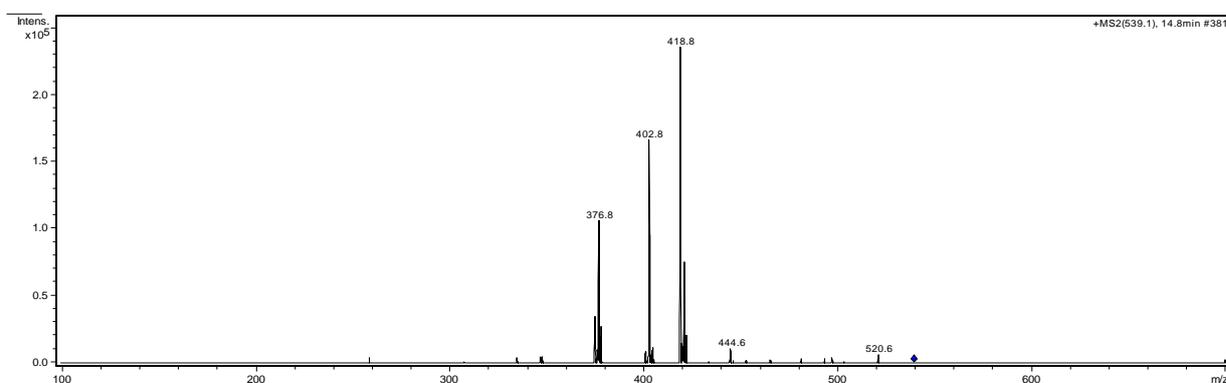
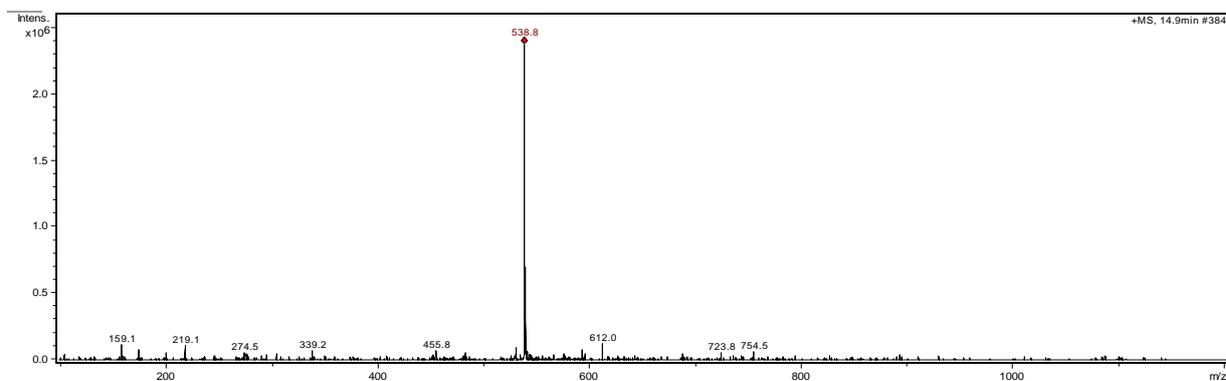
EAU							
Parâmetros	Coefficiente de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Grau de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F <sub>calc</sub> *	F <sub>f. de ajuste</sub> **	R <sup>2</sup>
Fenolicos Totais	Regressão	611702.9	9	67967.0	1.2	17,6	0.61
	Resíduo	395484.9	7	56497.8			
	Total (SS)	1007187.8	16				
Flavonoides Totais	Regressão	172.9	9	19.2	<b>5.7</b>	4.4	0.88
	Resíduo	23.5	7	3.4			
	Total (SS)	196.4	16				
%Sequestro de Radical Livre	Regressão	136.9	9	15.2	1.3	3.08	0.63
	Resíduo	80.2	7	11.5			
	Total (SS)	217.0	16				

\* F<sub>tab</sub> (9.7; 0.95) = 3.6; \*\* F<sub>tab</sub> (5.2; 0.95) = 19.30

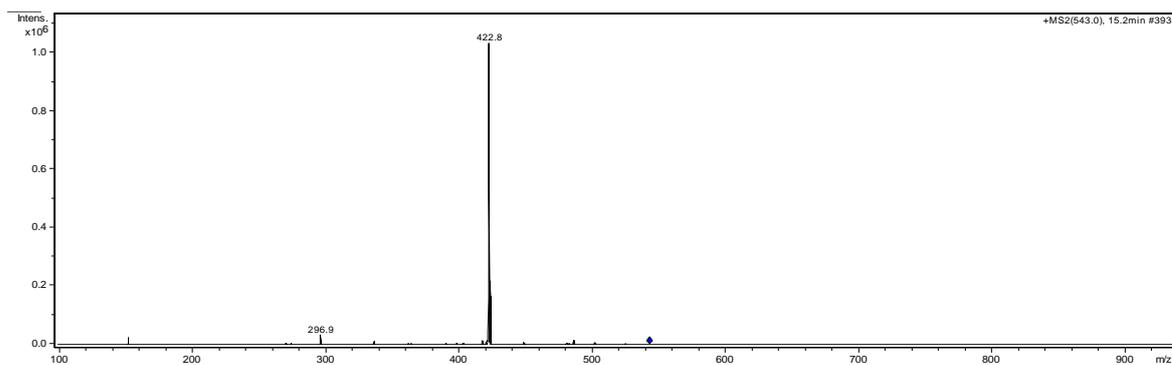
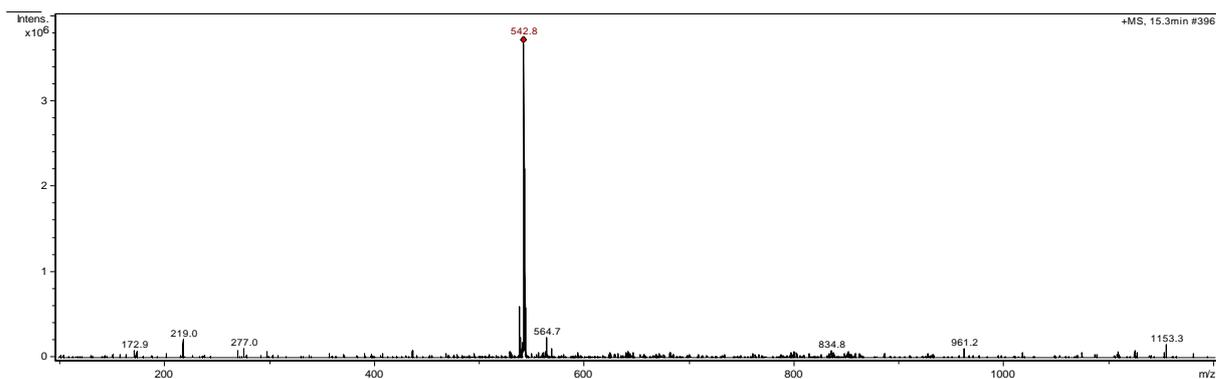
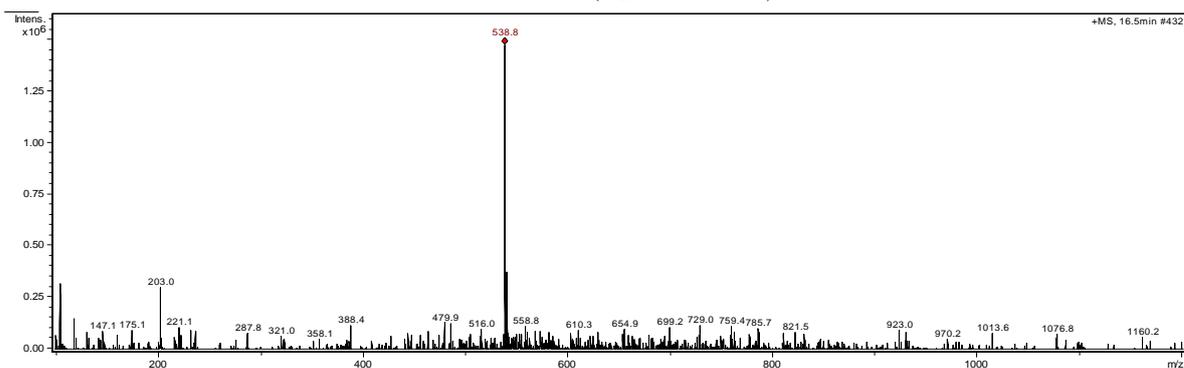
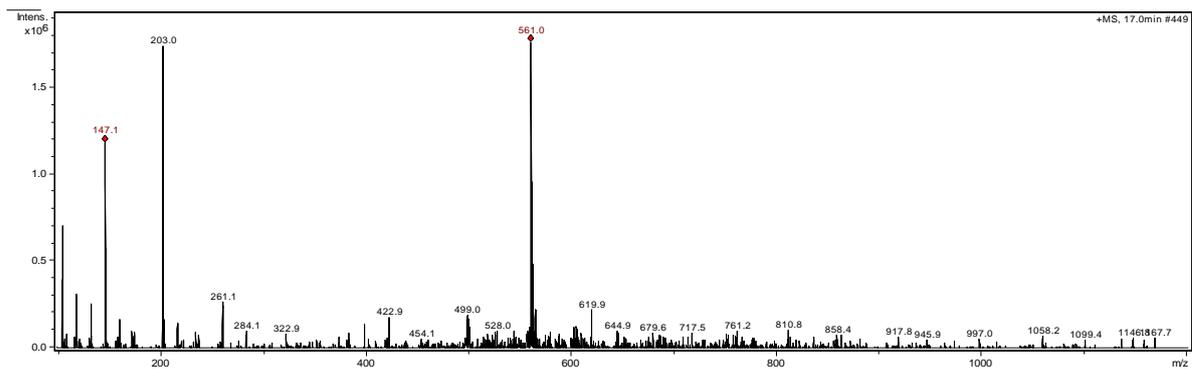
**APÊNDICE 2** - Cromatograma de íons totais obtidos por CLAE-EM/EM (modo positivo) do Extrato Etanólico dos Frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (EEFST)

