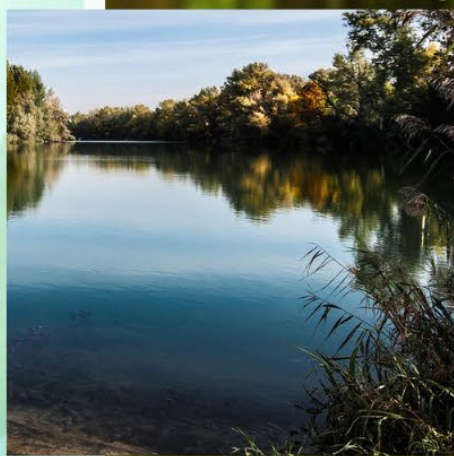
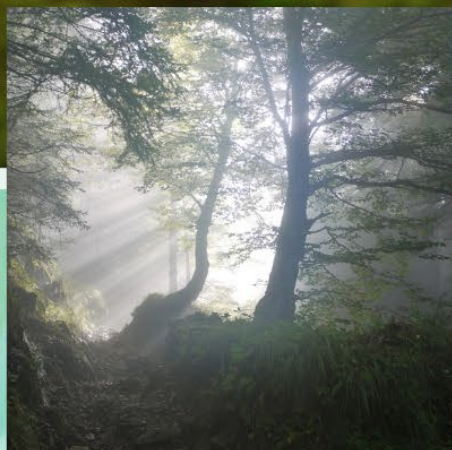


COLETÂNEA DE ARTIGOS

DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIENCIAS NATURAIS - PPGCN



FLÁVIA OLIVEIRA MONTEIRO DA SILVA ABREU
ORGANIZADORA



2022



COLETÂNEA DE ARTIGOS

DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS NATURAIS - PPGCN



FLÁVIA OLIVEIRA MONTEIRO DA SILVA ABREU
ORGANIZADORA



2022



2022 by Editora e-Publicar
Copyright © Editora e-Publicar
Copyright do Texto © 2022 A organizadora
Copyright da Edição © 2022 Editora e-Publicar
Direitos para esta edição cedidos
à Editora e-Publicar pela organizadora

Editora Chefe

Patrícia Gonçalves de Freitas

Editor

Roger Goulart Mello

Diagramação

Dandara Goulart Mello

Roger Goulart Mello

Projeto gráfico e Edição de Arte

Patrícia Gonçalves de Freitas

Revisão

A organizadora

**COLETÂNEA DE ARTIGOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS NATURAIS – PPGCN.**

Todo o conteúdo dos capítulos, dados, informações e correções são de responsabilidade exclusiva da organizadora. O download e compartilhamento da obra são permitidos desde que os créditos sejam devidamente atribuídos aos organizadores. É vedada a realização de alterações na obra, assim como sua utilização para fins comerciais.

A Editora e-Publicar não se responsabiliza por eventuais mudanças ocorridas nos endereços convencionais ou eletrônicos citados nesta obra.

Comitê Científico

Jane Eire Silva Alencar de Menezes

Sonia Maria Oliveira Costa

Maria Roniele Felix Oliveira

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

C694 Coletânea de artigos do programa de pós-graduação em ciências naturais - PPGCN / Organizadora Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu. – Rio de Janeiro, RJ: e-Publicar, 2022.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5364-102-0

1. Ciências naturais. 3. Extensão universitária. I. Abreu, Flávia Oliveira Monteiro da Silva.

CDD 378.81

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Editora e-Publicar

Rio de Janeiro, Brasil

contato@editorapublicar.com.br

www.editorapublicar.com.br





SUMÁRIO

PREFÁCIO.....	8
ARTIGO 1.....	9
ESTUDO EXPERIMENTAL E NUMÉRICO DOS EFEITOS DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA EM UM REATOR DE BATELADA PARA GERAÇÃO DE BIOGÁS PROVENIENTE DE DEJETOS SUÍNOS	9
DOI 10.47402/ed.ep.c20221819120	Pedro Henrique de Lima Gomes Lucinda Oliveira Amaro Anderson Honório de Brito Pontes Ana Paula Mattos Mona Lisa Moura de Oliveira
ARTIGO 2.....	25
SÍNTESE DE ÉSTERES DO ÁCIDO ANACÁRDICO COM O TIMOL E O CARVACROL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA.....	25
DOI 10.47402/ed.ep.c20221820220	Katherine Alves da Silva Francisco Felipe Maia da Silva Daniela Ribeiro Alves Telma Leda Gomes de Lemos Selene Maia de Moraes
ARTIGO 3.....	35
MICROCÁPSULAS DE ÓLEO DE PEQUI COM GOMA DE CAJUEIRO E QUITOSANA OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA.....	35
DOI 10.47402/ed.ep.c20221821320	Luana Carvalho da Silva Marília Alves do Nascimento Tiago Linhares Cruz Tabosa Barroso Rachel Menezes Castelo Celli Rodrigues Muniz Carlucio Roberto Alves Roselayne Ferro Furtado André Luiz Herzog Cardoso
ARTIGO 4.....	44
ESTUDO ESTATÍSTICO DA SÍNTESE DE CARBOXIMETILQUITOSANA E APLICAÇÃO COMO BIOCOAGULANTE.....	44
DOI 10.47402/ed.ep.c20221822420	João Lucas Isidio de Oliveira Almeida Raimundo Nonato Lima Júnior Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu
ARTIGO 5.....	55
POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>VERNONIA</i> SCHREB. (ASTAERACEAE).....	55
DOI 10.47402/ed.ep.c20221823520	Antônio Carlos Nogueira Sobrinho Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle





ARTIGO 6.....78

ESTUDO DAS EMISSÕES DE *BLACK CARBON* E FUMAÇA NEGRA NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ – CAMPUS ITAPERI..... 78

DOI 10.47402/ed.ep.c20221824620

Camila Maria Aguiar da Costa Alves
Rinaldo dos Santos Araújo
Mona Lisa Moura de Oliveira

ARTIGO 7.....92

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO TRITERPENO 3β , 6β , 16β -TRIHIDROXILUP-20(29) -ENO ISOLADO DAS FOLHAS DE *Combretum leprosum* EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO 92

DOI 10.47402/ed.ep.c20221825720

Francisca Crislândia Oliveira Silva
Maria Kueirislene Amâncio Ferreira
Antônio Wlisses da Silva
Hélcio Silva dos Santos
Francisco Ernani Alves Magalhães
Jane Eire Silva Alencar de Menezes

ARTIGO 8.....103

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DO ESXUDATO DA SIRIGUELA (*SPONDIAS PURPUREA L.*) 103

DOI 10.47402/ed.ep.c20221826820

Henety Nascimento Pinheiro
Flávia Freitas Veloso
Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu

ARTIGO 9.....113

MICROENCAPSULAÇÃO DA RIBOFLAVINA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA 113

DOI 10.47402/ed.ep.c20221827920

Silvana Silveira de Farias
Sônia Maria Costa Siqueira
Arcelina Pacheco Cunha
Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle
Selene Maia de Moraes
Nágila Maria Pontes Silva Ricardo

ARTIGO 10.....125

QUALIDADE, COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE A MATURAÇÃO DE QUATRO FRUTAS NATIVAS DA RESTINGA CEARENSE 125

DOI 10.47402/ed.ep.c202218281020

Nigéria Pereira Gonçalves
Eliseu Marlônio Pereira de Lucena

ARTIGO 11.....133

BIOPROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DA CHALCONA N-{4'-[(2E)-3-(4-FLUOROFENIL)-1-(FENIL) PROP-2-EN-1-ONA]}ACETAMIDA EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GABAÉRGICO..... 133

DOI 10.47402/ed.ep.c202218291120

Maria Kueirislene Amâncio Ferreira
Antônio Wlisses da Silva
Atilano Lucas dos Santos Moura
Joyce do Nascimento Martins Cardoso
Hélcio Silva dos Santos
Francisco Ernani Alves Magalhães
Jane Eire Silva Alencar de Menezes





ARTIGO 12.....144

FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ÓLEO DE PEQUI POR GELIFICAÇÃO IÔNICA EM MATRIZ POLIMÉRICA DE ALGINATO/QUITOSANA..... 144

DOI 10.47402/ed.ep.c202218301220

Rachel Menezes Castelo
Luana Carvalho da Silva
Joana de Barros Alexandre
Gabrielle Albuquerque Freire
Carlúcio Roberto Alves
Roselayne Ferro Furtado

ARTIGO 13.....151

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *MENTHA* E RELAÇÃO COM SUAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTICOLINESTERÁSICA E ANTIFÚNGICA..... 151

DOI 10.47402/ed.ep.c202218311320

Alexandre de Sousa Barros
Selene Maia de Morais
Pablito Augusto Travassos Ferreira
Ícaro Gusmão Pinto Vieira
Afrânio Aragão Craveiro
Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle
Jane Eire Silva Alencar de Menezes
Francisco Walber Ferreira da Silva
Halisson Araújo de Sousa
Hortência Ribeiro Liberato
Cleonilda Cláita Carneiro Pinto
Rita de Cássia Alves Pereira

ARTIGO 14.....163

PROSPECÇÃO, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO NO SENSORIAMENTO DE Co^{2+} 163

DOI 10.47402/ed.ep.c202218321420

Bruno Peixoto de Oliveira
Isadora Moreira Sampaio
Joice Farias do Nascimento
Nathália Uchôa de Castro Bessa
Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu

ARTIGO 15.....175

ESTRATÉGIA PARA O ECODSIGN DA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA 175

DOI 10.47402/ed.ep.c202218331520

Renata de Araújo e Silva
Ana Iraidy Santa Brígida
Morsyleide de Freitas Rosa
Raimundo Marcelino da Silva Neto
Wilma Aparecida Spinosa
Ednaldo Benício de Sá Filho
Maria Cléa Brito de Figueirêdo

ARTIGO 16.....188

MÉTODOS DE CONTROLE DE *CRYPTOSTEGIA MADAGASCARIENSIS* BOJER EX *DECNE* EM BOSQUES DA PALMEIRA *COPERNICIA PRUNIFERA* (MILL.) H. E. MOORE.) NO NORDESTE DO BRASIL..... 188

DOI 10.47402/ed.ep.c202218341620

José Vagner Rebouças Filho
Oriell Herrera Bonilla





ARTIGO 17.....201

MICROENCAPSULAMENTO DE ÓLEO DE PEQUI EM MATRIZ DE GOMA DE CAJUEIRO/GELATINA POR COACERVAÇÃO COMPLEXA SEGUIDO DE SECAGEM POR *SPRAY DRYING* OU LIOFILIZAÇÃO 201

DOI 10.47402/ed.ep.c202218351720

Marília Alves do Nascimento
Luana Carvalho da Silva
José Maria Correia da Costa
Roselayne Ferro Furtado
Carlucio Roberto Alves

ORGANIZADORA.....212



Prefácio

O atual momento histórico é caracterizado por impasses que variam desde problemas geopolíticos até a degradação ininterrupta dos recursos naturais. Os fatores geradores de tais problemas são variados, envolvendo aspectos relacionados à economia de uma nação, bem como aspectos alusivos à ética, à moral e à cultura que permeiam a sociedade. Perante esse contexto, a implantação do desenvolvimento sustentável tornou-se um dos principais desafios como uma alternativa possível para a humanidade no sentido de contribuir para a minimização dos problemas socioambientais da atualidade.

Dessa forma, pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais (<http://www.ciencias.naturais.ppg.br>) têm atuado de forma interdisciplinar contribuindo para o fomento o estado-da-arte dos últimos avanços em ciência e tecnologia para monitoramento e aproveitamento de recursos naturais, além da ampliação das possibilidades de qualificação de recursos humanos no gerenciamento de atividades socioeconômico e culturais relacionadas a recursos naturais.

O conteúdo deste livro é composto de uma coletânea de artigos que representa uma amostragem do conhecimento técnico e científico que vem sendo produzido no Programa em Ciências Naturais nos últimos 9 anos, e é dirigido a estudiosos e interessados nas ciências naturais, especialmente para quem contribui para o avanço científico, tecnológico e na inovação em áreas de fronteira como ambiental, planejamento de fármacos, (bio)nanotecnologia, (bio)materiais, energia renovável, alimentos e da indústria. Na oportunidade, os autores desse livro gostariam de agradecer aos órgãos de fomento das pesquisas científicas realizadas e em andamento: CAPES, FUNCAP, CNPq, FINEP, PPSUS, entre outros.

Os leitores podem entrar em contato conosco por meio do nosso endereço eletrônico: ciencias.naturais@uece.br.

Carlúcio Roberto Alves

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais



ARTIGO 1

ESTUDO EXPERIMENTAL E NUMÉRICO DOS EFEITOS DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA EM UM REATOR DE BATELADA PARA GERAÇÃO DE BIOGÁS PROVENIENTE DE DEJETOS SUÍNOS

DOI 10.47402/ed.ep.c20221819120

Pedro Henrique de Lima Gomes
Lucinda Oliveira Amaro
Anderson Honório de Brito Pontes
Ana Paula Mattos
Mona Lisa Moura de Oliveira

RESUMO

O aproveitamento de fontes alternativas de energia, como o biogás, tem chamado a atenção do setor energético global no que se refere à geração distribuída de energia, à gestão de resíduos agroindustriais e resíduos orgânicos urbanos e, sobretudo, por atenuar as emissões atmosféricas provenientes da queima de combustíveis fósseis. Visando aperfeiçoar a produção de biogás (PB), ferramentas computacionais voltadas à modelagem e simulação são usadas no melhoramento do processo de digestão anaeróbica (DA). Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da variação da faixa de temperatura na digestão anaeróbica de dejetos suínos, em reator de batelada automatizado (~12,14L), por meio do modelo de digestão anaeróbica nº 1 (ADM1). A batelada experimental destinada a PB recebeu dejetos suínos diluídos em uma razão inóculo: substrato de 0,15 v/v e permaneceu por um tempo de retenção hidráulica (TRH) de 20 dias. As simulações da PB via ADM1 foram realizadas no *software* MATLAB[®]. Os parâmetros bioquímicos, físico-químicos e operacionais necessários na simulação foram obtidos da literatura e de experimentos de bancada realizados neste estudo. Os resultados das simulações mostraram uma correlação de 0,99 em relação aos dados experimentais; indicaram que a hidrólise é a etapa limitante do processo de DA; e permitiram identificar que o baixo TRH utilizado desfavorece o rendimento de CH₄ no biogás. Além disso, observou-se que as principais variáveis influenciadas pela variação da temperatura operacional foram: as concentrações de acetato, de bactérias consumidoras de acetato, de NH₃⁺, de íons H⁺ e de componentes do biogás. Tais achados tornam o modelo calibrado um referencial a pesquisas futuras que buscam prever o comportamento da produção de biogás de dejetos suínos em diferentes faixas de temperatura operacional.

PALAVRAS-CHAVE: ADM1. Dejetos suínos. Produção de biogás. Reator automatizado em batelada.

INTRODUÇÃO

O uso de combustíveis fósseis como fonte de energia é o principal responsável pelo aumento acentuado das emissões de gases de efeito estufa (CO₂, CFCs, CH₄ e outros) (DRUMM *et al.*, 2014). De forma a contornar essa problemática, os países estão buscando fontes de energias alternativas, estando dentre elas a biomassa (MOHAMMADREZAEI *et al.*, 2018). Essa fonte de energia pode ser utilizada para a produção de biogás, tanto por meio da



digestão anaeróbica (DA) quanto pelo processo de co-digestão anaeróbica de dejetos animais e/ ou resíduos orgânicos (KOO; YULISA; HWANG, 2019).

Em meio as fontes de dejetos animais destacam-se os de origem suína, uma vez que o Brasil possui o quarto maior efetivo de suínos do mundo com cerca de 41,1 milhões de suínos (IBGE, 2020). No país, o setor agropecuário representa 77% das plantas de produção de biogás em operação totalizando em uma produção de 235 milhões de $\text{Nm}^3 \cdot \text{ano}^{-1}$ de biogás (CIBIOGAS *et al.*, 2022). Segundo o relatório da Associação Brasileira do Biogás (ABiogás), o Brasil poderia produzir quase 2,7 bilhões de $\text{m}^3 \cdot \text{ano}^{-1}$ de biogás a partir do aproveitamento dos dejetos suínos, conseqüentemente, quase 2,5 bilhões de litros de diesel deixariam de ser usados ao ano reduzindo em cerca de 96% as emissões de gases de efeito estufa (ENGIE, 2021).

O processo de produção de biogás (PPB) é influenciado por diversas variáveis — pH, Tempo de retenção hidráulica (TRH), Taxa de Carga Orgânica (TCO), razão C/N, concentração de ácidos graxos voláteis — assim como a variação da faixa de temperatura operacional que compromete diretamente a termodinâmica das reações, modifica a velocidade específica de utilização de substratos e inibe certos grupos da microbiota produtora de biogás (KIM, 2006; NESHAT, 2017). Nesse contexto, conhecer e controlar os limites das variáveis de um processo se torna algo primordial uma vez que experimentos físicos podem ser caros, demorados e não praticáveis quando em larga escala (PRADA, 2017). Sendo assim, modelos computacionais surgem como uma alternativa a esse propósito.

No âmbito computacional, no que se refere ao PPB, o modelo de digestão anaeróbica nº 1 (ADM1) se destaca, pois consegue reunir — a partir de um balanço de demanda química orgânica (DQO) global — as etapas da digestão anaeróbica (desintegração, hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese) e algumas funções responsáveis por inibir a produção de biogás quando valores superiores ao permitido são alcançados para o nitrogênio inorgânico, hidrogênio, amônia livre e por competição pelo consumo de butirato e valerato (BATSTONE *et al.*, 2002).

A utilização do ADM1 é bastante difundida na literatura (HEIKER, *et al.*, 2021). Adouani *et al.* (2016), utilizando esse modelo, analisaram os efeitos da variação sazonal da temperatura nas reações biológicas e a co-digestão de resíduos agrícolas (glicerol, dejetos de gado e silagem) frente a indisponibilidade de dejetos de gado durante o verão. Bergland, Dinamarca e Bakke (2015), com auxílio do modelo, observaram que a temperatura poderia diminuir a atividade microbiana e, conseqüentemente, a produção de biogás. Essa redução



representou cerca de 1,6 % na taxa de produção de biogás para a faixa de 30 °C a 35 °C e aumento de 3,4 % para a faixa de 25 °C a 30 °C. Tassew *et al.* (2019), usando o modelo e um reator anaeróbico de fluxo ascendente (UASB) de bancada, verificaram que a produção de biogás se elevou com o aumento da temperatura (25 e 35 °C) independente do conteúdo de sólidos (3 – 9,4 g L⁻¹ de sólidos suspensos) presentes nos dejetos suínos utilizados como substrato.

Apesar da difusão do ADM1 na literatura, estudos diretamente voltados aos efeitos da variação da faixa de temperatura no processo de digestão anaeróbica de dejetos suínos são incipientes. Sendo assim, é necessário avaliar o uso do modelo em condições ainda pouco exploradas visando um melhor entendimento e a otimização do processo como um todo. Nesse contexto, o presente trabalho investiga os efeitos da variação da faixa de temperatura na digestão anaeróbica de dejetos suínos por meio do uso do ADM1 que é baseado em parâmetros bioquímicos, físico-químicos e operacionais obtidos da literatura e por experimentos de bancada realizados neste estudo.

METODOLGIA

CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

Os dejetos suínos tiveram como origem a suinocultura da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (FAVET-UECE). A caracterização desse substrato seguiu a metodologia descrita em APHA (1999). A partir do valor dos sólidos totais, fornecido pela caracterização do substrato, determinou-se os percentuais de DQO biodegradável e inerte presentes no substrato, necessário à modelagem, conforme o fracionamento descrito por Girault *et al.* (2011).

ENSAIO EXPERIMENTAL

A bancada utilizada nos ensaios experimentais é composta por um biorreator automatizado, fabricado em aço inox (~12,14 L), que opera em regime de batelada juntamente com um sistema autônomo que agita mecanicamente e aquece via resistência elétrica o fluido contido em seu interior e, ainda, coleta e monitora os dados de temperatura, pressão e pH do meio reacional (Figura 1). A Tabela 1 apresenta as configurações utilizadas no ensaio experimental referente a digestão anaeróbica dos dejetos suínos.



Figura 1: Biorreator e seu sistema autônomo de aquisição de dados.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 1: Configuração da batelada experimental.

Descrição	Valor	Unidade
Volume total	0,0122	m ³
Volume da fase líquida	0,0084	m ³
Volume da fase gasosa	0,0038	m ³
Razão água: substrato	0,5	w·w ⁻¹
Razão inóculo: substrato	2	w·w ⁻¹ de SV
pH inicial	11,5	-
Temperatura	35	°C
TRH	20	dia

*w.w⁻¹: peso por peso do material.

Fonte: Elaborada pelos autores.

MODELAGEM E SIMULAÇÃO

A modelagem do ADM1, como ferramenta para avaliar a produção de biogás, requer o conhecimento sobre as características do biorreator, do substrato e do processo em si. Além disso, requer o conhecimento dos parâmetros biológicos, estequiométricos e físico-químicos utilizados no processo de produção de biogás que nesse estudo baseou-se nas sugestões de Batstone *et al.* (2002) e nos ajustes descritos nos trabalhos de Girault *et al.* (2011), Nguyen (2014) e Galí *et al.* (2009).

A execução das simulações da digestão anaeróbica dos dejetos suínos, via ADM1, ocorreram por meio da implementação das equações diferenciais ordinárias (EDOs) no ambiente de trabalho do *software* MATLAB[®], por meio de linhas de códigos semelhantes ao descrito pelo modelo de Nguyen (2014). As funções de inibição presentes no ADM1, relacionadas ao nitrogênio inorgânico, hidrogênio, amônia livre e por competição pelo consumo



de butirato e valerato — responsáveis por inibir a produção de biogás — foram consideradas no modelo simulado. A calibração do ADM1 realizou-se por meio do uso de planilhas do *Microsoft® Office Excel*, relacionando os parâmetros biológicos, estequiométricos e físico-químicos utilizados no processo de modelagem.

A simulação da digestão anaeróbica teve como base a configuração do ensaio experimental apresentada na Tabela 1. De forma a iniciar o processo de digestão anaeróbica, no âmbito computacional, as concentrações iniciais das variáveis de estado presentes no ADM1, inerentes ao inóculo, tiveram que ser obtidas por meio de uma simulação prévia, para que só então o processo de simulação da digestão anaeróbica dos dejetos suínos pudesse ser iniciado adequadamente.

A fim de avaliar os efeitos das variações de temperatura foram realizadas simulações nas faixas de temperatura mesofílica (35 °C), temperatura psicofílica (15 °C) e termofílica (55 °C). Os parâmetros bioquímicos, estequiométricos e físico-químicos utilizados nas diferentes faixas de temperatura foram os mesmos. Vale mencionar que as variações de temperatura do meio reacional presentes no processo de digestão anaeróbica são relacionadas com o ADM1 a partir da equação de Van't Hoff (Equação 1).

$$K_2 = K_1 \cdot e^{\left(\frac{\Delta H^\circ}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_{base}} - \frac{1}{T_{op}}\right)\right)} \quad (1)$$

Onde K_2 e K_1 são as constantes na temperatura de operação (T_{op}) e na temperatura base ($T_{base} = 298,15$ K); ΔH° é o calor de reação a uma temperatura e pressão padrão (273,15 K e 101 325 Pa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

FRACIONAMENTO DA DQO

O valor teórico da DQO, base do ADM1, é determinado a partir do valor dos sólidos totais obtido por meio da caracterização dos dejetos suínos. O resultado da caracterização desse substrato indicou um teor de sólidos totais, fixos e voláteis de 15%, 8% e 92%, respectivamente.

Segundo Gali *et al.* (2009), para cada grama de sólidos totais oriundos dos dejetos suínos um valor de 0,882 g O₂ L⁻¹ é exigida, sendo assim, o valor teórico da DQO seria de 132,3 g O₂ L⁻¹, para um percentual de sólidos totais de 15%. O fracionamento da DQO teórica permite que cada uma das frações presentes no substrato possa ser definida e usada pelo ADM1. A Tabela



2 apresenta em detalhes o fracionamento da DQO teórica. A descrição completa da obtenção das frações apresentadas na tabela abaixo pode ser consultada em Girault *et al.* (2011).

Tabela 2: Fracionamento da DQO teórica.

DQO teórica total	DQO teórica fracionada	
132,3 g O ₂ ·L ⁻¹	Fração facilmente biodegradável S _s = 31,75 g O ₂ ·L ⁻¹	Ácido acético: S _{ac} = 13,23 g O ₂ ·L ⁻¹ Ácido propiânico: S _{pro} = 7,94 g O ₂ ·L ⁻¹ Ácido butírico: S _{bu} = 3,97 g O ₂ ·L ⁻¹ Ácido valérico: S _{va} = 1,32 g O ₂ ·L ⁻¹ Monossacarídeos: S _{su} = 5,29 g O ₂ ·L ⁻¹ Aminoácidos: S _{aa} = 0 g O ₂ ·L ⁻¹ Ácidos graxos de cadeia longa: S _{fa} = 0 g O ₂ ·L ⁻¹ Solúvel inerte: S _I = 2,5 g O ₂ ·L ⁻¹
	Fração solúvel inerte S _I = 6,62 g O ₂ ·L ⁻¹	Proteínas: X _{pr} = 2,6 g O ₂ ·L ⁻¹ Polissacarídeos: X _{ch} = 1,8 g O ₂ ·L ⁻¹ Lipídios: X _{li} = 1,8 g O ₂ ·L ⁻¹
	Fração lentamente biodegradável X _c = 15,88 g O ₂ ·L ⁻¹	Particulada inerte: X _I = 30,2 g O ₂ ·L ⁻¹
	Fração particulada inerte X _I = 78,06 g O ₂ ·L ⁻¹	

Fonte: Adaptado de Girault *et al.* (2011).

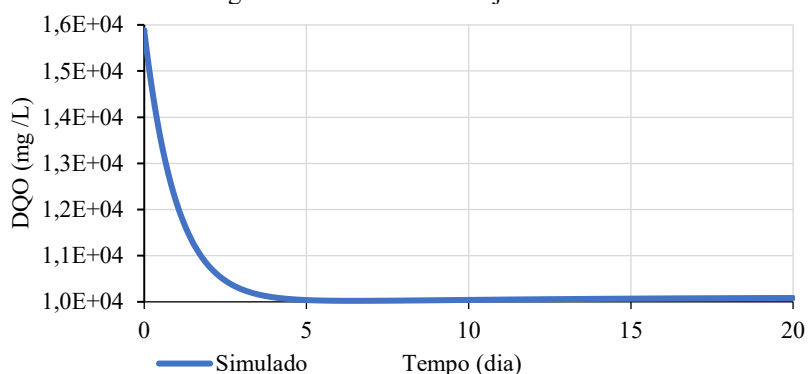
MODELAGEM E SIMULAÇÃO

A simulação do processo de digestão anaeróbica permitiu que a matéria orgânica presente no interior do biorreator, normalmente degradada ao longo do tempo, fosse monitorada a partir do comportamento da concentração de DQO obtido de forma experimental. Segundo os resultados do ensaio experimental, os níveis de DQO total foram reduzidos em 35,6%, enquanto a batelada simulada apresentou uma redução de 36,5% (desvio padrão de 0,45%).

O monitoramento do comportamento da concentração de DQO, via simulação (Figura 2), permitiu observar que o TRH utilizado no ensaio experimental foi insuficiente para que toda a matéria orgânica fosse completamente consumida e favorecesse a produção de CH₄, isso é perceptível a partir dos níveis de DQO que se mantiveram significativamente mesmo ao final do TRH. Segundo Neshat (2017), o TRH deve ser cuidadosamente definido, pois cada grupo biológico precisa de um determinado período de tempo para degradar o seu substrato específico, pois caso contrário a atividade metabólica favorecerá a produção de produtos intermediários e não a produção de CH₄.



