



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CÂMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA
Rodovia Sul Goiana, km 01, Zona Rural – Rio Verde - GO
CEP: 75.901-970. Fones: (64) 3620-5643. Fax: (64) 3620-5640

**EXTRATO VEGETAL DE *Capsicum Chinense*: COMPOSIÇÃO QUÍMICA,
AÇÃO ANTICOLINESTERASE, ANTILEISHMANIOSE, ANITUTOMORAL,
ANTIFÚNGICA E APLICAÇÃO EM FILMES BIODEGRADÁVEIS.**

Autora: Sandriny Evillin Machado Toigo
Orientadora: Prof. Dr. Cássia C. Fernandes Alves
Coorientador: Mayker L. Dantas Miranda e
Josemar Gonçalves de Oliveira Filho

RIO VERDE – GO
Março - 2023



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CÂMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA
Rodovia Sul Goiana, km 01, Zona Rural – Rio Verde - GO
CEP: 75.901-970. Fones: (64) 3620-5643. Fax: (64) 3620-5640

**EXTRATO VEGETAL DE *Capsicum Chinense*: COMPOSIÇÃO QUÍMICA,
AÇÃO ANTICOLINESTERASE, ANTILEISHMANIOSE, ANITUTOMORAL,
ANTIFÚNGICA E APLICAÇÃO EM FILMES BIODEGRADÁVEIS.**

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

RIO VERDE – GO
Março - 2023

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, por ter me conduzido até aqui, por estar sempre comigo me abençoando e iluminando meus passos.

Aos meus pais Valdocir Toigo e Dalva Machado da Silva, que sempre me incentivaram e me deram as condições necessárias para a realização de mais esse sonho. Vocês são minha base e meus exemplos e eu espero retribuir tudo o que fizeram por mim.

Aos meus irmãos Emilly e Nicolas, que são minhas inspirações e sempre me apoiaram em minhas decisões. A minha família, um agradecimento especial pela compreensão ao serem privados em muitos momentos da minha companhia e atenção e pelo apoio, me estimulando nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves, pela ajuda mesmo nos finais de semana ou horários inoportunos, saiba que tenho muita admiração e que você inspira força para continuar. Aos professores Dr. Mayker L. Dantas Miranda e Dr. Josemar Gonçalves de Oliveira Filho de Souza que me coorientaram e sempre estiveram dispostos a me ajudar, mesmo nos momentos em que pensava em desistir. A todos os meus colegas do Bloco Agroquímica e do Laboratório de Química de Produtos Naturais.

E por último, mas não menos importante, as minhas queridas amigas Ivandra e Raquel, que sempre acreditaram, me apoiaram e até me ajudaram nas etapas de mais esta conquista.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Sandriny Evillin Machado Toigo, filha de Dalva Machado da Silva e Valdocir Toigo, nascida em 08 de novembro de 1994 na cidade de Cacoal – RO. Graduiu-se em Engenharia Química pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro em Uberaba em agosto de 2018, ingressou em 2021 no Programa de Pós Graduação em Agroquímica nível Mestrado do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde sob Orientação da Professora Dr^a. Cássia Cristina Fernandes Alves e coorientação dos Professores Dr. Mayker L. Dantas Miranda e Dr. Josemar Gonçalves de Oliveira Filho de Souza.

ÍNDICE

CAPÍTULO I:.....	10
1. RESUMO	10
2. ABSTRACT	11
3. INTRODUÇÃO	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Material vegetal	14
4.2 Preparação de extratos hexânicos (HE-UB e HE-RB).....	14
4.3 Identificação química dos constituintes HE-UB e HE-RB	15
4.4 Ensaio antiacetilcolinesterase	15
4.5 Ensaio antileishmania	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
6. CONCLUSÃO	21
7. REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO II.....	24
8. RESUMO	24
9. ABSTRACT	25
10. INTRODUÇÃO.....	26
11. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
11.1 Atividade antifúngica de HE-RB e HE-UB	28
12. RESULTADOS	30
12.1 Atividade antifúngica.....	30
13. DISCUSSÃO	34
14. CONCLUSÕES	36
15. REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO III	41
16. RESUMO	41
17. ABSTRACT	42
18. INTRODUÇÃO.....	43
19. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
19.1 Filme biodegradável	45
19.2 Diluição do Extrato Hexânico.....	45
19.3 Incorporação do extrato no filme.....	45
19.4 Aplicação do filme nos morangos.....	46
20. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

21.	CONCLUSÕES	52
22.	REFERÊNCIAS	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Constituintes voláteis de extratos hexânicos de pimenta bode verde (HE-UB) e de pimenta biquinho madura (HE-RB).....	17
Tabela 2. Valores de IC ₅₀ (µg/mL) encontrados contra diferentes linhagens celulares humanas após um tratamento de 24 horas em diferentes concentrações (de 31,25 a 1000 µg/mL) de HE-RB e HE-UB.....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Duas variedades de <i>Capsicum chinense</i> : pimenta biquinho madura (esquerda) e pimenta bode verde (direita). Fonte: autoria própria.	14
Figura 2. Pimenta bode verde (esquerda) e pimenta biquinho madura (direita). Fonte: Google (https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-1700056693-sementes-de-pimenta-bode-vermelha-de-goias-ideal-para-horta-_JM).	27
Figura 3. Porcentagens de inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> em diferentes doses de HE-RB. Fonte: autoria própria.	30
Figura 4. Porcentagens de inibição do crescimento micelial de <i>R. stolonifer</i> em diferentes doses de HE-RB. Fonte: autoria própria.	31
Figura 5. Porcentagens de inibição do crescimento micelial de <i>C. golesporoides</i> em diferentes doses de HE-RB. Fonte: autoria própria.	31
Figura 6. Porcentagens de inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> em diferentes doses de HE-UB. Fonte: autoria própria.	32
Figura 7. Porcentagens de inibição do crescimento micelial de <i>R. stolonifer</i> em diferentes doses de HE-UB. Fonte: autoria própria.	32
Figura 8. Porcentagens de inibição do crescimento micelial de <i>C. golesporoides</i> em diferentes doses de HE-UB. Fonte: autoria própria.	33
Figura 9. Filme biodegradável com e sem a incorporação de extrato hexânico de pimenta. Fonte: autoria própria.	45
Figura 10. Morangos com aplicação do filme biodegradável incorporado com extrato vegetal prontos para armazenamento. Fonte: autoria própria.	46
Figura 11. Morangos com aplicação do filme biodegradável incorporado com extrato vegetal de pimenta bode nas três concentrações após 4 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.	47
Figura 12. Morangos com aplicação do filme biodegradável incorporado com extrato vegetal de pimenta biquinho nas três concentrações após 4 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.	48
Figura 13. Morangos com aplicação do filme sem incorporação de extrato após 4 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.	48
Figura 14. Morangos sem aplicação do filme após 4 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.	49

Figura 15. Morangos com aplicação do filme biodegradável incorporado com extrato vegetal de pimenta bode nas três concentrações após 7 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.....	49
Figura 16. Morangos com aplicação do filme biodegradável incorporado com extrato vegetal de pimenta biquinho nas três concentrações após 7 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.....	50
Figura 17. Morangos com aplicação do filme sem incorporação de extrato após 7 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.	50
Figura 18. Morangos sem aplicação do filme após 7 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.....	51

CAPÍTULO I:

EXTRATOS HEXANICOS DE FRUTOS DE DUAS VARIEDADES DE *CAPSICUM CHINENSE*, SEUS CONSTITUINTES VOLÁTEIS E ANTIACETILCOLINESTERASE, ANTILEISHMANIAL E ATIVIDADES ANTIPROLIFERATIVAS

Capítulo I conforme publicado na revista Natural Product Research, Volume 36, 2022 - Issue 23.

Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2022.2057972>>

1. RESUMO

Este trabalho tem como objetivo investigar os constituintes voláteis e as atividades antiacetilcolinesterase, antileishmania e antiproliferativa de extratos hexânicos de frutos de *Capsicum chinense* (pimenta verde 'HE-UB' e pimenta biquinho madura 'HE-RB'). HE-UB e HE-RB foram selecionados pelo método de ensaio de microplacas para determinar sua atividade antiacetilcolinesterase. Ambos exibiram potencial inibitório, i. e., $IC_{50} = 41,5$ e $20,3 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. HE-UB ($IC_{50} = 67,19 \mu\text{g/mL}$) e HE-RB ($IC_{50} = 38,16 \mu\text{g/mL}$) exibiram atividade antileishmania contra formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Além disso, HE-UB e HE-RB demonstraram atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais humanas com IC_{50} variando de $325,40$ a $425,0 \mu\text{g/mL}$. Ambas as análises GC-FID e GC-MS revelaram que o principal componente em ambos os extratos foi o E-cariofileno. Em suma, HE-RB foi mais satisfatório que HE-UB em todas as atividades in vitro avaliadas. Esses achados podem ser usados como dados iniciais para estudos posteriores das espécies de *Capsicum*.

PALAVRAS-CHAVE: Extratos não polares; E-cariofileno; fruta funcional; acetilcolinesterase; atividade antiparasitária; linhas de células tumorais.

2. ABSTRACT

This paper aims to investigate volatile constituents and antiacetylcholinesterase, antileishmanial and antiproliferative activities of hexane extracts from *Capsicum chinense* fruit (unripe bode pepper 'HE-UB' and ripe little beak pepper 'HE-RB'). HE-UB and HE-RB were screened by the microplate assay method to determine their antiacetylcholinesterase activity. Both exhibited inhibitory potential, i. e., $IC_{50} = 41.5$ and $20.3 \mu\text{g/mL}$, respectively. HE-UB ($IC_{50} = 67.19 \mu\text{g/mL}$) and HE-RB ($IC_{50} = 38.16 \mu\text{g/mL}$) exhibited antileishmanial activity against promastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. In addition, HE-UB and HE-RB demonstrated cytotoxic activity against different human tumor cell lines with IC_{50} ranging from 325.40 to $425.0 \mu\text{g/mL}$. Both GC-FID and GC-MS analyses revealed that the major component in both extracts was E-caryophyllene. In short, HE-RB was more satisfactory than HE-UB in all in vitro activities under evaluation. These findings may be used as initial data for further studies of *Capsicum* species.