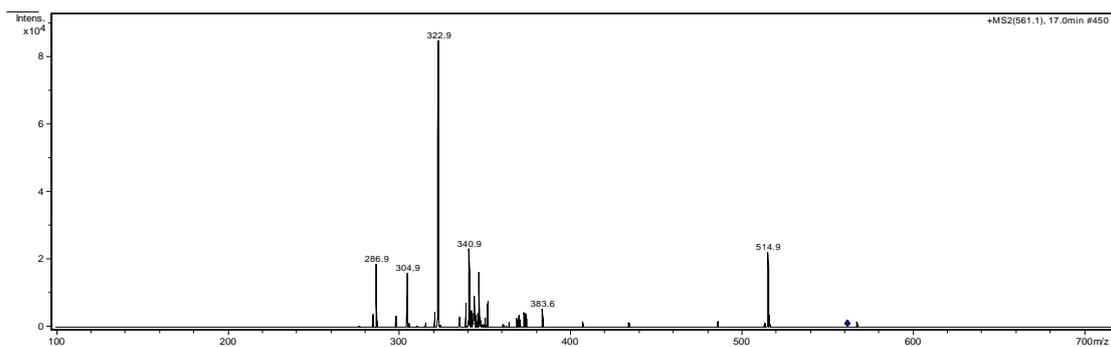
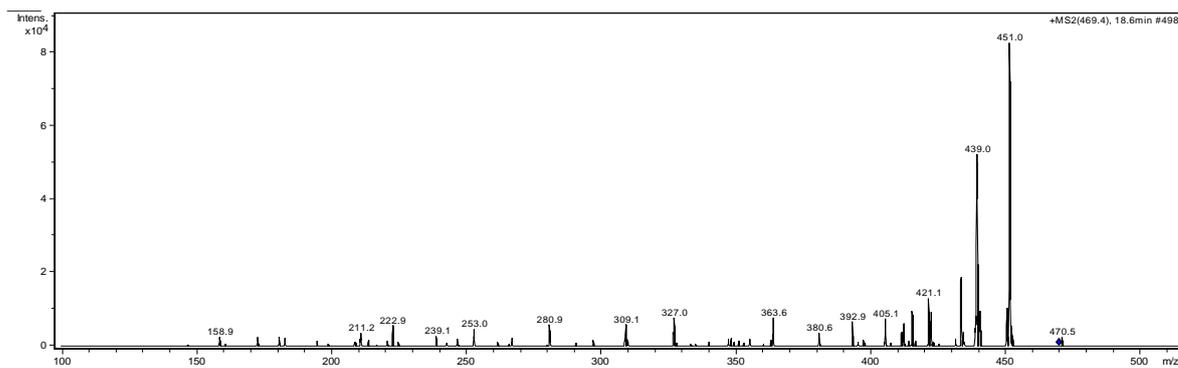
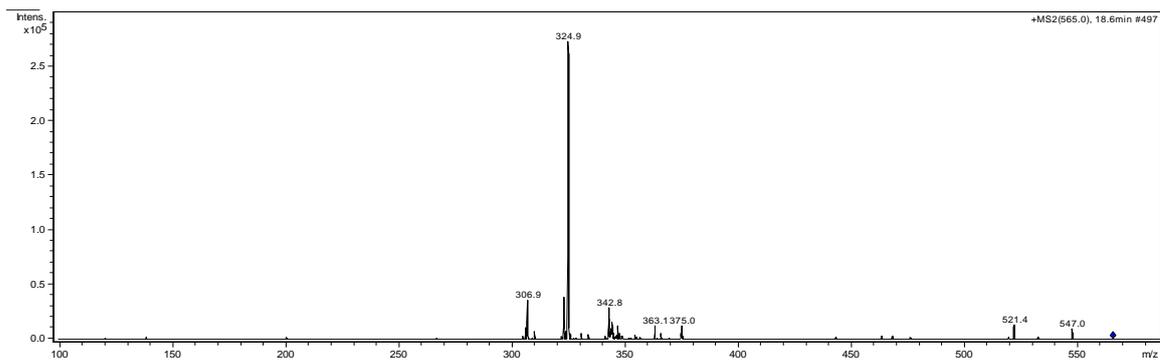
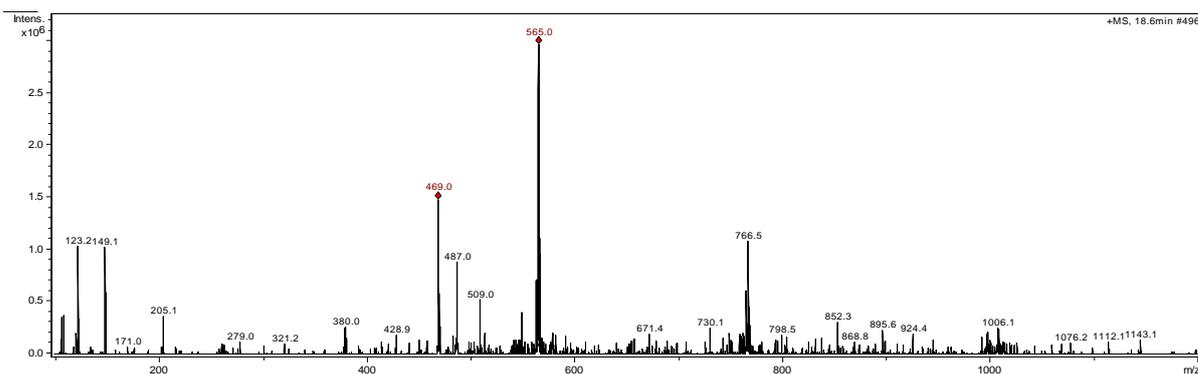


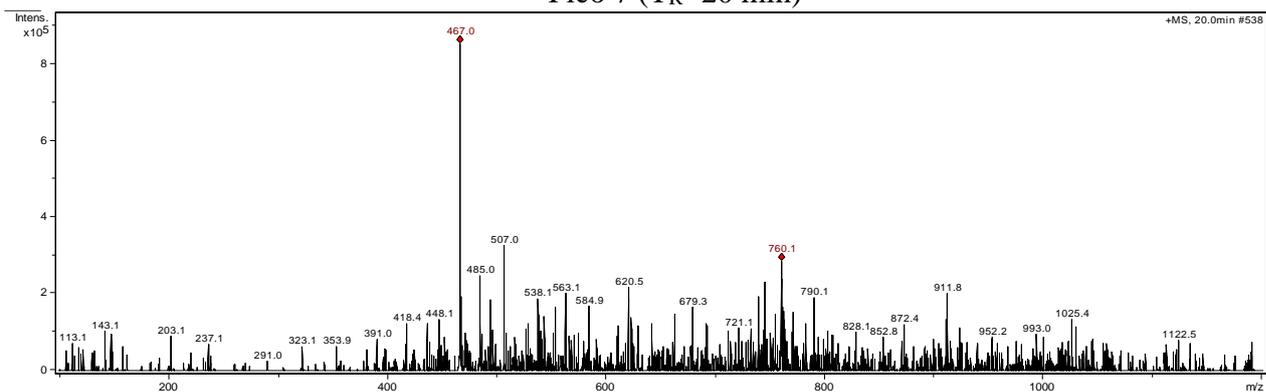
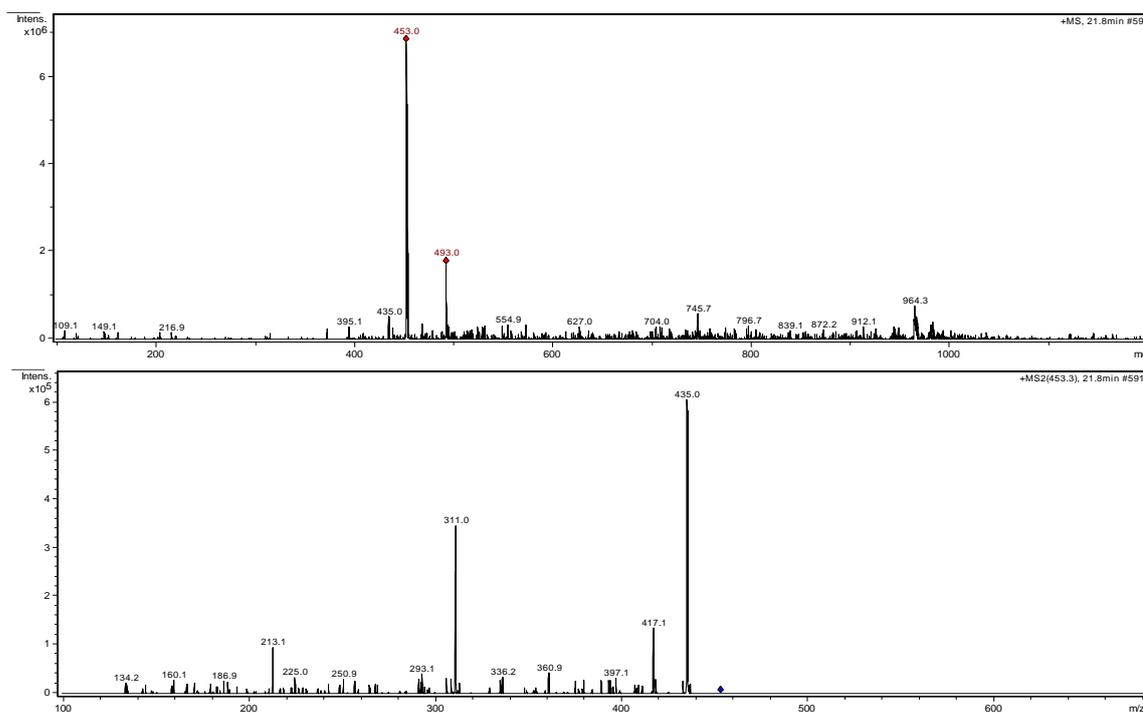
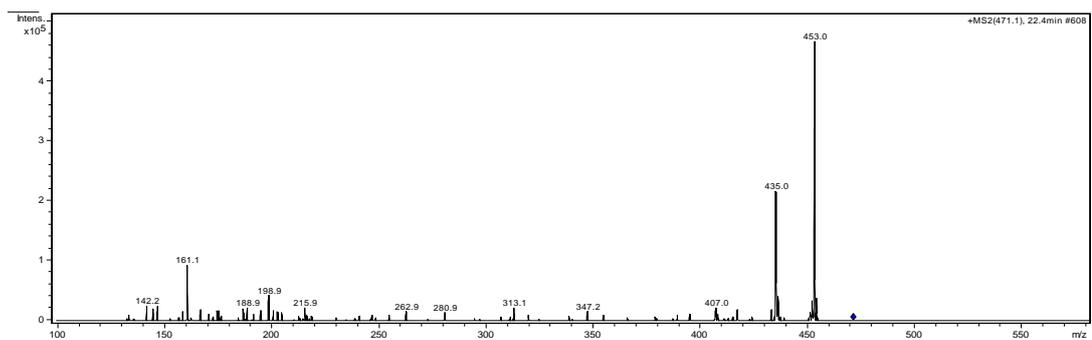
Pico 1 ( $T_R = 14.9$  min)