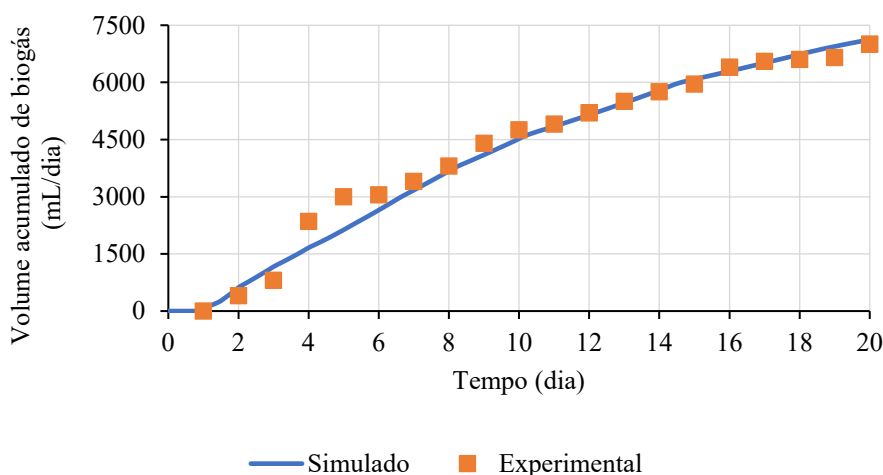
Figura 2: Comportamento da Demanda Química de Oxigênio observado durante a simulação do processo de digestão anaeróbica dos dejetos suínos.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Em adição ao comportamento da DQO, observou-se a adequação do modelo de simulação pela proximidade com que os dados de produção média diária acumulada de biogás experimental ($3,9 \text{ L dia}^{-1}$) possui com a curva de dados simulada ($3,6 \text{ L dia}^{-1}$), apresentada na Figura 3, e pelo valor do coeficiente de determinação (R^2) definido por meio de uma análise de regressão linear simples. Analisando a Figura 3 nota-se que a distribuição de dados experimental, em sua grande maioria, encontra-se próximo à curva simulada, como sugere o R^2 (0,99), indicando que o modelo de simulação ajustado pode prever de forma significativa a produção de biogás.

Figura 3: Produção acumulada de biogás: Experimental x Simulado.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Durante a simulação do processo de digestão anaeróbica identificou-se que nos quatro primeiros dias os grupos bacterianos acidogênicos e acetogênicos foram mais ativos, isso deve-se a elevada produção de hidrogênio ($\sim 90 \text{ cm}^3$). Por consequência, a metanogênese hidrogenotrófica é favorecida levando os componentes do biogás (CH_4 e CO_2) a valores em torno de 32 e 157 cm^3 , respectivamente.



Ao longo do processo de produção de biogás experimental os principais componentes do biogás tiveram as suas concentrações determinadas por cromatografia. A Tabela 3 apresenta o comportamento das concentrações percentuais de H₂, CH₄ e CO₂ produzido de forma experimental e simulada. Uma comparação realizada entre os dados, relacionados a cada TRH, revelou a existência de desvios percentuais mínimos de 0,18% para o CO₂ e máximos de 1,87% para o CH₄. Essa aproximação dos dados simulados aos experimentais reforça o potencial que o ADM1 representa e sinaliza que o comportamento observado via simulação possui altíssima relevância.

Tabela 3: Comportamento das concentrações percentuais de H₂, CH₄ e CO₂ produzido de forma experimental e simulada.

Componentes do biogás	TRH = 5 dias		TRH = 10 dias		TRH = 15 dias		TRH = 20 dias	
	Experimental (%)	Simulado (%)	Experimental (%)	Simulado (%)	Experimental (%)	Simulado (%)	Experimental (%)	Simulado (%)
H ₂	-	70,49	53,19	46,69	32,2	30,89	19,14	20,25
CH ₄	-	4,63	3,88	7,11	8,07	9,73	10,35	14,08
CO ₂	-	24,88	42,92	46,19	59,72	59,37	70,5	68,94

Fonte: Elaborada pelos autores.

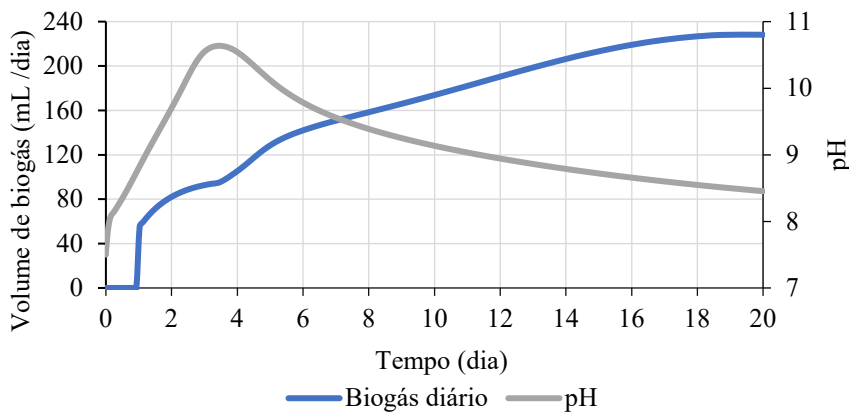
Analisando a Tabela 3, deve-se destacar a alta concentração de hidrogênio inicial que, conforme Silveira (2009), pode estar associada ao substrato que por sua vez está favorecendo a acidogênese e conseqüentemente a produção de intermediários como os ácidos graxos voláteis. Segundo Kondusamy e Kalamdhad (2014), esse tipo de intermediário beneficia a etapa acetogênica no sentido da produção de CO₂ em comparação a produção de CH₄ e H₂, sendo este cenário observado em ambos os ensaios experimental e simulado. A redução da concentração de H₂ e aumento do CH₄ indica uma maior participação da atividade bacteriana hidrogenotrófica, ao passo que o aumento da concentração de CO₂ indica um excesso de ácidos graxos totais prejudiciais ao desenvolvimento das bactérias metanogênicas.

A produção dos constituintes do biogás, descrita na Tabela 3, está diretamente ligado ao valor do pH do meio reacional, pois o volume de biogás produzido varia em relação ao comportamento do pH do meio, como sugere o comportamento gráfico apresentado na Figura 4. De acordo com Rajeshwari *et al.* (2000), o pH ideal para a digestão anaeróbica está situado entre 6,8 a 7,2, estando fora dessa faixa a produção de metano é influenciada negativamente devido à desintegração dos grânulos presentes no interior do biorreator. Os ensaios experimentais e simulados apresentaram comportamentos distintos com relação aos níveis de pH, uma vez que o valor do pH simulado aumentou em 12,6% (7,5 para 8,45), enquanto o ensaio experimental sofreu uma redução de 37% (11,5 para 7,2). Esse comportamento



divergente possivelmente ocorreu devido ao valor de pH experimental ter sido elevado propositalmente no início do experimento almejando atenuar a queda brusca de pH ao longo do TRH.

Figura 4: Comportamento do volume de biogás produzido em relação ao pH do meio reacional.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Essas variações bruscas de pH, observadas nos primeiros dias, segundo Al Seadi *et al.* (2013), são ocasionadas pela etapa de hidrólise, na qual espécies químicas reagem com a água para formar substâncias associadas em paralelo a liberação no meio reacional, a exemplo, íons H^+ . A constante redução no valor do pH e aumento na concentração de íons H^+ indica que os diferentes grupos de bactérias estão em desequilíbrio devido à alta produção de ácidos graxos totais (DROSG *et al.* 2013). Segundo Kunz *et al.*, (2019), a diminuição do pH é seguida por um aumento da concentração de CO_2 na fase gasosa, sendo o pH 6,52 o valor de equilíbrio entre as formas gasosas e solúveis no sistema reacional. Observou-se esse comportamento durante o ensaio experimental e também na simulação, o que impactou a baixa produção de CH_4 .

EFEITO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS

As reações bioquímicas e físico-químicas, presentes no ADM1, se alteradas podem distanciar o comportamento da produção de biogás pretendida. Portanto, os parâmetros relacionados às reações devem ser ajustados adequadamente. Diretamente ligado aos processos bioquímicos do modelo, a temperatura de operação do processo de produção de biogás se caracteriza como sendo um parâmetro influente, pois altera a taxa de formação do biogás através da modificação dos valores dos coeficientes de equilíbrio ácido-base e das constantes da lei de Henry presentes no ADM1.

As simulações realizadas com o intuito de avaliar os efeitos da variação de temperatura sobre a produção de biogás, especificamente nas faixas de temperatura mesofílica (35 °C),



psicrofílica (15 °C) e termofílica (55 °C), resultaram no comportamento apresentado pela Tabela 4.

Tabela 4: Percentual de H₂, CH₄ e CO₂ simulados presentes no biogás para TRH de 20 dias para diferentes temperaturas de operação.

Componentes	TRH = 5 dias			TRH = 10 dias			TRH = 15 dias			TRH = 20 dias		
	15 °C	35 °C	55 °C	15 °C	35 °C	55 °C	15 °C	35 °C	55 °C	15 °C	35 °C	55 °C
H ₂ (%)	46,88	70,49	93,82	28,92	46,69	85,91	23,00	30,89	31,25	10,90	20,25	19,16
CH ₄	8,57	4,63	5,96	12,66	7,11	9,89	15,48	9,73	6,50	11,33	14,08	9,75
CO ₂	44,55	24,88	0,22	58,41	46,19	4,20	61,52	59,37	62,24	77,77	68,94	71,09

Fonte: Elaborada pelos autores.

Analisando o comportamento dos componentes do biogás, apresentados na Tabela 4, percebeu-se que o percentual de H₂ se manteve elevado em relação aos demais componentes, independentemente da faixa de temperatura considerada. Segundo Silveira (2009), a presença elevada de H₂ inicial deve-se pelo excesso de matéria orgânica disponível no meio reacional. Já o percentual de CO₂, mantém um comportamento decrescente com o aumento da temperatura até o décimo dia, pois a partir disso as temperaturas extremas tomam os maiores percentuais. Segundo Kondusamy e Kalamdhad (2014), esse comportamento pode estar relacionado à presença de ácidos graxos, já que estes favorecem a via acetogênica responsável pela produção de CO₂. Diferentemente dos componentes anteriores, o CH₄ oscila entre um maior percentual a baixas temperaturas e um baixo percentual a altas temperaturas, exceto para o vigésimo dia, onde a faixa mesofílica assume o maior percentual. Conforme explica Batstone *et al.*, (2002), o baixo percentual a altas temperaturas pode estar relacionado à diminuição da taxa de reação devido à instabilidade do crescimento das culturas microbianas relacionadas às etapas iniciais da digestão anaeróbica.

Diversas são as variáveis influenciadas pela variação de temperatura no processo de digestão anaeróbica. A fim de compreender o comportamento da produção de biogás, frente a variação de temperatura do meio reacional, foram selecionadas as variáveis de estado dinâmico que mais sofreram alterações com a mudança de faixa de temperatura durante as simulações (Tabela 5).



Tabela 5: Principais variáveis influenciadas pela variação da faixa de temperatura no processo de produção do biogás.

Descrição das variáveis	Valor inicial (kgDQO·m ⁻³)*	Faixas de temperatura						
		15 °C	35 °C	55 °C	15 °C	35 °C	55 °C	
		Valor final (kgDQO·m ⁻³)*			Redução/Aumento (%)**			
Concentração de acetato	S_ac	0	0,05	0,15	0,18	4,78	15,21	18,30
Concentração de biomassa consumidora de acetato	X_ac	1,00E-01	0,07	0,07	0,07	-25,63	-30,01	-31,32
Concentração de íons H ⁺	S_H_ion	3,16E-08	7,39E-09	3,52E-09	1,90E-09	-76,64	-88,87	-93,99
Concentração de amônia	S_NH ₃	2,06E-03	1,04E-03	7,02E-03	1,95E-02	-49,57	241,51	850,64
Concentração dos componentes do biogás	S_gas_H ₂	0	0,18	0,22	0,23	18,16	22,43	22,60
	S_gas_CH ₄	0	0,31	0,18	0,12	31,11	17,65	12,12
	S_gas_CO ₂	0	0,03	0,02	0,01	2,53	1,56	1,05

*Exceto S_NH₃ e S_gas_CO₂ que são dados em kmol N·m⁻³ e kmol C·m⁻³, respectivamente.

**O sinal positivo ou negativo refere-se ao aumento ou redução percentual, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Analisando o comportamento das variáveis presentes na Tabela 5, observa-se que a concentração de acetato foi a única das variáveis que compõe o material solúvel a ser influenciada fortemente pela variação de temperatura. Analisando o seu comportamento, percebe-se que a redução da temperatura reduziu a concentração de acetato em ~10%, (0,15 para 0,5 kgDQO·m⁻³), enquanto o aumento da temperatura causou um aumento de apenas ~3%.

Em relação a concentração da biomassa consumidora de acetato, um comportamento contrário à sua produção foi observado, sendo reduzida em até 30% com a elevação da temperatura. Esse comportamento pode ser explicado pelo aumento brusco do pH, devido ao aumento das concentrações de amônia e diminuição da concentração de íons H⁺ percebidos durante o aumento da faixa de temperatura, concordando com as observações realizadas por Angelidaki (1993) e Angelidaki (1992). Essas alterações, segundo Batstone *et al.* (2002), podem inibir a biomassa responsável pela metanogênese acetoclástica, ou seja, provocar um não consumo de acetato e conseqüentemente elevar a sua concentração no meio reacional e contribuir para uma baixa produção de CH₄. As concentrações de amônia, obtidas durante as simulações, não foram suficientes para inibir o processo de produção de biogás, já que de uma concentração máxima aceitável de até 3000 mg·L⁻¹ apenas 396 mg·L⁻¹ de amônia foi observada (NESHAT *et al.*, 2017).

Em relação aos componentes do biogás, a variação de temperatura do meio reacional ocasionou um retardo na via hidrogenotrófica, o que gerou um acúmulo de hidrogênio (0,18–



0,23 kgDQO·m⁻³) desfavorável (inibitório) à ação da biomassa responsável pela acetogênese, uma vez que as concentrações de hidrogênio superam os valores máximos aceitáveis para o propionato (1E-6 kgDQO·m⁻³), valerato e butirato (3,5E-6 kgDQO·m⁻³), dificultando assim a formação de acetato (BATSTONE *et al.*, 2002). A inibição por hidrogênio tem impacto direto nas baixas concentrações de CH₄ e CO₂ observadas, já que o ADM1 utiliza a via acetoclástica como a principal via de absorção de acetato.

Diante da produção de biogás os processos bioquímicos não são os únicos a sofrerem alterações, pois os processos físico-químicos também podem vir a sofrer algumas alterações, a exemplo, quando a solubilidade dos gases é alterada ou o equilíbrio do balanço de carga. Conforme cita Neshat *et al.* (2017), as condições termofílicas melhoram o desempenho da digestão anaeróbica devido à maior solubilidade de compostos orgânicos e menor solubilidade dos gases dissolvidos, porém, deve se levar em consideração outros aspectos envolvidos na digestão anaeróbica. Conforme cita Risberg *et al.* (2013), a operação em temperaturas mais altas geralmente proporciona maior produção de biogás, porém maior produção de biogás com baixa concentração de CH₄ significa uma maior concentração de CO₂, como observado na simulação.

A análise dos efeitos da variação de temperatura durante a digestão anaeróbica foi capaz de descrever de forma detalhada o comportamento dos variados processos existentes, no entanto, segundo Risberg *et al.* (2013), a temperatura não é a única variável desse processo a ser estudada, pois em sua pesquisa a mudança de faixa de temperatura não afetou significativamente a redução da DQO ou o rendimento da produção de CH₄, indicando que é preciso avaliar outras variáveis como o TRH, pH, razão carbono/hidrogênio (C/N) e Ácidos Graxos Voláteis (AGV), para se chegar a uma produção ótima de biogás com um percentual satisfatório de CH₄.

O aumento no TRH tem grande impacto na otimização da produção de biogás, uma vez que Orrico, Orrico Junior e Lucas (2010), usando biodigestores em batelada alimentados com dejetos suínos, alcançaram uma redução da DQO de até 59% (TRH de 120 dias) e um aumento de 75% na produção de biogás (TRH de 60 dias), enquanto Orrico Júnior (2007), usando biodigestores semicontínuos alimentados com águas residuárias de suinocultura, observou aumento de 28% nos potenciais de produção de biogás para um TRH de 36 dias. Se tratando da razão C/N, segundo Begossi (2018), o emprego de apenas dejetos suínos enfatiza a carência de carbono no meio reacional (baixa razão), e com isso, conforme cita Neshat (2017), e Li, Park e



Zhu (2011), limita o crescimento dos agentes biológicos levando ao acúmulo de nitrogênio amoniacal e ácidos graxos no biodigestor, e conseqüentemente afeta o rendimento da produção de CH₄ no biogás.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As simulações retrataram de forma satisfatória o comportamento da degradação do substrato e, conseqüentemente, a produção de biogás; permitiram identificar que a hidrólise é a etapa limitante do processo de produção de biogás; e que o TRH, utilizado nos experimentos, precisaria ser cinco vezes maior para elevar o rendimento de CH₄ no biogás. Além disso, as simulações mostraram que as concentrações de acetato, de bactérias consumidoras de acetato, de NH₃⁺ e dos íons H⁺, e os componentes do biogás são variáveis sensíveis a variação da faixa de temperatura operacional. De forma geral, conclui-se que as alterações realizadas no ADM1 permitiram identificar e entender o comportamento das variáveis envolvidas no processo de produção do biogás que sofreram alterações à medida que ocorreram as variações da temperatura operacional. Portanto, a configuração usada no ADM1, referente a digestão anaeróbica de dejetos suínos, pode ser usada como base para trabalhos futuros que busquem prever o comportamento da produção de biogás em diferentes faixas de temperatura operacional e em condições semelhantes a esse estudo.

REFERÊNCIAS

ADOUANI, N.; *et al.* Dynamic modelling of an anaerobic digester for wastes at the territory level. **IFAC-Papersonline**, v. 49, n. 7, p. 1169–1174, 2016. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifacol.2016.07.361>. Acesso em: 12 fev. 2019

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2540G - Total, Fixed, and Volatile Solids in Solid and Semisolid Samples. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. Denver, CO: APHA, 1999, p. 255-257.

ANGELIDAKI I. AHRING B. K. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. **Applied Microbiol and Biotechnol**, v. 38, n. 4, p. 560–564, 1993. Disponível em: <https://www.osti.gov/etdweb/biblio/7047821>. Acesso em: 28 abr. 2019.

ANGELIDAKI I. AHRING B. K. Effects of free long-chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. **Applied Microbiol and Biotechnol**, v. 37, n. 6, p. 808–812, 1992. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00174850>. Acesso em: 12 abr. 2019.

BATSTONE, D. J. *et al.* The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). **Water Science; Technology**, v. 45, n. 10, p. 65–73, 1 maio 2002. Disponível em:



https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4296694/mod_resource/content/1/ADM1-WST.pdf. Acesso em: 08 jun. 2019.

BEGOSSI, J. P.; COELHO, J. P. Avaliação da produção de biogás produzido em biodigestores com dejetos de suínos para utilização como fonte energética alternativa. In: MOSTRA DE TALENTOS DA GRADUAÇÃO, 2., 2018, Campinas. **Anais[...]** Campinas: Ceatec, 2018. p. 1–2. Disponível em: <https://www.puc-campinas.edu.br/wpcontent/uploads/2018/08/AMBIENTAL-Jessica-Paionk-.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2019.

BERGLAND, W. H.; DINAMARCA, C.; BAKKE, R. Temperature Effects in Anaerobic Digestion Modeling. **Conference on Simulation and Modelling (sims 56)**, v. 119, p. 261-269, Oct. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3384/ecp15119261>. Acesso em: 09 jul. 2019.

CIBIOGAS, *et al.* Biogasmapp. 2022. Disponível em: <https://mapbiogas.cibiogas.org/>. Acesso em: 15 fev. 2022.

DRUMM, F. C. *et al.* Poluição atmosférica proveniente da queima de combustíveis derivados do petróleo em veículos automotores. **Revista eletrônica em gestão, educação e tecnologia ambiental (REGET)**. v. 18, p. 66–78, abr. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5902/2236117010537>. Acesso em: 12 abr. 2019.

DROSG, B. *et al.* Analysis and characterization of biogas feedstock. In: WELLINGER, A.; MURPHY, J.; BAXTER, D. **The biogas handbook Science, production and applications**. Philadelphia: Woodhead Publishing, 2013. cap. 3, p. 50–84.

ENGIE. **Produção de biogás com rejeitos de porcos avança no Brasil**. 2021. Disponível em: <https://www.alemdaenergia.engie.com.br/producao-de-biogas-com-rejeitos-de-porcoss-avanca-no-brasil/>. Acesso em: 15 fev. 2022.

GALÍ, A. *et al.* Modified version of ADM1 model for agro-waste application. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 11, p. 2783–2790, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.052>. Acesso em: 05 mar. 2019.

GIRAULT, R. *et al.* Combination of batch experiments with continuous reactor data for ADM1 calibration: application to anaerobic digestion of pig slurry. **Water Science Technology**, v. 63, n. 11, p. 2575-2582, 1 Jun. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/wst.2011.594>. Acesso em: 04 jan. 2019.

HEIKER, M.; *et al.* Biogas Plants in Renewable Energy Systems—A Systematic Review of Modeling Approaches of Biogas Production. **Applied Sciences**, v. 11, n. 8, p. 3361, 8 abr, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/app11083361>.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2020**. 2020. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2020_v48_br_informativo.pdf. Acesso em: 13 fev. 2022.

KIM, J. K.; *et al.* Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 4, p. 328-332, out. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.102.328>. Acesso em: 11 fev. 2019.



KONDUSAMY, D.; KALAMDHAD, A. S. Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high rate methane production: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 1821–1830, set. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.07.024>. Acesso em: 12 abr. 2019.

KOO, T.; YULISA, A.; HWANG, S. Microbial community structure in full scale anaerobic mono-and co-digesters treating food waste and animal waste. **Bioresource Technology**, v. 282, p. 439-446, jun. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.050>. Acesso em: 10 jan. 2019.

KUNZ, A. *et al.* **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia, SC: Sbera: Embrapa, 2019. 209 p.

LI, Y.; PARK S.Y.; ZHU J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. **Renew Sustain Energy Reviews**. v.15, n.1, p.821–826, jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.042>. Acesso em: 03 nov. 2018.

MOHAMMADREZAEI, R.; ZAREEI, S.; BEHROOZI-KHAZAEI, N. Optimum mixing rate in biogas reactors: Energy balance calculations and computational fluid dynamics simulation. **Energy**, v. 159, p. 54–60, et. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.06.132>. Acesso em: 02 abr. 2019.

NESHAT, S. A.; MOHAMMADIA M.; NAJAFPOURA, G. D; LAHIJANI, P. Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p.308–322, nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.137>. Acesso em: 14 mar. 2019.

NGUYEN, Hoa Huu. **Modelling of food waste digestion using ADM1 integrated with Aspen Plus**. 2014. 305 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) — University of Southampton, 2014. Disponível em: https://eprints.soton.ac.uk/375082/2/HHN_Thesis_FINAL_Feb_2017_rechecked.pdf. Acesso em: 27 out. 2019.

ORRICO JÚNIOR, M. A. *et al.* Avaliação de parâmetros da biodigestão anaeróbia de dejetos de suínos alimentados com dietas à base de milho e sorgo. **Engenharia Agrícola**, v. 30, n. 4, p.600-607, jul./ago. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-69162010000400004>. Acesso em: 27 jun. 2019.

ORRICO JÚNIOR, M. A. P. Avaliação dos processos de biodigestão anaeróbia e compostagem em dejetos de suínos: produção d e biogás, biofertilizante e composto. 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2007).

PRADA, R. J.; NUNHEZ, J. R. Numerical prediction of a nusselt number equation for stirred tanks with helical coils. **Aiche Journal**, v. 63, n. 9, p.3912–3924, maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/aic.15765>. Acesso em: 15 fev. 2019.

RAJESHWARI, K.V *et al.* State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, n. 2, p.135–156,



jun. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1364-0321\(99\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S1364-0321(99)00014-3). Acesso em: 11 nov. 2018.

RISBERG, K. *et al.* Biogas production from wheat straw and manure impact of pretreatment and process operating parameters. **Bioresour Technol**, 232–237, dez. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.054>. Acesso em: 16 jul. 2019.

SILVEIRA, G. S. Estudo de codigestão anaeróbia de lamas domésticas com o efluente da indústria de fermentação da levedura do pão da empresa Mauri Fermentos. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia) – Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 119 f. 2009).

TASSEW, F. A.; *et al.* Influences of Temperature and Substrate Particle Content on Granular Sludge Bed Anaerobic Digestion. **Applied Sciences**, p.1–15, dez. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app10010136>. Acesso em: 08 fev. 2019.



ARTIGO 2

SÍNTESE DE ÉSTERES DO ÁCIDO ANACÁRDICO COM O TIMOL E O CARVACROL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

DOI 10.47402/ed.ep.c20221820220

Katherine Alves da Silva
Francisco Felipe Maia da Silva
Daniela Ribeiro Alves
Telma Leda Gomes de Lemos
Selene Maia de Morais

RESUMO

O uso de inibidores da acetilcolinesterase (AChE) tem mostrado resultados promissores para o tratamento da doença de Alzheimer. Considerando as diversas propriedades biológicas do ácido anacárdico e dos monoterpênos fenólicos, timol e carvacrol, incluindo ação anti-AChE, o objetivo deste estudo foi combinar estas moléculas e avaliar sua ação anticolinesterásica. O ácido anacárdico (AA) foi obtido a partir do líquido da castanha de caju (LCC) e submetido à acetilação, formando o AA acetilado que foi submetido à esterificação com os alquilfenóis. As reações de esterificação foram catalisadas por dicitlohexilcarbodiimida (DCC) e dimetilaminopiridina (DMAP) usando diclorometano (DCM) como solvente. Os ésteres do timol e carvacrol com o AA foram submetidos à purificação por cromatografia em coluna de sílica gel e analisados por espectroscopia de RMN e Infravermelho e exibiram boa ação como inibidores da enzima acetilcolinesterase quando comparados à fisiostigmina, composto padrão, sendo mais ativos que os compostos de partida, com CI_{50} de 0,874 e 0,919 $\mu\text{g/ml}$ para o AA-timol e AA-carvacrol, respectivamente, sendo similares estatisticamente.

PALAVRAS-CHAVE: LCC. Alquilfenóis. Alzheimer. Síntese

INTRODUÇÃO

O LCC é uma mistura de compostos fenólicos com cadeia alquila de 15 carbonos na posição meta à hidroxila do anel aromático, um dos principais componentes do LCC é o ácido anacárdico que constitui uma mistura de ácidos salicílicos que apresentam, na posição 6 do núcleo aromático, uma cadeia alquílica de 15 carbonos de diferentes graus de instauração, encontrados, geralmente, como uma mistura de constituintes saturados, monoeno, dieno e trieno (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006) tal composto de grande interesse devido sua ampla bioatividade como antitumorais, antibióticos, gastroprotetoras e antioxidantes (HAMAD; MUBOFU, 2015).

Em recente trabalho, o ácido anacárdico foi separado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em seus três principais constituintes (monoeno, dieno e trieno) e avaliou-se o efeitos das atividades biológicas destes (MORAIS *et al.*, 2017), inclusive destacando-se sua atividade anticolinesterásica.



A enzima acetilcolinesterase é responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas, onde sua inibição poderia ser efetiva no tratamento da doença de Alzheimer, para esse fim alguns inibidores de acetilcolinesterase reversíveis incluindo donepezila, rivastantina e galantamina foram utilizados para tratamento dos sintomas causados por disfunção colinérgica (da SILVA *et al.*, 2021), no entanto, o uso destes inibidores para o tratamento da doença de Alzheimer é limitado por seus efeitos colaterais graves e alto custo no mercado, de modo que a busca por novos compostos apresentem-se como uma demanda emergente para o combate ao mal de Alzheimer, portanto os derivados de produtos naturais encontram-se como uma fonte alternativa aos fármacos sintéticos disponíveis, possuindo fácil acesso e baixa toxicidade.