KEYWORDS: non-polar extracts; E-caryophyllene; functional fruit; acetylcholinesterase; antiparasitic activity; tumor cell lines

3. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que afeta inicialmente a memória das pessoas e, posteriormente, a sua capacidade de raciocínio e comunicação (Agatonovic-Kustrin et al., 2019). Como seu tratamento consiste em tentar restaurar a função colinérgica, os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) têm sido amplamente utilizados para modular as atividades de enzimas que degradam a acetilcolina (ACh) (Agatonovic-Kustrin et al., 2019).

Os fármacos que inibem a AChE são caros e acarretam diversos efeitos adversos, fato que torna relevante a busca e o desenvolvimento de inibidores alternativos, principalmente os derivados de plantas medicinais (Patel et al., 2018).

Pesquisadores conhecidos também manifestaram preocupação com doenças negligenciadas, como a leishmaniose (Anversa et al., 2018).

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e afeta cerca de 350 milhões de pessoas em todo o mundo (Santana et al., 2014). As drogas utilizadas para o tratamento desta doença consistem em antimoniais pentavalentes, que são altamente tóxicos e causam efeitos colaterais adversos. Essas questões também reforçam a necessidade de encontrar novos agentes terapêuticos de origem natural que sejam mais seguros e menos agressivos à saúde (Santana et al., 2014).

Outro cenário preocupante é o tratamento de tumores e medicamentos utilizados na quimioterapia. Pesquisadores da área de química de produtos naturais têm trabalhado arduamente para descobrir plantas que sejam fontes promissoras de metabólitos com potencial antiproliferativo (Marrelli et al., 2020).

Nesse sentido, as espécies de *Capsicum chinense* e suas variedades têm se destacado entre as plantas que apresentam potencial biológico (Figura 1). A literatura tem mostrado que seus frutos são ricos em atividades biológicas, como antifúngicas, antioxidantes, antidiabéticas, antitumorais, antitrombóticas e antimicrobianas (Buitimea-Cantua et al., 2020; Sosa-Moguel et al., 2017; Menichini et al., 2009).

Até onde sabemos, poucos estudos investigaram as atividades antiproliferativas, antileishmania e antiacetilcolinesterase de espécies brasileiras de *Capsicum* (Domenico et al., 2012). Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar as atividades antiacetilcolinesterase, antileishmania e antiproliferativa de extratos hexânicos de frutos

de duas variedades de *Capsicum chinense* Jacq. (pimenta bode verde e pimenta biquinho madura); e seus constituintes voláteis identificados por GC-FID e GC-MS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Capsicum chinense (var. pimenta bode verde 'HE-UB' e pimenta biquinho maduro 'HE-RB') foram adquiridos em feiras em Santa Helena de Goiás e em Rio Verde, duas cidades do estado de Goiás (GO), Brasil. Os frutos foram identificados pela botânica Luzia Francisca de Souza e um exemplar comprovante de *C. chinense* (HJ558CC - pimenta biquinho madura) e (HJ559CC - pimenta bode verde) foram depositados no Herbário Jataiense Professor Germano Guarim Neto. Em seguida, foram levados ao Laboratório de Química de Produtos Naturais do IF Goiano - Campus Rio Verde, localizado em Rio Verde, GO, onde foram lavados com água destilada. Em seguida, foram secas com papel toalha e tiveram seus pedúnculos removidos. Os frutos foram então pesados e desidratados em estufa de circulação de ar a 40°C por 96 horas. Por fim, foram moídos, colocados em recipiente lacrado e armazenados em geladeira até a preparação dos extratos brutos hexânicos (HE-UB e HE-RB).



Figura 1. Duas variedades de *Capsicum chinense*: pimenta biquinho madura (esquerda) e pimenta bode verde (direita). Fonte: autoria própria.

4.2 Preparação de extratos hexânicos (HE-UB e HE-RB)

As frutas (300 g) foram secas ao ar e moídas em moinho Wiley. Posteriormente, elas foram exaustivamente extraídas a frio com hexano. Cada extrato resultante foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida. Por fim, foram coletados 6,0 g de extrato bruto hexânico de pimenta biquinho (HE-RB) e 4,3 g de extrato bruto hexânico de pimenta bode verde (HE-UB).

4.3 Identificação química dos constituintes HE-UB e HE-RB

HE-UB e HE-RB foram dissolvidos em éter etílico e analisados por cromatografia gasosa-detecção de ionização de chama (GC-FID) e cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) com o uso de Shimadzu QP5000 Plus e GCMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A temperatura da coluna em GC-FID foi programada para subir de 60 a 240°C a 3°C/min e foi mantida a 240°C por 5 min; o gás transportador era H₂ a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. O equipamento foi configurado para operar no modo de injeção; o volume de injeção foi de 0,1 µL (razão de divisão de 1:10) enquanto as temperaturas do injetor e do detector foram de 240 e 280°C, respectivamente. As concentrações relativas dos componentes foram obtidas por normalização das áreas dos picos (%). As áreas relativas consistiram na média de análises de GC-FID em triplicata. As condições de GC-MS e a identificação foram relatadas anteriormente (Souza et al., 2021). A identificação de componentes voláteis de extratos hexânicos (Tabela 1) foi baseada em seus índices de retenção em uma coluna capilar Rtx-5MS (30 m X 0,25 mm; 0,250 µm) sob as mesmas condições de operação usadas para GC em relação a uma série homóloga de n- alcanos (C8-C20). As estruturas foram comparadas por computador com Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura (Adams, 2007).

4.4 Ensaio antiacetilcolinesterase

O ensaio foi realizado pelo método espectrofotométrico de Ellman, modificado por Lopes et al. (2020). A enzima foi a acetilcolinesterase (AChE) da *Electrophorus electricus* VI (Sigma®). Na microplaca, 25 µL de acetilcolina iodada 15 mM, 125 µL de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), 50 µL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) com 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) e extratos de hexano em concentrações finais na solução de teste variando de 31,25 a 1000 µg/mL (20 µL) foram adicionados a 2 µL de tampão fosfato pH 8 e pré-incubados em banho de gelo a 4°C por 30 min. Os tubos duplicados também foram tratados desta forma com 20 mL de fisostigmina (0,1 mM) para permitir a interferência dos compostos de teste no ensaio em avaliação e para controlar qualquer hidrólise de acetilcolina que não resulte da atividade enzimática. A

absorbância foi medida 5 vezes a 405 nm pelo leitor de microplacas (Biotek, Elx800) em intervalos de 15 s. Após as leituras, 25 µL de acetilcolinesterase 0,22 U.mL⁻¹ foram adicionados aos poços. As absorbâncias foram então medidas 9 vezes a 405 nm em intervalos de 15 s. Os aumentos na absorbância devido à hidrólise espontânea do substrato foram corrigidos pela subtração da taxa de reação antes da adição da enzima. A porcentagem de inibição foi calculada comparando-se as taxas das amostras e as do controle. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. A atividade enzimática e a porcentagem de inibição da AChE foram calculadas pelo programa Microsoft® Excel.

4.5 Ensaio antileishmania

Para avaliar a atividade antileishmania, formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/PH8) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Posteriormente, cerca de 1 x 10⁶ parasitas foram distribuídos em placas de 96 poços, e HE-RB e HE-UB, que haviam sido previamente dissolvidos em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO, solução estoque 100 mM) (Synth), foram adicionados às culturas em concentrações que variam de 6,25 a 100 µg/mL. Anfotericina B (Sigma Aldrich, 97 % de pureza), em concentrações variando de 0,011 a 0,19 µg/mL, foi adicionada às culturas e utilizada como controle positivo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constituintes voláteis de extratos hexânicos de frutos de *C. chinense* – pimenta bode verde (HE-UB) e pimenta biquinho madura (HE-RB) – foram identificados por cromatografia gasosa-deteção de ionização de chama (GC-FID) e cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS) e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Constituintes voláteis de extratos hexânicos de pimenta bode verde (HE-UB) e de pimenta biquinho madura (HE-RB).

Compounds	RT (min)	RTexp	RTLit	%RA	
				HE-UB	HE-RB
Butyl isovalerate	15.41	1011	1010	0.5	1.1
Hemimellitene (1,2,3-trimethylbenzene)	16.71	1020	1020	5.0	2.3
Camphor	26.96	1144	1143	0.7	0.3
2,4-Dimethyl-undecane	28.24	1212	1213	4.4	0.3
Hexyl isovalerate	30.23	1235	1236	8.5	0.4
4-Methyldodecane	32.23	1259	1259	1.5	0.8
Hexyl valerate	33.61	1275	1275	0.4	0.2
<i>n</i> -Octyl isobutyrate	31.27	1345	1348	2.7	6.1
Hexyl caproate	31.62	1352	1352	0.7	1.0
Octadecanal	32.05	1355	1357	5.2	2.0
4-Methyltridecane	32.31	1358	1360	2.2	4.1
Capric acid	34.22	1381	1382	1.1	0.9
3,3-Dimethylcyclohexanol	35.09	1387	1392	2.4	1.1
Longifolene	35.86	1399	1402	0.6	0.9
(<i>E</i>)-Caryophyllene	36.49	1418	1418	21.6	49.4
<i>n</i> -Octyl 2-methyl butyrate	37.13	1433	1434	0.2	0.6
Aromadendrene	37.32	1439	1439	0.4	0.2
Octyl-Isovalerate	37.36	1440	1440	3.5	1.5
Citronellyl propionate	37.52	1441	1444	2.0	0.2
α -Himachalene	37.64	1445	1447	2.5	0.2
4-Methyltetradecane	37.92	1452	1454	7.6	4.8
β -Chamigrene	38.75	1473	1475	0.1	2.0
Isobutyl caprate	41.45	1543	1545	7.5	2.2
4-Methylpentadecane	41.91	1557	1557	0.6	0.5
Octyl hexanoate	42.41	1569	1570	1.9	0.7
Butyl decanoate	43.17	1589	1590	0.1	1.9
Tetradecanal	43.95	1611	1611	0.2	0.7
Citronellyl valerate	44.13	1614	1616	0.7	2.1
Methyl tridecanoate	44.45	1624	1625	2.5	1.3
Pentadecanal	47.47	1708	1710	3.0	2.0
Myristic acid	47.78	1719	1720	2.2	0.8
Total				92.5	92.6

RT = Tempo de retenção; **RI_{exp}** = Índice de retenção relativo aos n-alcenos (C8–C20) na coluna Rtx-5MS; **RI_{lit}** = índice de retenção de Kovats (valores encontrados na literatura - Adams 2007). **%RA** = Abundância relativa.