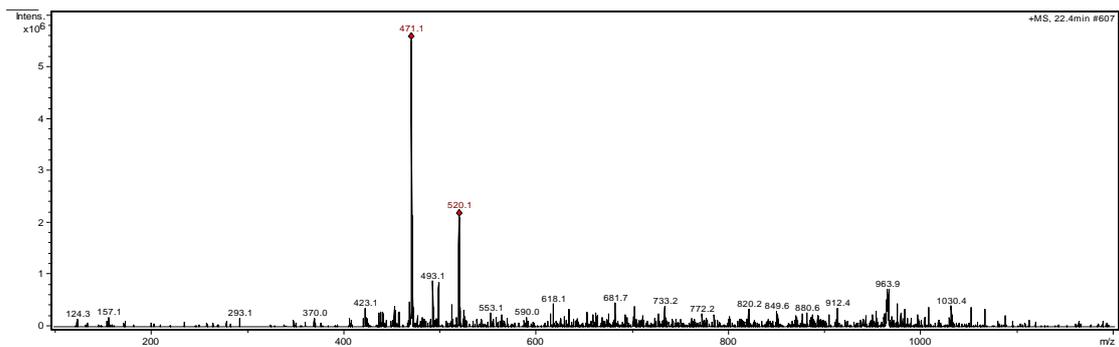
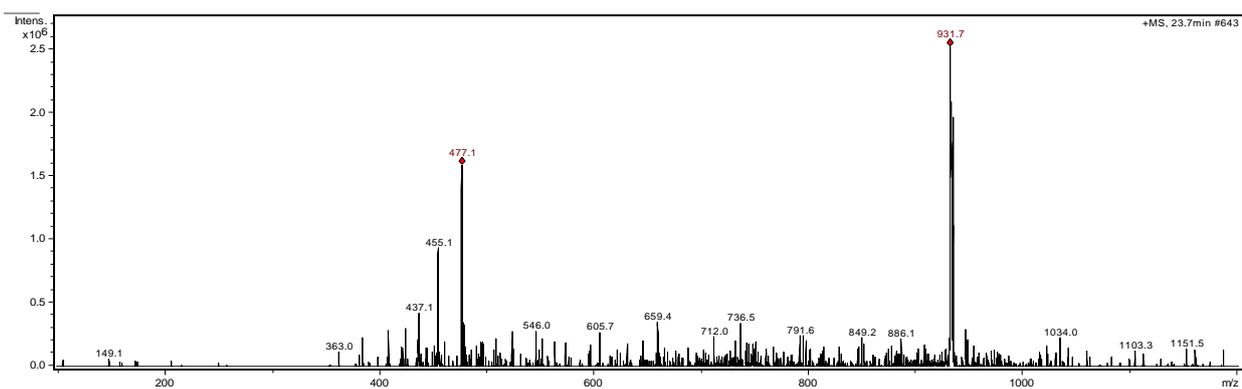
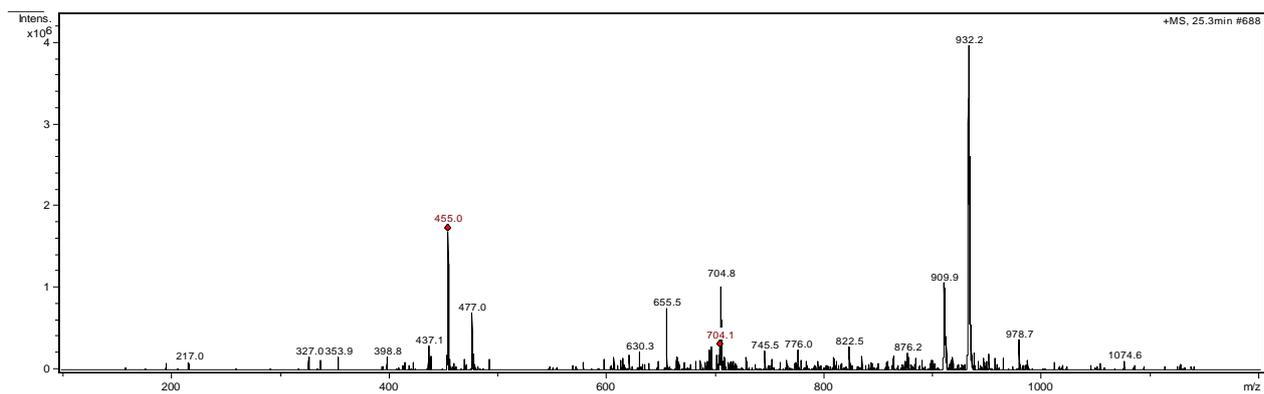


Pico 2 ( $T_R = 15.3$  min)

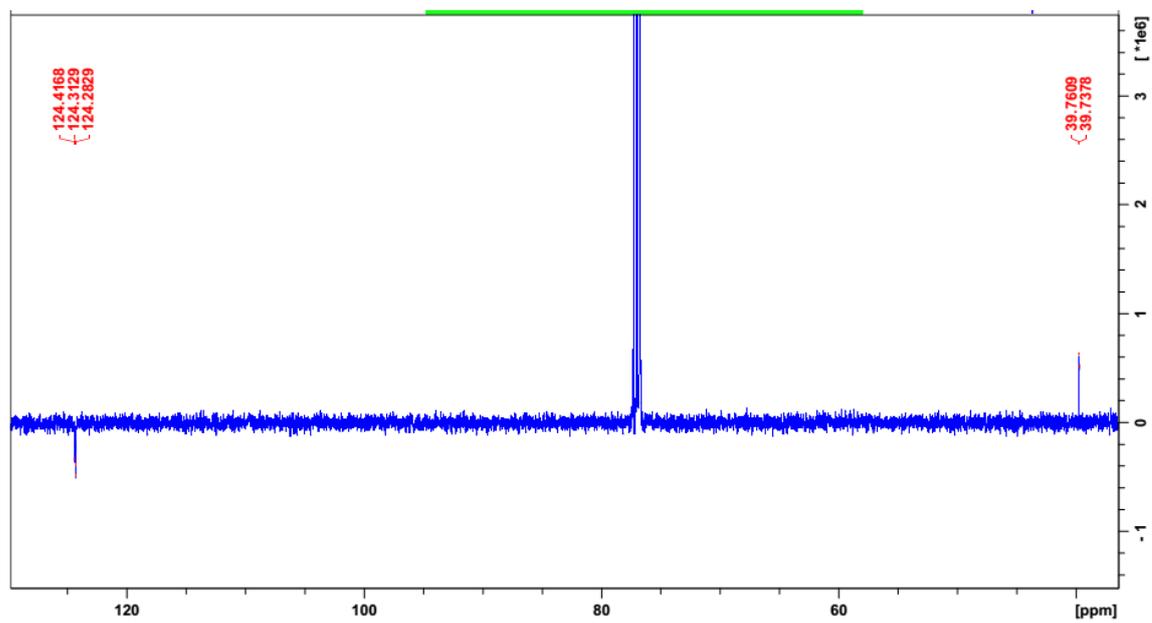
Pico 3 ( $T_R=16.5$  min)Pico 4 ( $T_R=17$  min)

Pico 5 e 6 (T<sub>R</sub>=18.6 min)

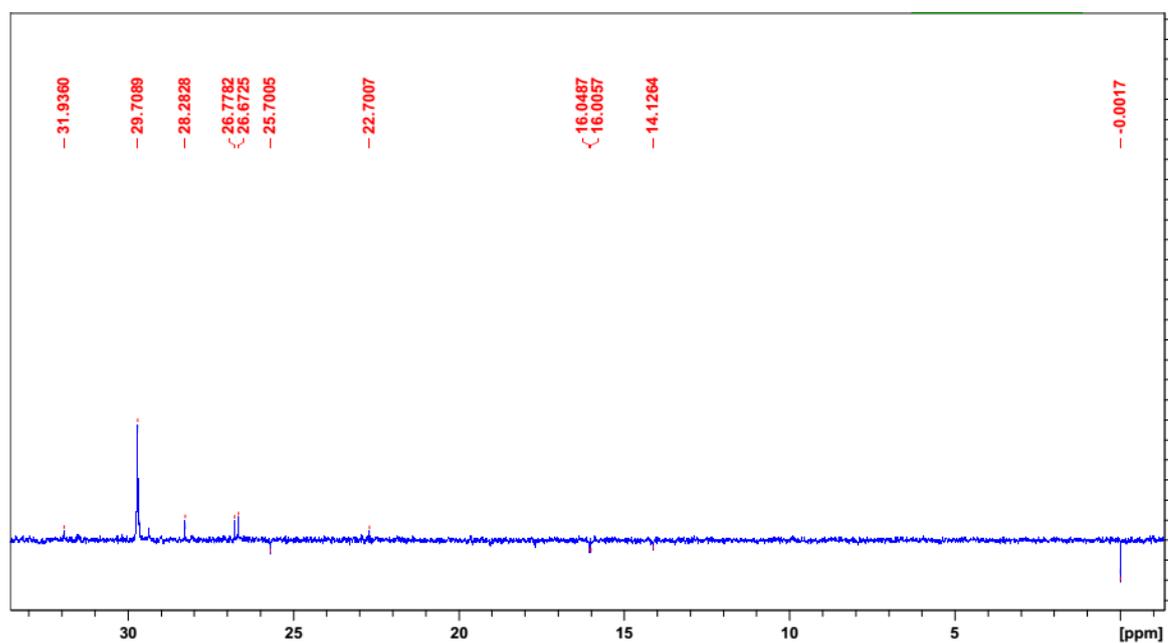
Pico 7 ( $T_R=20$  min)Pico 8 ( $T_R=21.8$  min)Pico 9 ( $T_R=22.4$  min)

Pico 10 (T<sub>R</sub>=23.7 min)Pico 11 (T<sub>R</sub>=25.3 min)