Em recente estudo feito por Topal e colaboradores (2019) foi demonstrado que o eugenol e seus derivados como o isoeugenol, por exemplo, mostraram-se como potentes inibidores da enzima acetilcolinesterase. O eugenol é classificado como um fenilpropanóide do tipo alilfenol, ele é extraído especialmente do óleo de cravo, possui diversas propriedades farmacológicas como antifúngicas, antibacterianas, anti-sépticas, analgésicas, antioxidantes e também usado em alimentos e cosméticos para dar fragrância e sabor.

Os compostos fenólicos timol, carvacrol (JUKIC *et al.*, 2007) usados nas reações de esterificação também são relatados como bons inibidores da enzima acetilcolinesterase. Neste contexto, considerando a versatilidade do ácido anacárdico e dos alquilfenóis (eugenol, isoeugenol, timol e carvacrol), neste trabalho visou-se a síntese de derivados do ácido anacárdico acetilado com estes alquilfenóis para avaliar a atividade anticolinesterásica destes produtos comparando com os produtos de partida, no sentido de aprimorar o potencial biológico destes constituintes.

METODOLOGIA

MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS

As castanhas de *Anacardium occidentale* L. foram cedidas pela EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Agroindústria Tropical, localizada na Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza- CE. Para realização dos experimentos, os solventes foram comprados das companhias Neon (São Paulo, Brasil), Êxodo Científica (São Paulo, Brasil) e J.T. BAKER (Radnor, USA). Os Reagentes são oriundos das companhias Sigma-Aldrich (St. Luis, USA), Chemical (St. Louis, USA) e Carvalhaes (Alvorada, RS, Brasil).



ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

Os compostos sintetizados foram analisados por espectroscopia de RMN ^{13}C e ^1H de mono e bidimensional em solução de clorofórmio deuterada a $70\text{ }^\circ\text{C}$. Os espectros foram obtidos no BRUKER Espectrômetro DRX de 500 MHz que opera a 500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para o carbono. Os espectros no infravermelho foram obtidos utilizando um espectrômetro Perkin Elmer, modelo (SPECTRUM 100) FT-IR.

OBTENÇÃO DO LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU

No laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Ceará, 1 kg de castanhas foram congeladas para obtenção do LCC. O processo de obtenção do LCC solvente foi feito da seguinte maneira: as castanhas foram bisseccionadas mecanicamente, ao longo do eixo das duas metades da casca e separada das amêndoas. As cascas obtidas foram extraídas a frio com hexano. Após maceração por um período de 24 horas, o extrato hexânico foi separado por filtração e as cascas foram submetidas a uma nova extração até remoção completa do LCC.

O extrato hexânico foi rotaevaporado a vácuo com temperatura máxima de $60\text{ }^\circ\text{C}$, até a completa remoção do solvente. O resíduo da concentração produziu um líquido viscoso escuro e límpido com rendimento de LCC de aproximadamente 4,5% em relação as amêndoas. O procedimento seguiu a metodologia desenvolvida por Paramashivappa *et al.* (2001).

SEPARAÇÃO DO ÁCIDO ANACÁRDICO DO LCC

O LCC extraído com solvente (50 g) obtido na etapa anterior foi dissolvido em 300 mL em uma solução metanólica aquosa 95 %. Para a solução foram adicionados lentamente 25 g de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), sob agitação. Após completar a adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a temperatura da mistura foi elevada a $50\text{ }^\circ\text{C}$ e agitada continuamente por 3 horas.

Em seguida a solução sobrenadante foi monitorada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para garantir que todo ácido anacárdico tenha sido consumido. Um precipitado de anacardato de cálcio foi separado dos outros constituintes do LCC por filtração, e o resíduo da filtração foi lavado com 100 mL de metanol e seco a vácuo na temperatura de $45 - 60\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas.

Desta forma, foram obtidos 55 g de anacardato de cálcio, que foi então suspenso em 220 mL de água destilada e 30 mL de HCl concentrado para decomposição do sal e a solução obtida foi extraída com acetato de etila (2 x 75 mL). A camada orgânica foi lavada com água destilada



(2 x 50 mL) e seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Após isso, a camada orgânica foi concentrada sob pressão reduzida produzindo 30g de ácido anacárdico, obtendo assim um rendimento final de 60% (PARAMASHIVAPPA *et al.*, 2001).

ACETILAÇÃO DO ÁCIDO ANACÁRDICO

Pesou-se 10 g do ácido anacárdico purificado e adicionou-se a uma mistura de 150 mL de anidrido acético com 15 g de acetato de sódio em um balão de 500 mL, deixou-se a mistura sob refluxo por 1 hora. Após este período resfriou e transferiu-se a mistura reacional para um béquer de 1000 mL contendo 200 mL de água destilada. A mistura foi neutralizada com solução de bicarbonato de sódio 5%. Em seguida, a mistura reacional foi colocada em um funil de decantação e extraiu-se com 200 mL de clorofórmio. Lavou-se a fração clorofórmica com água e secou-se com sulfato de sódio anidro. Concentrou-se o material em evaporador rotativo a vácuo e obteve-se 10,4 g de ácido anacárdico acetilado impuro. Para a purificação do ácido anacárdico acetilado, foi feita uma cromatografia em coluna, onde o empacotamento da coluna foi realizado com 10,4 g do ácido anacárdico acetilado com 50 g de sílica gel (0,063 – 0,200 mm; 70-230 mesh) eluída inicialmente com hexano e foi aumentando-se lentamente a polaridade do eluente, na seguinte ordem de polaridade crescente: hexano, clorofórmio e acetato de etila, obtendo-se 25 frações, onde as frações F(17-21) foram reunidas (rendimento 48%) e estas foram confirmadas por Cromatografia em Camada Delgada, por último verificou-se a confirmação da reação de acetilação do ácido anacárdico por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C).

SÍNTESE DE ÉSTERES DERIVADOS DO ÁCIDO ANACÁRDICO ACETILADO COM ALQUILFENÓIS (O-ACETIL-ANACARDATO DE EUGENILA, O-ACETIL-ANACARDATO DE TIMILA E O-ACETIL-ANACARDATO DE CARVACRILA).

A síntese ocorreu, em sistemas separados, a partir da reação de esterificação realizada misturando-se 2 mmol (769 mg) do ácido anacárdico acetilado com 1,5mmol dos compostos fenólicos (eugenol, timol e carvacrol) foi adicionado a 15mL de diclorometano (DCM) junto com 80mg de dimetilaminopiridina (DMAP) seguido da adição de 2mmol (412 mg) de dicioelhilcarboimida (DCC). A reação permaneceu sob agitação por 24h a temperatura ambiente. Em seguida a reação foi filtrada a vácuo e a fase líquida lavada com 3x10ml com solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 5% (m/v). Logo após a fase orgânica foi lavada com 3x10 mL com solução de bicarbonato de sódio a 5% (m/v) seguido da lavagem com água



destilada (3x5mL). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

QUANTIFICAÇÃO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi aferida em placas de 96 poços de fundo chato utilizando leitor Elisa BIOTEK, modelo ELX 800, software *Gen5 V2.04.11*, baseando-se na metodologia descrita por Ellman *et al.* (1961). Em placas de 96 poços, foram utilizadas as seguintes soluções por poço: 25 μL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 125 μL de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) na solução Tris/HCl (50 mM, pH = 8, com 0,1 M de NaCl e 0,02 M de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3 mM de DTNB ou reagente de Ellman), 50 μL da solução Tris/HCl (50 mM, pH = 8, com 0,1 % de albumina sérica bovina (BSA), 25 μL de cada amostra (ácido anacárdico acetilado, eugenol e um éster derivado) foram dissolvidos em metanol e diluídos 10 vezes na solução Tris/HCL (50 mM, pH = 8) para obter uma concentração final de 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (RHEE *et al.*, 2001).

A absorbância foi aferida a 405 nm durante 30 segundos, em seguida, foram adicionados 25 μL da enzima acetilcolinesterase (0,25 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) em cada amostra e a absorbância foi aferida por minuto até o total de 25 minutos de incubação da enzima. Como padrão negativo foram utilizadas todas as soluções, excetuando-se as amostras. As diluições das amostras e dos padrões positivos utilizados nas avaliações quantitativas em microplaca, partiram da solução mãe com concentração de 20 mg/mL nas respectivas concentrações seriadas: 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 3,12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1,56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,78 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,39 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,195 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reações (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao branco (considerada atividade total da AChE (100 %)). O padrão utilizado como controle positivo foi a fisostigmina. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As amostras apresentaram coloração própria absorvida pelo espectro de onda de leitura, sendo assim, foram deduzidos os valores referentes à coloração.

Após normalização dos dados foi realizado o teste de curva de regressão não linear pelo programa estatístico *GraphPad Prism v 5.01* para obtenção dos dados. Para a análise estatística, os valores de CI_{50} das médias foram realizados o teste de variância com comparação múltipla entre pares pelo teste de Tukey, considerando significativos valores de $P < 0.05$.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise por espectro de RMN de ^1H do ácido anacárdico acetilado observou-se a presença de um singlete em 2,30 ppm referente ao CH_3 do grupamento acetila, confirmando a reação de acetilação do grupamento fenólico. As absorções em 6,73 - 7,39 ppm são correspondentes aos hidrogênios da fração aromática, absorção em 5,34 ppm corresponde aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral alquílica de 15 carbonos e os deslocamentos entre 1,25 e 1,60 ppm são correspondentes aos hidrogênios ligados a carbonos simples da cadeia lateral. Os 24 sinais de carbonos esperados para a estrutura do ácido anacárdico acetilado ou ácido acetilanacárdico foram registrados no espectro de RMN de ^{13}C que apresentou como destaque o sinal do grupo carbonila do éster ligado ao metil ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$) em 169,7 ppm, além disso observou-se a presença em 148,69 ppm do carbono aromático ligado ao oxigênio, em 120,73 ppm os carbonos da parte aromática e entre 127,70 - 130,18 ppm os carbonos da cadeia lateral alquílica de 15 carbonos.

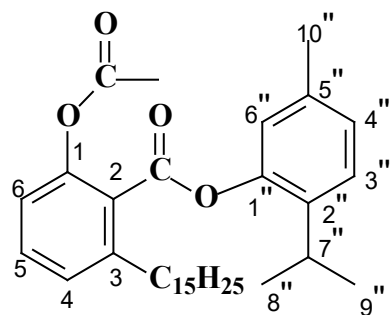
O ácido anacárdico acetilado apresentou os seguintes dados espectroscópicos: RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,37 (1H, t, 7,8 Hz, H-5), 6,84 (1H, d, 7,8 Hz, H-6), 6,73 (1H, d, 7,8 Hz, H-4), 5,92 - 6,01 (2H, m, H-14'), 5,34 - 5,50 (4 H, m, H-8', H-9', H-11', H-12'), 5,14 (m, H-15'), 3,02 (2H, t, 7.5 Hz, H-1'), 2,83 (4H, m, H-10', H-13'), 2,30 (CH_3CO), 2,02 (2H, br t, H-7'), 1,58 (2H, m, H-2'), 1,27-1,28 (8H, m, H-3', H-4', H-5', H-6'). RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169,7 (COOH, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 148,69 (C-1), 120,73 (C-2), 143,51 (C-3), 127,70 (C-4), 131,36 (C-5), 120,73 (C-6). Cadeia lateral: 36,59 (C-1'), 31,72 (C-2'), 29,19 -29,90 (C-3', C-4', C-5', C-6'), 27,43 (C-7'), 130,18, 130,13, 130,03, 127,70 (C-8', C-9', C-11', C-12'), 31,63 (C-10'), 24,79 (C-13'), 29,52, 14,13 (C-15'), 22,86 (CH_3CO).

A obtenção dos ésteres derivados do ácido *O*-acetil-anacárdico foi realizada partindo-se da rota sintética de esterificação em reação catalisada por DCC e DMAP, usando diclorometano como solvente. Com essa metodologia foram preparados os derivados do ácido acetil-anacárdico com os fenóis carvacrol e timol de acordo com a Figura 1.

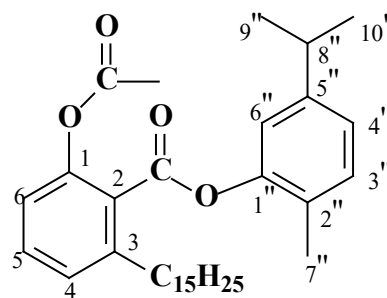


Figura 1: Representação estrutural dos ésteres do ácido anacárdico acetilado.

***O*-acetil-anacardato de timila**



***O*-acetil-anacardato de carvacrila**



Fonte: Elaborada pelos autores.

Ácido anacárdico acetilado. Na síntese deste composto obteve-se um rendimento de 38%, através da rota sintética de acetilação. Os dados espectroscópicos obtidos foram consistentes com a estrutura esperada. O espectro de RMN de ^1H registrou um singlete devido aos hidrogênios do grupo metil do grupo acetato (CH_3COO) com deslocamento químico em 2,30 ppm. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou como destaque o sinal do grupo carbonila do acetato em 169,40 ppm juntamente com a absorção da carboxila do ácido, as absorções em 122,6 - 139,21 ppm correspondem aos carbonos aromáticas, no deslocamento químico em 22,68 ppm ao grupo metil (CH_3) do grupo acetato.

Na síntese do *O*-acetil-anacardato de timila, a análise espectroscópica confirma a estrutura pois houve o aparecimento do grupamento éster no espectro de RMN de ^{13}C com a presença das duas carbonilas, a do acetato em 169,40 ppm e a do grupo carboxilato em 162,49. Há também o aparecimento de um hepteto em 2,96 - 3,13 do isopropil de timila, além das outras absorções dos carbonos aromaticos.

O-acetil-anacardato de timila: Grupo anacardato: RMN de ^1H (499,60 MHz, CDCl_3) δ : 7,43 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-5), 6,82 - 6,94 (m, H-6, H-4), 5,82 (2H, m, H-14'), 5,43 - 5,5 (4 H, m, H-8', H-9', H-11', H-12'), 5,06 (m, H-15'), 3,02 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-1'), 2,83 (4H, m, H-10', H-13'), 2,30 (CH_3COO), 2,02 (2H, br t, H-7'), 1,58 (2H, m, H-2'), 1,27 - 1,28 (8H, m, H-3', H-4', H-5', H-6') ppm. RMN de ^{13}C (125,63 MHz, CDCl_3) δ : 169,94 (*O*-acetil- $\text{CH}_3\text{C}=\text{OO}$ -), 163,63 ($-\text{C}=\text{OO}$, carboxilato), 148,83 (C-1), 122,98 (C-2), 148,00 (C-3), 122,98 (C-4), 131,19 (C-5), 116,14 (C-6) ppm, Cadeia lateral: 36,59 (C-1'), 31,72 (C-2'), 29,19-29,99 (C-3', C-4', C-5', C-6, C-14'), 27,41 (C-7'), 130,59; 130,13; 127,77; 127,06 (C-8', C-9', C-11', C-12'), 31,72 (C-10'), 25,78 (C-13'), 14,29 (C-15'), 22,86 (CH_3COO) ppm. Grupo timila: RMN de ^1H : 7,25 (H-3'', d, $J = 7,7$ Hz), 7,02 (H-4'', d, $J = 7,7$), 6,82 - 6,94 (m, H-6''), 2,96 - 3,13 (H-7'', heptete,



$J = 6,9$ Hz), 1,29 (H-8''), d, $J = 6,9$ Hz), 1,29 (H-9''), d, $J = 6,9$ Hz), 2,32 (H-10''), s) ppm. RMN de ^{13}C : 148,83 (C-1''), 116,14 (C-2''), 127,52 (C-3''), 126,0 (C-4''), 134,9 (C-5''), 114,90 (C-6''), 34,4 (C-7''), 24,1, 23,56 (C-8'', C-9''), 21,02 (C-10'') ppm.

O-acetyl-anacardato de carvacrila: Grupo anacardato: RMN de ^1H (499,60 MHz, CDCl_3) δ : 7,37 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-5), 6,82 - 6,94 (m, H-6, H-4), 5,82 (2H, m, H-14'), 5,35 - 5,43 (4 H, m, H-8', H-9', H-11', H-12'), 5,06 (m, H-15'), 3,02 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-1'), 2,83 (4H, m, H-10', H-13'), 2,30 (CH_3COO), 2,02 (2H, br t, H-7'), 1,58 (2H, m, H-2'), 1,27 - 1,28 (8H, m, H-3', H-4', H-5', H-6') ppm. RMN de ^{13}C (125,63 MHz, CDCl_3) δ : 169,94 (CH_3COO), 163,64 (C=OO, carboxilato), 149,48 (C-1), 122,89 (C-2), 148,22 (C-3), 124,72 (C-4), 131,40 (C-5), 119,58 (C-6), Cadeia lateral: 36,59 (C-1'), 31,72 (C-2'), 29,19 -29,99 (C-3', C-4', C-5', C-6' C-14'), 27,41 (C-7'), 130,59; 130,13; 127,77; 127,06 (C-8', C-9', C-11', C-12'), 31,72 (C-10'), 25,78 (C-13'), 14,31 (C-15'), 22,86 (CH_3COO) ppm. Grupo carvacrila: RMN de ^1H δ : 1,22 (6H, d, $J = 6,9$ Hz), 2,10 (3H, s), 2,16 (3H, s), 2,99 (1H, sept, $J = 6,9$ Hz), 6,95 - 7,03 (2H, 7,02 (dd, $J = 2,8, 0,5$ Hz), 6,98 (dd, $J = 8,4, 0,5$ Hz), 7,07 (1H, dd, $J = 8,4, 2,8$ Hz). RMN de ^{13}C δ : 149,48 (C-1''), 114,91 (C-2''), 127,79 (C-3''), 124,38 (C-4''), 143,46 (C-5''), 127,04 (C-6''), 34,21 (C-7''), 23,49; 23,56 (C-8'', C-9'', 2 x CH_3), 14,29 (C-10'', CH_3) ppm.

Os espectros de infravermelho dos dois ésteres de timila e carvacrila confirmam a presença das duas carbonilas uma do grupo acetila em 1750 cm^{-1} e a do grupo carboxilato em 1715 cm^{-1} , bandas esqueléticas de composto aromático revelado pelas bandas entre 1600 a 1500 cm^{-1} e em 1370 cm^{-1} banda forte de deformação do CH_3 do acetato bem como as fortes absorções da ligação C-O de grupos éster na região de 1215 a 1200 cm^{-1} .

Atividade anticolinesterásica dos ésteres derivados do ácido anacárdico

Tanto o ácido anacárdico ($\text{CI}_{50} = 2.98 \pm 0.05\ \mu\text{g/mL}$) (da SILVA *et al.*, 2021) como os dois fenóis monoterpênicos carvacrol e timol (JUKIC *et al.*, 2007), apresentam atividades anticolinesterásicas já relatadas. Elaborou-se então a hipótese de que a combinação do AA com os monoterpênicos fenólicos em reação de condensação das duas moléculas por esterificação, poderia resultar em moléculas com maior atividade anticolinesterásica. Esta hipótese foi confirmada pois os ésteres formados a partir do ácido anacárdico acetilado com o timol e o carvacrol mostraram-se mais ativos que os produtos de partida, como mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Resultados do teste de inibição da acetilcolinesterase (AChE) dos derivados do ácido anacárdico acetilado.

Amostras	CI ₅₀ (µg/mL)
Ácido anacárdico	1,722 ± 0,058 c
Ácido anacárdico acetilado	1,773 ± 0,032 c
Timol	3,178 ± 0,023 e
<i>O</i> -acetil-anacardato de timila	0,874 ± 0,011 b
Carvacrol	2,876 ± 0,015 d
<i>O</i> -acetil-anacardato de carvacrila	0,919 ± 0,036 b
Fisostigmina (padrão)	0,338 ± 0,051 a

¹Letras diferentes significam diferença estatística significativa entre as amostras em $p < 0,05$ no teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pelos autores.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ésteres acetil-anacardato de timila e carvacrila foram sintetizados e os dados espectroscópicos confirmaram as estruturas das moléculas propostas, revelando atividade melhor que os produtos de partida. Desta forma os produtos são considerados bons potenciais inibidores da enzima acetilcolinesterase, sugerindo-se estudos mais aprofundados acerca dos mecanismos de ação destes e ainda a avaliação de outras atividades biológicas correlacionadas com a atividade anticolinesterásica.

REFERÊNCIAS

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

da SILVA, W.M.B.; *et al.* Anacardic Acid Complexes as Possible Agents Against Alzheimer's Disease Through Their Antioxidant, In vitro, and In silico Anticholinesterase and Anxiolytic Actions. *Neurotoxicity Research*, v. 39, n. 2, p. 467-476, 2021.

ELLMAN, G. L.; *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

HAMAD, F.; MUBOFU, E. Potential Biological Applications of Bio-Based Anacardic Acids and Their Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 8569-8590, 2015.



JUKIC M; *et al.* In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 259-261, 2007.

MORAIS, S. M.; *et al.* Anacardic Acid Constituents from Cashew Nut Shell Liquid: NMR Characterization and the Effect of Unsaturation on Its Biological Activities. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 31-41, 2017.

PARAMASHIVAPPA, P.; *et al.* Novel Method for Isolation of Major Phenolic Constituents from Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Shell Liquid. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2548-2551, 2001.

RHEE, I. K.; *et al.* Screening for Acetylcholinesterase Inhibitors Using Silica Gel Chromatography in Combination with Bioactive Staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, n. 217, 2001.

TOPAL, F. Anticholinergic and antidiabetic effects of isoeugenol from clove (*Eugenia caryophyllata*) oil. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 583-592, 2019.



ARTIGO 3

MICROCÁPSULAS DE ÓLEO DE PEQUI COM GOMA DE CAJUEIRO E QUITOSANA OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA

DOI 10.47402/ed.ep.c20221821320

Luana Carvalho da Silva
Marília Alves do Nascimento
Tiago Linhares Cruz Tabosa Barroso
Rachel Menezes Castelo
Celli Rodrigues Muniz
Carlucio Roberto Alves
Roselayne Ferro Furtado
André Luiz Herzog Cardoso

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi descrever como proceder para a formação de microcápsulas de óleo de pequi a partir de matrizes de goma de cajueiro e quitosana, utilizando-se a técnica de coacervação complexa. Foi comprovada a formação das microcápsulas de óleo de pequi por meio da precipitação dos dois polímeros decorrente da interação eletrostáticas entre goma de cajueiro e quitosana. Com a microscopia óptica, pode-se observar uma dominante ocorrência de partículas com geometrias aproximadamente esféricas, com distribuição de tamanhos em torno de 4,8 μm . Por fim foi analisada a morfologia das microcápsulas secas por liofilização, as quais apresentaram estruturas em formas de placas, resultado da utilização de alto vácuo e baixas temperaturas. Pode-se concluir que a utilização do método de coacervação complexa para a formação de microcápsulas de óleo de pequi, em matriz de goma de cajueiro e quitosana, se mostrou bastante eficaz, podendo ser um meio alternativo de aplicação do óleo de pequi.

PALAVRAS-CHAVE: Óleo de pequi. Microencapsulação. Coacervação complexa. Goma de cajueiro. Quitosana.

INTRODUÇÃO

Caryocar coriaceum Wittm. (Caryocaraceae) é uma árvore comum encontrada na área de cerrado do Nordeste brasileiro, e seu fruto, popularmente conhecido como “pequi” ou “piqui”, atualmente está em processo de expansão (BORGES *et al.*, 2021). O fruto fornece óleo nutritivo, que pode ser extraído da amêndoa ou da polpa. Seu óleo é uma rica fonte de carotenoides e ácidos graxos insaturados (LIMA *et al.*, 2020). Esses compostos podem ser responsáveis por algumas das propriedades funcionais relatadas para o óleo de pequi, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e redutor de colesterol (FIGUEIREDO *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2020).

O óleo pequi tem grande potencial para ser explorado como fonte de nutrientes (MAGALHÃES *et al.*, 2019), mesmo com aroma e cheiro fortes. Por esse motivo, o uso de métodos de microencapsulação poderia ajudar a mascarar o sabor forte do óleo de pequi, além



de proteger os compostos bioativos e promover sua liberação controlada. Entre os bioativos presentes no óleo de pequi, destacam-se o teor de ácido graxo insaturado e os carotenoides. Ambos os compostos estão sujeitos à oxidação durante o processo ou armazenamento do óleo e ambos levam a geração de radicais livres, que podem ter efeitos negativos no organismo (ALCÂNTARA *et al.*, 2019; ŠEREGELJ *et al.*, 2021).

A microencapsulação por coacervação complexa é usada para encapsular compostos bioativos e sustentar sua liberação sob várias condições. A coacervação complexa é um dos métodos mais utilizados para microencapsulação lipídica (SILVA *et al.*, 2022). Este processo envolve condições de processo moderadas, baixo custo e alta eficiência de encapsulamento. Ela resulta da separação de fase líquido-líquido que ocorre entre polímeros de cargas opostas por meio de interações eletrostáticas (EGHBAL; CHOUDHARY, 2018).

A composição do material da parede das microcápsulas desempenha um papel crucial nas propriedades físico-químicas, reológicas, morfológicas, microbianas e sensoriais do produto (GUMUS; GHARIBZAHEDI, 2021). Dentre os polissacarídeos utilizados como material de parede, a goma arábica é um dos mais utilizados na indústria alimentícia apesar de seu alto custo e problemas de disponibilidade. Um substituto alternativo é a goma de cajueiro, devido às suas características físico-químicas e também por ser um coproduto de baixo valor econômico agregado na cadeia da produção do caju (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Estudos anteriores já mostraram o potencial da goma de caju como substituto da goma arábica na microencapsulação do óleo de pequi (NASCIMENTO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2018).

Neste trabalho, está descrito como proceder para a formação de microcápsulas de óleo de pequi a partir de matrizes de goma de cajueiro e quitosana, utilizando-se a técnica de coacervação complexa. Estas matrizes foram escolhidas em razão do caráter aniônico e catiônico da goma de cajueiro (um polissacarídeo ainda sem valor econômico agregado) e quitosana (um polissacarídeo de baixo custo), respectivamente.

METODOLOGIA

MATERIAIS

A goma de cajueiro foi obtida do exsudato, coletado de plantas de cajueiro do Campo Experimental de Pacajus pertencente a Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, Brasil). A quitosana (baixa massa molar) 75-85% de desacetilação foi obtida da Sigma-Aldrich. O óleo



de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) foi obtido com produtores na cidade de Barbalha, no Cariri cearense, Brasil.

PURIFICAÇÃO DA GOMA DE CAJUEIRO

A purificação da goma de cajueiro ou o isolamento dos polissacarídeos foi realizado através da metodologia descrita previamente por Silva *et al.* (2018), com modificações. Inicialmente o exsudato coletado foi triturado em um moinho de facas. Em seguida, a amostra triturada foi solubilizada em água, na proporção de 300 g da amostra para um litro de água filtrada e centrifugada (15.303xg por 10 min a 25 °C) para a retirada de resíduos. Após a retirada dos resíduos, o sobrenadante foi precipitado em etanol 96°GL, na proporção de 1:3 (m/V) da amostra:etanol por 24 h, sob refrigeração (4 °C). O excesso de etanol foi retirado e o precipitado seco em estufa de circulação de ar a 60 °C. Por fim, a amostra foi triturada, e obtida, assim, a goma de cajueiro purificada.