Em primeiro lugar, foram encontradas concentrações notáveis de E-cariofileno em ambos os extratos, i. e., 49,4% em HE-RB e 21,6% em HE-UB (Tabela 1). Além do E-cariofileno, o HE-RB exibiu apenas outro constituinte principal, que foi o n-octil isobutirato (6,1%). No entanto, HE-UB exibiu cinco outros constituintes principais: hexil isovalerato (8,5%), 4-metiltetradecano (7,6%), caprato de isobutil (7,5%), octadecanal (5,2%) e hemimeliteno (5,0%). *C. chinense* fruta de origem cubana apresentou alta variedade química de constituintes voláteis, enquanto seus principais constituintes foram hexil isopentanoato, hexil pentanoato, hexil 2-metilbutanoato, 3,3-dimetilciclohexanol, c-himachalene e germacreno D (Pino et al., 2011).

Um estudo recente relatou que diferentes tipos de ésteres são comumente encontrados em espécies de *Capsicum* (*C. chinense*, *C. frutescens*, *C. annuum*, *C. baccatum* e *C. pubescens*) e mencionou que a porção 3-metilbutanoil é aparentemente uma característica de *C. chinense* (Murakami et al., 2019).

A composição volátil encontrada pelo estudo relatado nesta breve comunicação, que se refere a frutos de *C. chinense* cultivados em Goiás (GO), Brasil, é muito semelhante à dos frutos de outras duas variedades de *C. chinense* encontradas em Brasília, Capital do Brasil (Garruti et al., 2013). Uma semelhança importante é a concentração notavelmente alta de E-cariofileno (60,01%) identificada em uma variedade de *C. chinense* conhecida como seriema no Brasil (Garruti et al., 2013).

A atividade antiacetilcolinesterase de HE-UB e HE-RB foi rastreada pelo método de ensaio em microplaca e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de IC₅₀ (µg/mL) encontrados contra diferentes linhagens celulares humanas após um tratamento de 24 horas em diferentes concentrações (de 31,25 a 1000 µg/mL) de HE-RB e HE-UB.

Treatments	Cell lines			
	GM07492A	HeLa	MCF-7	U-251
HE-UB	343.06 ± 17.29	363.10 ± 23.44	363.60 ± 17.72	325.40 ± 22.61
HE-RB	447.30 ± 2.55	420.00 ± 6.92	425.00 ± 16.04	373.80 ± 17.72*
PC	12.6 ± 0.39	20.78 ± 0.58	16.25 ± 0.12	30.61 ± 2.41

IC₅₀ - concentração da amostra que inibe 50% da viabilidade celular; **GM07492A** - fibroblastos não tumorais; HeLa - adenocarcinoma cervical; **MCF-7** - adenocarcinoma de mama; **U-251MG** - glioblastoma. **HE-RB** - extrato hexânico de frutos maduros de *C. chinense* (pimenta biquinho). **HE-RB** - extrato hexânico de frutos verdes de *C. chinense* (pimenta bode). **PC** – controle positivo (cisplatina).

*Significativamente diferente da linhagem celular não tumoral (p<0,05).

Ambos os extratos hexânicos exibiram potencial inibitório, cujos valores de IC₅₀ foram 41,5 e 20,3 µg/mL, respectivamente. A fisostigmina de controle positivo exibiu IC₅₀ = 1,3 µg/mL. Ogunruku et al. (2014) avaliaram a atividade antiacetilcolinesterase do extrato aquoso preparado com frutos maduros e verdes de *C. chinense* e constataram que também possui potencial inibitório.

A atividade antiacetilcolinesterase do extrato etanólico de frutos maduros de *C. chinense* também foi avaliada e sua IC₅₀ foi de 18,8 µg/mL (Vargas-Méndez et al., 2016), um pouco menor que a de HE-RB. Assim, os valores de IC₅₀ de HE-UB e HE-RB podem ser considerados altamente satisfatórios.

A literatura tem mostrado que extratos de plantas medicinais, como os de *Blumea lacera* (IC₅₀ = 150 µg/mL) e *Cyclea barbata* (IC₅₀ = 176 µg/mL), são fortes inibidores da acetilcolinesterase (Uddin et al., 2021).

Quanto à atividade antileishmania, HE-UB (IC₅₀ = 67,19 µg/mL) e HE-RB (IC₅₀ = 38,16 µg/mL) foram moderadamente ativos e ativos, respectivamente, contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Pesquisadores afirmaram que

amostras cujos valores de IC₅₀ variam entre 10 e 50 µg/mL são ativas, enquanto aquelas cujos valores de IC₅₀ variam de 50 a 100 µg/mL são moderadamente ativas (Cabral et al., 2020).

Além disso, HE-UB e HE-RB tiveram seu potencial citotóxico contra diferentes linhagens de células tumorais humanas avaliadas. Os extratos exibiram IC₅₀ variando de 325,40 a 425,0 µg/mL após um tratamento de 24 horas. HE-RB apresentou IC₅₀ (373,80 µg/mL) na linhagem U251 significativamente menor do que na linhagem não tumoral (GM07492A, 447,30 µg/mL), revelando assim um efeito seletivo. Ressalta-se que tanto o HE-UB quanto o HE-RB exerceram efeito citotóxico em linhagens celulares humanas não tumorais em concentrações maiores (343,06 e 447,30 µg/mL, respectivamente) do que aquelas em que revelaram efeito antileishmania.

Portanto, os extratos exerceram atividade antileishmania em concentrações não citotóxicas. Este estudo sugere que as atividades exibidas por HE-UB e HE-RB podem estar relacionadas às suas altas concentrações de E-cariofileno, uma vez que é um constituinte promissor que possui atividades antileishmania, anticolinesterase e antitumorais bem conhecidas (Soares et al., 2013; Moreira et al., 2019; Salleh e Khamis, 2020).

6. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou o potencial químico e biológico de extratos hexânicos de frutos maduros e verdes provenientes de duas variedades de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivadas no Brasil: pimenta bode e pimenta biquinho. Os extratos de hexano resultantes exibiram os mesmos constituintes químicos, mas diferiram significativamente em termos de suas concentrações. A única semelhança é que o sesquiterpeno E-cariofileno foi identificado como o principal constituinte tanto em HE-UB quanto em HE-RB. Em relação às atividades biológicas avaliadas, ambos os extratos apresentaram valores de IC₅₀ promissores, mas os de HE-RB foram mais satisfatórios. Em suma, o estudo de extratos de plantas medicinais é um passo fundamental para alcançar resultados de pesquisa de qualidade.

7. REFERÊNCIAS

- Adams, R.P. (2007), Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation.
- Agatonovic-Kustrin, S., Kustrin, E., Morton, D.W. (2019). Essential oils and functional herbs for healthy aging. *Neural Regen Res.*, 14, 441-445.
- Anversa, L., Tiburcio, M.G.S., Richini-Pereira, V.B., Ramirez, L.E. (2018). Human leishmaniasis in Brazil: a general review. *Rev Assoc Med Bras.*, 64, 281-289.
- Buitimea-Cantúa, G.V., Velez-Haro, J.M., Buitimea-Cantúa, N.E., Molina-Torres, J., Rosas-Burgos, E.C. (2020). GC-EIMS analysis, antifungal and anti-aflatoxigenic activity of *Capsicum chinense* and *Piper nigrum* fruits and their bioactive compounds capsaicin and piperine upon *Aspergillus parasiticus*. *Nat Prod Res.*, 34, 1452-1455.
- Cabral, F.D., Fernandes, C.C., Ribeiro, A.B., Squarisi, I.S., Tavares, D.C., Candido, A.C.B.B., Magalhães, L.G., Souza, J.M., Martins, C.H.G., Miranda, M.L.D. (2020). Bioactivities of essential oils from different parts of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae). *Rodriguésia.*, 71, e00902019.
- Domenico, C.I., Coutinho, J.P., Godoy, H.T., Melo, A.M.T. (2012). Caracterização agrônômica e pungência em pimento de cheiro. *Hortic. Bras.*, 30, 466-472.
- Garruti, D.S., Pinto, N.O.F., Alves, V.C.C., Penha, M.F.A., Tobaruela, E.C., Araújo, I.M.S. (2013). Volatile profile and sensory quality of new varieties of *Capsicum chinense* pepper. *Ciênc Tecnol Aliment.*, 33, 102-108.
- Lopes, A.S.N., Guesdon, I.R., Corrêa, G.M., Silva, L.S., Mar, J.M., Sanches, E.A., Bezerra, J.A., do Carmo, D.F.M. (2020). Composição química e atividades biológicas do óleo essencial de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae). *Rev Virtual Quim.* 12, 433-446.
- Marrelli, M., Pisani, F., Amodeo, V., Duez, P., Conforti, F. (2020). *Echinophora tenuifolia* L. branches phytochemical profile and antiproliferative activity on human cancer cell lines. *Nat Prod Res.*, 34, 2664-2667.
- Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M.R., Conforti, F., Statti, G., Cindio, B., Houghton, P.J., Menichini, F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. Cv habanero. *Food Chem.*, 114, 553-560.
- Murakami, Y., Iwabuchi, H., Ohba, Y., Fukami, H. (2019). Analysis of volatile compounds from chili peppers and characterization of habanero (*Capsicum chinense*) volatiles. *J Oleo Sci.*, 68, 1251-1260.
- Ogunraku, O.O., Oboh, G., Ademosun, A.O. (2014). Water extractable phytochemical from peppers (*Capsicum* spp.) inhibit acetylcholinesterase and