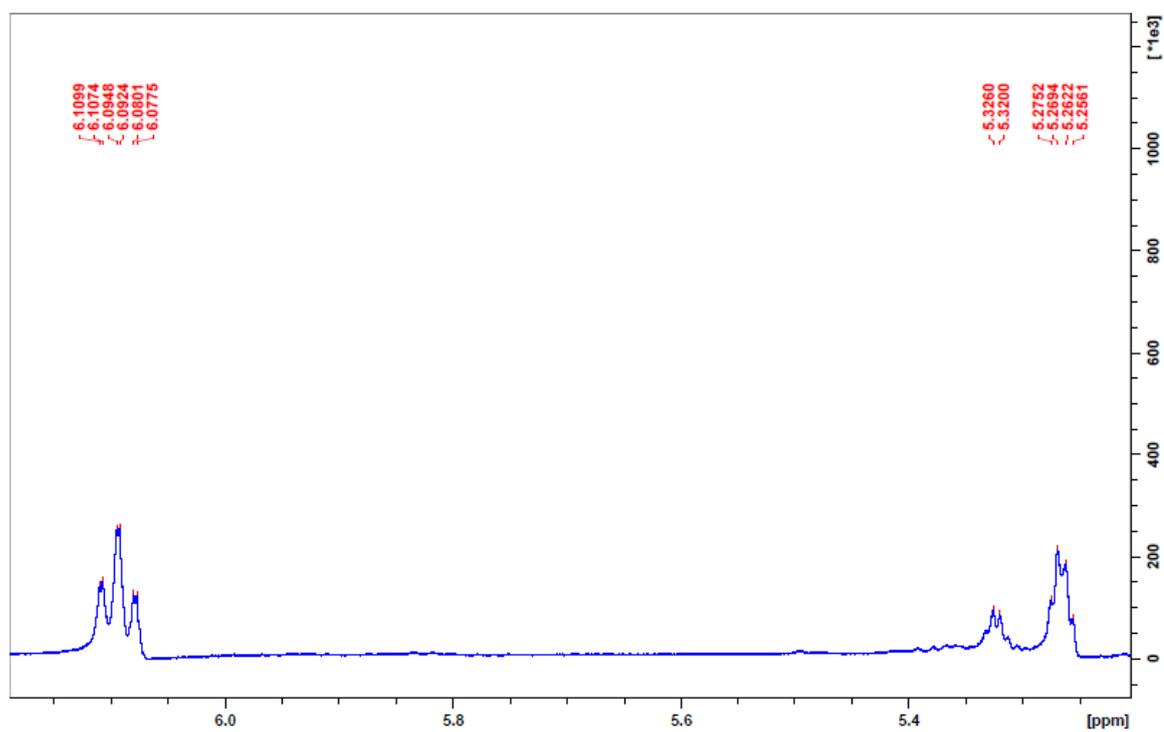
APÊNDICE 3- Ampliação 1 do espectro de RMN DEPTQ 135 da Substância 1 obtida do  
EEFST



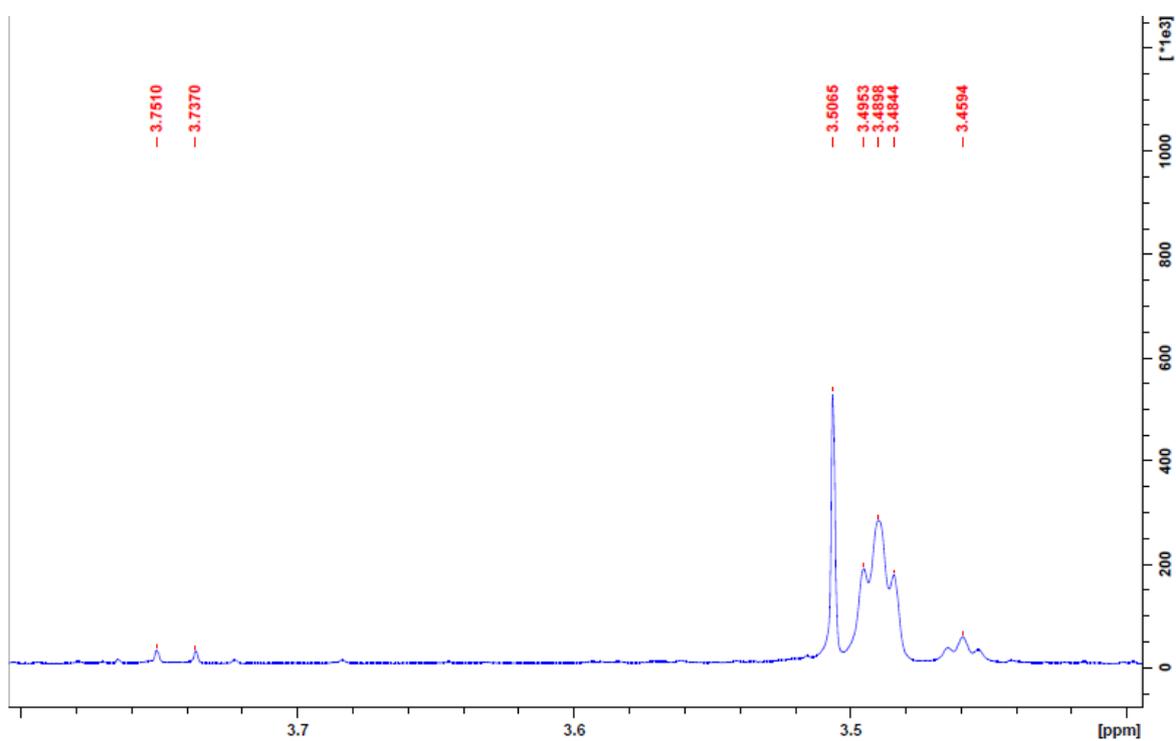
APÊNDICE 4- Ampliação 2 do espectro de RMN DEPTQ 135 da Substância 1 obtida do  
EEFST



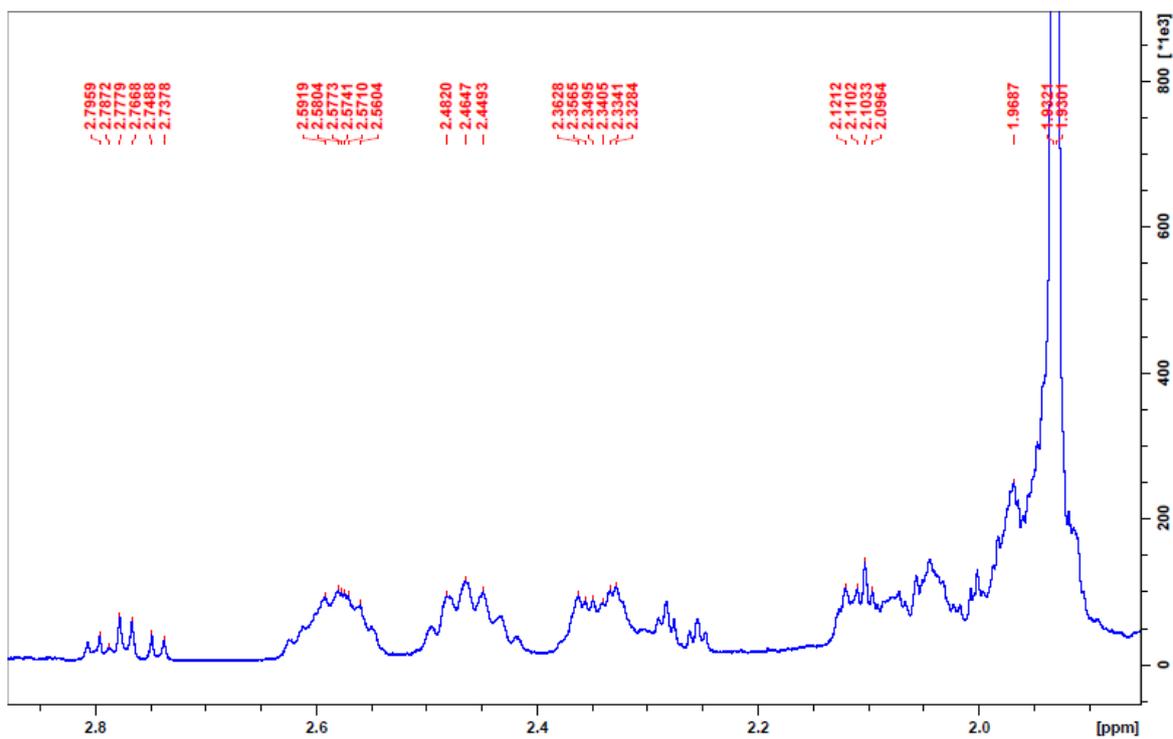
APÊNDICE 5- Ampliação 1 do espectro de RMN 1H das Substâncias II, III e IV obtidas do EEFST



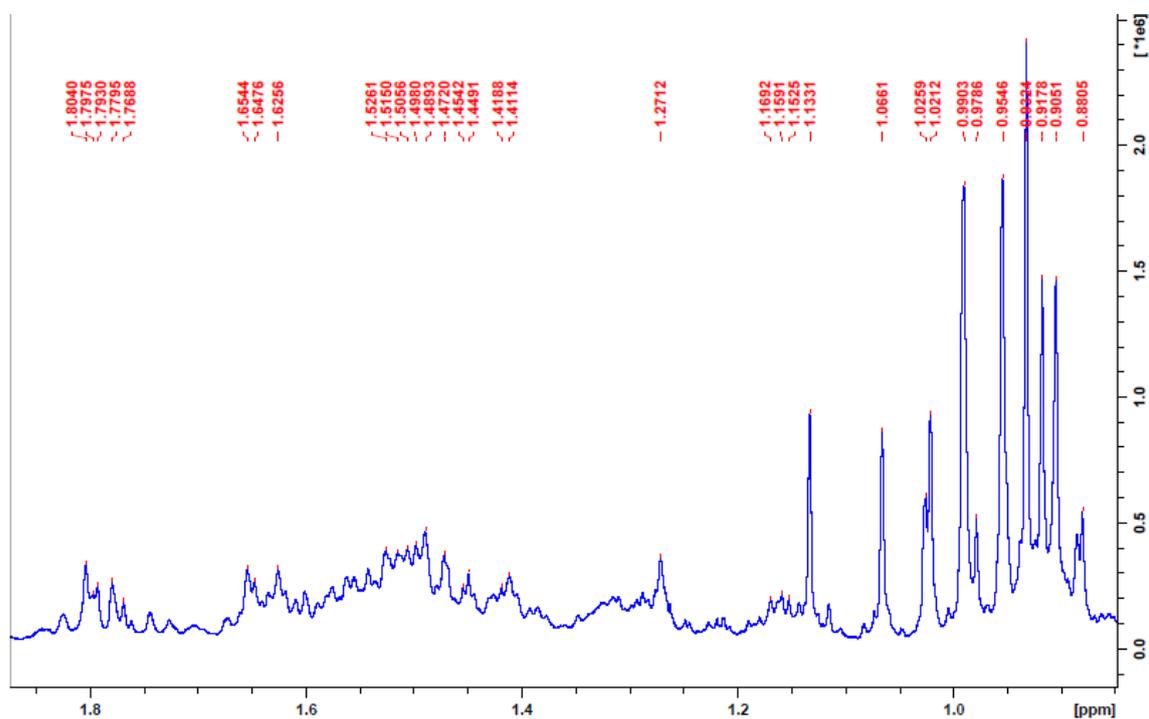
APÊNDICE 6- Ampliação 2 do espectro de RMN 1H das Substâncias II, III e IV obtidas do EEFST