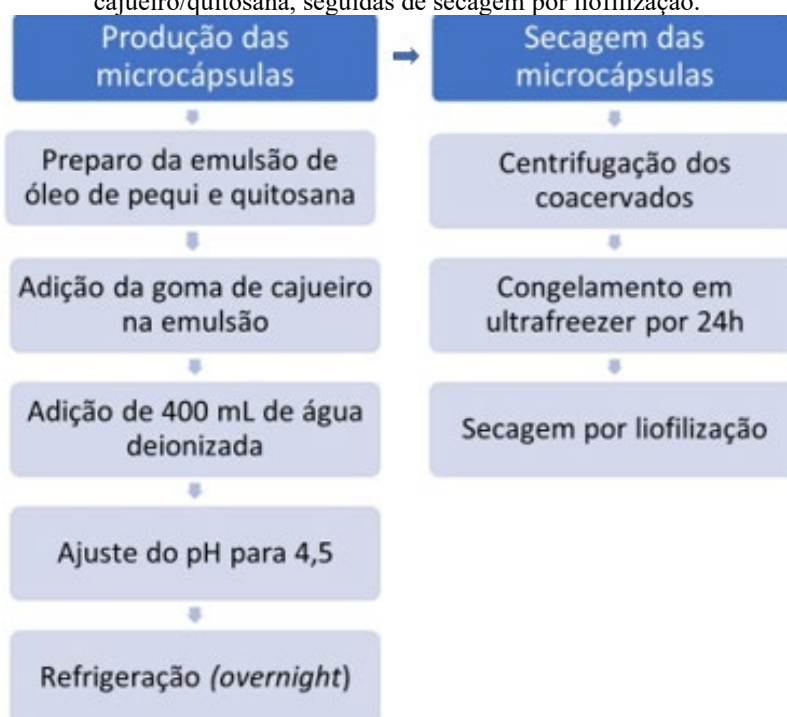
FORMAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

Para solução de goma de cajueiro, 11 g do polissacarídeo foram solubilizadas em 100 mL de água deionizada e homogeneizadas em ultraturrax durante 3 min a 10.000 rpm. Para solubilização da quitosana 0,5 g foram misturados em 100 mL de água deionizada à 2% de ácido acético (v/v) e homogeneizadas em ultraturrax durante 3 min a 10.000 rpm.

A formação das microcápsulas de óleo de pequi em matriz de goma de cajueiro/quitosana foi produzida conforme descrito na Figura 1. Primeiramente, o óleo de pequi (2 g) foi adicionado a solução de quitosana e homogeneizados em ultraturrax a 10.000 rpm por 3 min. Posteriormente, foi adicionado à solução de goma de cajueiro e homogeneizados novamente a 10.000 rpm por 3 min. Por fim, adicionou-se 400 mL de água deionizada e homogeneizou-se uma vez mais em ultraturrax. O pH das misturas foram ajustados para 4,5, e as soluções foram refrigeradas por 24 h (4 °C) para precipitação das microcápsulas. Após a precipitação, as microcápsulas foram secas por liofilização. O material foi previamente centrifugado a 15.303xg, por 10 min a 25 °C, retirando-se o excesso de água, e congelando-se em ultrafreezer (-80 °C) por 24h. Em seguida os materiais congelados foram levados ao liofilizador do tipo Liotop K1005, e ali deixados até a total secagem das microcápsulas.



Figura 1: Fluxograma das etapas de preparação das microcápsulas de óleo de pequi, em matriz de goma de cajueiro/quitosana, seguidas de secagem por liofilização.



Fonte: Elaborada pelos autores.

MORFOLOGIA ÓPTICA E TAMANHO DE PARTÍCULA DOS COACERVADOS

Após o processo de formação dos coacervados foram retiradas alíquotas do precipitado e depositados em lâminas, com posterior recobrimento por lamínulas, para a realização de micrografias óptica das microcápsulas. Foi utilizado um microscópio óptico Zeiss, acoplado a um sistema de obtenção de imagem digital através de câmera do tipo CCD.

Os tamanhos médios de partícula também foram analisados através da microscopia ótica, com o auxílio do programa de análises de imagens de domínio público ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012), desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, US), acessível em <http://imagej.nih.gov/ij/>. Nesse caso, foram escolhidos três campos diferentes da imagem, e em cada campo foi realizada a determinação de tamanhos de 50 micropartículas.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROCÁPSULAS APÓS SECAGEM

A morfologia das microcápsulas secas por liofilização foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio Zeiss modelo DSM940A, operando com aceleração do feixe de elétrons de 15 kV. Amostras de micropartículas secas de goma de cajueiro/quitosana com o óleo de pequi foram preparadas sobre porta-amostras metálicas



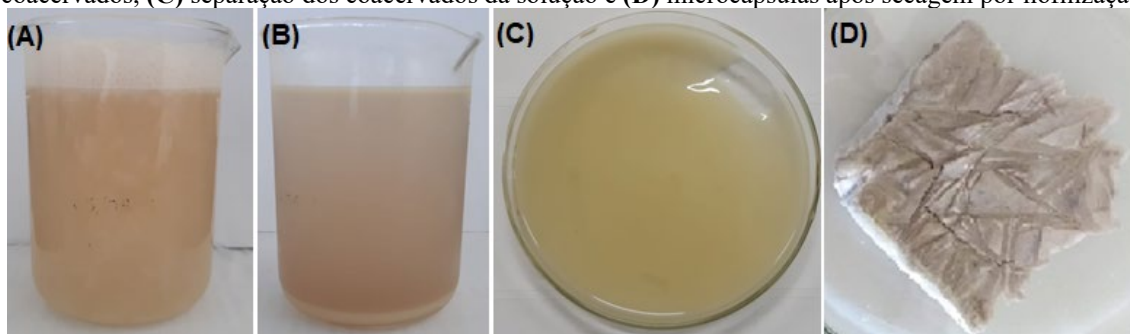
(stubs), com o auxílio de fitas condutoras de carbono, e recobertas com uma fina camada de ouro produzidas por um evaporador (sputter) do tipo Emitech, modelo K 550. Nas microcápsulas sem o óleo de pequi foram realizadas fraturas com o auxílio de bisturi, tendo como objetivo a visualização da estrutura interna das paredes das cápsulas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

FORMAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

A formação das microcápsulas de óleo de pequi, obtidas por coacervação complexa ocorrem devido as interações eletrostáticas atrativas entre goma de cajeiro e quitosana. A precipitação dos dois polímeros é decorrente da neutralização mútua dos polissacarídeos aniônicos e catiônicos, diminuindo a carga elétrica total líquida e a hidrofiliicidade das zonas de interface, conforme pode ser visto na Figura 2.

Figura 2: (A) Emulsão óleo, quitosana e goma de cajeiro da formação dos coacervados, (B) precipitação dos coacervados, (C) separação dos coacervados da solução e (D) microcápsulas após secagem por liofilização.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Essas interações, determinadas principalmente por atrações do tipo eletrostáticas entre biopolímeros com cargas opostas, induzem a formação de coacervados complexos, que podem ser insolúveis, formando um sistema de duas fases, consistindo em fases complexas macromoleculares precipitadas e uma fase líquida contínua (BUTSTRAEN; SALÜN, 2014).

Estudos prévios realizados por Silva *et al.* (2022) relacionados ao presente trabalho mostraram que microcápsulas de óleo de pequi em matriz de goma de cajeiro e quitosana apresentaram uma eficiência de encapsulação de 93,65 %, com um rendimento de 53,29 % e capacidade de carga de 25,71 %. Outros trabalhos que utilizaram a coacervação complexa como método de encapsulação também encontraram uma capacidade de carga em torno de 30% (OLIVEIRA *et al.*, 2020; TIMILSENA *et al.*, 2019). A espessura da matriz encapsulante pode causar uma maior taxa de liberação (DEVI *et al.*, 2012) e influenciam o valor de eficiência. Esse comportamento foi observado por Silva *et al.* (2022), onde microcápsulas que

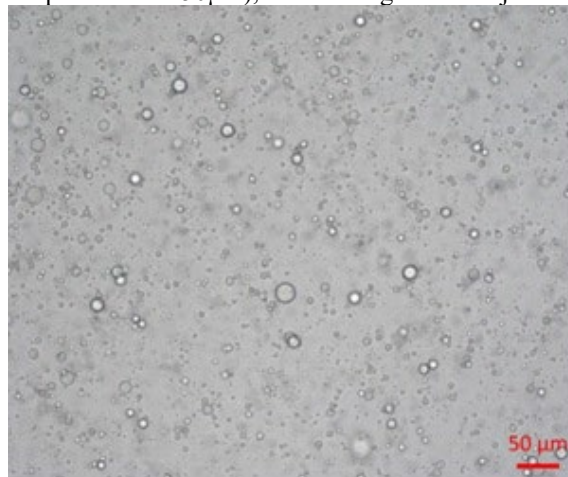


apresentaram maior eficiência são aquelas que obtiveram menores resultados de capacidade de carga.

MORFOLOGIA ÓPTICA E TAMANHO DE PARTÍCULA

A Figura 3 representa a micrografia das microcápsulas de óleo, usando a coacervação complexa, em matriz de goma de cajueiro e quitosana.

Figura 3: Microscopia óptica das microcápsulas de óleo produzidas por coacervação complexa (aumento de 20x, barra representativa 50µm), em matriz goma de cajueiro/quitosana.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Observa-se a dominante ocorrência de partículas com geometrias aproximadamente esféricas, com uma razoável distribuição de tamanhos, o que corrobora o êxito da formação de microcápsulas de óleo de pequi, obtidas através do processo de coacervação complexa, com uma interface rígida e firme envolvendo a fase oleosa contida no interior das microcápsulas. Estudos relataram a ocorrência de semelhantes características estruturais, como o de Barreto *et al.*, (2009) em microcápsulas de quitosana e proteínas de leite; Yuan *et al.*, (2017) com microcápsulas de proteína de soja e quitosana; Gomez-Estaca *et al.*, (2016) com a goma de cajueiro e gelatina e Butstraen e Salün (2014) com quitosana e gelatina como biomateriais de interface estrutural dos coacervados.

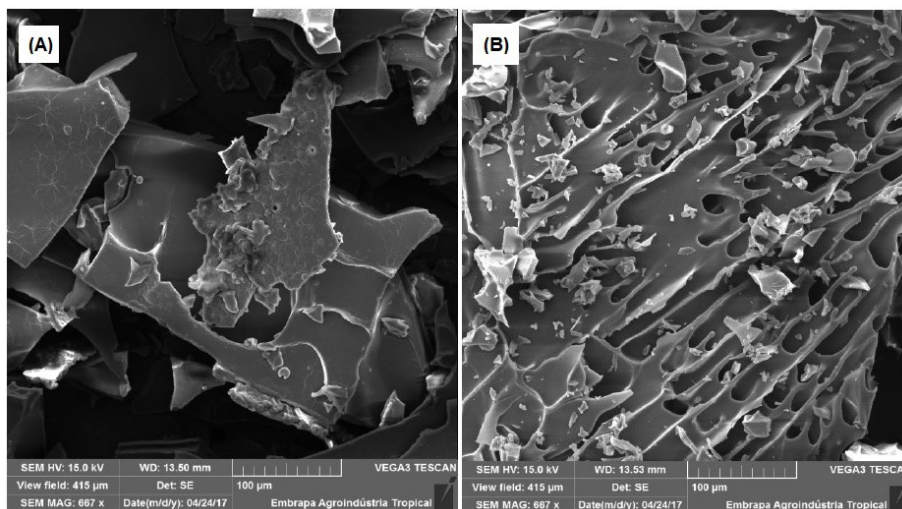
São observadas ainda uma distribuição de tamanho heterogênea e foi realizada determinação de tamanho médio de partículas, onde o valor obtido foi de 4,8 µm.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS PARTÍCULAS

A Figura 4 é referente as micrografias das microcápsulas após secagem por liofilização. Após secagem por liofilização, as cápsulas apresentaram estruturas em formas de placas, resultado da utilização de alto vácuo e baixas temperaturas.



Figura 4: Micrografias realizadas por MEV das microcápsulas secas por liofilização, onde (A) são as microcápsulas de óleo de pequi, em matriz de goma de cajueiro/quitosana e (B) são as microcápsulas na ausência do óleo.



Fonte: Elaborada pelos autores.

A presença de estruturas semelhantes a “bolhas” pode ser atribuída à presença de óleo na superfície das micropartículas (Figura 4 A). Suas estruturas irregulares, como a presença de poros e rachaduras, ajudam na reidratação das micropartículas.

Para melhor visualização da estrutura da parede das micropartículas, foram realizadas micrografias (Figura 4 B) com cortes na superfície, na ausência de óleo, haja vista que na presença do óleo, ocorre o seu extravasamento da amostra no momento da fratura. Essas micrografias evidenciam a presença de falhas nas estruturas das partículas e que as estruturas semelhantes a “bolhas” visualizadas nas micrografias anteriores estão relacionadas à presença de óleo na superfície. Alvim (2005) e Mendes (2012) usaram a liofilização como técnica de desidratação de micropartículas, obtendo amostras similares às apresentadas nas Figuras 4 A e B.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da técnica de coacervação complexa para a formação de microcápsulas de óleo de pequi, em matriz de goma de cajueiro e quitosana se mostrou bastante eficaz, haja vista que foi comprovada a microencapsulação pelas micrografias, onde os tamanhos de partículas estão dentro dos padrões de microcápsulas. Com isso, as propriedades ativas estarão protegidas e o mascaramento do sabor e odor característico do óleo poderão ser realizados em um sistema onde a liberação pode ser controlada de acordo com as necessidades do produto.

REFERENCIAS

ALCÂNTARA, M. A.; *et al.* Influence of the emulsion homogenization method on the stability



of chia oil microencapsulated by spray drying. **Powder Technology**, v. 354, p. 877–885, 2019.

ALVIM, Izabela Dutra. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por spray drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes**. 2005. 277f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2005.

BARRETO, B. N.; *et al.* Formação de coacervatos complexos de quitosana e proteínas do soro do leite e obtenção de microcápsulas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 10., 2009, Foz do Iguaçu, PR. **Anais [...]** Foz do Iguaçu, PR: CBPol, 2009.

BUTSTRAEN, C.; SALAÜN, F. Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum arabic and chitosan. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 608–616, 2014.

BORGES, O. M. A.; *et al.* Pequi pulp oil: effect on the physicochemical, nutritional, and textural properties of cottage cheese. **Food Science and Technology**, v. 2061, p.1-8, 2021.

DEVI, N.; *et al.* Study of complex coacervation of gelatin a and sodium alginate for microencapsulation of olive oil. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 49, n.11, p. 936–945, 2012.

EGHBAL, N.; CHOUDHARY, R. Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 254–264, 2018.

FIGUEIREDO, P. R. L.; *et al.* Caryocar coriaceum Wittm. (Pequi) fixed oil presents hypolipemic and anti-inflammatory effects in vivo and in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 87–94, 2016.

GOMEZ-ESTACA, J.; *et al.* Encapsulation of na astaxanthin-containing lipid extract from shrimp waste by complex coacervation using a novel gelatin-cashew gum complex. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 155-162, 2016.

GUMUS, C. E.; GHARIBZAHEDI, S. M. T. Yogurts supplemented with lipid emulsions rich in omega-3 fatty acids: New insights into the fortification, microencapsulation, quality properties, and health-promoting effects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 110, p. 267–279, 2021.

LIMA, J. R.; *et al.* Pequi kernel oil extraction by hydraulic pressing and its characterization. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 42, n. 5, p. e-456, 2020.

MAGALHÃES, F. S.; SÁ, M. S. M.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Recovery of phenolic compounds from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit extract by membrane filtrations: Comparison of direct and sequential processes. **Journal of Food Engineering**, v. 257, p. 26–33, 2019.

MENDES, L. G. **Microencapsulação do corante natural de urucum: uma análise da eficiência da goma do cajueiro como material de parede**. 2012. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.



NASCIMENTO, M. A.; *et al.* Pequi oil microencapsulation by complex coacervation using gelatin-cashew gum. **International Journal of Food Studies**, v. 9, p. SI97–SI109, 2020.

PEREIRA, F. F. G.; *et al.* Characterization, antibacterial activity and antibiotic modifying action of the Caryocar coriaceum Wittm. pulp and almond fixed oil. **Natural Product Research**, v.34, n. 22, p. 3239-3243, 2020

ŠEREGELJ, V.; *et al.* New concept of fortified yogurt formulation with encapsulated carrot waste extract. **LWT - Food Science and Technology**, v.138, p. 110732, 2021.

SILVA, L. C.; *et al.* Characterization and controlled release of pequi oil microcapsules for yogurt application. **LWT – Food Science and Technology**, v. 157, p. 113105, 2022.

SILVA, L. C.; *et al.* Optimization of cashew gum and chitosan for microencapsulation of pequi oil by complex coacervation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 3, p. 1–8, 2018.

OLIVEIRA, M. A.; *et al.* Performance evaluation of cashew gum and gelatin blend for food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 17, p. 57–64, 2018.

OLIVEIRA, W. Q.; *et al.* Complex coacervates of cashew gum and gelatin as carriers of green coffee oil: The effect of microcapsule application on the rheological and sensorial quality of a fruit juice. **Food Research International**, v. 131, p. 109047, 2020.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 671-675, 2012.

TIMILSENA, Y. P.; *et al.* Investigation of oil distribution in spray-dried chia seed oil microcapsules using synchrotron-FTIR microspectroscopy. **Food Chemistry**, v. 275, p. 457–466, 2019.

YUAN, Y.; *et al.* Complex coacervation of soy protein with chitosan: Constructing antioxidant microcapsule for algal oil delivery. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 171-179, 2017.



ARTIGO 4

ESTUDO ESTATÍSTICO DA SÍNTESE DE CARBOXIMETILQUITOSANA E APLICAÇÃO COMO BIOCOAGULANTE

DOI 10.47402/ed.ep.c20221822420

João Lucas Isidio de Oliveira Almeida
Raimundo Nonato Lima Júnior
Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu

RESUMO

Biopolímeros como a quitosana (QT) têm sido propostos como floculantes alternativos para o tratamento de águas devido à biodegradabilidade, maior eficiência em comparação com os coagulantes tradicionais, além de modificações estruturais que podem potencializar sua atividade. Neste trabalho foram sintetizados derivados carboximetílicos (CMQ) de QT sob diferentes condições: concentrações de NaOH de 3 e 6 mol. L⁻¹, razão de ácido cloroacético: quitosana (m/m) de 3:1 e 6:1 e nas temperaturas de 25 e 50 °C e tempo de agitação de 2 e 4h, onde avaliou-se a influência desses parâmetros no grau de substituição (GS) da QT através de um fatorial 2⁴⁻¹. As CMQ's foram caracterizadas por FTIR e titulação potenciométrica. Os resultados do grau de substituição para as amostras variaram entre 32% e 41%, onde observou-se que a temperatura e a razão ácido:QT exerceram influências significativas no GS. De acordo com os estudos de coagulação/floculação foi possível observar que tanto QT, quanto CMQ, são mais eficientes que o Al₂(SO₄)₃, pois necessitam de dosagens bem menores para uma remoção de 99% de cor e turbidez, com concentrações que variaram entre 4 mg. L⁻¹ e 24 mg. L⁻¹, enquanto que para o Al₂(SO₄)₃ foram necessárias dosagens acima de 90 mg. L⁻¹. Também foi possível observar que a amostra com maior GS teve uma melhor eficiência, indicando ser um fator importante na aplicação das CMQ's. Com os estudos realizados pôde-se demonstrar que as CMQ's apresentaram uma elevada eficiência em concentrações menores que o Al₂(SO₄)₃ e menor variação no pH final utilizando as concentrações ideais.

PALAVRAS-CHAVE: Quitosana. Derivativos Funcionais. Bioadsorção.

INTRODUÇÃO

Otimizar o tratamento de água é um objetivo geral em todo o mundo, visando reduzir cada vez mais os resíduos gerados durante as etapas realizadas como, por exemplo, o excesso de alumínio residual na água e no lodo gerado ao fim do processo de coagulação além de reduzir os custos do processo. (GHERMAOUT; GHERMAOUT; NACEUR, 2011). Visando aperfeiçoar o processo e reduzir os impactos ambientais, materiais naturais biodegradáveis vêm ganhando força para utilização principalmente na etapa de coagulação que utiliza sulfato de alumínio, que necessita de altas dosagens e gera uma grande quantidade residual de alumínio livre ao fim do tratamento (VERMA; DASH; BHUNIA, 2012).

Biocoagulantes vem ganhando atenção para serem aplicados no processo de coagulação no lugar dos coagulantes tradicionais devido a biodegradabilidade, baixo preço e abundância



no ambiente além de outras vantagens como utilização em menores dosagens e formação de lodo que pode ser degradado por micro-organismos (BOLTO; GREGORY, 2007). Biopolímeros são os biocoagulantes de maior destaque em recentes estudos, em especial a quitosana que já demonstrou uma excelente eficiência como coagulante em comparação aos tradicionais além de ser suscetível a modificações estruturais que a tornam mais eficiente (LIMA JÚNIOR; ABREU; ALMEIDA, 2018)

Devido aos resultados promissores de biopolímeros e seus derivados como agentes biocoagulantes, neste trabalho utilizou-se quitosana e carboximetilquitosana em comparação com o sulfato de alumínio para avaliar a eficiência na remoção de cor e turbidez e variação do pH, buscando mostrar a aplicabilidade destes polímeros como agentes coagulantes no tratamento de água visando reduzir os impactos ambientais e produzir uma água de melhor qualidade ao fim do processo de tratamento.

METODOLOGIA

SÍNTESE DA CARBOXIMETILQUITOSANA

As amostras de carboximetilquitosana (CMQ) foram obtidas de acordo com metodologia descrita por Abreu (2009), através da síntese de éteres de Williamson, em que aproximadamente 3,5 g de QT foram suspensos em 70 mL de isopropanol por aproximadamente 10 minutos, em seguida foi adicionado NaOH promover a alcalinização do meio reacional durante 30 minutos em agitador magnético. Após esse tempo adicionou-se ácido monocloroacético em determinadas proporções e a mistura reacional foi aquecida a certa temperatura durante determinado período. Após essa etapa retirou-se o sistema da agitação, esperou-se esfriar até a temperatura ambiente e foram realizadas diversas lavagens com etanol 80 e 90% e uma última lavagem com metanol. Após isso as amostras foram secas em a temperatura ambiente por 24h.

Foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para avaliar quais os fatores influenciam de forma significativa no grau de substituição das amostras sintetizadas, utilizando a concentração de NaOH, o tempo de agitação, a razão em massa de ácido:QT (m/m) e a temperatura como fatores. Os níveis de cada fator estão representados na Tabela 1 a seguir. O planejamento foi constituído por 8 experimentos, onde cada um dos fatores foi avaliado em dois níveis diferentes, baixo (-) e alto (+).

**Tabela 1:** Níveis das variáveis reacionais da síntese das CMQ's.

Fator	Nível Baixo (-1)	Nível Alto (+1)
A- Tempo de agitação (h)	2	4
B - Temperatura (°C)	25	50
C - Razão ácido:QT (m/m)	3:1	6:1
D - Concentração de NaOH (mol.L ⁻¹)	3	7

Fonte: Elaborada pelos autores.

CARACTERIZAÇÕES

Titulação potenciométrica

Para a determinação do grau de substituição (GS) das amostras de CMQ foram realizadas titulações potenciométricas de acordo com metodologia descrita por Abreu (2009). Dissolveu-se aproximadamente 0,4000 g de amostra do polissacarídeo em 100,00 mL de água. A mistura foi acidificada com HCl 0,1 mol.L⁻¹ até que fosse obtida leitura de pH 2,00 em um pHmetro (Luca-210). Em seguida, titulou-se a mistura com KOH 0,1 mol.L⁻¹ registrando a adição de volume da base em função do pH. O GS foi calculados, com base na equação proposta por Ge e Luo (2005) (Equação 1).

$$GS_{CMQ} (\%) = \frac{161 \times (M_{KOH} \times V_{KOH})}{m_{CMQ} - 58 \times (M_{KOH} \times V_{KOH})} * 100 \quad (1)$$

Sendo: 161 (g/mol) representa a massa molecular da unidade glicosídica da QT, [base] a concentração molar de KOH utilizada na titulação, o termo (V_{KOH}) é a diferença do volume em litros da solução de KOH entre o segundo e o primeiro ponto de inflexão da curva, m_{CMQ} é a massa de CMQ (g), e 58 é a massa molar da unidade dos grupos carboximéticos. Foi aplicada a análise derivativa para auxiliar na determinação de V_2 e V_1 . Para isso foi utilizado o método da primeira derivada (dpH/dV) com o auxílio do Microsoft Excel 2007.

Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada para determinar o GD da QT e os valores de GS das CMQ's através da análise das bandas características das amostras obtidas nos espectros. Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando um espectrofotômetro modelo Nicolet is5 da Thermo Scientific. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr na proporção 1:20 (m/m) (amostra:KBr) e os espectros registrados no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹, empregando-se 32 scans e resolução de 4 cm⁻¹.



RESULTADOS E DISCUSSÕES

GRAU DE SUBSTITUIÇÃO DAS CMQ's

O GS das amostras sintetizadas foi obtido através de potenciometria, e foi utilizado como variável de resposta para a análise ANOVA a fim de identificar quais fatores influenciam de forma significativa na reação sob as condições estudadas. A Tabela 2 indica o grau de substituição obtido após a realização das titulações de todos os experimentos realizados.

Tabela 2: GS obtidos para as amostras bem como as condições dos fatores.

	BCD	ACD	ABD	CD	BD	AD	D	GS
Amostra	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	(%)
2/25CMQ3A/3M	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	38,5
4/25CMQ3A/7M	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	39,9
2/60CMQ3A/7M	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	36,1
4/60CMQ3A/3M	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	32,7
2/25CMQ6A/7M	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	39,5
4/25CMQ6A/3M	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	41,2
2/60CMQ6A/3M	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	37,8
4/60CMQ6A/7M	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	35,9

Fonte: Elaborada pelos autores.

Através da obtenção dos valores de GS e da utilização da matriz experimental, foram calculados para cada fator o contraste, o efeito e a soma quadrada (SQ). Os resultados obtidos foram utilizados para a construção da tabela ANOVA (Tabela 3). A partir dos resultados pôde-se analisar que o efeito principal A, referente ao tempo de agitação, o efeito D, confundido com o efeito terciário ABC, que se refere a concentração de base, e os efeitos confundidos AC/BD e BC/AD não influenciam significativamente o GS das amostras.

Tabela 3: Análise ANOVA dos fatores.

	SQ	GL	MQ	F	F _{tab}
B	34,4	1	34,4	67,7	7,71
C	6,5	1	6,5	12,7	
AB/CD	8,8	1	8,8	17,3	
RESÍDUO	2,0	4	0,51		
SQT	51,8	7			

Fonte: Elaborada pelos autores.

No que diz respeito a influência dos fatores no GS das amostras sintetizadas, dois fatores principais e um efeito de interação confundido se mostraram significativos, ou seja, possuíram $F > F_{tab}$, que foram os fatores B referente a temperatura, C referente a razão ácido:QT e os



efeitos confundidos AB/CD. O fator A, tempo de agitação, não se mostrou significativo para a reação e por possuir um efeito negativo, a otimização do experimento se dá com um tempo de agitação de duas horas.

Através desses dados obtidos foi realizado um fatorial completo sem o fator A, que não foi significativo, mas levando em conta o fator D, que está confundido com a interação ABC, pois estudos sugerem que há influência da concentração da base no GS das amostras. Analisando os dados percebeu-se que o fator principal B e os fatores de interação BD, CD e BCD possuem baixas somas quadradas, isso demonstra que eles não contribuem de forma significativa para o grau de substituição das amostras, e foram utilizados para compor o erro da tabela ANOVA que é representada pela Tabela 4.

Tabela 4: Tabela ANOVA do fatorial 2³.

	SQ	GL	MQ	F	F_{tab}
C	17,2	1	17,2	67,71	7,71
D	3,2	1	3,2	12,74	
BC	4,4	1	4,4	17,34	
RESÍDUO	1	4			
SQT					

Fonte: Elaborada pelos autores.

O fator B não foi significativo e possui um efeito negativo, indicando que o GS das CMQs não sofre influência da significativa devido a variação da temperatura, mas são favorecidos quando se utiliza a temperatura em nível baixo, ou seja, quando a reação é realizada a 25 °C. Isso se deve ao fato de que podem ocorrer reações paralelas entre o cloroacetato de sódio formado, após a adição do ácido monocloroacético no meio reacional e o hidróxido de sódio, dando origem a um subproduto chamado glicolato de sódio (KOUNDURI; FATEHI, 2016).