- butyrylcholinesterase activities and prooxidants induced lipid peroxidation in rat brain *in vitro*. *Int J Food Sci.*, 2014, 605618.
- Patel, S.S., Raghuwanshi, R., Masood, M., Acharya, A., Jain, S.K. (2018). Medicinal plants with acetylcholinesterase inhibitory activity. *Rev Neurosci.*, 29, 491-529.
- Pino, J., Fuentes, V., Barrios, O. (2011). Volatile constituents of cachucha peppers (*Capsicum chinense* Jacq.) grown in Cuba. *Food Chem.*, 125, 860-864.
- Salleh, W.M.N.H.W., Kahmis, S. (2020). Chemical composition and anticholinesterase inhibitory activity of *Pavetta graciliflora* Wall. Ex. Ridl. Essential oil. *Z Naturforsch.*, 75, 467-471.
- Santana, L.C.L.R., Carneiro, S.M.P., Caland-Neto, L.B., Arcanjo, D.D.R., Moita-Neto, J.M., Citó, A.M.G.L., Carvalho, F.A.A. (2014). Brazilian brown propolis elicits antileishmanial effect against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Nat Prod Res.*, 28, 340-343.
- Silva, I.P., Brissow, E., Kellner Filho, L.C., Senabio, J., Siqueira, K.A., Vandresen Filho, S., Damasceno, J.L., Mendes, S.A., Tavares, D.C., Magalhães, L.G., Sales Junior, P.A., Januário, A.H., Soares, M.A. (2017). Bioactive compounds of *Aspergillus terreus*-F7, an endophytic fungus from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *World J Microbiol Biotechnol.*, 33, 62.
- Sosa-Moguel, O., Pino, J.A., Ayora-Talavera, G., Sauri-Duch, E., Cuevas-Glory, L. (2017). Biological activities of volatile extracts from two varieties of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Int J Food Proper.*, 20, S3042-S3051.
- Souza, A.O., Pereira, P.S., Fernandes, C.C., Andrade, G., Pires, R.H., Candido, A.C.B.B., Magalhães, L.G., Vieira, T.M., Crotti, A.E.M., Martins, C.H.G., Miranda, M.L.D. (2021). Hexane extract from *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. leaves: chemical composition and its bioactive potential against *Candida* pathogenic species, *Leishmania amazonensis* and *Xylella fastidiosa*. *Nat Prod Res.*, 25, 1-6.
- Uddin, M.J., Russo, D., Rahman, Md.M., Uddin, S.B., Halim, M.A., Zidorn, C., Milella, L. (2021). Anticholinesterase activity of eight medicinal plants species: *in vitro* and *in silico* studies in the search for therapeutic agents against Alzheimer's disease. *Evid-Based Complement Altern Med.*, 2021, 9995614.
- Vargas-Méndez, L.Y., Rosado-Solano, D.N., Sanabria-Flórez, P.L., Puerto-Galvis, C.E., Kouznetsov, V. (2016). *In vitro* antioxidant and anticholinesterase activities and *in vivo* toxicological assessment (Zebrafish embryo model) of ethanolic extracts of *Capsicum chinense* Jacq. *J Med Plants Res.*, 10, 59-66.

CAPÍTULO II

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA PROMISSORA DE DUAS VARIEDADES DE *CAPSICUM CHINENSE* CONTRA *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*, *RHIZOPUS STOLONIFER* E *COLLETOTRICHUM GLEOSPOROIDES*

Capítulo II conforme publicado na revista Food Science and Technology.

Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/fst.52722>>

8. RESUMO

As pimentas (*Capsicum sp.*) pertencentes à família Solanaceae constituem um importante segmento no setor de hortaliças, tanto na agricultura quanto na indústria alimentícia. Este trabalho tem como objetivo investigar a atividade antifúngica *in vitro* de extratos hexânicos de frutos de *Capsicum chinense* (pimenta bode verde – ‘HE-UB’ – e pimenta biquinho madura – ‘HE-RB’) contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum gloeosporioides*. A atividade antifúngica foi avaliada pelo método de difusão em disco (DDM) em doses entre 25 µL e 300 µL de ambos os extratos diluídos. As análises químicas revelaram que o constituinte majoritário em ambos os extratos foi o E-cariofileno. HE-RB inibiu 100% do crescimento de *S. sclerotiorum*, *R. stolonifer* e *C. gloeosporioides* nas doses de 200 µL, 100 µL e 300 µL, respectivamente. HE-UB também inibiu 100% do crescimento fúngico em doses de 100 µL (*S. sclerotiorum*), 150 µL (*C. gloeosporioides*) e 200 µL (*R. stolonifer*). HE-RB e HE-UB foram ativos contra os fungos em estudo; assim, a triagem de plantas medicinais oferece outra alternativa para a produção de fungicidas químicos relativamente atóxicos e de baixo custo.

PALAVRAS-CHAVE: Fungicida natural; fungos fitopatogênicos; extrato vegetal; pimenta

APLICAÇÃO PRÁTICA: A pesquisa de fungicidas derivados de plantas para a agricultura tem sido intensificada, uma vez que se torna evidente que eles ainda têm um enorme potencial para inspirar e influenciar a pesquisa da agroquímica moderna.

9. ABSTRACT

Peppers (*Capsicum sp.*) which belong to the Solanaceae family constitute an important segment in the vegetable sector, both in agriculture and in the food industry. This paper aims to investigate in vitro antifungal activity of hexane extracts from *Capsicum chinense* fruit (unripe bode pepper – ‘HE-UB’ – and ripe little beak pepper – ‘HE-RB’) against *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Antifungal activity was evaluated by the disk diffusion method (DDM) at doses between 25 μL and 300 μL of both diluted extracts. Chemical analyses revealed that the major constituent in both extracts was E-caryophyllene. HE-RB inhibited 100% of *S. sclerotiorum*, *R. stolonifer* and *C. gloeosporioides* growth at doses of 200 μL , 100 μL and 300 μL , respectively. HE-UB also inhibited 100% of fungal growth at doses of 100 μL (*S. sclerotiorum*), 150 μL (*C. gloeosporioides*) and 200 μL (*R. stolonifer*). HE-RB and HE-UB were active against the fungi under study; thus, screening of medicinal plants provides another alternative to produce chemical fungicides that are relatively non-toxic and cost-effective.

KEYWORDS: Natural fungicide; phytopathogenic fungi; plant extract; pepper

PRACTICAL APPLICATION: Research into plant-derived fungicides for agriculture has now been intensified since it becomes evident that they still have enormous potential to inspire and influence modern agrochemical research.

10. INTRODUÇÃO

As pimentas (*Capsicum sp.*) pertencentes à família Solanaceae constituem um importante segmento no setor de hortaliças, tanto na agricultura quanto na indústria alimentícia. São especiais para a produção de especiarias devido às suas características de cor do fruto e ingredientes ativos que conferem aroma e sabor (Bianchi et al., 2020).

É uma espécie que possui frutos pequenos e redondos – com caudas que lembram o bico de uma ave – que possuem baixa pungência e caracterizam-se como frutos doces que podem ser consumidos in natura ou processados (Diel et al., 2020).). Outra variedade de *Capsicum* que cresce no Brasil foi avaliada por este estudo: pimenta bode. Tem aroma especial e seus frutos verdes são vendidos frescos enquanto os maduros inteiros (amarelos ou vermelhos) são principalmente enlatados (com vinagre ou azeite) e transformados em molhos (Jesus et al., 2020).

Em relação às plantas medicinais, a literatura tem descrito amplamente a importância de extratos vegetais, compostos isolados e óleos essenciais (OEs) no combate a fitopatógenos que danificam diversas culturas economicamente relevantes (Seepe et al., 2021). Alguns fitopatógenos são os fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum gloeosporioides*. O que causa a doença conhecida como mofo branco e ataca a cultura da soja é o *S. sclerotiorum* (Silva et al., 2019). *R. stolonifer* danifica principalmente frutos, pois causa a doença pós-colheita conhecida como podridão mole (Rezende et al., 2020). *C. gloeosporioides* causa antracnose, a doença pós-colheita que leva à podridão dos frutos, que afeta diversos frutos, como manga, abacate e maracujá, e impede a comercialização (Gomes et al., 2021).

Levando em consideração o potencial bioativo de extratos de *C. chinense* (Morais et al., 2019; Santos et al., 2022), este estudo teve como objetivo investigar o potencial antifúngico in vitro de extratos hexânicos de duas variedades brasileiras de frutos de *C. chinense* (pimenta bode verde – 'HE-UB' – e pimenta biquinho madura – 'HE-RB' – Figura 2).



Figura 2. Pimenta bode verde (esquerda) e pimenta biquinho madura (direita). Fonte: Google (https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-1700056693-sementes-de-pimenta-bode-vermelha-de-goias-ideal-para-horta-_JM).