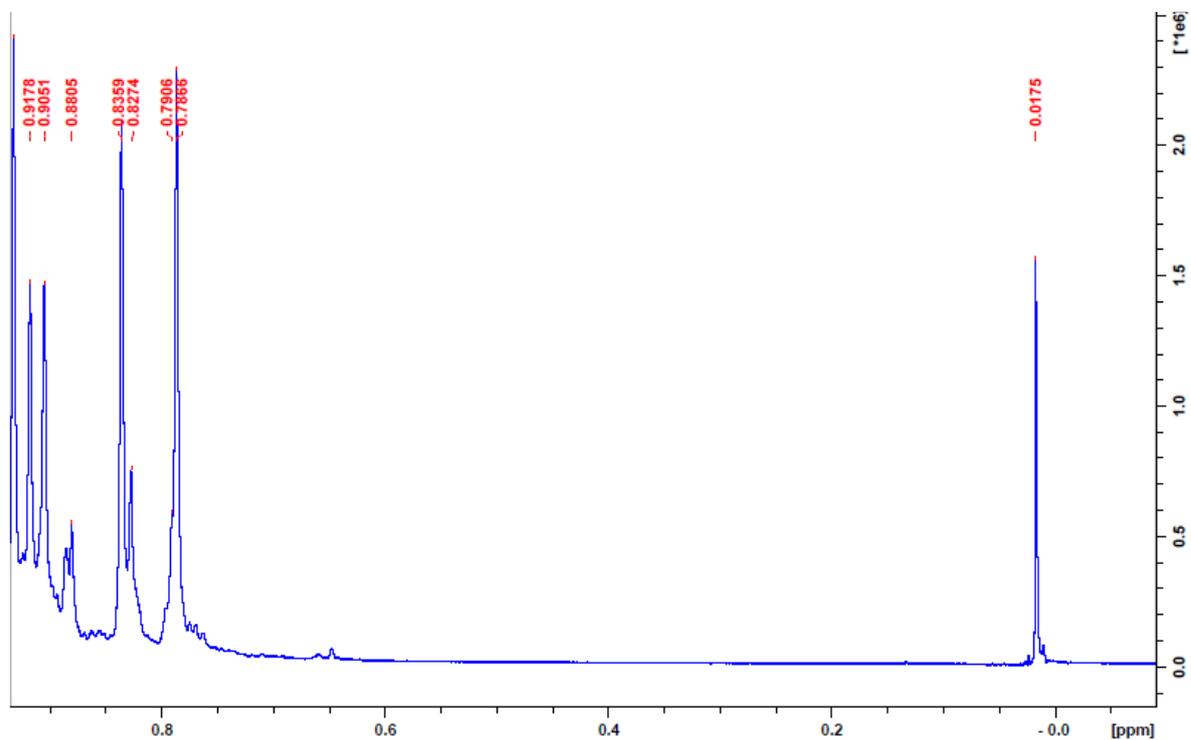
APÊNDICE 7- Ampliação 3 do espectro de RMN 1H das Substâncias II, III e IV obtidas do EEFST



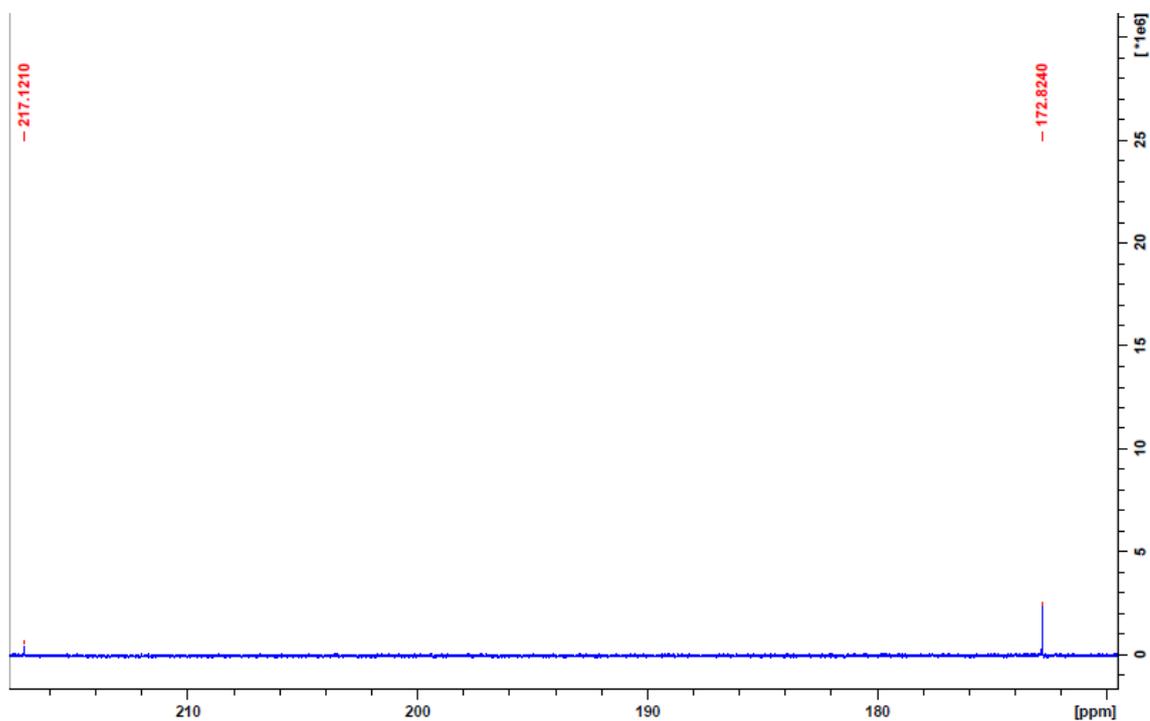
APÊNDICE 8 - Ampliação 4 do espectro de RMN 1H das Substâncias II, III e IV obtidas do EEFST



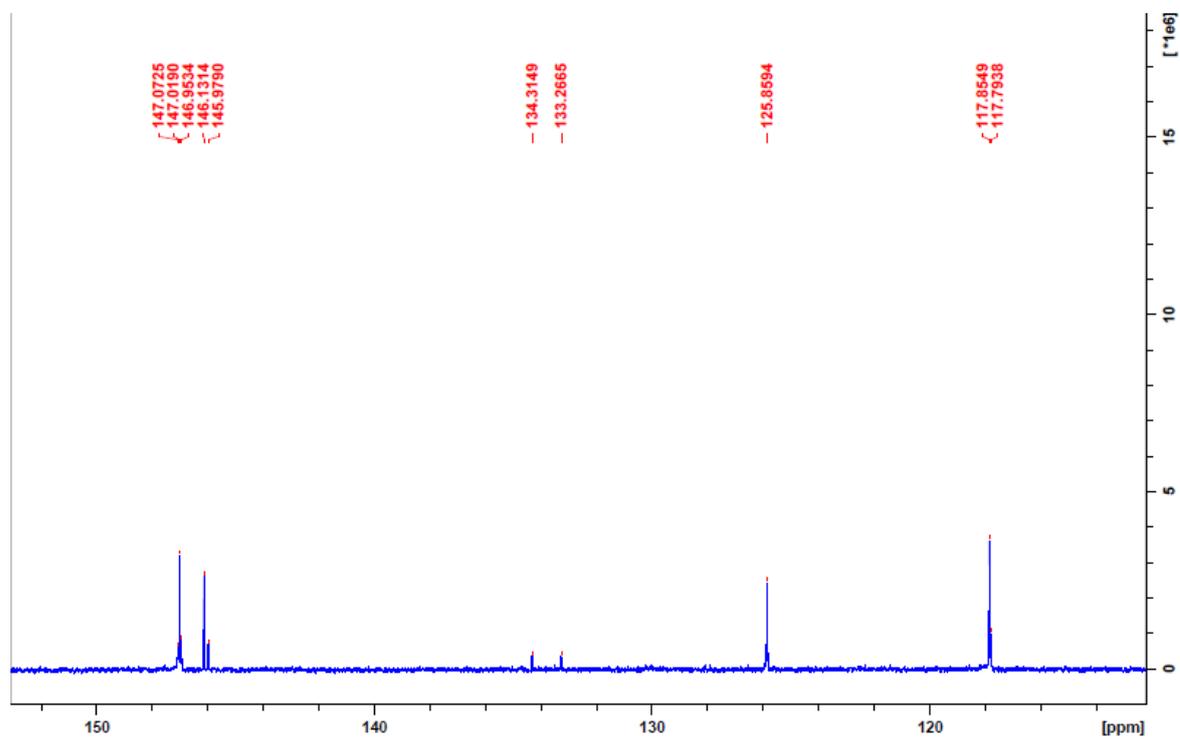
APÊNDICE 9- Ampliação 5 do espectro de RMN 1H das Substâncias II, III e IV obtidas do EEFST



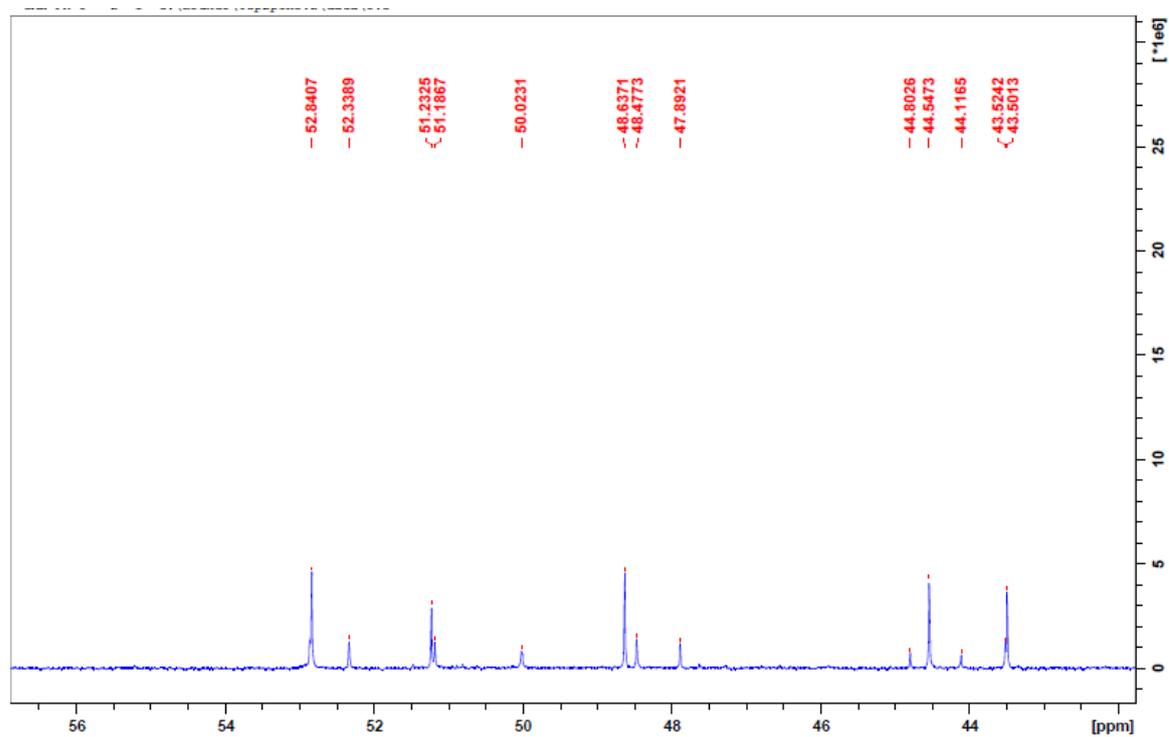
APÊNDICE 10 - Ampliação 1 do espectro de RMN 13C das Substâncias II, III e IV obtidas do EEFST