A reação paralela para a formação do glicolato de sódio possui uma energia de ativação mais elevada do que a reação de carboximetilação, logo um aumento da temperatura favorece a ocorrência dessa reação lateral, reduzindo a quantidade de ácido monocloroacético disponível para reagir com as hidroxilas desprotonadas nos carbonos C-3 e C-6, levando a um menor grau de substituição (IM *et al.*, 2018; WU, 2011).

O fator C, referente a razão em massa ácido:QT também foi significativo, com um efeito negativo, indicando que o GS das amostras é favorecido quando se utiliza o nível baixo do fator, ou seja, a razão ácido:QT de 3:1. Isso é explicado devido ao fato de que uma quantidade menor de ácido presente tende a não favorecer a reação paralela que pode ocorrer entre ele e o



hidróxido de sódio, o que acarretaria em uma redução da eficiência da reação de carboximetilação (BUKZEM *et al.*, 2016).

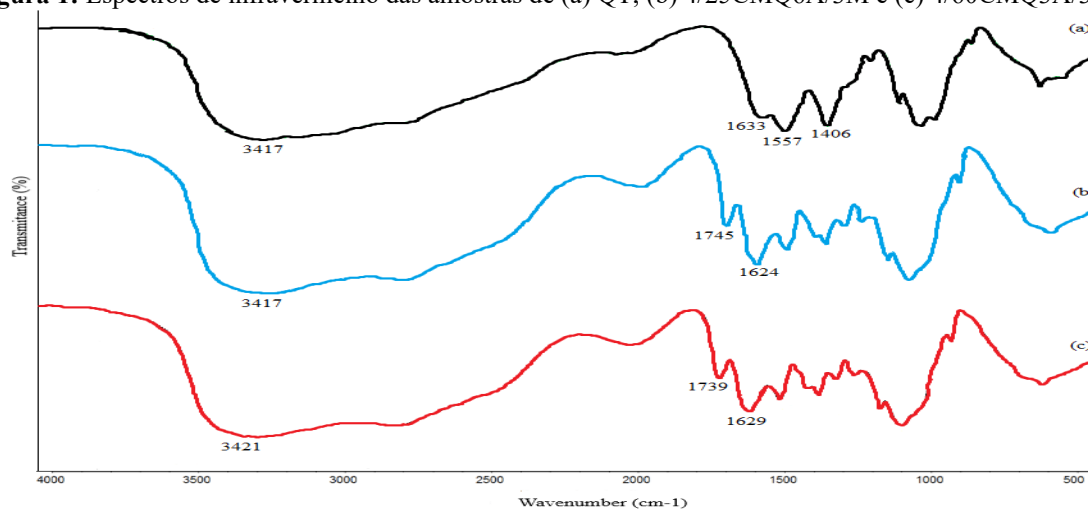
O fator D, concentração da base, foi significativo para o GS das amostras. Estudos relatam que uma elevada concentração de base causa uma maior desprotonação das hidroxilas e permite uma quantidade maior de sítios para reagir com o ácido presente (BUKZEM *et al.*, 2016; SIAHAAN *et al.*, 2017). Com isso, a concentração de base de 7 mol. L⁻¹ favorece um aumento no GS das amostras de CMQ.

A interação entre os fatores BC (Temperatura/razão ácido:QT) também se demonstrou significativo com efeito negativo, indicando que enquanto um dos fatores deve ser utilizado com nível alto, outro deve ser utilizado com nível baixo devido a cinética da reação paralela (KONDURI; FATEHI, 2016).

ESPECTROS DE INFRAVERMELHO

Para a avaliação da atividade coagulante foram selecionadas as amostras com maior e menor grau de substituição que foram, respectivamente, 4/25CMQ6A/3M e 4/60CMQ3A/3M cujos espectros de infravermelho estão representados na Figura 1 a seguir junto com o da QT.

Figura 1: Espectros de infravermelho das amostras de (a) QT, (b) 4/25CMQ6A/3M e (c) 4/60CMQ3A/3M.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Na Figura 1 (a) pode-se observar o espectro da amostra de QT, que apresenta as bandas características do material, como a banda em 3417 cm⁻¹ devido ao estiramento das hidroxilas presentes (-OH) que se sobrepõe ao estiramento -NH dos grupos amino presentes, a banda em 1633 cm⁻¹ referente ao estiramento simétrico da carbonila presente devido a incompleta desacetilação da amostra (-C=O) que corresponde ao pico da Amida I, o pico em 1557 cm⁻¹



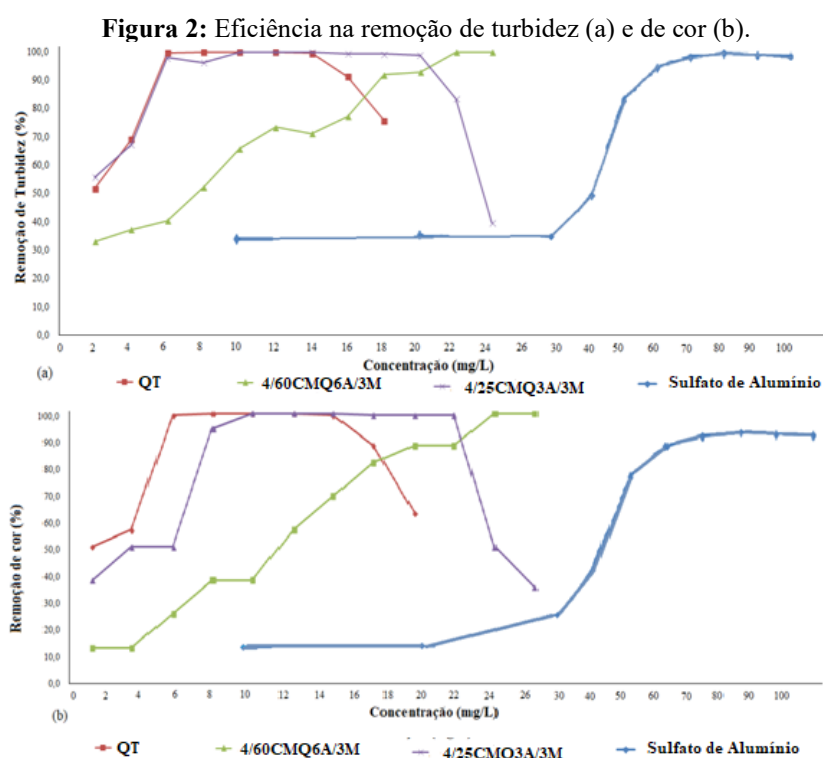
devido ao estiramento assimétrico da ligação –NH junto a carbonila correspondente ao pico da Amida II (BORSAGLI *et al.*, 2015; REDDI *et al.*, 2017).

Para as amostras de CMQ é possível observar os picos característicos da QT, mas com algumas modificações que indicam a modificação por carboximetilação. o pico por volta de 1740 cm^{-1} é associado a interação entre dímeros carboximéticos. Também é possível observar um deslocamento do pico de 1633 cm^{-1} , Amida I, para a região de 1620 cm^{-1} devido a formação de ligações de hidrogênio estabelecidas entre a amida e os grupos carboximéticos inseridos indicando que a síntese ocorreu com sucesso.

ESTUDOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO

Determinação da Dosagem Ideal

Após as realizações dos testes de coagulação/floculação para a determinação da dosagem ideal foram obtidas as eficiências de remoção de turbidez (Figura 2a) e de cor aparente (Figura 2b) para a QT, as amostras de CMQ e o Sulfato de Alumínio para comparação, como pode ser visualizado a seguir.



Fonte: Elaborada pelos autores.

As amostras foram aplicadas sob a forma de cloridrato, isso possibilita que ocorra a protonação dos grupamentos amino presentes ($-\text{NH}_3^+$) tornando-os polieletrólitos de natureza



catiônica, com isso o polímero é capaz de neutralizar ou reduzir a carga superficial das partículas suspensas na amostra de água sintética, que no geral possuem carga negativa, causando assim a desestabilização e posterior agregação formando flocos (BHALKARAN; WILSON, 2016).

Para a QT foi observada uma dosagem ideal de 8 mg. L⁻¹ com uma eficiência de 99% de remoção de cor e turbidez; para a amostra de 4/25/CMQ6A/3M a dosagem ideal foi de 10 mg. L⁻¹ e para a 4/60CMQ3A/3M foi 24 mg.L⁻¹. Em comparação com o Sulfato de Alumínio, que atingiu 97% de eficiência com concentrações da ordem de 90 mg. L⁻¹, fica evidente que os biocoagulantes possuem uma melhor atividade de remoção de cor e turbidez utilizando concentrações bem menores que o coagulante tradicional.

É possível observar para as amostras de QT e de 4/25/CMQ6A/3M que a uma certa concentração ocorre uma redução na eficiência, isso se deve ao fato de que está ocorrendo a adição de excesso de coagulante, com isso ocorre uma re-estabilização das partículas suspensas devido ao excesso de cargas positivas presentes, possibilitando com que as partículas possa ficar novamente suspensas (YANG *et al.*, 2016).

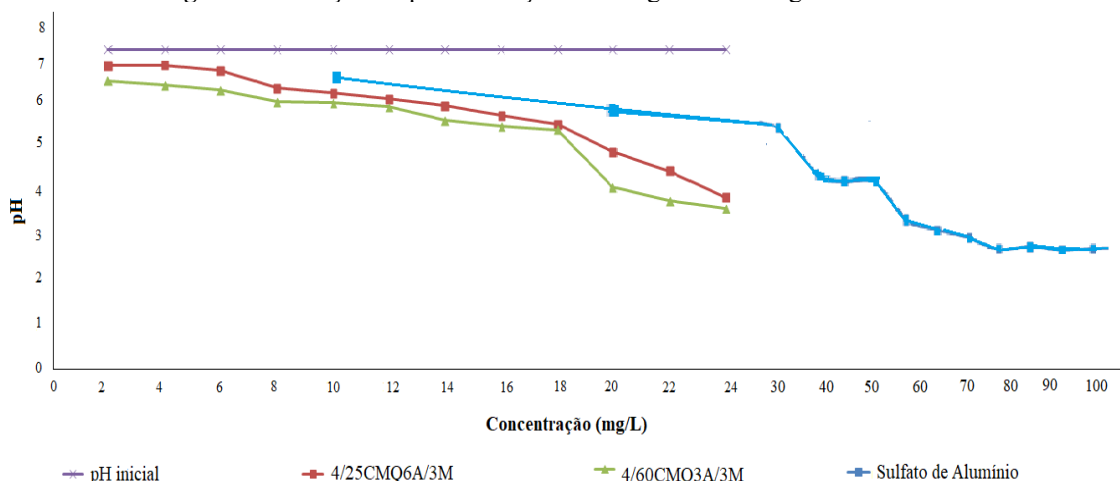
Para as amostras de CMQ também é possível observar que a dosagem ideal é bem menor do que a do sulfato de alumínio. Para a amostra com menor GS a dose ideal é de 24 mg. L⁻¹, maior do que a QT e a outra CMQ. Esse fato está relacionado com sua solubilidade, pois por apresentar menor GS a amostra tende a ter solubilidade limitada em certas faixas de pH. (BIDGOLI; ZAMANI; TAHERZADEH, 2010; CHEN; PARK, 2003). Outro fator que contribui para sua baixa eficiência é o percentual de *N*-Carboximetilação, da ordem de 3,63%, isso dificulta que estes grupos amino sejam protonados o que reduz ainda mais a eficiência, pois ocorrerá uma diminuição na quantidade de sítios positivos (-NH₃⁺) que são fundamentais no processo de desestabilização das partículas suspensas.

Influência no pH

O pH é um parâmetro essencial para a análise da qualidade da água, com isso a atividade dos coagulantes deve gerar variações que não comprometam sua qualidade, deixando assim esse parâmetro dentro dos valores limite após essa etapa de tratamento. Na Figura 3 é possível observar como o pH variou em função da dosagem e do coagulante utilizado.



Figura 3: Variação do pH em função da dosagem e do coagulante utilizado.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Ao ser adicionado Sulfato de alumínio na água o coagulante sofre hidrólise ácida formando diversos aquocomplexos de carga positiva que atuam na desestabilização das partículas suspensas, com isso ocorre a formação de grande quantidade de íons $H_3O^+_{(aq)}$ o que causa redução no pH (MATILAINEM; VEPSALAINEM; SILLANPAA, 2010). Utilizando a dosagem ideal do coagulante, 90 mg. L^{-1} , o pH final foi de 4,14 sendo assim ocorreu uma variação de 43% em relação ao pH inicial, tornando a água muito ácida.

Para as amostras de CMQ é possível observar também que há variação do pH, isso está relacionado com a forma sob a qual as amostras foram adicionadas, pois foram dissolvidas em HCl e a variação se deve a ele, já que está presente com as amostras. Embora essa variação ocorra ela é menos acentuada do que a causada pelo sulfato, a amostra de 4/25CMQ6A/3M apresenta uma variação de 13,8% deixando o pH em 6,26. A amostra de 4/60CMQ3A/3M apresentou uma variação de 47,3%, deixando o pH final igual a 3,82 com a dosagem de 24 mg. L^{-1} , devido ao fato de ser necessário utilizar uma maior quantidade do coagulante, acaba se adicionando mais ácido presente e gerando maior variação no pH.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram sintetizadas diferentes amostras de carboximetilquitosana com a finalidade de estudar a influência dos parâmetros reacionais no grau de substituição para posterior aplicação como biocoagulantes em água bruta sintética. Através dos experimentos foi possível observar que somente dois fatores foram significativos, a razão ácido:QT (m:m) e a temperatura, sendo que as condições otimizadas sugerem a utilização da temperatura em 25°C e da razão ácido:QT de 6:1, corroborando com resultados já publicados na literatura. Através dos testes de coagulação para determinar a dosagem ideal foi possível concluir que as amostras



de CMQ, com maior e menor GS, necessitam de uma dosagem significativamente menor que o Sulfato de alumínio utilizado como comparativo, 10 mg. L⁻¹ para a 4/25CMQ6A/3M e 24 mg. L⁻¹ para a 4/60CMQ6A/3M, enquanto que o Sulfato de alumínio necessitou de 90 mg. L⁻¹ para uma eficiência de 97%. Além disso, as CMQs geraram menor variação no pH e um menor volume de sólidos sedimentáveis, o que corrobora ainda mais para confirmá-las como materiais a serem utilizados como potenciais substituintes do sulfato de alumínio.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. O. M. S.; *et al.* Preparation and properties of core-shell alginate-carboxymethylchitosan hydrogels. **Polymer International**, v. 58, p. 1267-1274, 2009.
- AHMED, A. E. S. I.; *et al.* Natural and synthetic polymers for water treatment against dissolved pharmaceuticals. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, p. 40458-40468, 2014
- BHALKARAN, S.; WILSON, L. D. Investigation of self-assembly processes for chitosan-based coagulant-flocculant systems: A mini-review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1662-1683, 2016.
- BIDGOLI, H.; ZAMANI, A.; TAHERZADEH, M. J. Effect of carboxymethylation conditions on the water-binding capacity of chitosan-based superabsorbents. **Carbohydrate Research**, v. 18, p. 2683-2689, 2010.
- BOLTO, B.; GREGORY, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. **Water Research**, v. 41, n. 11, p. 2301-2324, 2007.
- BUKZEM, A. L.; *et al.* Optimization of carboxymethyl chitosan synthesis using response surface methodology and desirability function. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 615-624, 2016.
- CHEN, L.; DU, Y.; ZENG, X. Relationships between the molecular structure and moisture-absorption and moisture-retention abilities of carboxymethyl chitosan - II. Effect of degree of deacetylation and carboxymethylation. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 333-340, 2003.
- CHEN, X. G.; PARK, H. J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 4, p. 355-359, 2003.
- GE, H. C.; LUO, D. K. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 7, p. 1351-1356, 2005.
- GHERNAOUT, D.; GHERNAOUT, B.; NACEUR, M. W. Embodying the chemical water treatment in the green chemistry-A review. **Desalination**, v. 2-3, p. 1-10, 2011.
- GOPAL REDDI, M. R.; *et al.* Adsorption and kinetic studies on the removal of chromium and copper onto Chitosan-g-malic anhydride-g-ethylene dimethacrylate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1578-1585, 2017.
- IM, W.; *et al.* Optimization of carboxymethylation reaction as a pretreatment for production of



cellulose nanofibrils. **Cellulose**, v. 25, p. 3873-3883, 2018.

LIMA JÚNIOR, R. N.; ALMEIDA, J. L. I. O.; ABREU, F. O. M. S. Use of chitosan as a biocoagulant for treatment of water with high turbidity. **The International Journal of Engineering and Science**, v 7, p. 54–58, 2018.

KOUNDRI, M. K. R.; FATEHI, P. Synthesis and characterization of carboxymethylated xylan and its application as a dispersant. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 26-35, 2016.

LEE, C. S.; ROBINSON, J.; CHONG, M. F. A review on application of flocculants in wastewater treatment. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 92, n 6, p. 489–508, 2014.

MATILAINEN, A.; VEPSÄLÄINEN, M.; SILLANPÄÄ, M. Natural organic matter removal by coagulation during drinking water treatment: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 159, n. 2, p. 189–197, 2010.

MEDEIROS BORSAGLI, F. G. L.; *et al.* O-carboxymethyl functionalization of chitosan: Complexation and adsorption of Cd (II) and Cr (VI) as heavy metal pollutant ions. **Reactive and Functional Polymers**, v. 97, p. 37–47, 2015.

MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N.; TIWARI, A. Carboxymethyl chitosan and its applications. **In Advanced Materials Letters**, v. 1, p. 11-33, 2010.

RENAULT, F.; *et al.* Chitosan for coagulation/flocculation processes - An eco-friendly approach. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 5, p. 1337–1348, 2009.

SHANNON, M. A.; *et al.* Science and technology for water purification in the coming decades. **Nature**, v. 452, n. 7185, p. 301–310, 2008.

SIAHAAN, P.; *et al.* The optimum conditions of carboxymethyl chitosan synthesis on drug delivery application and its release of kinetics study. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 17, p. 291-300, 2017.

VERMA, A. K.; DASH, R. R.; BHUNIA, P. A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. **Journal of Environmental Management**, v. 93, n. 1, p. 154–168, 2012.

WU, Z. Reaction kinetics of carboxymethylation of cornstarch. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, p. 1901-1907, 2011.

YANG, R.; *et al.* A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment. **Water Research**, v. 95, p. 59–89, 2015.

YANG, Z.; *et al.* Cationic content effects of biodegradable amphoteric chitosan-based flocculants on the flocculation properties. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 8, p. 1378–1385, 2012.



ARTIGO 5

POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *VERNONIA* SCHREB. (ASTAERACEAE)

DOI 10.47402/ed.ep.c20221823520

Antônio Carlos Nogueira Sobrinho
Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle

RESUMO

Os produtos naturais são fontes de vários compostos químicos biologicamente ativos. Portanto, estudos etnofarmacológicos e etnobotânicos são essenciais para a prospecção de novas substâncias químicas, com potencial biológico, como uso no desenvolvimento de medicamentos. Nesse contexto, muitos estudos têm sido realizados com a família Asteraceae demonstrando propriedades medicinais de seus representantes, como espécies do gênero *Vernonia*, que são ricas em substâncias bioativas como lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, taninos e esteróides. Esta revisão apresenta uma visão geral das espécies de *Vernonia* com potencial antimicrobiano, suas principais características fitoquímicas e usos etnomedicinais.

PALAVRAS-CHAVE: Potencial antimicrobiano; Família Asteraceae; Características fitoquímicas.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das sociedades, desde a era primitiva, permitiu a utilização dos recursos naturais vegetais para a elaboração de medicamentos de uso terapêutico com a finalidade de controlar certas infecções microbianas e deste modo otimizar resultados frente aos fenômenos de resistência aos micro-organismos (DADGOSTAR, 2019). O crescente aumento nas infecções microbianas, de etiologia bacteriana e fúngica, suscita novas alternativas terapêuticas diante de micro-organismos de importância médico-veterinária, o que revela a necessidade de realização de novas pesquisas de prospecção química e biológica de produtos naturais (ROCHA *et al.*, 2011).

Um fator relevante na terapêutica de infecções microbianas consiste no aumento da resistência de micro-organismos as novas drogas produzidas pela indústria farmacêutica (BERMAN; KRYSAN, 2020). As bactérias apresentam uma habilidade genética relacionada à pressão seletiva gerada pelos agentes antimicrobianos, o que contribui para a ocorrência de resistência (OLIVEIRA; SILVA, 2008). Em relação à descoberta de novas drogas antifúngicas, os produtos naturais são amplamente utilizados, e os resultados apresentam grande utilidade contra infecções fúngicas (HOWARD *et al.*, 2020). Devido à resistência de muitos micro-organismos patogênicos, a procura por novos agentes antimicrobianos a partir das plantas é



intensa. Contudo ainda são necessárias pesquisas científicas que confirmem o potencial terapêutico de grande número de espécies vegetais.

Inúmeras plantas têm sido utilizadas com fins profiláticos e curativos de infecções. Nesse contexto muitas pesquisas são desenvolvidas em busca de espécies com potencial antimicrobiano, como os ensaios com plantas aromáticas por seus óleos essenciais serem reconhecidos empiricamente e pelas propriedades antimicrobianas demonstradas contra uma variedade de micro-organismos (SILVA *et al.*, 2012).

Dentro do grupo das angiospermas, as plantas pertencentes à família Asteraceae correspondem a maior parcela, possuindo distribuição cosmopolita frequentemente encontrada nos trópicos, subtropicos e regiões temperadas (HATTORI; NAKAJIMA, 2008). Incluindo cerca de 24.000-30.000 mil espécies descritas, pertencentes a 1600-1700 gêneros distribuídos em 17 tribos e 3 subfamílias, a família Asteraceae é relevante por suas propriedades cosméticas, aromáticas e terapêuticas dentro da classe das angiospermas eudicotiledôneas (FUNK *et al.*, 2009; PETACCI *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2015). Junto com *Calyceraceae*, *Campanulaceae*, *Menyanthaceae* e *Goodeniaceae* compõe a ordem Asterales.

Os principais gêneros de Asteraceae são *Aster*, *Inula*, *Xanthium*, *Eupatorium*, *Carpesium*, *Saussurea*, *Vernonia* e *Taraxacum*. (WU *et al.*, 2006). Da tribo Vernonieae, o gênero *Vernonia* Schreb. é um dos maiores da família Asteraceae, predominando na África e na América do Sul, com mais de 1000 espécies descritas (COSTA *et al.*, 2008). Apresenta vasto uso etnofarmacológico para o tratamento das mais diversas patologias, como antídoto para picada de serpentes, além do uso alimentício em algumas regiões africanas (TOYANG; VERPOORTE, 2013).

Inúmeros estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Vernonia* demonstraram a presença majoritária de diterpenos (KOS *et al.*, 2006), triterpenos (LIANG *et al.*, 2003), esteroides (TCHINDA *et al.*, 2003), e dos constituintes químicos mais frequentemente isolados, flavonóides (ALARA; ABDURAHMAN; OLALERE, 2020) e lactonas sesquiterpênicas (BUSKUHL *et al.*, 2010).

Este capítulo apresenta uma revisão do potencial antimicrobiano, com foco nas atividades antibacteriana e antifúngica, de espécies pertencentes ao gênero *Vernonia*, destacando as propriedades biológicas, fitoquímicas e etnofarmacológicas de espécies do gênero.



POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO GÊNERO *VERNONIA*

Vernonia é um gênero de plantas pertencente à tribo Vernonieae (Cichorioideae) e a família Asteraceae, com cerca de 1.000 espécies descritas, sendo o maior gênero da tribo (TOYANG; VERPOORTE, 2013). São encontradas nas áreas tropicais e subtropicais do mundo, especialmente na América do Sul e na África, seus principais centros de dispersão (COSTA *et al.*, 2008). O referido gênero leva o nome do botânico inglês William Vernon, que coletou e identificou este gênero em Maryland/USA nos fins da década de 1600 (TOYANG; VERPOORTE, 2013).

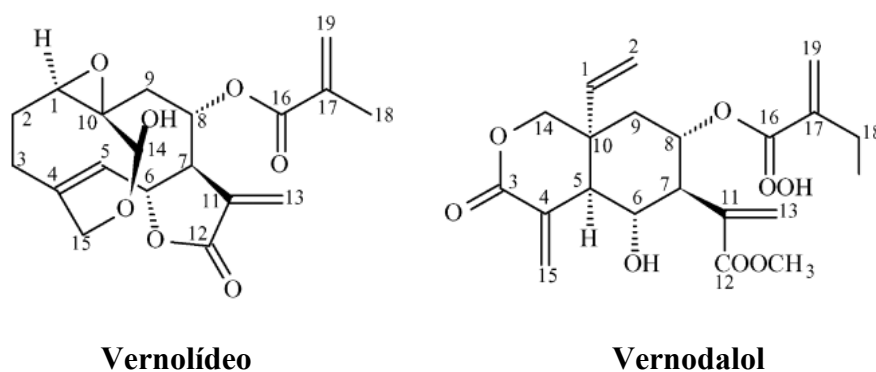
No Brasil foram estimadas mais de 200 espécies de *Vernonia*, sendo caracterizadas como ervas, arbustos ou árvores com folhagens e hábitos variados (GALLON *et al.*, 2018). Quanto às características morfoanatômicas, apresentam capítulos solitários, racemosos, paniculados ou escorpioides, com flores de cores variadas. Os frutos são cípselas podendo ser angulosas ou costadas, glabras ou seríceas. Apresentam um papus quase sempre duplo, formado por uma fileira externa de cerdas curtas e outra fileira interna de cerdas plumosas, barbeladas ou escabrosas, persistentes ou não. (GALASTRI; OLIVEIRA, 2010).

Estudos fitoquímicos apontam como principais constituintes relatados para o gênero: lactonas sesquiterpênicas, triterpenos, esteroides, carotenoides, flavonóides, lignóides, alcaloides e taninos (TOIGO *et al.*, 2004). Os constituintes mais frequentes são os flavonóides, indicativos de atividade antioxidante (SALAWU *et al.*, 2011) e as lactonas sesquiterpênicas, sendo estas últimas consideradas os marcadores quimiotaxonômicos do gênero (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007a).

Diversas lactonas sesquiterpênicas foram isoladas de espécies do gênero *Vernonia* com variados tipos de bioatividade, como moluscocida, antifúngica, antitumoral, citotóxica e inseticida contra insetos herbívoros (WEDGE *et al.*, 2000; FREIRE *et al.*, 1996c; LOPES, 1991). Em *V. amygdalina* foram isolados as lactonas sesquiterpênicas vernolídeo e vernodalol (Figura 1) com potencial atividade antibacteriana e antifúngica (ERASTO *et al.*, 2006).



Figura 1: Estrutura química do vernolídeo e vernodalol. Lactonas sesquiterpênicas encontradas na *V. amygdalina*.



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

Em uma investigação da composição química dos extratos hexânico e etanólico das partes aéreas de *V. chalybaea* Mart, por meio de métodos espectroscópicos, foram isolados terpenóides, flavonóides, álcoois e éteres alifáticos. Um álcool e um dos éteres foram isolados como produtos naturais pela primeira vez no gênero (COSTA *et al.*, 2008).

Na medicina tradicional, inúmeras espécies de *Vernonia* são empregadas no tratamento de patologias diversas. Do ponto de vista farmacológico têm sido investigadas revelando propriedades como, antiplasmódica (STANGELAND *et al.*, 2011), analgésica (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007b), anti-inflamatória (MALAFRONTTE *et al.*, 2009), antimicrobiana (OGUNDARE *et al.*, 2006), antidiabetes (AKINOLA *et al.*, 2011), antioxidante (OWOLABI *et al.*, 2011) e antitumoral (SANGEETHA; VENKATARATHINAKUMAR, 2011).

A literatura mundial aponta inúmeros estudos de espécies do gênero *Vernonia*, com potencial atividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias, protozoários e fungos patógenos animais e vegetais, fazendo uso de extratos, óleos fixos e óleos essenciais (SOBRINHO; SOUZA; FONTENELLE, 2015).