11. MATERIAIS E MÉTODOS

11.1 Atividade antifúngica de HE-RB e HE-UB

Neste estudo, foram utilizadas duas metodologias para avaliação da atividade antifúngica *in vitro* (Dias et al., 2022; Cabral et al., 2022). As linhagens de *R. stolonifer* e *C. gloeosporioides* foram isoladas de mamão mofado em condições naturais e identificadas. Isolados de *S. sclerotiorum* foram coletados em uma área naturalmente infestada por este patógeno em Rio Verde, GO, Brasil. Os escleródios foram produzidos cortando micélios fúngicos e colocando-os em frascos Erlenmeyer contendo discos de cenoura previamente autoclavados. Os frascos foram incubados a 25°C no escuro por 30 dias. Em seguida, os escleródios resultantes foram retirados dos frascos, lavados em água corrente e armazenados a 5°C até serem utilizados nos experimentos. O método de gravação em placa foi usado para isolamento e purificação. Colônias fúngicas isoladas (*R. stolonifer* e *C. gloeosporioides*) selecionadas em mamão naturalmente contaminado foram dissolvidas em solução salina estéril para fazer uma suspensão fúngica que foi espalhada em placas de Petri contendo meio de ágar batata dextrose (PDA) e incubada a 28 ° C por 3- 5 dias até o crescimento completo do fungo. As colônias crescidas foram recultivadas para obter culturas puras, transferidas para meio inclinado PDA e armazenadas a 4°C para estudos posteriores. As cepas fúngicas foram cultivadas a 28°C por 3-5 dias e os esporos fúngicos em placas foram dissolvidos em solução salina estéril e diluídos na proporção aproximada de 10⁶ UFC/mL. HE-RB e HE-UB foram dissolvidos em 0,1% de Tween 80 para renderizar doses entre 25-300 µL. Os extratos foram preparados e diluídos conforme metodologia do Capítulo I e foram filtrados por um filtro microporoso de 0,45 µM. Em seguida, 100 µL de cada suspensão fúngica foi espalhado em meio de placa PDA e o papel de filtro estéril (6,0 mm de diâmetro, 1,0 mm de espessura) foi impregnado com 10 µL de cada extrato e colocado na superfície das placas de Petri semeadas. Papel de filtro carregado com solvente foi usado como controle. As placas foram colocadas numa incubadora a 28°C durante 3-5 dias. O diâmetro da zona de inibição foi medido e registrado como um indicador de atividade antifúngica. O Frownicide 500SC foi usado como controle positivo (dose de 5 µL). Tween 80 também foi avaliado na dose mais baixa sob investigação (25 µL) em todas as etapas do experimento para descobrir se interferiria nos ensaios. Ensaios de difusão em ágar aplicados a cada HE contra os três fungos foram realizados em triplicata. Eles foram

incubados a 28°C e o crescimento micelial foi medido diariamente até o crescimento completo do fungo em placas de controle. O tratamento foi realizado em quadruplicada e o delineamento experimental realizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram avaliadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância pelo programa ASSISTAT. A porcentagem de inibição do crescimento micelial (IMG – Figuras 3-8) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$IMG (\%) = \frac{(\text{crescimento de controle} - \text{crescimento com tratamento})}{\text{crescimento de controle}} \times 100$$

12. RESULTADOS

12.1 Atividade antifúngica

Os ensaios de atividade antifúngica foram divididos em duas partes e os resultados foram mostrados por gráficos nas Figuras 2-7. A primeira parte consistiu em testar todas as doses pré-selecionadas de HE-RB (25-300 μ L) e Tween 80 (25 μ L) contra *S. sclerotiorum*, *R. stolonifer* e *C. golesporoides* para encontrar a dose de HE-RB que ser capaz de inibir 100% dos três fungos (Figuras 2-4). No caso de *S. sclerotiorum*, a inibição máxima foi alcançada com 200 μ L de HE-RB enquanto 100 μ L foi suficiente para inibir 100% do crescimento de *R. stolonifer* e 300 μ L inibiu 100% do crescimento de *C. golesporoides*. A segunda parte das análises teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico do HE-UB frente aos fungos. Os resultados mostraram que 100 μ L, 200 μ L e 150 μ L inibiram 100% do crescimento de *S. sclerotiorum*, *R. stolonifer* e *C. golesporoides*, respectivamente. O controle positivo foi o fungicida comercial Frowncide 500SC a 5 μ L (100% de inibição).

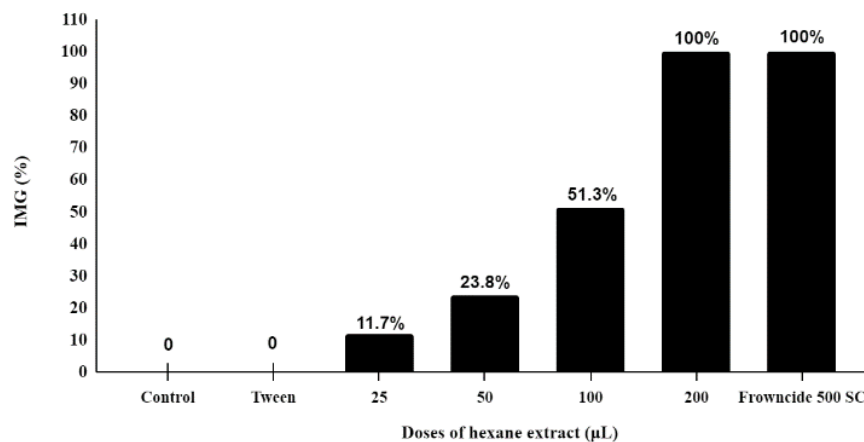


Figura 3. Porcentagens de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em diferentes doses de HE-RB. Fonte: autoria própria.

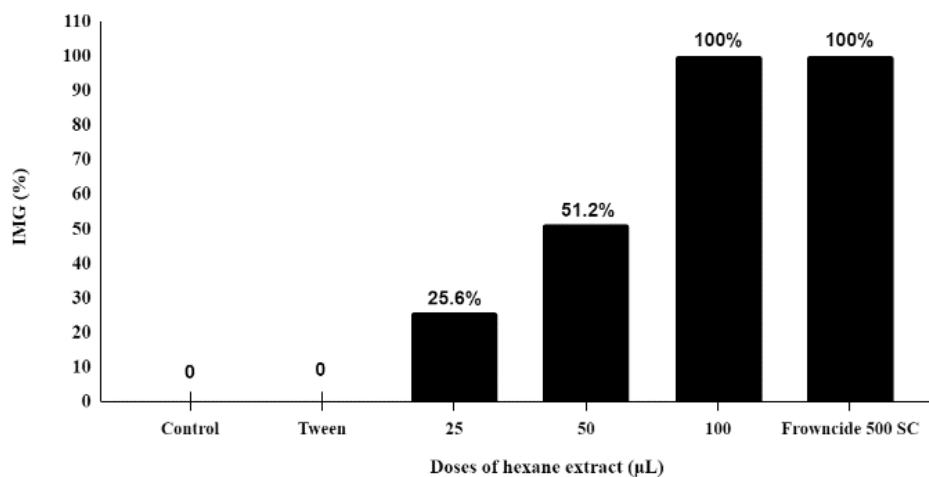


Figura 4. Porcentagens de inibição do crescimento micelial de *R. stolonifer* em diferentes doses de HE-RB. Fonte: autoria própria.

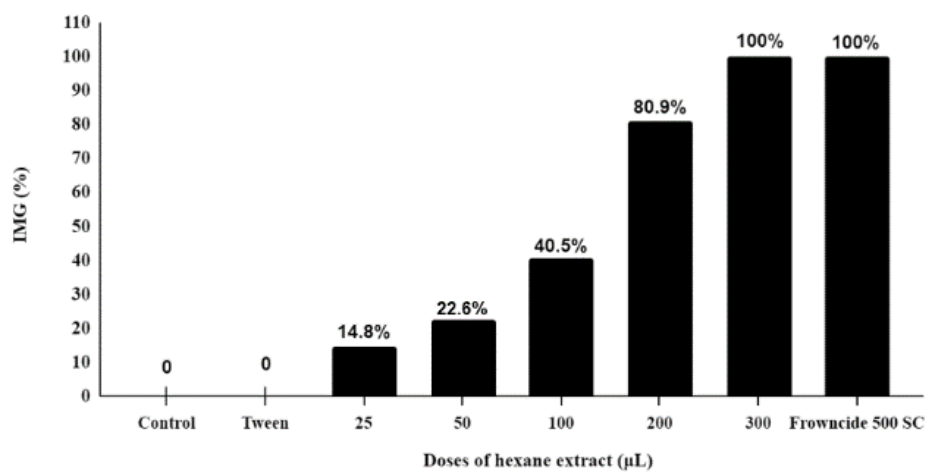


Figura 5. Porcentagens de inibição do crescimento micelial de *C. golesporoides* em diferentes doses de HE-RB. Fonte: autoria própria.

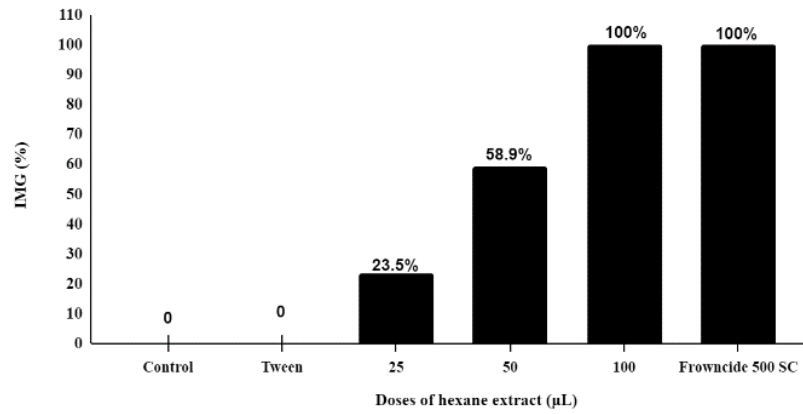


Figura 6. Porcentagens de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em diferentes doses de HE-UB. Fonte: autoria própria.

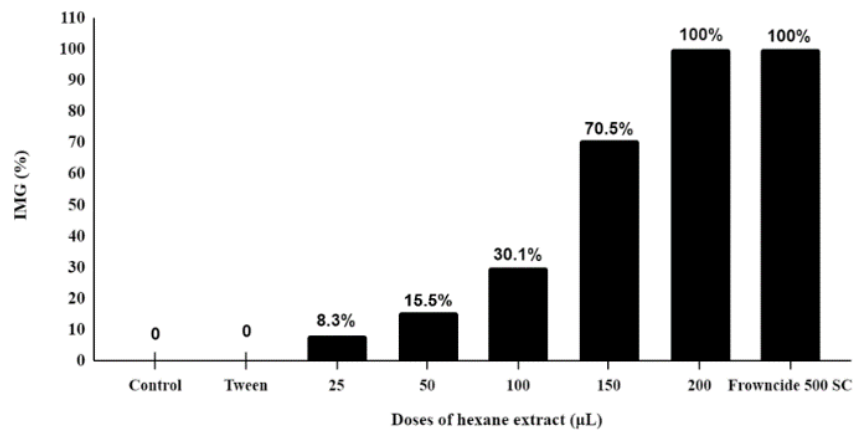


Figura 7. Porcentagens de inibição do crescimento micelial de *R. stolonifer* em diferentes doses de HE-UB. Fonte: autoria própria.