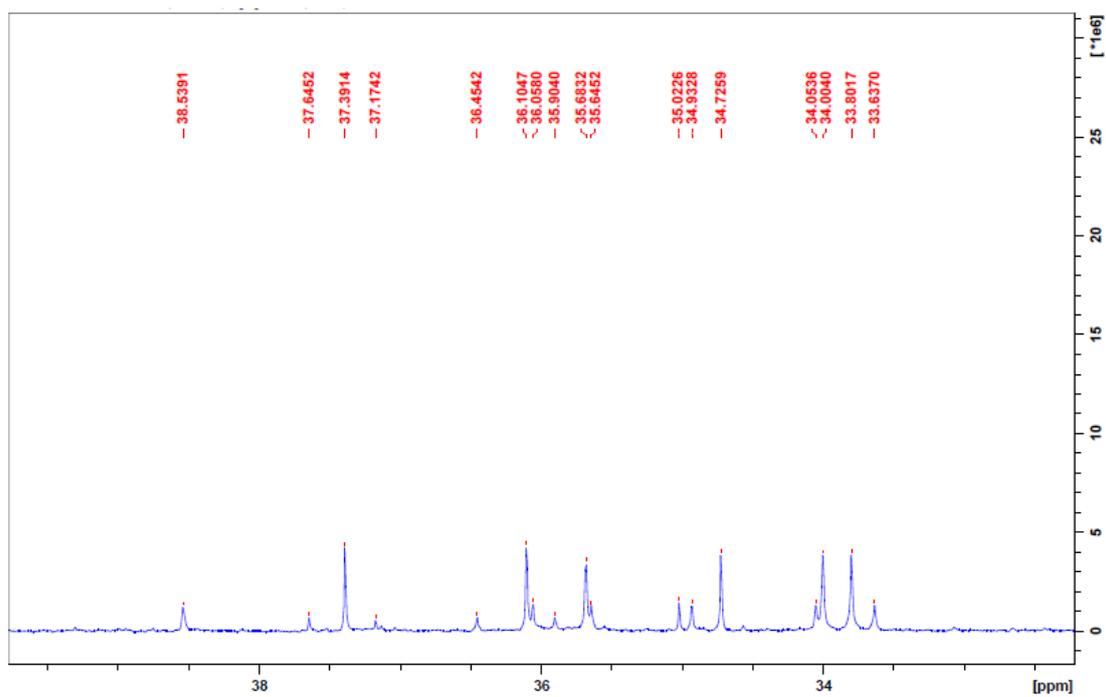
APÊNDICE 11- Ampliação 2 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das Substâncias II, III e IV obtidas do EEFST



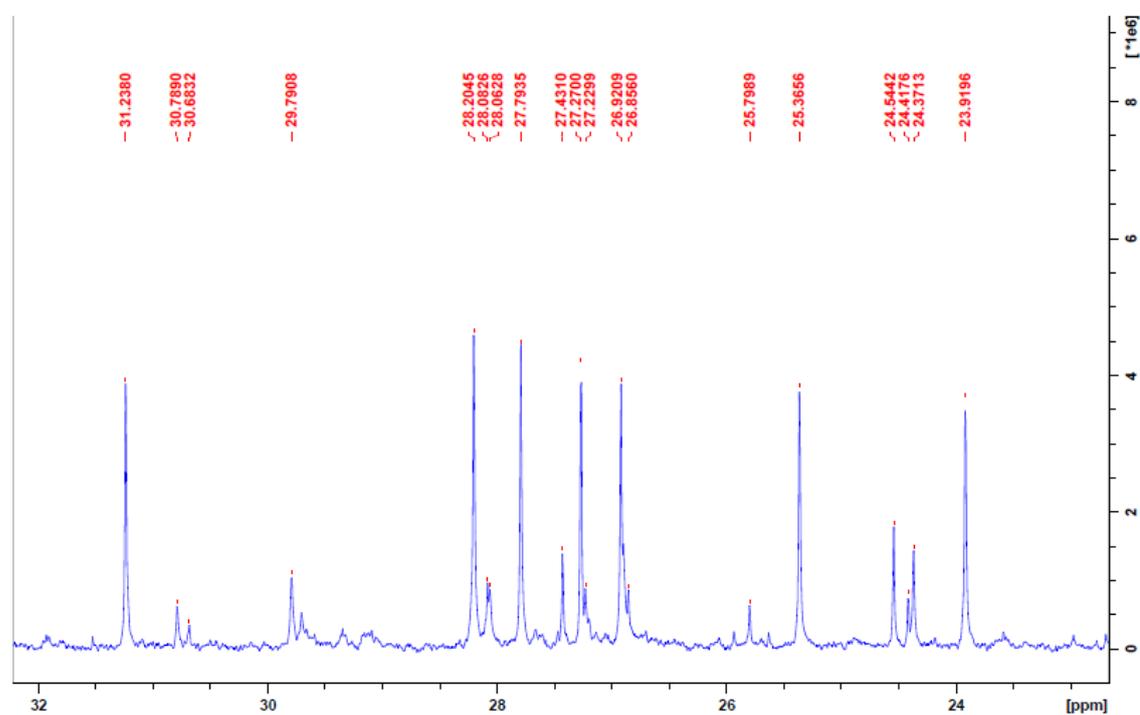
APÊNDICE 12- Ampliação 3 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das Substâncias II, III e IV obtidas do EEFST



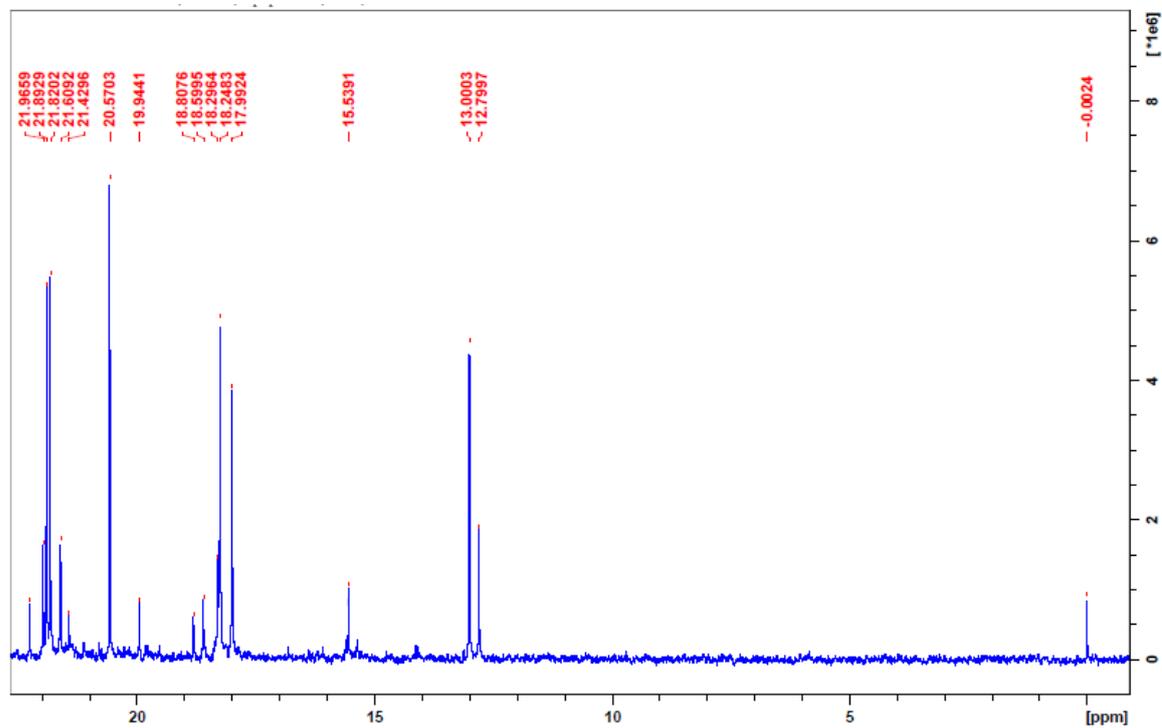
APÊNDICE 13 - Ampliação 4 do espectro de RMN <sup>13</sup>C das Substâncias II, III e IV obtidas do EEFST



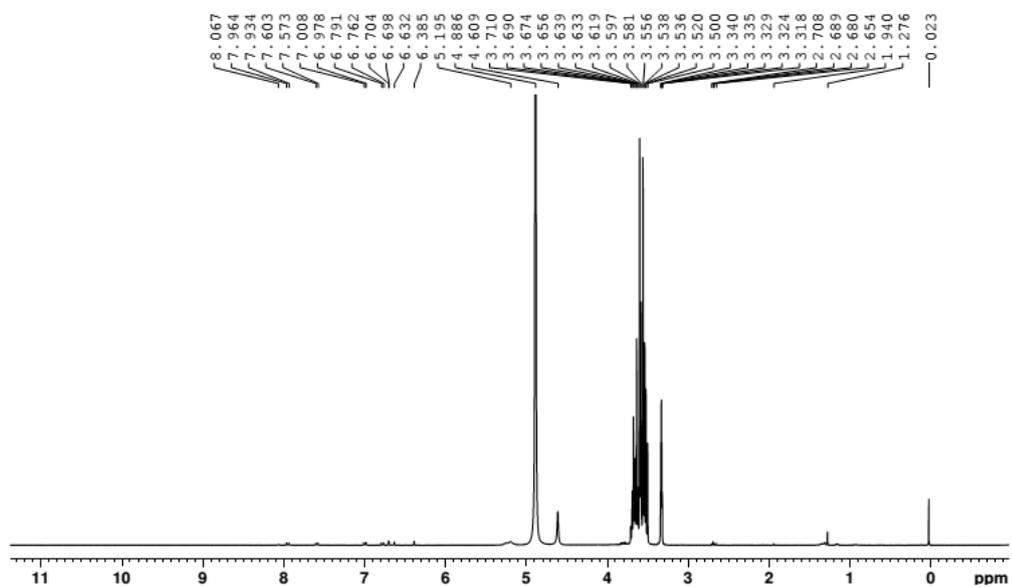
APÊNDICE 14 - Ampliação 5 do espectro de RMN <sup>13</sup>C das Substâncias II, III e IV obtidas do EEFST