Os estudos de prospecção fitoquímica são promissores na identificação de compostos bioativos por meio de um *screening* com plantas de uso etnomedicinal, sendo relevantes na identificação de plantas pertencentes ao gênero *Vernonia*, com ação antimicrobiana (HAMILL *et al.*, 2000; MAGADULA; ERASTO, 2009).

Na Etiópia, um estudo com nove plantas de uso etnomedicinal indica que espécies do gênero *Vernonia* são usadas para o tratamento de infecções da visão, como cicatrizante de



feridas e para o tratamento de problemas ósseos decorrentes de fraturas por meio da decoção de folhas frescas com posterior aplicação nas lesões e ingestão (KALAYOU *et al.*, 2012).

Segue uma revisão dos usos etnofarmacológicos, dos locais de prevalência e do potencial antimicrobiano de espécies pertencentes ao gênero *Vernonia*, com correspondentes informações no Quadro 1.

Quadro 1: Espécies do gênero *Vernonia* com atividade antimicrobiana frente a fungos e bactérias.

Nome científico	Parte utilizada	Preparação biológica	Substâncias bioativas	Atividade biológica	Referência
<i>Vernonia adoensis</i> Sch. Bip. ex Walp	F	EE	Terpenóides	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas Atividade antifúngica: levedura <i>Candida albicans</i>	KISANGAU <i>et al.</i> (2007)
<i>Vernonia amygdalina</i> Delile	F	EAE	Lactonas sesquiterpênicas	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas	JISAKA <i>et al.</i> (1993)
	F	EM	Taninos, saponinas e flavonóides	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas Atividade antifúngica: levedura <i>Candida albicans</i>	AKINPELU (1999a)
	F	EM/EET/EA	Lactonas sesquiterpênicas e esteroides glicosídicos	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas	OTSHUDI <i>et al.</i> (1999)
	PA	EM/EC		Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas	KAMBIZI; AFOLAYAN(2001)
	F	EET	Lactonas sesquiterpênicas	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas	ERASTO <i>et al.</i> (2006)
	F	EA		Atividade antifúngica: fungo filamentosso <i>Fusarium sp</i>	SULEIMAN <i>et al.</i> (2008)
	F	EM	Lactonas sesquiterpênicas e esteroides glicosídicos	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas	CHERUIYOT <i>et al.</i> (2009)
	F	EC		Atividade antibacteriana: bactéria gram-positiva <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	MURAINA <i>et al.</i> (2010)
	F	EET/EA	Compostos fenólicos	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas	SALAWU <i>et al.</i> (2011)
		F	EET/EA	Lactonas sesquiterpênicas	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas
F		EM	Alcaloides, fenóis, taninos, fitosteróis, flavonóides e saponinas	Atividade antibacteriana: gram-negativas	NOUMEDEM <i>et al.</i> (2013)
<i>Vernonia anthelmintica</i> (L.) Willd	S	EM		Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas Atividade antifúngica: levedura e fungos filamentosos	JAHAN <i>et al.</i> (2010)



<i>Vernonia auriculifera</i> Hiern	F/C/R	EH/EDM/E AE/EM	Triterpenos e sesquiterpenos	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas	KIPLIMO <i>et al.</i> (2011)
<i>Vernonia brasiliiana</i> (L.) Druce.	F	OE	Sesquiterpenos	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas	MAIA <i>et al.</i> (2010)
<i>Vernonia chalybaea</i> Mart. ex DC.	PA	OE	Sesquiterpenos	Atividade antifúngica: fungos filamentosos dermatófitos	SOBRINHO <i>et al.</i> (2020)
<i>Vernonia cinerea</i> (L.) Less.	PA	EM		Atividade antibacteriana: bactéria gram-negativa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LATHA <i>et al.</i> (2010)
	F	EM		Atividade antifúngica: levedura <i>Candida albicans</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	LATHA <i>et al.</i> (2011)
<i>Vernonia condensata</i> Baker.	PA	EM		Atividade antibacteriana: bactéria gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i> e bactéria gram-negativa <i>Escherichia coli</i>	BRASILEIRO <i>et al.</i> (2006)
<i>Vernonia galamensis</i> (Cass.) Less.	S	OF	Compostos aminados	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas Atividade antifúngica: levedura e fungos filamentosos dermatófitos	MBUGUA <i>et al.</i> (2007)
<i>Vernonia glabra</i> (Steetz) Oliv. ; Hiern	PA/C/R	EDM/EM		Atividade antibacteriana: bactéria gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i> e bactéria gram-negativa <i>Escherichia coli</i> Atividade antifúngica: levedura e fungo filamentosos	KITONDE <i>et al.</i> (2013)
<i>Vernonia guineensis</i> Benth.	R	EDM/EM/E A		Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas Atividade antifúngica: leveduras e fungos filamentosos dermatófitos	TOYANG <i>et al.</i> (2012)
<i>Vernonia hymenolepis</i> (H.F.) Hook.	F	EM	Alcaloides, fenóis e flavonóides	Atividade antibacteriana: gram-negativas	NOUMEDEM <i>et al.</i> (2013)
<i>Vernonia lasiopus</i> O. Hoffm.	F/C	EA		Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas	KARERU <i>et al.</i> (2008)
<i>Vernonia polyanthes</i> Less.	F	EM	Alcaloides, triterpenoides, cumarinas e flavonóides	Atividade antifúngica: levedura <i>Candida albicans</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> Atividade leishmanicida: <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania chagasi</i>	BRAGA <i>et al.</i> (2007)
<i>Vernonia remotiflora</i>	F	OE	Sesquiterpenos	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas	MAIA <i>et al.</i> (2010)
<i>Vernonia scorpioides</i> (Lam.) Pers.	C	EH/ECL	Lactonas sesquiterpênicas	Atividade antifúngica: fungo <i>Penicilium citrinum</i>	FREIRE <i>et al.</i> (1996a)
	F	EH/ECL	Lactonas sesquiterpênicas	Atividade antifúngica: fungos <i>Penicilium citrinum</i> e <i>Aspergillus alutaceus</i>	FREIRE <i>et al.</i> (1996b)
	PA	OE	Terpenóides	Atividade antibacteriana: bactéria gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i> e bactéria gram-negativa <i>Escherichia coli</i> Atividade antifúngica: levedura <i>Candida albicans</i>	TOIGO <i>et al.</i> (2004)



	F	EAE		Atividade antibacteriana: bactéria gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	KREUGER <i>et al.</i> (2012)
<i>Vernonia smithiana</i> (DC) Less.	PA	OE	Terpenóides	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas Atividade antifúngica: leveduras	VAGIONAS <i>et al.</i> (2007)
<i>Vernonia species</i>	F	EM		Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas	KALAYOU <i>et al.</i> (2012)
<i>Vernonia tenoreana</i> Oliv	F/C	EM/EAE/EC /EH	Alcaloides, taninos, taninos flobafênicos, antraquinonas e glicosídeos cardíacos	Atividade antibacteriana: bactérias gram-positivas e gram-negativas Atividade antifúngica: leveduras e fungos filamentosos	OGUNDARE <i>et al.</i> (2006)

C - Caules; EA - Extrato de acetona; EAE - Extrato de acetato de etila; EAq - Extrato aquoso; EC - Extrato de clorofórmio; ED - Extrato de diclorometano; EE - extrato etanólico; EED - Extrato de éter dietílico; EH - Extrato hexânico; EM - Extrato metanólico; EP - Extrato de éter de petróleo; F - Folhas; OE - Óleo essencial; OF - Óleo fixo; PA - Parte aérea; R - Raiz; S - Semente.

***Vernonia adoensis* Sch. Bip. ex Walp**

Espécie usada na medicina popular africana para o tratamento de diversas enfermidades, com destaque para doenças infecciosas como HIV/AIDS (LAMORDE *et al.*, 2010), tuberculose e gonorreia (KISANGAU *et al.*, 2007) e para a protozoose malária (RAGUNATHAN; SOLOMON, 2009).

Na Tanzânia a partir de estudos etnobotânicos foi testado o extrato etéreo de petróleo das folhas contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de ensaio antifúngico para a levedura *Candida albicans*. Foram usados os métodos de difusão em disco e difusão em ágar. Para todos os micro-organismos ensaiados os extratos apenas mostraram bioatividade frente à cepa de *E. coli*. (KISANGAU *et al.*, 2007).

***Vernonia amygdalina* Delil**

V. amygdalina se configura como uma espécie de vasto uso medicinal por muitas populações de países africanos, tendo seu uso popular para tratamento de malária, helmintoses, distúrbios gastrointestinais e febre (HAMILL *et al.*, 2000; MAGADULA; ERASTO, 2009), cicatrização de feridas por meio da decocção (ADETUTU *et al.*, 2011b), tratamento de infecções microbianas (NOUMEDEM *et al.*, 2013).

A partir de extrato acetato-etílico das folhas foram isoladas três lactonas sesquiterpênicas: vernodalina, vernolídeo e hidroxivernolídeo. Do extrato metanólico foi isolado o vernodalol. Todos foram ensaiados frente às cepas de *Bacillus subtilis*, *Micrococcus*



luteus, *Escherichia coli* e *Agrobacterium tumefaciens*, apresentando resultados significativos expressos em zona de inibição de crescimento (JISAKA *et al.*, 1993).

Em estudo de Akinpelu (1999a), foram isoladas saponinas, taninos e flavonóides do extrato metanólico de folhas. Foram realizados testes de sensibilidade pelo método de difusão em ágar e diluição em caldo para as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae* e *Staphylococcus aureus*. Também ensaio antifúngico para a levedura *Candida albicans*. Os resultados mostraram atividade antimicrobiana para quase todos os micro-organismos ensaiados, exceto *S. marcescens*, *E. coli* e *C. albicans*.

Fazendo uso das partes aéreas, estudos diversos investigaram o potencial antimicrobiano para bactérias gram-positivas e gram-negativas, diversificando os solventes: metanol, etanol e água (OTSHUDI *et al.*, 1999); metanol e acetona (KAMBIZI; AFOLAYAN, 2001); etanol (ERASTO *et al.*, 2006); metanol (CHERUIYOT *et al.*, 2009); etanol e água (SALAWU *et al.*, 2011); etanol e água (ADETUTU *et al.*, 2011); metanol (NOUMEDEM *et al.*, 2013); acetona (MURAINA *et al.*, 2010).

Há relatos na literatura de atividade antifúngica de *V. amygdalina* frente a *C. albicans* (AKINPELU, 1999), bem como a fungos do gênero *Fusarium*, responsáveis por infecções humanas superficiais e sistêmicas, além da contaminação alimentar por meio de micotoxinas produzidas (SULEIMAN *et al.*, 2008).

***Vernonia anthelmintica* (L.) Willd**

V. anthelmintica [sin. *Centhraterum anthelminticum* Kuntze] nativa dos continentes africano e asiático, se apresenta como uma espécie de uso medicinal, sendo usada para o tratamento de diabetes (FATIMA *et al.*, 2010; RAO *et al.*, 2010) e de helmintoses (MALI; MEHTA, 2008).

Extrato metanólico de sementes foi testado contra cepas de bactérias *P. aeruginosa*, *Yersinia aldovae*, *Citrobacter*, *Shigella flexneri*, *E. coli* e *S. aureus*. Também foi testada a atividade antifúngica frente à *Saccharomyces cerevisiae*, *C. albicans*, *Aspergillus parasiticus*, *Macrophomina*, *Fusarium solani*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton occidentale*. Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as cepas ensaiadas exceto *Y. aldovae*. Entretanto nos ensaios antifúngicos apenas demonstrou ação inibitória para o dermatófito *T. rubrum* (JAHAN *et al.*, 2010).



***Vernonia auriculifera* Hiern**

V. auriculifera é uma espécie de porte arbustivo cuja altura varia entre 1m e 7,5m, nativa do continente africano apresenta uso na medicina popular para o alívio de dores de cabeça (KUSAMBA, 2001), para tratamento de conjuntivite, febre, infecções virais e bacterianas (MUTHAURA *et al.*, 2007), além de relatos de uso como decocção em Camarões (FOCHO *et al.*, 2009).

Em estudos de Kiplimo *et al.* (2011) a partir de raiz, caule e folhas de *V. auriculifera* foram realizados extratos com os solventes orgânicos hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Foram isolados oito triterpenos e um sesquiterpeno aminado. Os compostos isolados foram testados, pelo método de microdiluição em caldo, contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*. Os resultados mostraram moderada atividade antibacteriana.

***Vernonia brasiliana* (L.) Druce.**

V. brasiliana é uma espécie vegetal encontrada no nordeste do Brasil, cuja atividade antiplasmódica para *Plasmodium berghei* e *P. falciparum* foi investigada (CARVALHO *et al.*, 1991).

O óleo essencial de folhas, extraído pelo método de hidrodestilação, foi ensaiado contra *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *B. subtilis*, pelo método de difusão em disco, apresentando atividade antibacteriana de amplo espectro contra todos os micro-organismos ensaiados (MAIA *et al.*, 2010).

***Vernonia chalybaea* Mart. ex DC.**

V. chalybaea é uma espécie de porte subarbustivo, com crescimento ereto entre 0,5 e 1,5 m de altura (Figura 11), muito ramificada, conhecida vulgarmente como “cheira-bode”, “balaio” e “vassourinha” (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007b). No território brasileiro encontra-se distribuída pela região Nordeste (TELES; BAUTISTA, 2006), sendo encontrada no Estado do Ceará de modo especial na restinga e planície costeira (SANTOS-FILHO *et al.*, 2011).

Os estudos biológicos sobre a espécie *V. chalybaea* ainda são escassos, prevalecendo levantamentos florísticos e fitogeográficos no domínio da Caatinga (LEMOS; MEGURO, 2010; PEREIRA; SILVA; BARBOSA, 2010). Em estudos etnobotânicos de Albuquerque *et al.*, (2007b) foram investigados os usos populares de plantas para fins medicinais na Caatinga.



Observaram que da *V. chalybaea* são usadas folhas e raízes para o tratamento de hidropisia e de disfunções da vesícula biliar. Todavia, um estudo recente identificou ação antifúngica contra o fungo dermatófito *Trichophyton rubrum*, do óleo essencial, que apresentou em sua composição química os constituintes majoritários β -cariofileno, biciclogermacreno e óxido de cariofileno (SOBRINHO *et al.*, 2020).

***Vernonia cinerea* (L.) Less.**

V. cinerea é uma espécie de porte herbáceo com uso etnofarmacológico registrado na América do Sul, África e Ásia, para tratamento de diversas disfunções orgânicas, como malária (JAIN; PURI, 1984; MOSHI *et al.*, 2009; PADAL *et al.*, 2010), helmintoses (ALAGESABOOPATHI *et al.*, 2009; JOHRI *et al.*, 1995) e infecções da pele (MAREGESI *et al.*, 2007; MOSHI *et al.*, 2009).

O extrato metanólico das partes aéreas foi testado frente à bactéria *P. aeruginosa*, patógeno oportunista destaque em infecções hospitalares. Foi usado o método de difusão em disco e de diluição em caldo. O extrato mostrou atividade antimicrobiana dose-dependente para a bactéria ensaiada (LATHA *et al.*, 2010).

Quanto à atividade antifúngica, foi testado o extrato metanólico das partes aéreas contra cepas das leveduras *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Os ensaios foram realizados pelo método de difusão em disco, demonstrando atividade contra ambas as leveduras, com melhor atividade para *C. albicans* (LATHA *et al.*, 2011).

***Vernonia condensata* Baker.**

V. condensata é uma espécie encontrada no Brasil e na África com relatos de uso medicinal na Nigéria contra picada de serpentes (PEREIRA *et al.*, 1994). No Brasil seu uso terapêutico, em geral das folhas, é empregado para alívio de dores musculares, problemas gastrointestinais e hepáticos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007b).

O estudo do extrato metanólico das partes aéreas demonstrou atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de diluição seriada em caldo, com concentração inibitória mínima superior ao controle positivo utilizado que foi o quimioterápico cloranfenicol (BRASILEIRO *et al.*, 2006).

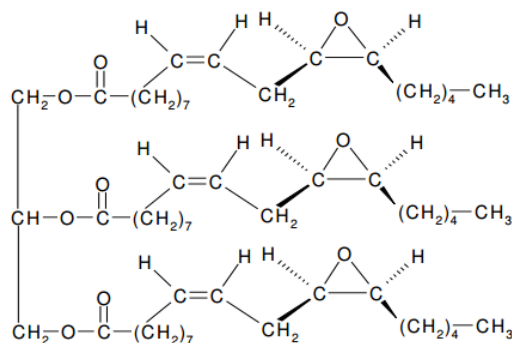


Vernonia galamensis (Cass.) Less.

A espécie *V. galamensis* encontrada no continente africano, apresenta valor comercial agregado devido ao óleo extraído de suas sementes com importante uso medicinal para o tratamento de diabetes e outras disfunções orgânicas (AUTAMASHIH *et al.*, 2011).

Esses óleos apresentam altos teores de ácido vernólico, uma gordura insaturada formada por triglicerídeos como a trivernolina presente como constituinte majoritário (Figura 2). Os derivados dos óleos fixos de *V. galamensis*, como as gorduras aminadas, são importantes intermediários químicos para o comércio, além de atuarem como aditivos para filmes de polietileno, repelentes a base de água, compostos fungicidas, dentre outros (WATANABE *et al.*, 1993).

Figura 2: Trivernolina. Triglicerídeo do ácido vernólico (ácido cis-12,13-epoxi-cis-9octadecanóico).



Fonte: Mbugua *et al.* (2007).

Estudo envolvendo o óleo fixo de sementes isolou gorduras insaturadas, posteriormente convertidas em gorduras aminadas, vernoliamidas, cuja atividade antimicrobiana foi testada para as bactérias *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*, e para os fungos *S. cerevisiae*, *Microsporium gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Foi usado o método de difusão em disco, no qual os resultados demonstraram apenas atividade contra as cepas de *E. coli* e *B. subtilis*, não inibindo o crescimento dos fungos dermatófitos ensaiados e da levedura (MBUGUA *et al.*, 2007).

Vernonia glabra (Steetz) Oliv. ; Hiern

Espécie herbácea encontrada na África, *V. glabra* apresenta uso terapêutico no Quênia para problemas gastrointestinais por meio da decocção de folhas e raízes com a posterior ingestão (JOHNS *et al.*, 1995). Também é usada no mesmo país como antídoto para picada de serpentes (OWUOR; KISANGAU, 2006).

Extrato diclorometânico e metanólico das partes aéreas, caule e raiz, foram testados frente às cepas de bactéria gram-positiva *S. aureus* e bactéria gram-negativa *E. coli* e de fungos



C. albicans e *Aspergillus niger* pelo método de difusão em disco. Os resultados apresentaram um potencial antimicrobiano moderado para todos os micro-organismos ensaiados dependente da parte da planta utilizada (KITONDE *et al.*, 2013).

***Vernonia guineensis* Benth**

Espécie amplamente usada na medicinal popular na África Central, Congo e em Camarões, sendo relatada utilização etnofarmacológica de sua raiz como estimulante, afrodisíaco, antimicrobiano, como antídoto contra picada de serpentes e para o tratamento de helmintoses (NOUMI, 2010; TCHINDA *et al.*, 2002).

A partir das raízes de *V. guineensis* var. *cameroonica* C. D. Adams foram realizadas extrações com diclorometano, metanol e água destilada. Os extratos obtidos foram testados frente às bactérias *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *S. aureus* resistente à metilicina, *S. epidermidis*. Para os testes antifúngicos foram testados os micro-organismos *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans* e *T. mentagrophytes*. Foi usado o método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima. Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana para todas as cepas testadas (TOYANG *et al.*, 2012).

***Vernonia hymenolepis* (H.F.) Hook.**

Encontrada no oeste do continente africano, a espécie *V. hymenolepis* apresenta uso medicinal para tratamento de distúrbios do sistema respiratório e hipertensão arterial em Angola (MENGOME *et al.*, 2010).

A partir de testes fitoquímicos, o extrato metanólico de folhas frescas permitiu o isolamento de alcaloides, fenóis e flavonóides. Os extratos foram testados contra as bactérias gram-negativas: *Providencia stuartii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* e *aerogenes*. Os ensaios foram realizados segundo o método de microdiluição em caldo, com resultados promissores para todas as cepas de micro-organismos testados (NOUMEDEM *et al.*, 2013).

***Vernonia lasiopus* O. Hoffm.**

V. lasiopus é uma espécie nativa do continente africano, encontrada no Quênia, Tanzânia, Uganda e Ruanda, países situados na África Central. Apresenta potencial biológico sendo usada para tratamento de malária e helmintoses, por meio da decocção de suas folhas e cascas (KARERU *et al.*, 2007).



Extrato aquoso das folhas e cascas foi testado contra cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, pelo método de difusão em disco com resultados positivos para *E. coli* e *B. subtilis*, expressos por meio de zona de inibição de crescimento (KARERU *et al.*, 2008).

***Vernonia polyanthes* Less.**

Espécie nativa do Brasil, *V. polyanthes* conhecida popularmente como “assa-peixe” apresenta uso etnofarmacológico de suas folhas e raízes para o tratamento de reumatismo, bronquite e tosse (LORENZI; MATOS, 2002).

Por meio de testes fitoquímicos do extrato metanólico de folhas, foram isolados alcaloides, triterpenoides, cumarinas e flavonóides. Os extratos foram ensaiados em testes antifúngicos e leishmanicidas. Para os ensaios antifúngicos foram testadas cepas das leveduras *C. albicans* e *C. neoformans* pelo método de difusão em ágar e diluição seriada para determinação da concentração inibitória mínima. Para os ensaios leishmanicidas foram usados os protozoários *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi* e os resultados expressos por concentração inibitória do crescimento do parasita. Os resultados foram satisfatórios para a atividade leishmanicida, entretanto o extrato não apresentou atividade antifúngica (BRAGA *et al.*, 2007).

Vernonia remotiflora

V. remotiflora [sin. *Lepidaploa remotiflora*] é uma espécie encontrada na região nordeste do Brasil, cujos estudos fitoquímicos preliminares já permitiram a identificação e isolamento de lactonas sesquiterpênicas (VALDÉS *et al.*, 1998) e de uma flavona (JACOBS *et al.*, 1986).

Em estudo com o óleo essencial, extraído pelo método de hidrodestilação das folhas frescas, foi investigada atividade antibacteriana para cepas de *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *B. subtilis*, pelo método de difusão em disco. O óleo essencial inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados (MAIA *et al.*, 2010).

***Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers.**

Conhecida popularmente no Brasil, como “piracá”, “erva-de-são-simão”, “nogueira” e “assa-peixe”, a espécie *V. scorpioides* é uma erva lianosa, perene, subarborescente, ramificada, tida como erva daninha de ampla distribuição em todo o território brasileiro, geralmente crescendo



em solos pobres e desmatados, comportando-se como planta parantropófito ruderal (RAUH *et al.*, 2011, TOIGO *et al.*, 2004).

Estudo fitoquímico do seu óleo essencial, por cromatografia em fase gasosa associado à espectrometria de massa, indicou a presença majoritária de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sendo os principais constituintes β -cariofileno, germacreno-D e biciclogermacreno (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007a). Investigações fitoquímicas de extratos das partes aéreas, utilizando como solvente o etanol e o hexano permitiram o isolamento de triterpenos, esteroides, um flavonóide e uma lactona poliacetilênica (MACHADO *et al.*, 2013).

Conforme Rauh *et al.* (2011) a *V. scorpioides* tem seu uso tópico muito comum pela população para tratar uma variedade de doenças da pele, tais como alergias, irritações, parasitoses, lesões de pele, feridas crônicas, incluindo úlceras das extremidades inferiores e prurido. Segundo Freire *et al.* (1996c) ela também é usada popularmente como um potente anti-hemorroidário e antidiarreico, empregada pela forma de chás para uso interno e infusões para uso externo.

Avaliação da atividade antifúngica do extrato clorofórmico do caule de *V. scorpioides* para o fungo *Penicillium citrinum* mostrou a formação de halos de inibição de crescimento de até 80 mm de diâmetro. Os ensaios foram realizados pelo método de difusão em ágar. O uso de um solvente pouco polar para a preparação do extrato permitiu a obtenção satisfatória de extratos ativos, o que reforça a possibilidade da presença de lactonas sesquiterpênicas, constituintes com potente ação antifúngica (FREIRE *et al.*, 1996a).

Em estudo com os extratos, clorofórmico e hexânico de caules e folhas foi demonstrado que o desenvolvimento de hifas na presença dos extratos mostrou-se incipiente e que os extratos obtidos a partir das folhas apresentaram menor intensidade, uma vez que os halos de inibição de crescimento foram menores para os dois fungos ensaiados, *Aspergillus alutaceos* e *P. citrinum* (FREIRE *et al.*, 1996b).

Kreuger *et al.*, (2012) investigaram a atividade antimicrobiana da fração de acetato de etila obtida a partir de extratos de folhas frescas de *V. scorpioides* no processo de cicatrização de feridas excisionais em tecido de ratos com lesões inflamatórias causadas pela bactéria *S. aureus*. Como controle positivo usaram o quimioterápico rifamicida B dietilamida e como controle negativo solução salina. Os resultados apontam para uma eficiente atividade antimicrobiana na cicatrização de feridas em ratos infectados, com aumento da contração da



ferida, menor área de tecido necrosado, bom desenvolvimento de tecido de granulação, extensa disposição de matriz extracelular e regeneração epitelial.

O extrato etanólico de *V. scorpioides* apresentou atividade antimicrobiana frente à cepa da levedura *C. albicans* e da bactéria *S. aureus* com halos de inibição superiores a 16mm concentração dependente para os cocos Gram-positivos e superiores a 15mm para a levedura ensaiada. Para os ensaios foi realizado o método de difusão em ágar (TOIGO *et al.*, 2004).

***Vernonia smithiana* (DC) Less.**

Espécie nativa do continente africano, *V. smithiana* [sin. *Hilliardiella smithiana* (Less.) H. Rob.] cujo nome vulgar na Tanzânia é “umwanzuranya” apresenta uso terapêutico para disenteria, problemas gastrointestinais, doenças da visão e problemas urinários, sendo frequentemente utilizadas as partes aéreas e a raiz (ADJANOHOUN *et al.*, 1988).

Em um estudo com o óleo essencial extraído das partes aéreas pelo método de hidrodestilação, foram isolados trinta e nove compostos voláteis, sendo os principais constituintes sesquiterpenos e monoterpenos. O óleo essencial foi ensaiado, pelo método de diluição em ágar, frente a um painel de micro-organismos incluindo as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus viridans*, sendo os dois últimos patógenos da mucosa oral. Para os ensaios antifúngicos foram usadas às leveduras *Candida glabrata*, *C. albicans* e *C. tropicalis*. Os resultados demonstraram um excelente potencial antimicrobiano da espécie inibindo todos os micro-organismos testados (VAGIONAS *et al.*, 2007).

***Vernonia tenoreana* Oliv**

V. tenoreana é caracterizada como um arbusto de crescimento selvagem encontrado nas savanas africanas, cujo nome vulgar no idioma iorubá da Nigéria é “Ewuro Igbo”. As cascas são usadas em algumas regiões da Nigéria como alimento para alívio da fome (OGUNDARE *et al.*, 2006).

Apresenta escassos estudos, entretanto a atividade biológica antidiabetes foi investigada em um estudo de prospecção biológica por meio de um *screening* aleatório (TAIWO *et al.*, 2008).

Um estudo fitoquímico do extrato das folhas frescas, fazendo dos solventes orgânicos: metanol, acetato de etila, acetona e n-hexano, isolou alcaloides, taninos, taninos flobafênicos,



antraquinonas e glicosídeos cardíacos, o que demonstra a riqueza fitoquímica desta espécie, promissora em estudos biológicos posteriores (OGUNDARE *et al.*, 2006).