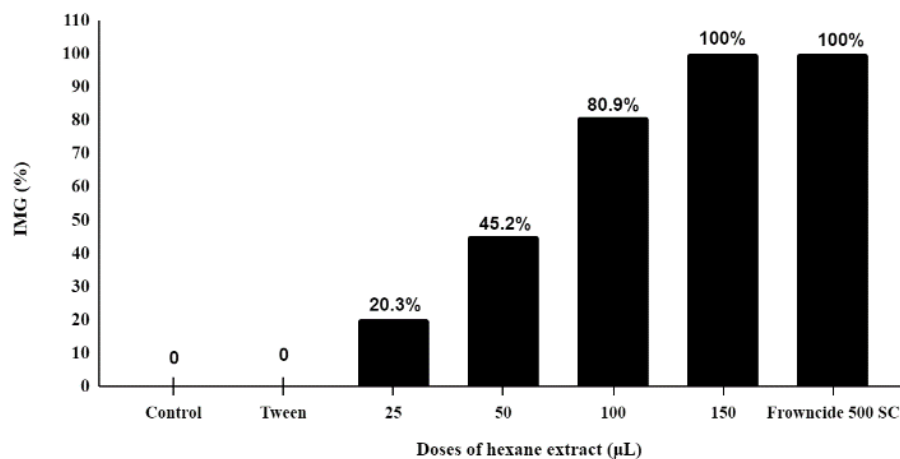


Figura 8. Porcentagens de inibição do crescimento micelial de *C. golesporoides* em diferentes doses de HE-UB. Fonte: autoria própria.

13. DISCUSSÃO

Em relação à atividade antifúngica, foram encontrados excelentes resultados *in vitro*. Tanto HE-RB quanto HE-UB exibiram alta inibição do crescimento micelial de três fitopatógenos, i. e., *S. sclerotiorum*, *R. stolonifer* e *C. golesporoides*. Deve-se reforçar que causam prejuízos econômicos incalculáveis a importantes culturas mundiais, como a soja, e impedem a comercialização de diversos tipos de frutas devido à podridão precoce (Wang et al., 2020; Nunes et al., 2020).

No cenário em que os fungos são responsáveis por graves perdas econômicas e danos no setor alimentício, produtos naturais com atividade antifúngica são considerados alternativas promissoras para substituir fungicidas sintéticos altamente tóxicos. Os metabólitos secundários de plantas já provaram ser tão ativos quanto os fungicidas comerciais usados na agricultura (Jiménez-Reyes et al., 2019).

Dados recentes publicados por vários pesquisadores mostraram que *C. chinense* apresenta atividade antifúngica relevante, fato que foi confirmado e corroborado por esta breve comunicação. Por exemplo, Anaya-López e colaboradores (2006) mostraram que *C. chinense* exibe atividade contra o fungo *Candida albicans*. Dias et al. (2013) relataram que *C. chinense* é ativo contra as leveduras *C. albicans*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *C. tropicalis* e *K. marxianus*. O extrato etanólico à base de frutos de *C. chinense* mostrou sua capacidade de inibir o crescimento de *Aspergillus parasiticus* (Buitimea-Cantúa et al., 2020). Além disso, alguns pesquisadores afirmaram que os peptídeos encontrados no fruto de *C. chinense* possuem alto potencial antimicrobiano contra fungos fitopatogênicos, o que é uma forte evidência de que a espécie é promissora na agricultura (Santos et al., 2020; Moguel-Salazar et al., 2011). Também, um estudo recente realizado por Aguiéiras e colaboradores (2021) mostrou que os frutos de *C. chinense* possuem metabólitos bioativos capazes de combater patógenos multirresistentes.

Estudos de *C. chinense* e seus constituintes ativos – já publicados na literatura – podem explicar os resultados satisfatórios de HE-RB e HE-UB. Este estudo destaca a inibição total do crescimento fúngico quando diferentes doses de extratos hexânicos foram avaliadas. Santos et al. (2024) relataram que 200 µL do extrato de acetato de etila extraído do fruto de *C. chinense* foi capaz de inibir o crescimento de *S. sclerotiorum* (96,2%), *R. stolonifer* (87,3%) e *C. golesporoides* (98,3%). O extrato metanólico foi

pouco ativo, pois inibiu apenas cerca de 50% do crescimento micelial dos três fungos (Santos et al., 2024). Em suma, este estudo sugere que a atividade antifúngica exibida por HE-RB e HE-UB pode ser explicada por suas altas concentrações de E-cariofileno, uma vez que este sesquiterpeno possui atividade antifúngica bem conhecida (Sobrinho et al., 2020; Hilgers et al. ., 2021). Outra possibilidade que também deve ser mencionada é o efeito sinérgico de todos os constituintes dos extratos que atuam para resultar em atividade antifúngica satisfatória (Rueangrit et al., 2019).

14. CONCLUSÕES

Os extratos de pimenta em avaliação têm efeito inibitório sobre o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Outra observação é que quanto maior a doses de extrato, maior a atividade antifúngica.

15. REFERÊNCIAS

- Adams, R.P. (2007), Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation.
- Aguieiras, M.C.L., Resende, L.M., Souza, T.A.M., Nagano, C.S., Chaves, R.P., Taveira, G.B., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Gomes, V.M., Mello, E.O. 2021. Potent anti-Candida fraction isolated from Capsicum chinense fruits contains an antimicrobial peptide that is similar to plant defensin and is able to inhibit the activity of different α -amylase enzymes. Probiotics Antimicrob. Proteins, 13: 862-872.
- Anaya-López, J.L., López-Meza, J.E., Baizabal-Aguirre, V.M., Cano-Camacho, H., Ochoa-Zarzosa, A. 2006. Fungicidal and cytotoxic activity of a Capsicum chinense defensin expressed by endothelial cells. Biotechnol. Lett. 28: 1101-1108.
- Bianchi, P.A., Silva, L.R.A., Alencar, A.A.S., Santos, P.H.A.D., Pimenta, S., Sudré, C.P., Corte, L.E.D., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R. 2020. Biomorphological characterization of Brazilian Capsicum chinense Jacq. Germplasm. Agronomy, 10: 447.
- Buitimea-Cantúa, G.V., Velez-Haro, J.M., Buitimea-Cantúa, N.E., Molina-Torres, J., Rosas-Burgos, E.C. 2020. GC-EIMS analysis, antifungal and anti-aflatoxigenic activity of Capsicum chinense and Piper nigrum fruits and their bioactive compounds capsaicin and piperine upon Aspergillus parasiticus. Nat. Prod. Res., 34: 1452-1455.
- Cabral, F.V., Fernandes, C.C., Dias, A.L.B., Ribeiro, A.B., Squarisi, I.S., Tavares, D.C., Crotti, A.E.M., Moreira, F.F., Miranda, M.L.D. 2022. Hexane extract from Tradescantia pallida (Rose) D.R. Hunt (Commelinaceae): its volatile constituents and in vitro antifungal and cytotoxic activities. Braz. Arch. Biol. Technol., 65: e22210621.
- Dias, A.L.B., Batista, H.R.F., Sousa, W.C., Bailão, E.F.L.C., Rocha, J.D., Sperandio, E.M., Fernandes, C.C., Souchie, E.L., Miranda, M.L.D. 2022. Psidium myrtooides O. Berg fruit and leaves: physicochemical characteristics, antifungal

- activity and chemical composition of their essential oils in different seasons. *Nat. Prod. Res.*, 36: 1043-1047.
- Dias, G.B., Gomes, V.M., Pereira, U.Z., Ribeiro, S.F.F., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S., Ferreira, A.T.S., Perales, J., Cunha, M. 2013. Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. Seeds. *Protein. J.*, 32: 15-26.
- Diel, M.I., Lúcio, A.D.C., Valera, O.V.S., Sari, B.G., Olivoto, T., Pinheiro, M.V.M., Melo, P.J., Tartaglia, F.L., Schmidt, D. 2020. Production of biquinho pepper in different growing seasons characterized by the logistic model and its critical points. *Cienc. Rural*, 50: e20190477.
- Garruti, D.S., Pinto, N.O.F., Alves, V.C.C., Penha, M.F.A., Tobaruela, E.C., Araújo, I.M.S. 2013. Volatile profile and sensory quality of new varieties of *Capsicum chinense* pepper. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 33: 102-108.
- Gomes, S., Azevedo-Nogueira, F., Martins-Lopes, P. 2021. Editorial comments to the special issue: “*Colletotrichum* spp. on fruit crops – state of the art, perspectives and drawbacks”. *Pathogens*, 10: 478.
- Hilgers, F., Habash, S.S., Loeschcke, A., Ackermann, Y.S., Neumann, S., Heck, A., Klaus, O., Hage-Hulsmann, J., Grundler, F.M.W., Jaeger, K.E., Schleker, A.S.S., Drepper, T. 2021. Heterologous production of β -caryophyllene and evaluation of its activity against plant pathogenic fungi. *Microorganisms*, 9: 168.
- Jesus, G.C.R., Neto, E.C.F., Barraque, M.J.M., Mesquita, P.H.G., Curvêlo, C.R.S. 2020. Qualidade e produtividade de variedades botânicas de pimenta (*Capsicum chinense*) fora da região amazônica, seu centro de diversificação. *Braz. J. of Develop.*, 6: 32378-32389.
- Jiménez-Reyes, M.F., Carrasco, H., Olea, A.F., Silva-Moreno, E. 2019. Natural compounds: a sustainable alternative to the phytopathogens control. *J. Chil. Chem. Soc.*, 64: 4459-4465.
- Moguel-Salazar, F., Brito-Argáez, L., Díaz-Brito, M., Islas-Flores, I. 2011. A review of a promising therapeutic and agronomical alternative: antimicrobial peptides from *Capsicum* sp. *Afr. J. Biotechnol.*, 10: 19918-19928.