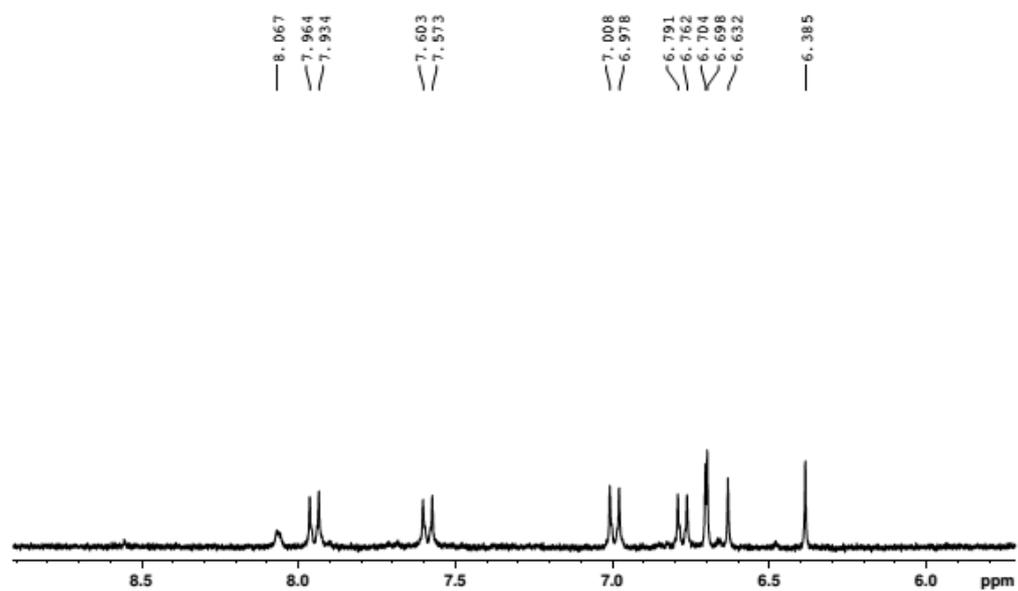
APÊNDICE 15- Ampliação 6 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das Substâncias II, III e IV obtidas do EEFST



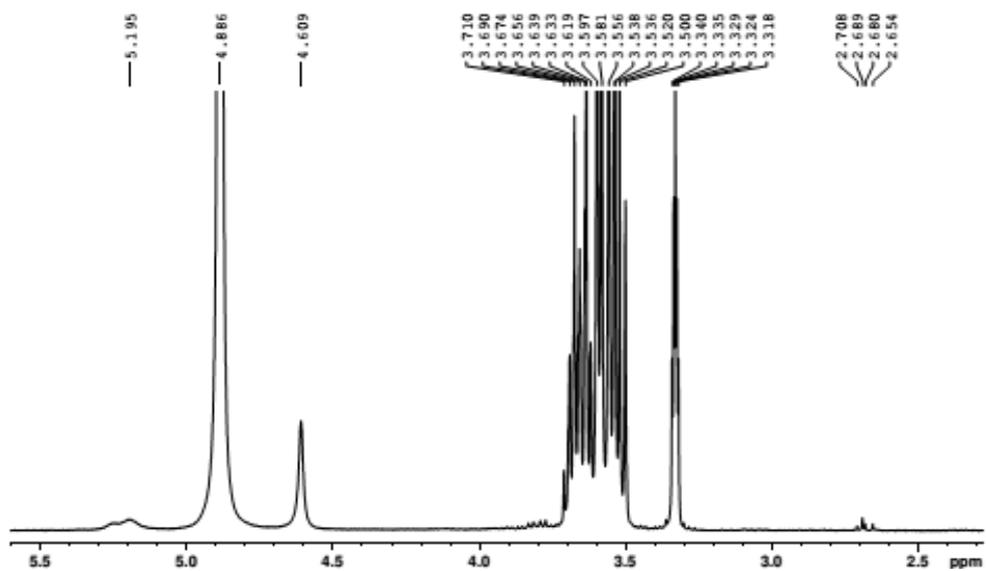
APÊNDICE 16- Ampliação 1 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da Substância V obtida do EEFST



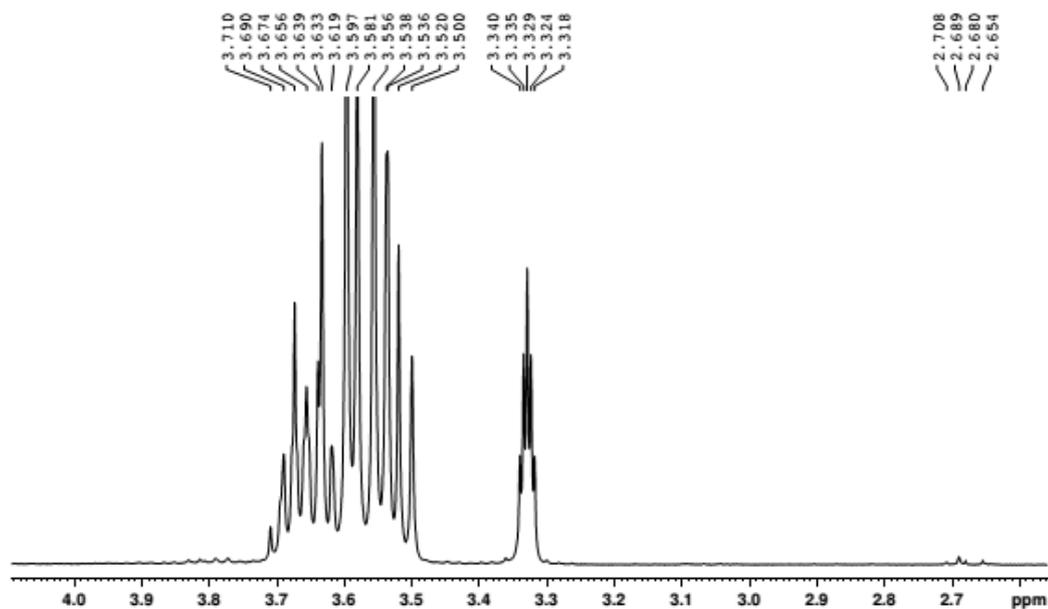
## APÊNDICE 17- Ampliação 2 do espectro de RMN 1H da Substância V obtida do EEFST



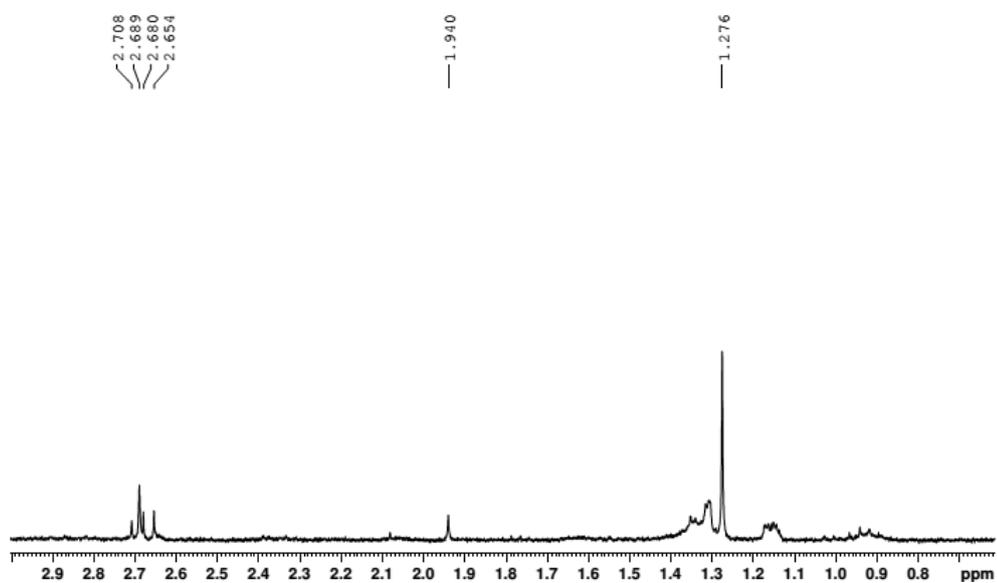
## APÊNDICE 18- Ampliação 3 do espectro de RMN 1H da Substância V obtida do EEFST