A partir dos extratos supracitados foram realizados testes de sensibilidade microbiana para bactérias e fungos pelo método de difusão em ágar. Foram ensaiadas as bactérias *S. aureus*, *Streptococcus faecalis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Shigella dysenteriae* e *Serratia marcescens*. Para os ensaios antifúngicos foram usados os micro-organismos *C. albicans*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Rhizopus stolonifer* e *Fusarium poae*. Os resultados demonstraram inibição de crescimento para todas as bactérias ensaiadas, entretanto não apresentaram atividade para os fungos *R. stolonifer* e *F. poae* (OGUNDARE *et al.*, 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta revisão mostrou que o gênero *Vernonia* é rico em espécies com vasta utilização etnomedicinal, sobretudo no continente africano, sendo empregada para o tratamento de muitas enfermidades, segundo diversos modos de preparo, sobretudo usando folhas, cascas e raízes.

V. amygdalina e *V. scorpioides* apresentam vastos trabalhos na literatura apontando seu uso na medicina popular, bem como suas propriedades biológicas já investigadas, o que efetiva o gênero como sendo de importância em estudos de química e biologia produtos naturais.

Quanto aos testes fitoquímicos, o gênero mostra ser um celeiro bioativo no grupo das Asteraceae apresentando múltiplos compostos químicos, de modo especial os terpenoides, flavonoides, taninos, esteroides e alcaloides. Por apresentarem lactonas sesquiterpênicas como marcadores quimiotaxonômicos do grupo, já foram isoladas algumas substâncias desse grupo químico com potencial atividade antifúngica, citotóxica, moluscocida, inseticida e antitumoral.

Os achados da medicina popular que envolvem plantas deste gênero corroboram com os estudos de bancada envolvendo espécies e/ou metabólitos isolados, o que consolida a família Asteraceae como dotada de espécies com propriedades antimicrobianas. Deste modo, esta revisão apresentou um perfil de espécies de *Vernonia* com potencial antimicrobiano e seus principais usos etnomedicinais, o que corrobora com outros estudos já existentes para a família Asteraceae e para o gênero *Vernonia*. Assim, se espera que este texto seja útil como suporte teórico para futuros estudos envolvendo espécies correlatas.



REFERÊNCIAS

ADETUTU, A.; MORGAN, W. A.; CORCORAN, O. Ethnopharmacological survey and *in vitro* evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 50–56, 2011.

ADJANOHOON, E.; *et al.* **Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Congo**. 1 vol. Paris, France: Collection Médecine Traditionnelle et Pharmacopée, Agence de Coopération Culturelle et Technique (ACCT). 1988. 605p.

AKINOLA, O. S.; CAXTON-MARTINS, E. A.; AKINOLA, O. B. Ethanolic leaf extract of *Vernonia amygdalina* improves islet morphology and upregulates pancreatic G6PDH activity in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 932–942, 2010.

AKINPELU, D. A. Antimicrobial activity of *Vernonia amygdalina* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, p. 432–434, 1999.

ALAGESABOOPATHI, C. Ethnomedicinal plants and their utilization by villagers in Kumaragiri Hills of Salem District of Tamilnadu, India. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 6, p. 222–227, 2009.

ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; OLALERE, O. A. Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using two-level factorial design. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 1, p. 7-16, 2020.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; *et al.* Chemical composition of the essential oil from *Vernonia scorpioides* Asteraceae. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 249–250, 2007a.

ALBUQUERQUE, U. P.; *et al.* Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007b.

AUTAMASHIH, M.; ISAH, A. B.; ALLAGH, T. S. Negative intercepts in the Heckel analysis of the crude extract of *Vernonia galamensis*: a major setback of the equation. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 2, p. 14–19, 2011.

BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 319-331, 2020.

BRAGA, F. G.; *et al.* Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 396–402, 2007.

BRASILEIRO, B. G.; *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 195–202, 2006.

BUSKUHL, H.; *et al.* Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their *in vitro* cytotoxicity. **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p. 1539-1544, 2010.

CARVALHO, L. H.; *et al.* Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium*



falciparum in culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, p. 1113–1123, 1991.

CHERUIYOT, K. R.; OLILA, D.; KATEREGGA, J. *In-vitro* antibacterial activity of selected medicinal plants from Longisa region of Bomet district, Kenya. **African Health Sciences**, v. 9, p. S42–S46, 2009.

COSTA, F. J.; *et al.* Constituintes químicos de *Vernonia chalybaea* Mart. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1691–1695, 2008.

DADGOSTAR, P. Antimicrobial resistance: implications and costs. **Infection and drug resistance**, v. 12, p. 3903-3910, 2019.

ERASTO, P.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A. J. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 117–120, 2006

FATIMA, S. S.; *et al.* Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of ethyl acetate: isopropanol (1:1) fraction of *Vernonia anthelmintica* seeds in Streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 495–501, 2010.

FOCHO, D. A.; NDAM, W. T.; FONGE, B. A. Medicinal plants of Aguambu-Bamumbu in the Lebialem highlands, southwest province of Cameroon. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, p. 001–013, 2009.

FREIRE, M. F. T.; *et al.* Antibiose e toxidez de extratos de caules *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae). **Floresta e Ambiente**, v. 3, p. 74–80, 1996a.

FREIRE, M. F. T.; *et al.* Inhibition of fungal growth by extracts of *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 27, p. 51–56, 1996b.

FREIRE, M. F. T.; ABREU, H. S.; FREIRE, R. B. O potencial antifúngico de substâncias produzidas por plantas da família Asteraceae. **Floresta e Ambiente**, v. 3, p. 108–118, 1996c.

FUNK V. A.; *et al.* Classification of Compositae. In: FUNK V. A.; *et al.* (eds.). **Systematics, evolution, and biogeography of Compositae**. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy, 2009. p. 171–192.

GALASTRI, N. A.; OLIVEIRA, D. M. T. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Vernonia platensis* (Spreng.) Less. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 1, p. 75–83, 2010.

GALLON, M. E.; *et al.* Metabolomic analysis applied to chemosystematics and evolution of megadiverse Brazilian Vernonieae (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 150, p. 93-105, 2018.

HAMILL, F. A; *et al.* Traditional herbal drugs of southern Uganda, I. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 281–300, 2000.

HATTORI, E. K. O.; NAKAJIMA, J. N. A família Asteraceae na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia** **59**: 687–749. 2008.



HOWARD, K. C.; *et al.* A comprehensive overview of the medicinal chemistry of antifungal drugs: perspectives and promise. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 8, p. 2426-2480, 2020.

JACOBS, H.; BUNBURY, M.; MCLEAN, S. Flavanoids and a heliangolide from *Melampodium camphoratum*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 6, p. 1163-1164, 1986.

JAHAN N.; *et al.* Antimicrobial screening of some medicinal plants of Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, p. 4281-4284, 2010.

JAIN, S. P.; PURI, H. S. Ethnomedicinal plants of Jaunsar-Bawar hills, Uttar Pradesh, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, p. 213-222, 1984.

JISAKA, M.; *et al.* Antischistosomal activities of sesquiterpene lactones and steroid glucosides from *Vernonia amygdalina*, possibly used by wild chimpanzees against parasite-related diseases. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, p. 833-834, 1993.

JOHNS, T; *et al.* Anti-giardial Activity of Gastrointestinal Remedies of the Luo of East Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 17-23, 1995.

JOHRI, R. K.; SINGH, C.; KAUL, B. L. *Vernonia lasiopus* and *Vernonia galamensis*: a medicinal perspective. **Research and Indus try**, v. 40, p. 327-328, 1995.

KALAYOU, S; *et al.* *In-vitro* antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray Region, Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 512-522, 2012.

KAMBIZI, L.; AFOLAYAN, A. J. An ethnobotanical study of plants used for the treatment of sexually transmitted diseases (njovhera) in Guruve District, Zimbabwe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 5-9, 2001.

KARERU, P. G.; *et al.* Antimicrobial activity of some medicinal plants used by herbalists in Eastern Province, Kenya. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 5, p. 51-55, 2008.

KARERU P. G.; *et al.* Traditional Medicines among the Embu and Mbeere Peoples of Kenya. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, p. 75-86, 2007.

KIPLIMO, J. J.; KOORBANALLY, N. A.; CHENIA, H. Triterpenoids from *Vernonia auriculifera* Hiern exhibit antimicrobial activity. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 1150-1156, 2011.

KISANGAU, D. P.; *et al.* *In vitro* antimicrobial assay of plants used in traditional medicine in Bukoba Rural District, Tanzania. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, p. 510-523, 2007.

KITONDE, C. K.; *et al.* Antimicrobial activity and phytochemical study of *Vernonia glabra* (Steetz) Oliv.; Hiern. in Kenya. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, p. 149-157, 2013.



- KOS, O.; *et al.* Ent-kaurene glycosides and sesquiterpene lactones of the hirsutinolide type from *Vernonia triflosculosa*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 62–69, 2006.
- KREUGER, M. R. O.; *et al.* Effects of the topical application of an ethyl acetate fraction from *Vernonia scorpioides* on excisional wounds infected with *Staphylococcus aureus* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 123–130, 2012.
- KUSAMBA C. Contribution to the inventory of medicinal plants from the Bushi area, South Kivu Province, Democratic Republic of Congo. **Fitoterapia**, v. 72, p. 351–368, 2001.
- LAMORDE, M.; *et al.* Medicinal plants used by traditional medicine practitioners for the treatment of HIV/AIDS and related conditions in Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 43–53, 2010.
- LATHA, L. Y.; *et al.* Effects of *Vernonia cinerea* Less methanol extract on growth and morphogenesis of *Candida albicans*. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15, p. 543–549, 2011.
- LATHA, L. Y.; *et al.* Antibacterial Activity and Morphological Changes of *Pseudomonas aeruginosa* Cells after Exposure to *Vernonia cinerea* Extract. **Ultrastructural Pathology**, v. 34, p. 219–225, 2010.
- LEMONS, J. R.; MEGURO, M. Florística e fitogeografia da vegetação decidual da Estação Ecológica de Aiuaba, Ceará, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 34–43, 2010.
- LIANG, Q. L.; MIN, Z. D. Studies on the constituents from the herb of *Vernonia patula*. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 28, p. 235–237, 2003.
- LOPES, J. L. C. Sesquiterpene lactones from *Vernonia*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 227–230, 1991.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002. 512 p.
- MAGADULA, J. J.; ERASTO, P. Bioactive natural products derived from the East African flora. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1535–1554, 2009.
- MAIA, A. I. V.; *et al.* Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliensis*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 33, p. 584–586, 2010.
- MALAFRONTTE, N. *et al.* New flavonoid glycosides from *Vernonia ferruginea*. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 1639–164, 2009.
- MALI, R. G.; MEHTA, A. A. A review of anthelmintic plants. **Natural Product Radiance**, v. 7, p. 466–475, 2008.
- MAREGESI, S. M.; *et al.* Ethnopharmacological survey of the Bunda district, Tanzania: Plants used to treat infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 457–470, 2007.



MBUGUA, M. N.; *et al.* Conversion of *Vernonia galamensis* oil to pyridinyl vernolamides and their antimicrobial activities. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 21, p. 103–110, 2007.

MENGOME, L. E.; *et al.* *In vitro* activities of plant extracts on human Loa isolates and cytotoxicity for eukaryotic cells. **Parasitology Research**, v. 107, p. 643–650, 2010.

MOSHI, M. J.; *et al.* Ethnomedicine of the Kagera Region, north western Tanzania. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, p. 24–28, 2009.

MURAINA, I. A.; *et al.* Antimycoplasmal activity of some plant species from northern Nigeria compared to the currently used therapeutic agent. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 1103–1107, 2010.

MUTHAURA, C. N.; *et al.* Traditional phytotherapy of some remedies used in treatment of malaria in Meru District of Kenya. **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 402–411, 2007.

NOUMEDEM, J. A. K.; *et al.* *In Vitro* antibacterial and antibiotic-potential activities of four edible plants against multidrug-resistant gram-negative species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 137, p. 130–190, 2013.

NOUMI, E. Ethno medicines used for treatment of prostatic disease in Foumban, Cameroon. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, p. 793–805, 2010.

OGUNDARE, A. O.; ADETUYI, F. C.; AKINYOSOYE, F. A. Antimicrobial activities of *Vernonia tenoreana*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1663–1668, 2006.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, p. 189–197, 2008.

OTSHUDI, A. L.; *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of six medicinal plants traditionally used for the treatment of dysentery and diarrhoea in Democratic Republic of Congo (DRC). **Phytomedicine**, v. 7, p. 167–172, 1999.

OWOLABI, M. A.; *et al.* Attenuation of oxidative damage in alloxan induced diabetic rabbits following administration of the extract of the leaves of *Vernonia amygdalina*. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, p. 94–101, 2011.

OWUOR, B. O.; KISANGAU, D. P. Kenyan medicinal plants used as antivenin: a comparison of plant usage. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, p. 1–8, 2006.

PADAL, S. B.; *et al.* Ethnomedicinal plants from Paderu Division of Visakhapatnam District, A.P, India. **Journal of Phytology**, n. 2, p. 70–91, 2010.

PEREIRA, N. A., *et al.* Folk medicine as snake venom antidotes; VI—protection against Jararaca venom by isolated constituents. **Planta Medica**, v. 60, p. 99–100, 1994.

PEREIRA, R. C. A.; *et al.* Flora de um “brejo de altitude” de Pernambuco: Reserva Ecológica da Serra Negra. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 7, p. 286–304, 2010.



PETACCI, F.; *et al.* Phytochemistry and quantification of polyphenols in extracts of the Asteraceae weeds from Diamantina, Minas Gerais State, Brazil. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 9-15, 2012.

RAGUNATHAN, M.; SOLOMON, M. The study of spiritual remedies in orthodox rural churches and traditional medicinal practice in Gondar Zuria district, Northwestern Ethiopia. **Pharmacognosy Journal**, v. 1, p. 178–183, 2009.

RAO, U. M.; *et al.* Herbal medicines for diabetes mellitus: a review. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, p. 1883–1892, 2010.

RAUH, L. K.; *et al.* Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 3990–397, 2011.

REIS, G. H.; *et al.* Asteraceae dos Campos Rupestres das Serras da Bocaina e de Carrancas, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 3, p. 829-845, 2015.

ROCHA, M. F. G; *et al.* Extratos de *Moringa oleifera* e *Vernonia* sp. sobre *Candida albicans* e *Microsporium canis* isolados de cães e gatos e análise da toxicidade em *Artemia* sp. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1807-1812, 2011.

SALAWU, S. O.; *et al.* Antimicrobial activities of phenolic containing extracts of some tropical vegetables. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 486–492, 2011.

Sangeetha T, Venkatarathinakumar T. 2011. Antitumor activity of aerial parts of *Vernonia cinerea* (L.) Less. against Dalton's Ascitic Lymphoma. **Int J PharmTech Res** 3: 2075–2079.

SANTOS-FILHO, F. S.; ALMEIDA JR, E. B.; BEZERRA, L. F. M.; LIMA, L. F.; ZICKEL, C. S. Magnoliophyta, restinga vegetation, state of Ceará, Brazil. **Check List**, v. 7, n. 4, p. 478-485, 2011.

SILVA, S. M. F. Q.; *et al.* Atividade *in vitro* de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, p. 1649–1656, 2012.

SOBRINHO, A. C. N.; *et al.* Antifungal and antioxidant activities of *Vernonia Chalybaea* Mart. ex DC. essential oil and their major constituent β -caryophyllene. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, p. e20190177, 2020.

SOBRINHO, A. C. N.; SOUZA, E. B.; FONTENELLE, R. O. S. A review on antimicrobial potential of species of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 31, p. 838-850, 2015.

STANGELAND, T; *et al.* Plants used to treat malaria in Nyakayojo sub-county, western Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 154–166, 2011.

SULEIMAN, M. N.; EMUA, S. A.; TAIGA, A. Effect of aqueous leaf extracts on a spot fungus (*Fusarium* sp.) isolated from Compea. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 2, p. 261–263, 2008.



TAIWO, I. A.; ODEIGAH, P. G. C.; OGUNKANMI, L. A. The Glycaemic effects of *Vernonia amygdalina* and *V. tenoreana* with Tolbutamide in Rats and the Implications for the Treatment of Diabetes Mellitus. **Journal of Scientific Research and Development**, v. 11, p. 122–130, 2008.

TCHINDA, A. T.; *et al.* Stigmastane derivatives and isovaleryl sucrose esters from *Vernonia guineensis* (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 63, p. 841–846, 2003.

TCHINDA, A. T.; *et al.* Vernoguinsterol and vernoguinoside, trypanocidal stigmastane derivatives from *Vernonia guineensis* (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 59, p. 371–374, 2002.

TELES, A. M.; BAUTISTA, H. P. Asteraceae no Parque Metropolitano de Pituáçu, Salvador, Bahia, Brasil. **Lundiana**, v. 7, p. 87–96, 2006.

TOIGO, L.; *et al.* Caracterização farmacobotânica, estudo do óleo essencial e atividade antimicrobiana da erva de São Simão *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. **Revista brasileira de farmácia**, v. 85, p. 49–55, 2004.

TOYANG, N. J.; VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 3, p. 681–723, 2013.

VAGIONAS K.; *et al.* Chemical analysis of edible aromatic plants growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1711–1717, 2007.

VALDÉS, D.A.; *et al.* Glaucolides, piptocarphins and cadinanolides from *Lepidaploa remotiflora*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 685–689, 1998.

WATANABE, S.; *et al.* Characteristic properties of cutting fluid additives derived from the adducts of diamines and acid chlorides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, p. 927–929, 1993.

WEDGE, D. E.; GALINDO, J. C. G.; MACIAS, F. A. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. **Phytochemistry**, v. 53, p. 747–757, 2000.

WU, Q. X.; SHI, Y. P.; JIA, Z. J. Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 699–734, 2006.



ARTIGO 6

ESTUDO DAS EMISSÕES DE *BLACK CARBON* E FUMAÇA NEGRA NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ – CAMPUS ITAPERI¹

DOI 10.47402/ed.ep.c20221824620

Camila Maria Aguiar da Costa Alves
Rinaldo dos Santos Araújo
Mona Lisa Moura de Oliveira

RESUMO

A problemática inerente a qualidade do ar em grandes centros urbanos é uma constante em todo o mundo. A concentração de poluentes na atmosfera tem crescido significativamente nos últimos anos, principalmente devido a fontes antrópicas, reduzindo a qualidade do ar no meio urbano e expondo a população a altos níveis de poluição. Dentre esses poluentes está o material particulado (MP) que em concentrações elevadas, pode causar riscos à saúde humana e ao clima em escala regional e global. Em virtude desse cenário, o objetivo principal deste trabalho foi determinar as emissões de *black carbon* e fumaça negra (que são frações do MP_{2,5}) na Universidade Estadual do Ceará – campus Itaperi em função dos fatores meteorológicos. O estudo foi realizado em uma estação de monitoramento da qualidade do ar, localizada na entrada principal, da Universidade Estadual do Ceará (UECE) - Campus Itaperi, por um período de duas semanas, compreendendo os meses fevereiro e março. Foram realizadas coletas no período de 19 de fevereiro a 03 de março de 2018 (exceto domingos), correspondendo um monitoramento total de 12 dias, com a utilização de um amostrador de pequeno volume para coleta de *black carbon* e fumaça negra (OPSOMS). As concentrações de BC registraram médias na primeira e segunda semana de 0,29 µg/m³ e 0,24 µg/m³ respectivamente. Para fumaça negra registraram médias na primeira e na segunda semana de 4,15 µg/m³ e 2,40 µg/m³, respectivamente, os quais encontram-se inferiores aos limites atualmente legislados no Brasil. Essas concentrações foram influenciadas principalmente pelos parâmetros meteorológicos de precipitação e velocidade dos ventos que ajudaram a dispersar os poluentes na segunda semana do estudo. Em geral, o trabalho possibilitou uma melhor percepção quanto a influência das condições meteorológicas nos poluentes atmosféricos.

PALAVRAS-CHAVE: Poluição Atmosférica. *Black carbon*. Fumaça Negra. Monitoramento.

INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, a poluição do ar configura-se como um problema sério e crescente, isso é recorrente desde a Revolução Industrial ocorrido na Inglaterra, no século XVIII tendo em vista que nesse período foram descobertos novos processos de produção e deu-se início da urbanização (SOUSA, 2017; VIEIRA 2009). O rápido processo de industrialização, o crescimento populacional e a melhoria nos padrões de vida, contribuíram para aumentar consideravelmente os níveis de gases poluentes na atmosfera, principalmente nos países em

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais (PPGCN).



desenvolvimento (SOUSA, 2017). Na interrelação entre meio ambiente, economia e sociedade, o objetivo geral é a boa qualidade de vida das populações (VIEIRA, 2009).

Os principais responsáveis pela degradação da qualidade do ar são substâncias geradas por fenômenos naturais ou pelas atividades humanas, em concentrações suficientes e com potencial para causar danos à saúde, ao meio ambiente ou ao patrimônio (WIESE, 2017). A preocupação com a poluição do ar não é recente, há registros de que as primeiras reclamações datam de 351 a.C. feitas por Theophrastus, filósofo grego que relacionava a queima de substâncias fósseis com cheiro desagradável; o poeta Horácio em 65 a.C. comentava que os templos de sua época estavam enegrecidos devido a fumaça da queima de combustíveis; em 1909 em Glasgow, Escócia, 1.063 mortes foram atribuídas às condições de fumaça e neblina. Em suma, pode-se dizer que a preocupação com a qualidade do ar é identificada e relacionada com o bem-estar e saúde da população e meio ambiente (VIEIRA, 2009).

A partir dos acontecimentos de diversos desastres ambientais com a ocorrência de mortes que se correlacionam com efeitos na saúde da população, foi dada atenção para a gravidade do problema da poluição do ar em áreas urbanas. Diante disso foi criada em 1970 a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) que estabeleceu padrões de qualidade do ar para poluentes que são considerados nocivos como partículas inaláveis (MP₁₀), partículas inaláveis finas (MP_{2,5}), dióxido de enxofre (SO₂), dióxido de nitrogênio (NO₂), monóxido de carbono (CO), ozônio (O₃), e chumbo (Pb). No Brasil, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) baseado nas legislações dos Estados Unidos também estabeleceu parâmetros de qualidade do ar, excluindo o monitoramento de MP₁₀ e incluindo os poluentes como partículas totais em suspensão (PTS), e fumaça, que devem ser monitorados de acordo com a metodologia específica de cada poluente (BAIRD; CANN, 2011; VIEIRA 2009).

Para estudos de monitoramento da qualidade do ar, o poluente material particulado (MP), que são pequenos sólidos ou partículas líquidas que estão suspensas no ar, pode ser dividido em duas categorias: fumaça negra e *black carbon* (BC) (CARVALHO, 2017; LIMA, 2015; ZHANG *et al.* 2015). A fumaça negra refere-se às partículas mais escuras presentes no MP e são responsáveis por absorção da luz (BURIGO, 2016; SOUSA, 2017). Em geral, são partículas muito finas associada às emissões veiculares, sobretudo aqueles movidos a diesel, portanto presentes em atmosferas tipicamente urbanas (VIEIRA, 2009). Dentro da fração MP_{2,5} está o BC que é a forma sólida do carbono puro, que absorve a luz em todos os comprimentos de onda. O BC são as partículas mais eficazes para absorver a energia solar e é



produzido também por combustão incompleta (EPA, 2012; SOUSA 2017). A alta capacidade de absorção da luz para o BC e seu papel nos processos atmosféricos resulta em diversos impactos climáticos como aumento da temperatura, degelo da neve e interrupções nos padrões de precipitação (EPA, 2012).

Além de fumaça negra e BC serem prejudiciais ao meio ambiente, eles causam problemas na saúde. O fato das partículas de BC serem frações do $MP_{2,5}$ e muito finas, faz com que sejam facilmente assimiladas no corpo humano através da inalação, elas também podem aderir a pele e a mucosa através do trato gastrointestinal com a água ou alimentos (GIWA *et al.*, 2014; VIEIRA, 2009). Segundo Beverland e colaboradores, mortalidade por problemas cardiovasculares e respiratórios podem também ser relacionados às concentrações de fumaça negra.

O grande interesse nesses poluentes é o fato deles serem formados a por meio das emissões veiculares, portanto é por meio da amostragem de coletas que é possível comparar com os padrões de qualidade do ar estabelecidos pelas legislações vigentes em cada região. Vale salientar que a concentração de poluentes no ar é função não somente das emissões, mas também da forma que eles se transportam, dispersam, depositam e reagem entre si e das condições meteorológicas (VIEIRA, 2009). É de fundamental importância o acompanhamento de uma estação meteorológica simultânea ao monitoramento dos poluentes para possíveis correlações.

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo determinar as emissões de *black carbon* e fumaça negra na Universidade Estadual do Ceará – Campus Itaperi em função dos fatores meteorológicos relacionadas a qualidade do ar no trecho urbano estudado. Além disso, comparar os resultados das concentrações de *black carbon* e fumaça negra com as legislações vigentes e outros trabalhos da literatura.

METODOLOGIA

O estudo foi realizado na estação meteorológica da Universidade Estadual do Ceará (UECE) – Campus Itaperi localizada na Av. Dr. Silas Munguba, circundada pelas avenidas Bernardo Manuel e Dr. Justa Araújo (Figura 1A). O trecho em questão é conhecido pela grande movimentação de pessoas e veículos, haja vista que nos arredores da Universidade existem residências, estabelecimentos comerciais, escolas, faculdade e a própria universidade, além de circular diariamente diversas linhas de ônibus. Tudo isso evidencia uma significativa influência



de emissões para a atmosfera provenientes de fontes móveis, resultados da combustão automotiva.

A aquisição dos parâmetros meteorológicos de temperatura, umidade relativa, precipitação, pressão, velocidade e direção do vento utilizada simultaneamente a coleta de *black carbon* e fumaça negra, foram obtidos com o radar meteorológico da Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME) que fica situado na UECE Campus Itaperi (Figura 1B).

Figura 1: (A) Estação meteorológica da Universidade Estadual do Ceará (UECE) – Campus Itaperi (B) Torre do radar meteorológico da Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME).



(A)



(B)

Fonte: Elaborada pelos autores (2018).

As amostragens foram realizadas em conformidade com a legislação brasileira vigente, usando como base a Resolução CONAMA N° 491, de novembro de 2018. As coletas totalizaram duas semanas – de segunda à sábado – do mês de fevereiro de 2018 (e os três primeiros dias do mês de março). As análises foram efetuadas no dia posterior à coleta. Os horários das coletas corresponderam de 6:30h às 6:30h do dia seguinte, totalizando 24 horas para o monitoramento de *black carbon* e fumaça negra.

A Resolução CONAMA N° 491 estabelece métodos de amostragem e análise de poluentes atmosféricos. Para a determinação de fumaça, é estabelecido o método da refletância, predita pela NBR 10736 “Material Particulado em Suspensão na Atmosfera – Determinação da Concentração de Fumaça pela Método da Refletância da Luz”, esta norma adota o amostrador ativo OPSOMS da ENERÉTICA como equipamento oficial para amostragem de fumaça. Entretanto a NBR 10736 foi cancelada pela ABNT no dia 14 de outubro de 2013 e como alternativa, a ENERÉTICA recomenda que se utilize o Método L8.012 da CETESB, que é a



norma atualmente vigente. A determinação de *black carbon* na atmosfera também é feita através do método da refletância.

O princípio do método da refletância utiliza a refletância da luz sobre a área enegrecida do filtro, para isso foram selecionados filtros não expostos com valores de refletância de 100% (filtro completamente branco) e refletância do filtro após 24 horas de coleta (R), a diferença entre as medições final e inicial dá o valor do índice de obscurecimento (I) dada pela Equação 1.

$$I = 100 - R \quad (1)$$

O índice de obscurecimento é utilizado para o cálculo da concentração superficial de fumaça em (s). As medições do índice de obscurecimento são realizadas utilizando um refletômetro *SmokeStainRefletometer* da *Diffusion System*, modelo M43. A partir do índice (I), tomando como base valores tabelados, obtém-se a concentração superficial (s) em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ por meio de uma curva padrão. A razão da concentração superficial multiplicada pela área do filtro enegrecido (A) em cm^2 e o volume corrigido de ar amostrado (V) em m^3 , determina a concentração de fumaça em $\mu\text{g}/\text{m}^3$, conforme a Equação 2.

$$C_F (\mu\text{g}/\text{m}^3) = \left(\frac{S \times A}{V} \right) \quad (2)$$

Para determinar a concentração de *black carbon*, a refletância obtida para cada filtro foi inserida em uma equação validada por Beal (2015) para a obtenção da concentração do BC em $\mu\text{g}/\text{m}^3$, dada pela Equação 3.