- Morais, K.S., Morais, B.S., Vilarinho, L.B.O., Chagas, P.C., Melo, A.C.G.R., Takahashi, J.A., Filho, A.A.M. 2019. Bioactive extracts of *Capsicum chinense* in the Northern Amazon. *Chem. Enginn. Trans.*, 75: 433-438.
- Murakami, Y., Iwabuchi, H., Ohba, Y., Fukami, H. 2019. Analysis of volatile compounds from chili peppers and characterization of habanero (*Capsicum chinense*) volatiles. *J. Oleo Sci.*, 68: 1251-1260.
- Nunes, M.S., Farias, O.R., Cruz, J.M.F.L., Duarte, I.G., Silva, H.F., Nascimento, L.C. 2020. Incidência de fungos fitopatogênicos em frutos e hortaliças comercializadas em Areia-Paraíba. *Braz. J. of Develop.*, 6: 36283-36295.
- Pino, J., Fuentes, V., Barrios, O. 2011. Volatile constituents of cachucha peppers (*Capsicum chinense* Jacq.) grown in Cuba. *Food Chem.*, 125: 860-864.
- Rezende, J.L., Fernandes, C.C., Costa, A.O.M., Santos, L.S., Neto, F.V., Sperandio, E.M., Souchie, E.L., Colli, A.C., Crotti, A.E.M., Miranda, M.L.D. 2020. Antifungal potential of essential oils from two varieties of *Citrus sinensis* (lima orange and bahia navel orange) in postharvest control of *Rizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Food Sci. Technol.*, 40: 405-409.
- Rueangrit, S., Eakjamnong, W., Dethoup, T. 2019. Hidden synergistic effects of the combinations of plant extracts against plant pathogenic fungi. *J. Biopest.*, 12: 51-60.
- Santos, L.A., Taveira, G.B., Silva, M.S., Gebara, R.S., Pereira, L.S., Perales, J., Teixeira-Ferreira, A., Mello, E.O., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Gomes, V.M. 2020. Antimicrobial peptides from *Capsicum chinense* fruits: agronomic alternatives against phytopathogenic fungi. *Biosci. Rep.*, 40: BSR20200950.
- Santos, L.S., Fernandes, C.C., Santos, L.S., Candido, A.C.B.B., Magalhães, L.G., Andrade, G., Pires, R.H., Miranda, M.L.D. 2022. Phenolic compounds and biological activities of ethanolic extract from *Capsicum chinense* unripe fruit (var. bode pepper). *Mediterr. J. Chem.*, 12: 31-37.
- Santos, L.S., Fernandes, C.C., Santos, L.S., Dias, A.L.B., Souchie, E.L., Miranda, M.L.D. 2024. Phenolic compounds and antifungal activity of ethyl acetate extract and methanolic extract from *Capsicum chinense* Jacq. Ripe fruit. *Braz. J. Biol.*, 84: e258084.

- Seepe, H.A., Nxumalo, W., Amoo, S.O. 2021. Natural product from medicinal plants against phytopathogenic *Fusarium* species: current research endeavours, challenges and prospect. *Molecules*, 26: 6539.
- Silva, F.F.A., Alves, C.C.F., Filho, J.G.O., Vieira, T.M., Crotti, A.E.M., Miranda, M.L.D. 2019. Chemical constituents of essential oil from *Murraya paniculata* leaves and its application to in vitro biological control of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Food Sci. Technol.*, 39: 413-417.
- Sobrinho, A.C.N., Morais, S.M., Souza, E.B., Albuquerque, M.R.J.R., Santos, H.S., Cavalcante, C.S.P., Sousa, H.A., Fontenelle, R.O.S. 2020. Antifungal and antioxidant activities of *Vernonia chalybaea* Mart. Ex DC. Essential oil and their major constituent β -caryophyllene. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 63: e20190177.
- Wang, Y., Sun, Y., Wang, J., Zhou, M., Wang, M., Feng, J. 2019. Antifungal activity and action mechanism of the natural product cinnamic acid against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.*, 103: 944-950.

CAPÍTULO III

EXTRATOS VEGETAIS DE *Capsicum chinense* INCORPORADOS EM FILME DE ARARUTA, APLICADOS A EMBALAGENS PARA CONTROLE DE FUNGOS DO GÊNERO RHIZOPUS EM CULTURA DE MORANGOS.

16. RESUMO

A grande preocupação com o meio ambiente e a saúde pública no que tange o uso em larga escala de antifúngicos e bactericidas, tem feito com que o estudo de produtos alternativos advindos de fontes naturais tenha ganhado importância no cenário ambiental. Este trabalho tem como objetivo investigar a atividade antifúngica do extrato hexânico de frutos de *Capsicum chinense* (pimenta bode verde – ‘HE-UB’ – e pimenta biquinho madura – ‘HE-RB’) em diferentes concentrações incorporados em filme biodegradável de araruta, aplicados em cultura de morango contra o fungo *Rhizopus stolonifer*. O aumento da vida útil dos morangos foi avaliada de forma visual conforme o aparecimento dos fungos. As análises constataram que os extratos demonstram ser uma excelente barreira contra o crescimento dos fungos e eficaz em impedir a desidratação dos frutos.

PALAVRAS-CHAVE: Vida útil; antifúngico; extrato vegetal; pimenta.

APLICAÇÃO PRÁTICA: Aumento da vida útil do morango com a aplicação do biofilme de araruta incorporado com extrato vegetal de pimenta.

17. ABSTRACT

The great concern with the environment and public health regarding the large-scale use of antifungals and bacteria, has made the study of alternative products from natural sources has gained importance. This work aims to investigate the antifungal activity of the hexanic extract of *Capsicum chinense* fruits (green goat pepper – 'HE-UB' – and mature biquinho pepper – 'HE-RB') at different concentrations incorporated into arrowroot biofilm, applied in strawberry culture against the fungus *Rhizopus stolonifer*. The increase in shelf life of strawberries was visually evaluated according to the appearance of fungi. Analyzes found that the extract proves to be an excellent barrier against fungal growth and effective in preventing fruit dehydration.

KEYWORDS: Service life; antifungal; plant extract; pepper.

PRACTICAL APPLICATION: Increased of strawberry crops with the application of arrowroot biofilm incorporated with pepper plant extract.

18. INTRODUÇÃO

Segundo a Embrapa em 2021, o Brasil alcançou o marco de maior exportador mundial de soja do planeta (91 milhões de toneladas) e terceiro maior produtor de milho e feijão (105 milhões e 2,9 milhões de toneladas, respectivamente). Além disso o país se destaca como o terceiro maior produtor mundial de frutas, porém com uma exportação ainda modesta.

Para que frutas sejam exportadas, as mesmas devem cumprir a Instrução Normativa MAPA nº 69/2018 que estabelece que os produtos devem estar: inteiros, limpos, firmes, sem pragas visíveis a olho nu, fisiologicamente desenvolvidos ou com maturidade comercial.

Sendo assim, a utilização de antifúngicos durante o processo de cultivo e após colheita é amplamente utilizado e fez com que em 2008, o Brasil ultrapassasse os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. Em 2010, o consumo de agrotóxicos no Brasil teve acréscimo no ano de 190% e os fungicidas corresponderam a 14% nesse mercado (TAKAHASHI et al., 2014).

A utilização em larga escala de agrotóxicos e antifúngicos tem gerado grande preocupação em relação ao meio ambiente e a saúde pública. Pois estes produtos causam contaminação do solo e das águas.

Visto todo esse cenário a busca por alternativas naturais vem ganhando espaço, devido as suas propriedades antifúngicas e viabilidade econômica.

Deste modo a utilização de filmes biodegradáveis com a incorporação de extratos vegetais, estão sendo analisadas para se avaliar as atividades antifúngicas desse material.

Para a produção destes filmes, alguns amidos são comumente utilizados como o amido de milho, de trigo e de araruta.

O amido de araruta tem a vantagem de excelente digestibilidade (VILLASBOAS; FRANCO, 2016), capacidade de gelificação (CHARLES et al., 2016; HOOVER, 2001), características físico-químicas especiais, como o alto teor de amilose é desejável para a produção de filmes com boas propriedades tecnológicas, principalmente, quando se trata de resistência mecânica e propriedades de barreira

(FAKHOURI et al., 2012; LI et al., 2011; ROMERO-BASTIDA et al., 2015; THARANATHAN, 2003).

19. MATERIAIS E MÉTODOS

19.1 Filme biodegradável

Para a preparação do filme biodegradável foram adicionados 1,5g de glicerol, 5g de fécula de araruta, 100mL de água destilada ao qual foram mantidos sob agitação constante e aquecimento até 70°C. Após o filme atingir a consistência de gelatinoso e transparente o aquecimento foi desligado.

19.2 Diluição do Extrato Hexânico

Os extratos hexânicos das pimentas foram preparados conforme metodologia do Capítulo I e diluídos, sendo que HE-RB foi diluído em água e HE-UB em tween.

19.3 Incorporação do extrato no filme

Quando o filme atingiu uma temperatura de 40°C, ainda sob agitação foram adicionados os volumes de 0,5mL, 0,75mL e 1mL de extrato já diluído.



Figura 9. Filme biodegradável com e sem a incorporação de extrato hexânico de pimenta.
Fonte: autoria própria.

19.4 Aplicação do filme nos morangos

Após o filme estar bem homogêneo, a agitação é cessada e os morangos previamente limpos, são embebidos no filme. Eles foram então armazenados em bandejas limpas, envolvidas em filme stretch e armazenados em temperatura ambiente por 7 dias.



Figura 10. Morangos com aplicação do filme biodegradável incorporado com extrato vegetal prontos para armazenamento. Fonte: autoria própria.

A atividade antifúngica do filme incorporado com extrato das pimentas foi avaliado visualmente, conforme o aparecimento dos fungos e comparado com morangos armazenados sob as mesmas condições sem a aplicação do filme e com aplicação do filme sem a incorporação de extrato.

20. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após quatro dias de armazenamento o aparecimento do fungo nos morangos embebidos no filme com as três concentrações de extrato hexânico da pimenta bode foi relevante, nos morango com filme sem a incorporação de extrato e nos morangos sem filme também houve a manifestação dos fungos. Já para os morangos embebidos no filme incorporados no extrato hexânico da pimenta biquinho o aparecimento dos fungos foi mais sutil e em algumas bandejas não ocorreu.

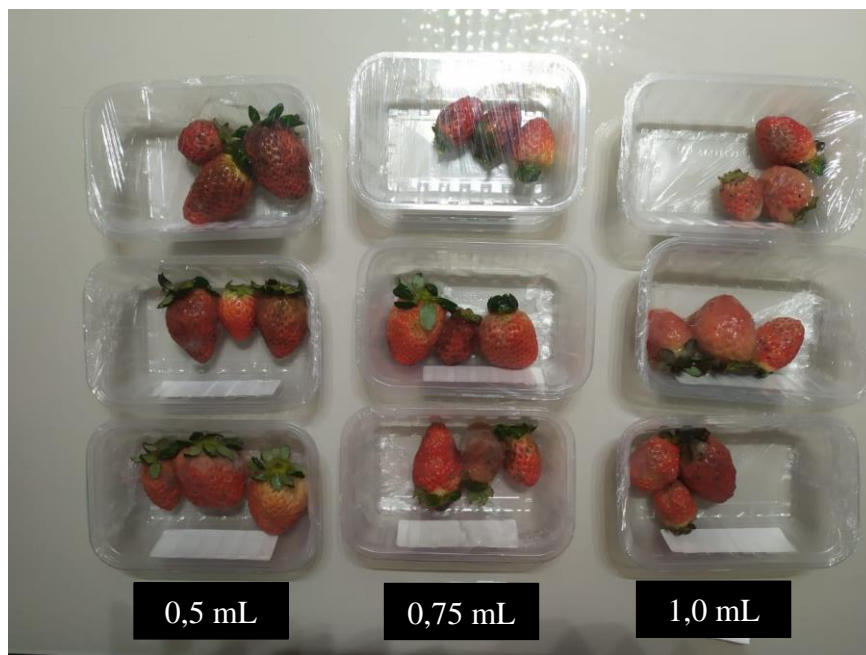


Figura 11. Morangos com aplicação do filme biodegradável incorporado com extrato vegetal de pimenta bode nas três concentrações após 4 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.



Figura 12. Morangos com aplicação do filme biodegradável incorporado com extrato vegetal de pimenta biquinho nas três concentrações após 4 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.



Figura 13. Morangos com aplicação do filme sem incorporação de extrato após 4 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.



Figura 14. Morangos sem aplicação do filme após 4 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.

Após sete dias de armazenamento dos morangos a manifestação dos fungos era totalmente evidente em todas as concentrações, entretanto nos morangos com aplicação do filme incorporados no extrato vegetal da pimenta biquinho a proliferação foi menor para as três concentrações em especial a de 0,5 mL.

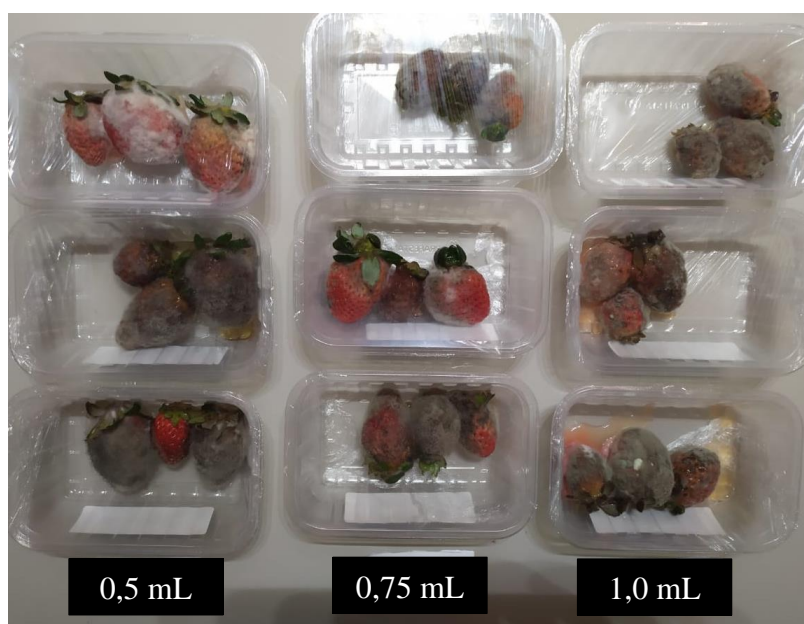


Figura 15. Morangos com aplicação do filme biodegradável incorporado com extrato vegetal de pimenta bode nas três concentrações após 7 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.

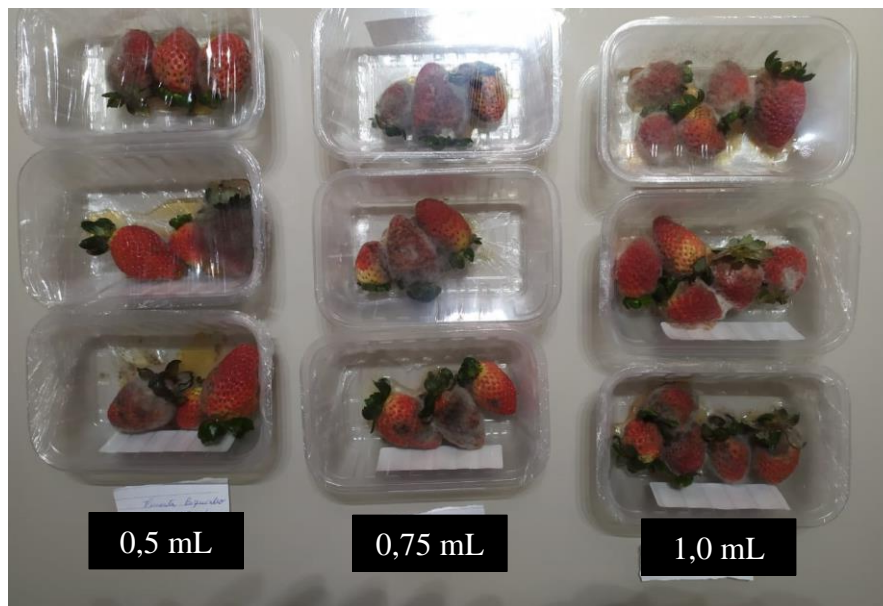


Figura 16. Morangos com aplicação do filme biodegradável incorporado com extrato vegetal de pimenta biquinho nas três concentrações após 7 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.



Figura 17. Morangos com aplicação do filme sem incorporação de extrato após 7 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.



Figura 18. Morangos sem aplicação do filme após 7 dias de armazenamento. Fonte: autoria própria.

Segundo Moraes et. al. (2014), foi comprovado que em seu estudo morangos que eram revestidos em solução à base de gelatina mantinham seu aspecto físico e apresentavam menor perda de massa, após dez dias de armazenamento, enquanto que morangos revestidos com filme à base de goma arábica não apresentavam os mesmos resultados. Isso pode se dever a maior afinidade desse sistema em atrair água, acelerando a degradação do morango.

Dantas et. al. (2017), afirma que a aplicação de revestimento utilizando extrato alcoólico de pimenta biquinho foi eficiente para aumentar a vida útil de frutos de goiaba. E quanto maior a concentração de extrato aplicado, menor a degradação da Vitamina C, devido a proteção e ação do extrato.

21. CONCLUSÕES

O aumento da vida útil dos morangos foi avaliada de forma visual conforme o aparecimento dos fungos. As análises constataram que o extrato hexânico da pimenta biquinho demonstra ser uma excelente barreira contra o crescimento dos fungos e eficaz em impedir a desidratação dos frutos, já o extrato da pimenta bode não se mostrou tão eficiente.

Desta forma temos que filmes biodegradáveis utilizados como revestimento são uma boa alternativa à substituição de filmes plásticos. Estes quando aliados a ação antifúngica dos extratos hexânicos de pimenta que podem ser incorporados aos filmes, se mostram uma excelente opção de revestimento, pois além de ter um menor tempo de degradação no meio ambiente, aumenta a vida útil dos frutos.

22. REFERÊNCIAS

- CHARLES, A. L. et al. Propriedades funcionais do amido de araruta em amidos compostos de mandioca e batata-doce. *Food Hydrocolloids*, v. 53, p. 187–191, 2016.
- DANTAS, E. R. et al. Extrato da Pimenta ‘Biquinho’ como revestimento comestível na conservação de goiabas. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. v.12, Nº 4, p. 695-700, 2017.
- EMBRAPA, 2023. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/75085849/ciencia-e-tecnologia-tornaram-o-brasil-um-dos-maiores-produtores-mundiais-de-alimentos>>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2023.
- FAKHOURI, F. M. et al. Edible films made from blends of manioc starch and gelatin e Influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. *LWT - Food Science and Technology*, v. 49, p. 149–154, 2012.
- HOOVER, R. Composition , molecular structure , and physicochemical properties of tuber and root starches : a review. v. 45, 2001.
- MORAIS, M. M. et al. Estudo de filmes biodegradáveis de recobrimento aplicado em morangos. Universidade Federal do Pampa. COBEQ, 2014. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0597-24776-162407.pdf>>. Acesso em: 11 de maio de 2023.
- ROMERO-BASTIDA, C. A. et al. Effect of the addition order and amylose content on mechanical , barrier and structural properties of films made with starch and montmorillonite. *Carbohydrate Polymers*, v. 127, p. 195–201, 2015.
- TAKAHASHI, J., MELHEM, M. 2014. Uso de fungicidas na agricultura e resistência a antifúngicos na clínica médica. Disponível em :< https://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial_241/bial_24_1-13.pdf>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2023.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future Trends in Food Science and Technology, 2003.

VILLAS-BOAS, F.; FRANCO, C. M. L. Effect of bacterial β -amylase and fungal α amylase on the digestibility and structural characteristics of potato and arrowroot starches. Food Hydrocolloids, v. 52, p. 795–803, 2016.