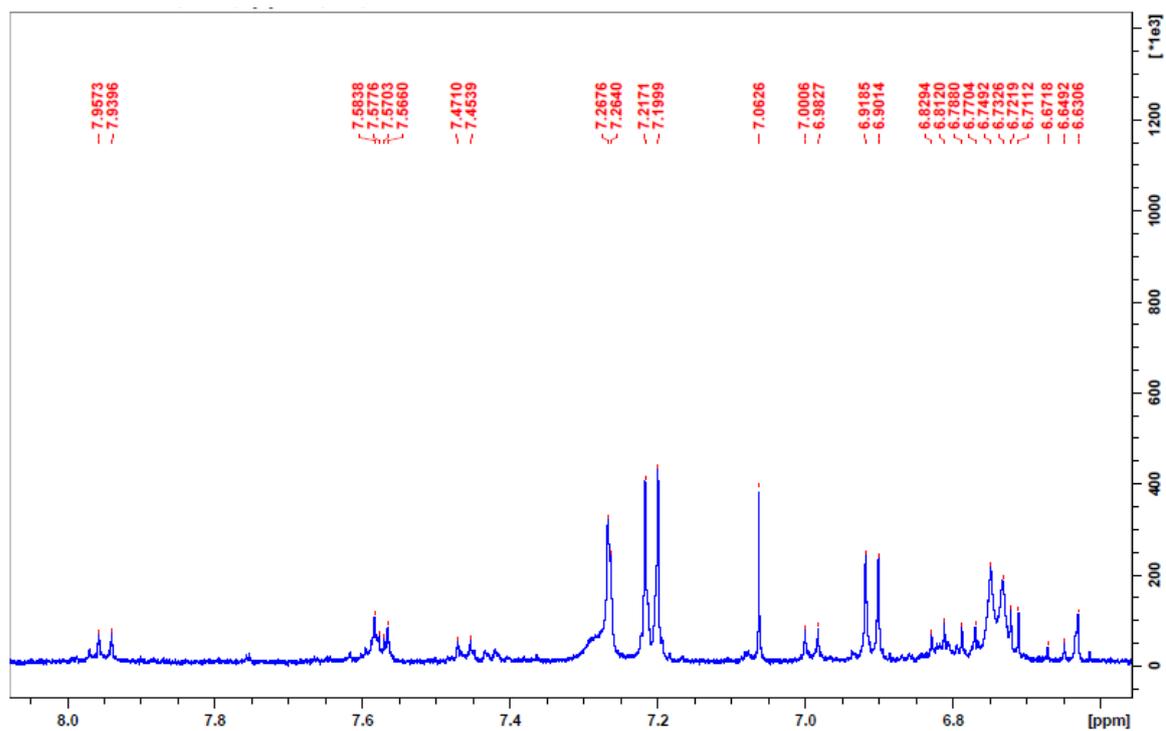
## APÊNDICE 19 - Ampliação 4 do espectro de RMN 1H da Substância V obtida do EEFST



## APÊNDICE 20- Ampliação 5 do espectro de RMN 1H da Substância V obtida do EEFST



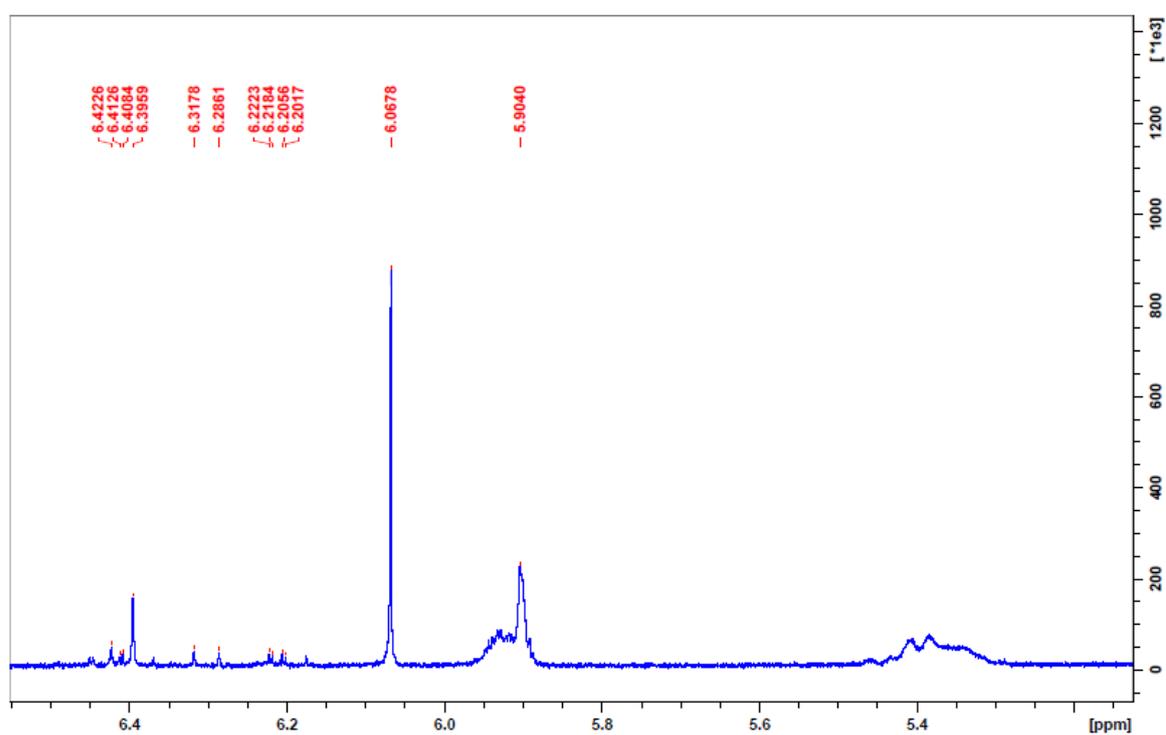
APÊNDICE 21 - Ampliação 1 do espectro de RMN 1H da Substância VI obtida do



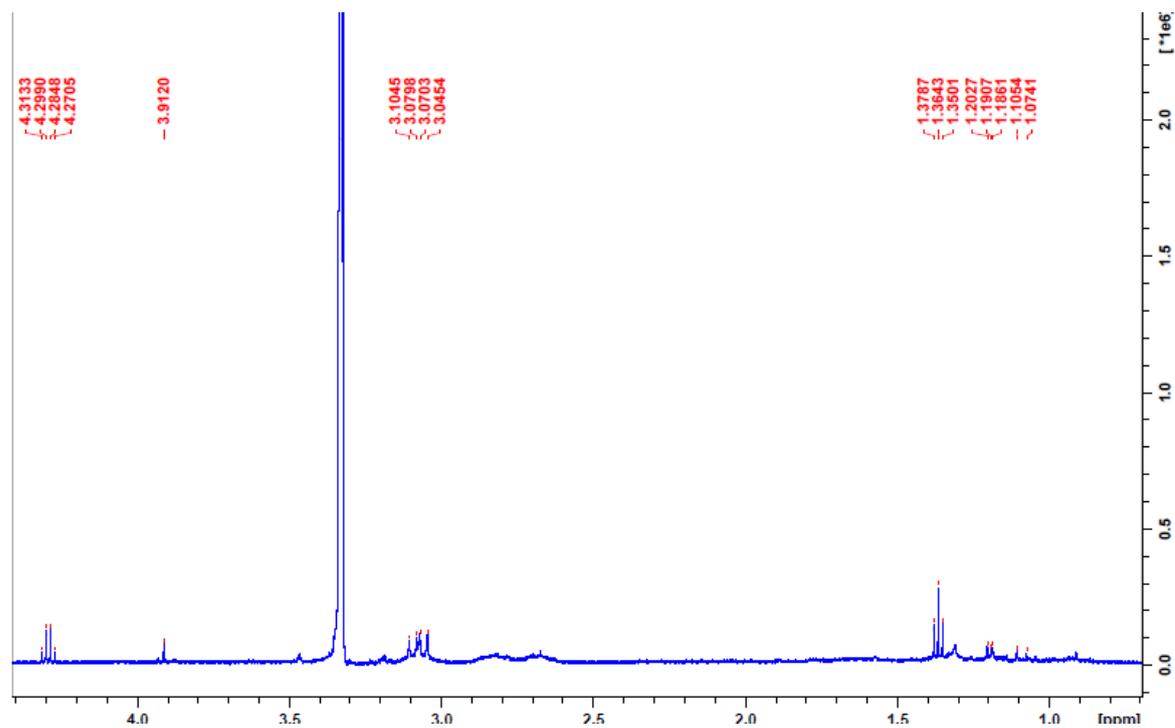
EEFST

APÊNDICE 22- Ampliação 2 do espectro de RMN 1H da Substância VI obtida do

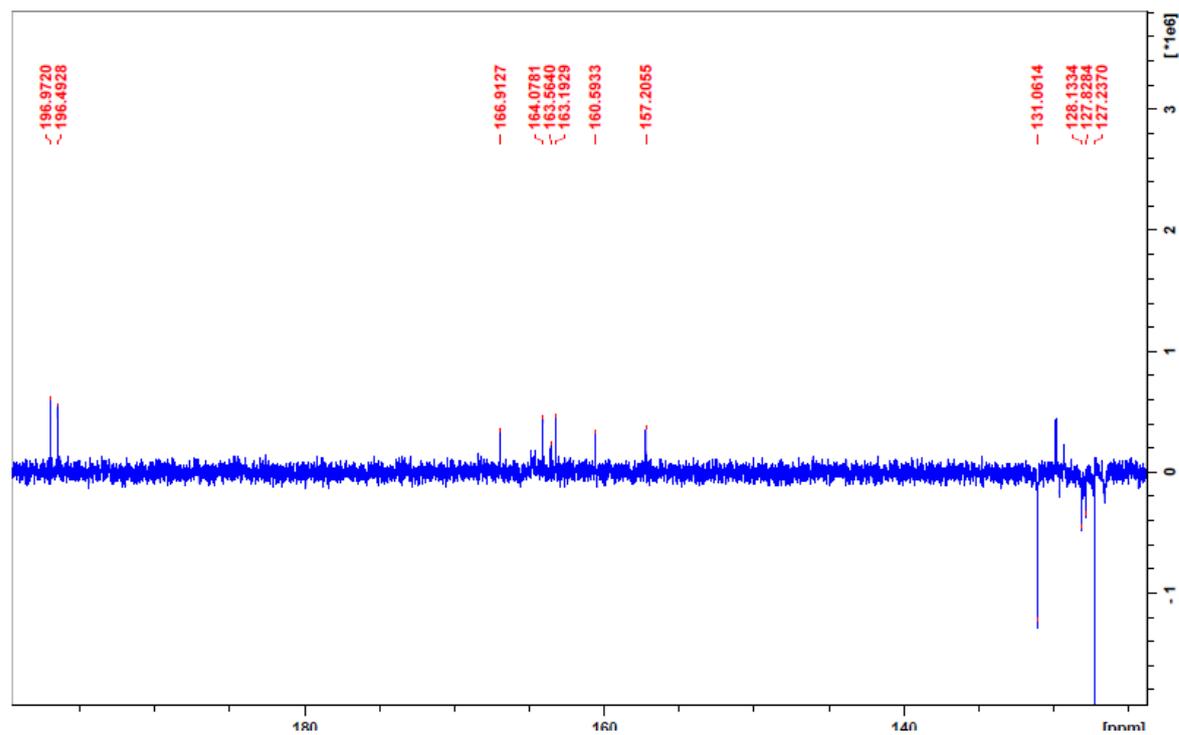
EEFST



APÊNDICE 23- Ampliação 3 do espectro de RMN 1H da Substância VI obtida do EEFST



APÊNDICE 24- Ampliação 1 do espectro de RMN DEPTQ 135 da Substância VI obtida do EEFST



APÊNDICE 25- Ampliação 2 do espectro de RMN DEPTQ 135 da Substância VI obtida do EEFST