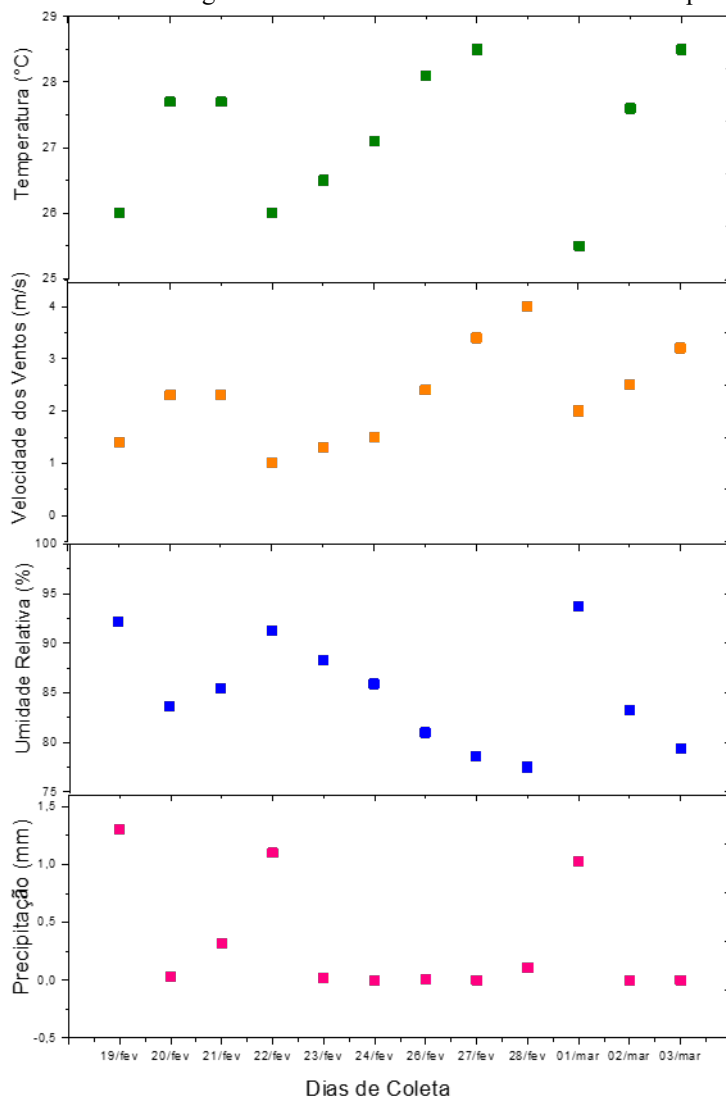
$$\text{BC} (\mu\text{g}/\text{m}^3) = (0,3724 \times e(5,52 - \left(\frac{0,51}{\ln(R)}\right) \times e^{(0,84 \times \ln(R))}) \times A) / V \quad (3)$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O período de estudo compreendeu duas semanas – de segunda a sábado – do mês de fevereiro de 2018 (e os três primeiros dias do mês de março). As variáveis meteorológicas, temperatura média, umidade relativa, precipitação e velocidade dos ventos, foram medidas e os valores estão representados na Figura 2. Foram feitas médias relativas às coletas realizadas para uma melhor representação dos resultados coletados.



Figura 2: Variáveis meteorológicas observadas na área de estudo durante o período amostral.

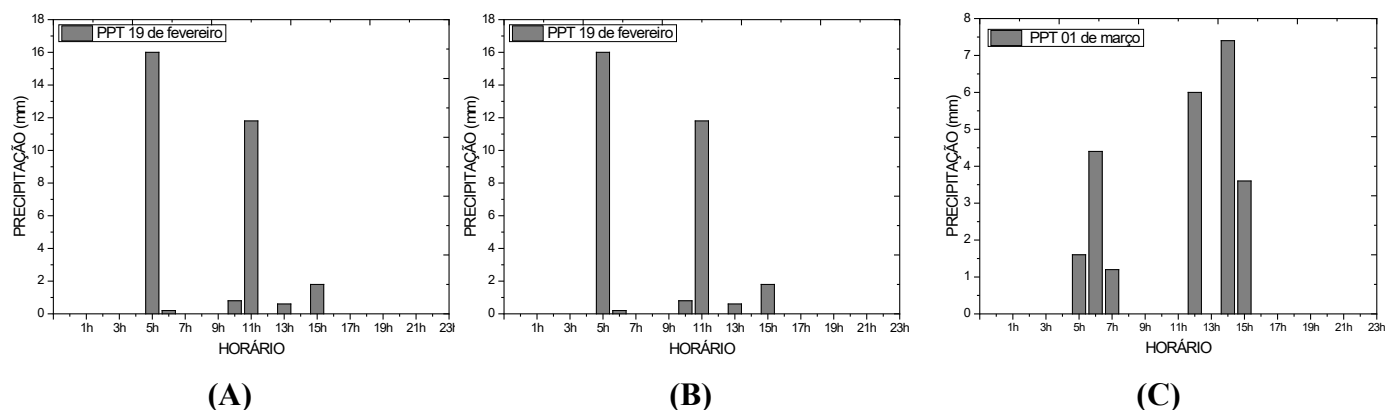


Fonte: Elaborada pelos autores (2018).

O período de monitoramento no mês de fevereiro está dentro do período de quadras chuvosas no estado do Ceará, segundo Sakamoto (2017), esse período se estende até maio e são influenciadas pela presença da Zona de Convergência Intertropical - ZCIT, considerada o principal sistema ocasionador da pluviometria no norte do Nordeste. Os índices pluviométricos variaram de 0,00 mm a 1,30 mm. Apesar de ser um valor pequeno diante da quadra chuvosa (pois os valores são as médias diárias), houve dias com intensa chuva, como os dias 19 e 22 de fevereiro; e 01 de março, como pode ser visto na Figura 3.



Figura 3: Distribuição de chuvas (A) Dia 19/02 (B) Dia 22/02 (C) 01/03.



Fonte: Elaborada pelos autores (2018).

Durante os dias de estudo, alguns horários apresentaram chuvas fracas (1,1 mm/h até 5,0 mm/h) em sua grande maioria, porém houve a presença de chuvas moderadas (5,1 mm/h até 25 mm/h), Segundo Lima e colaboradores, esta classificação foi feita pela Organização Meteorológica Mundial (OMM). Esse volume de chuva em determinados horários pode influenciar diretamente nos resultados das concentrações dos poluentes estudados, segundo Vieira (2009) a chuvas afetam a concentração de poluentes por diluição e por auxiliarem na precipitação das partículas por deposição úmida.

A umidade relativa (UR), tendo relação direta com as chuvas, também constitui um parâmetro expressivo. A presença de nebulosidade com *eventos* de chuva contribuiu para o aumento dessa umidade na atmosfera. A UR apresentou variações entre 77,5 % e 92,9 %. Pode-se notar que os maiores valores de umidade relativa foram observados nos dias que tiveram o maior índice pluviométrico. O aumento da umidade relativa do ar em uma determinada região pode impedir a formação de novas partículas na atmosfera, influenciando também na qualidade do ar (SOUSA, 2017).

No período de estudo, as temperaturas médias apresentaram baixas amplitudes, variando, em média, entre 25,7 °C e 29,2 °C. Pode-se observar na Figura 2 que o comportamento da temperatura é inversamente proporcional ao da precipitação: Os dias com maiores índices pluviométricos são os que apresentam menor temperatura média.

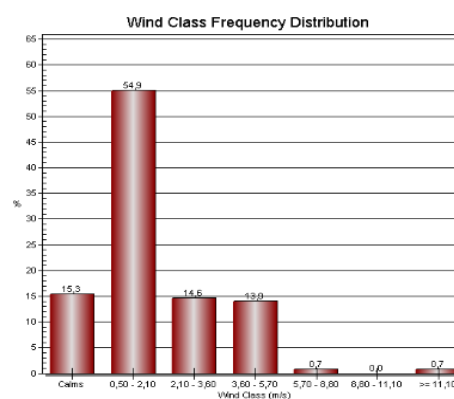
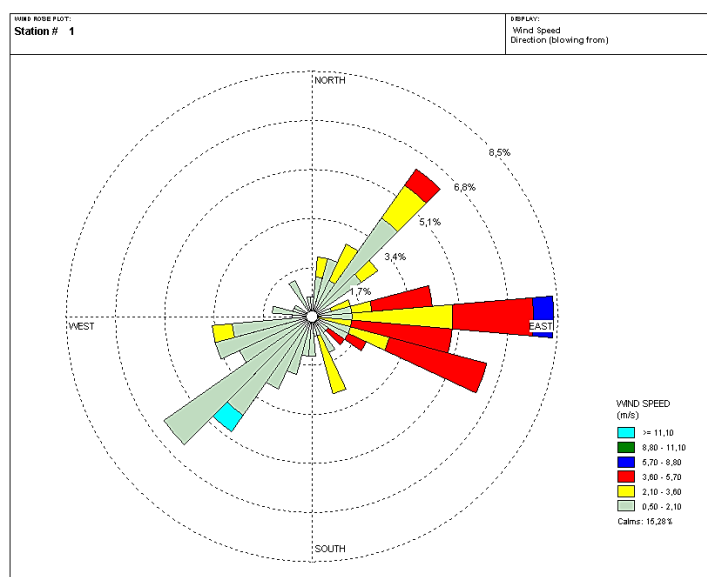
A topografia local é mais um parâmetro que influencia o transporte e a dispersão dos poluentes no ar. Nos centros urbanos localizados na costa normalmente tem condições de vento que promovem maior dispersão de poluentes do que aqueles cercados de montanhas e morros (VIEIRA, 2009). Quanto a isso, a velocidade dos ventos apontou variações entre 1,0 m/s e 4,0



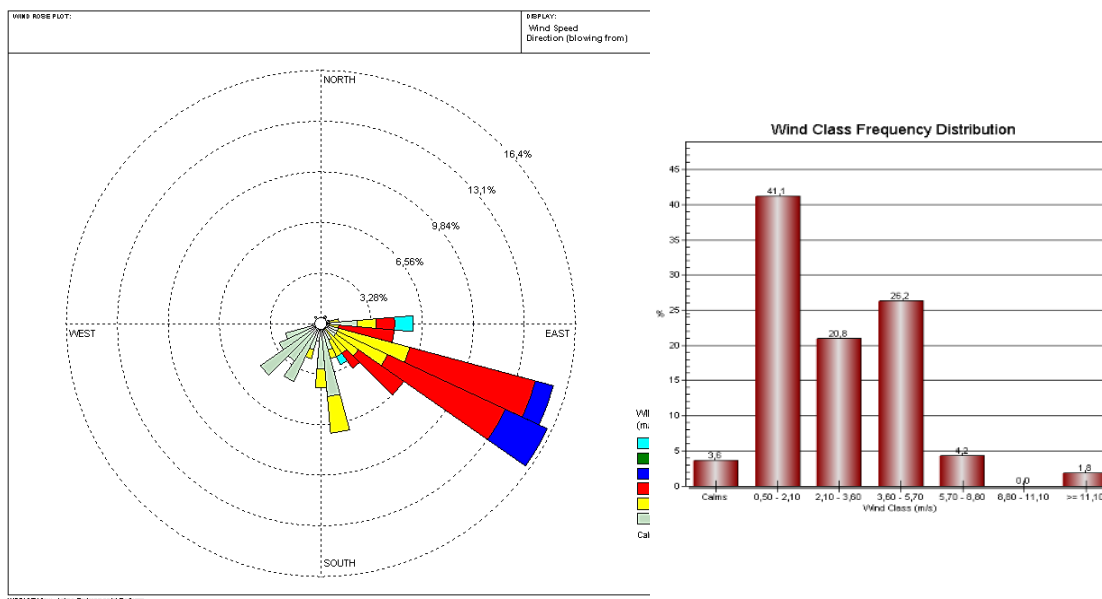
m/s durante o período de estudo. Segundo a escala de Beaufort, os ventos desse período são classificados com força 3 e como ventos fracos. Segundo a FUNCEME (2017) com a atuação da Zona de Convergência Intertropical (ZCIT) e formação de chuvas, os ventos tendem a ter velocidade menor.

Os ventos são responsáveis pelo carreamento dos compostos existentes no ar para outras regiões, dessa forma, podem ser transportados a longas distâncias, e o aumento da velocidade dos ventos tende a promover maior dispersão de gases e partículas (SOUSA, 2017). Além da velocidade, a direção do vento também é um parâmetro que altera as concentrações de partículas na atmosfera. A Figura 4 apresenta de forma mais detalhada o perfil de ventos observados durante o período monitorado em fevereiro e março de 2018.

Figura 4: Rosa dos ventos e frequência das velocidades dos ventos na área em estudo durante o período de coleta: (A) Primeira semana – 19/02 a 24/02. (B) Segunda semana – 26/06 a 03/03.



(A)



(B)

Fonte: Elaborada pelos autores (2018).

Considerando as rosas dos ventos, na primeira semana (Figura 4a), observa-se uma maior frequência e predominância destes na direção nordeste, leste e sudeste, enquanto que na segunda semana (Figura 4b), houve predominância nas direções leste-sudeste e sudeste. Tal característica reflete o perfil do comportamento das massas de ar no litoral cearense, onde predominam os ventos de nordeste, sudeste e leste, tal como foi verificado nos estudos de Leite e Frota (2010). Eles ainda destacam a influência das edificações na intensidade e direção dos ventos, causando alterações dependendo de suas presenças e alturas em cada região.

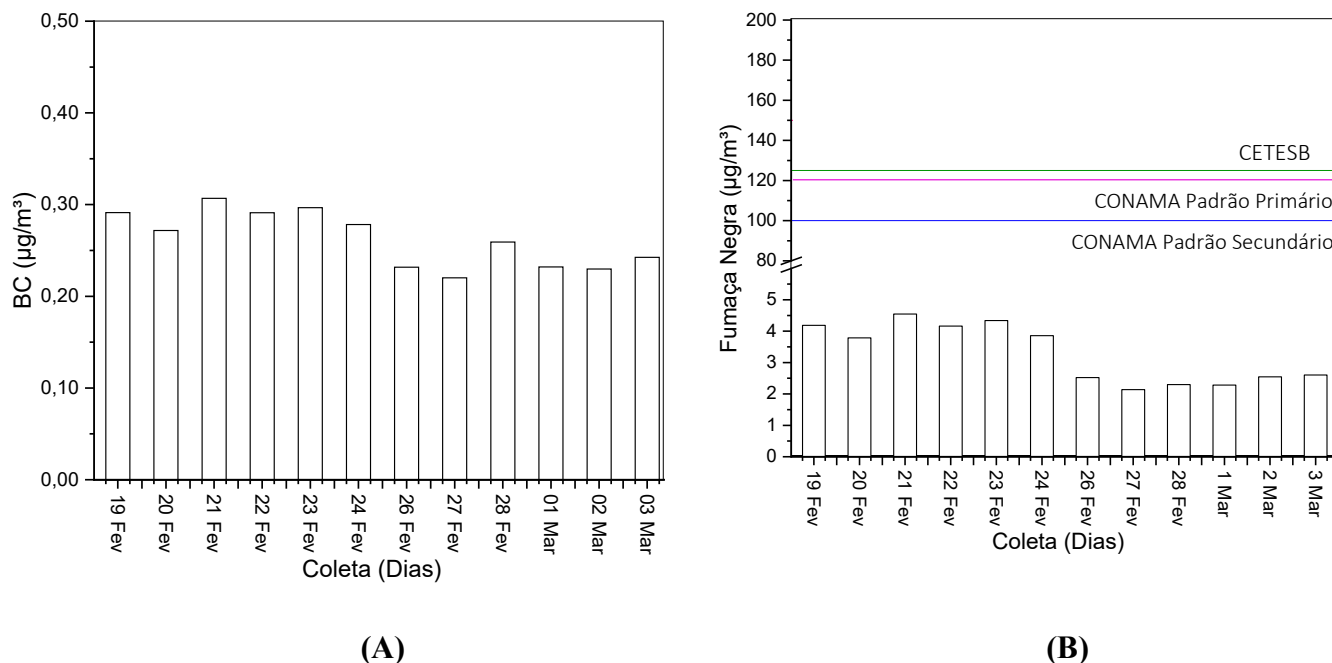
Considerando a frequência de distribuição dos ventos em função das velocidades (Figura 4a), a maior parte variou na faixa entre 0,5 m/s a 5,70 m/s, correspondendo a 83,4% de todo o período analisado, destacando-se a faixa entre 0,5 m/s a 2,1 m/s com ocorrência de 54,9%. Já a segunda semana (Figura 4b), a maior parte variou na faixa entre 0,5 m/s a 8,80 m/s correspondendo a 92,3%, o que difere da outra semana estudada foi o fato da ocorrência de ventos mais velozes. Na classe entre 3,60 m/s a 5,70 m/s e 5,70 m/s a 8,80 m/s houve a ocorrência de 26,2% e 4,2%, respectivamente. Essa predominância de ventos mais fortes na segunda semana pode acarretar em uma maior dispersão dos poluentes.

Os resultados relativos às concentrações de BC e fumaça negra estão apresentados na Figura 5. Os valores de BC na primeira semana variaram entre 0,27 a 0,31 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ com média de 0,29 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, os valores de BC na segunda semana variaram entre 0,22 a 0,26 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ com



média de $0,24 \mu\text{g}/\text{m}^3$, resultado bem inferior comparado à primeira. Referente às concentrações de fumaça negra, seus valores também foram maiores na primeira semana, variando entre $3,79$ a $4,55 \mu\text{g}/\text{m}^3$ com média de $4,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$, enquanto que na segunda semana os valores variaram entre $2,14$ a $2,60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ com média de $2,40 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Figura 5: Concentrações de (A) *black carbon* (BC) e (B) fumaça negra em 24 h durante o período amostral.



Fonte: Elaborada pelos autores (2018).

O *black carbon* não é legislado pelos limites nacionais para a qualidade do ar, contudo, figura-se como um importante poluente a ser analisado tendo em vista seus efeitos prejudiciais tanto a saúde humana quanto ao meio ambiente (SOUSA, 2017). Durante o período estudado, foi observado, em geral, uma baixa concentração de BC com média total de $0,26 \mu\text{g}/\text{m}^3$, comparando esse resultado com o estudo de Sousa (2017) que também monitorou o BC e fumaça negra na mesma área de estudo, nos meses de agosto, setembro e outubro de 2017 em períodos com ausência de chuva, foi obtido a concentração média de $0,44 \mu\text{g}/\text{m}^3$, quase o dobro do que foi visto no presente estudo. Isso demonstra que a precipitação influencia diretamente nas concentrações dos poluentes. O fato da concentração de *black carbon* ter apresentado um valor médio menor na segunda semana de estudo pode ser atribuído à maior distribuição dos ventos em classes com maiores velocidades, ocasionando numa maior dispersão dos poluentes.

É importante destacar que as emissões oriundas de veículos a diesel correspondem no geral cerca de 40 a 60% das emissões de NOx e material particulado e em torno de 70 a 90% das emissões de *black carbon* (ICCT, 2015). As emissões do BC no local monitorado do



presente estudo estão relacionadas, sobretudo, aos veículos pesados movidos a diesel (ônibus, caminhões) que trafegam na avenida Dr. Silas Munguba, em frente à estação de monitoramento da UECE.

Quanto à fumaça negra, durante o monitoramento os valores estiveram de acordo com os padrões nacionais que abrangem coletas de 24 horas. O CONAMA delimita um padrão primário de $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para o padrão primário e $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para o padrão secundário, já a CETESB, apresenta um limite com um padrão de $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$. O mesmo comportamento que foi notado para BC em comparação às duas semanas estudadas, também foi visto no monitoramento de fumaça negra. Maiores concentrações foram observadas na primeira em comparação com a segunda semana, justificados pelos mesmos motivos apresentados para BC quanto as influências das variáveis meteorológicas.

Um estudo de Lima (2015) em outra via urbana da cidade de Fortaleza, obteve os valores médios de BC e fumaça negra os valores de $0,69 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $7,27 \mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente, concentrações maiores haja vista que no trecho em estudo trafegam cerca de 58 linhas de transporte coletivo e as condições meteorológicas e períodos de estudo foram diferentes.

No estado de São Paulo e região metropolitana, o monitoramento dos teores de fumaça em São Paulo no ano de 2013 apontam valores médios de $26 \mu\text{g}/\text{m}^3$ segundo a CETESB (2014), valor exorbitante quando comparado com outros locais. Trabalhos realizados em Londrina-PR como o de Squizzato *et al.* (2017) foram avaliadas concentração de BC em duas universidades distintas e obteve valores médios em torno de $1,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $1,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Valores bem superiores ao presente estudo, que pode ser associado a fatores além dos meteorológicos, tendo em vista que a cidade de Londrina possui uma localização geográfica diferente da cidade de Fortaleza-CE, cidade litorânea.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os parâmetros meteorológicos influenciaram significativamente os processos de deposição e dispersão dos poluentes analisados; principalmente quanto à velocidade dos ventos, como foi evidenciada na segunda semana monitorada.

A precipitação foi outro fator meteorológico fundamental, pois estudos realizados em Fortaleza-CE em vias urbanas movimentadas em períodos de ausência de chuva tiveram concentrações mais elevadas de BC e fumaça negra.



Os resultados mostram que em todo o período monitorado, a concentração de fumaça negra se manteve dentro dos limites estabelecidos pela legislação nacional para controle da qualidade do ar e inferiores a estudos de outros estados. Para *black carbon* obteve-se valores bem inferiores a médias de outras cidades.

Apesar do grande fluxo de automóveis na avenida estudada, as variáveis meteorológicas exerceram grande impacto; para melhores resultados quanto a influência do trânsito, a pesquisa deve ser complementada com um estudo do fluxo de veículos atrelada as variáveis meteorológicas.

A revisão dos valores dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira é de grande importância para fomentar ações de redução das emissões e urge a implementação de uma rede de monitoramento em todo o estado mostra-se necessária para ampliação de estudos sobre o entendimento da dinâmica dos poluentes, bem como subsidiar ações de controle de emissões.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10736**: Material particulado em suspensão na atmosfera - Determinação da concentração de fumaça pelo método da refletância da luz. Rio de Janeiro, 1989.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p.

BEAL, Alexandra. **Avaliação inorgânica de material particulado atmosférico inalável na região norte do Paraná**. 2015. 151f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

BEVERLAND, I. J.; *et al.* Associations between short/medium-term variations in black smoke air pollution and mortality in the Glasgow conurbation, UK. **Environment International**, v. 50, p. 1-6, 2012.

BRASIL. Ministério Do Meio Ambiente. Conselho Nacional Do Meio Ambiente – **Resolução CONAMA nº 491, de 19 de novembro de 2018**. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/51058895. Acesso em: 10 maio 2022.

BRASIL. Ministério Do Meio Ambiente. Conselho Nacional Do Meio Ambiente – **O que é o CONAMA?** Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/estr.cfm>. Acesso em: 01 maio 2022.

BRASIL. Ministério Do Meio Ambiente. Conselho Nacional Do Meio Ambiente – **Resolução CONAMA nº 05 de junho de 1989**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res89/res0589.html>. Acesso em 01 maio 2022.



BURIGO, Stefano Damian. **Análise da emissão de fumaça preta em obras de construção e montagem industrial no Brasil**. 2016. 97 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Planejamento Energético). Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

CARVALHO, Amanda Carvalho. **Monitoramento da exposição pessoal ao poluente atmosférico black carbon**. 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Engenharia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.

CEARÁ. Secretaria De Meio Ambiente Do Ceará. **Programa Fumaça Negra**. Disponível em: <http://www.semace.ce.gov.br/licenciamento-ambiental/monitoramento/programa-fumaca-negra/>. Acesso em: 01 maio 2018

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Material particulado em suspensão na atmosfera - determinação da concentração pelo método da refletância da luz: método de ensaio. **Norma Técnica L8.012**. São Paulo: CETESB, 1986.

COMPANHIA ESTADUAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Poluentes Atmosféricos. Disponível em: <http://ar.cetesb.sp.gov.br/poluentes>. Acesso em: 01 maio 2018.

COMPANHIA ESTADUAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade do ar no estado de São Paulo 2013**. São Paulo: CETESB, 2014. 110 p.

ENERGÉTICA (QUALIDADE DO AR). Analisador de refletância da luz. Refletômetro. Disponível em: <http://www.energetica.ind.br/produto/refletometro>. Acesso em: 20 abr. 2018.

ENERGÉTICA (QUALIDADE DO AR). Manual de Operação (OPSOMS) (2012). Disponível em: <http://www.energetica.ind.br>. Acesso em: 20 abr. 2018.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Report to Congress on Black carbon – Black carbon Effects on Public Health and the Environment**. Washington, D.C.: EPA, 2012.

FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS. FUNCEME, Fortaleza, 01 mai. 2018. Chuvas no Ceará. Disponível em: http://www.funceme.br/produtos/script/chuvas/Grafico_chuvas_postos_pluviometricos/totalc_huvas/index.htm>. Acesso em: 01 maio 2022.

GIWA, S. O; ADAMA, O. O; AKINYEMI, O. O. Baseline *black carbon* emissions for gas flaring in the Niger Delta region of Nigeria. **Journal of Natural Gas Science and Engineering**, v. 20, p. 373-379. 2014.

INTERNATIONAL COUNCIL ON CLEAN TRANSPORTATION (ICCT). **Review of current practices and new developments in heavy-duty vehicle inspection and maintenance programs**. Washington, D.C.: 2015.

LEITE, R. C. V.; FROTA, A. B. Análise da influência da verticalização sobre a ventilação natural através de aplicativo de dinâmica dos fluidos computadorizada - Estudo de caso em Fortaleza, Ceará. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE ARQUITETURA, URBANISMO E DESIGN, 8, 2010, São Paulo. **Anais...** São Paulo: NUTAU, 2010.



LIMA, A. M. de; *et al.* Intensidade das chuvas na bacia de Caçu-GO. **Revista Geonorte**, v. 2, p.1089–1097, 2012.

LIMA, Rodrigo Martins de. **Avaliação da Qualidade do ar em um trecho urbano da cidade de Fortaleza – Ceará**. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Tecnologia e Gestão Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Estado do Ceará, Fortaleza, 2015.

SAKAMOTO, Meire. [Entrevista publicada em 01 de agosto de 2017]. Disponível em: <https://www.opovo.com.br/noticias/fortaleza/2017/08/temporada-de-ventos-fortes-inicia-neste-mes-de-agosto.html>. Acesso em: 01 maio 2018.

SÃO PAULO. Decreto Estadual Nº. 59.113, de 23 de abril de 2013. Estabelece novos padrões de qualidade do ar e dá providências correlatas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**. Poder Executivo, de 24 abr. 2013.

SOUSA, Natanael Almeida. **Determinação de Material Particulado em um corredor de trânsito e modelagem da deposição no sistema respiratório**: Estudo de caso em Fortaleza-CE. 2017. 103 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Físicas Aplicadas) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2017.

SQUIZZATO, Rafaela. **Avaliação de curto prazo nos sintomas respiratórios em indivíduos expostos ao material particulado em ar ambiente**. 2017. 100 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.

VIEIRA, N. R. **Poluição do ar**. Rio de Janeiro: E-papers, 2009. 220 p.

WIESE, Luiz Felipe. **Modelagem da dispersão de poluentes atmosféricos na cidade de Curitiba-PR usando modelos semi-empíricos**. 2017. 81 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.

ZHANG, X.; *et al.* *Black carbon* an urban central China. **Journal of Quantitative Spectroscopy; Radiative Transfer**, v. 150, p. 3-11, 2015.



ARTIGO 7

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO TRITERPENO 3β , 6β , 16β - TRIHIDROXILUP-20(29) -ENO ISOLADO DAS FOLHAS DE *Combretum leprosum* EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO

DOI 10.47402/ed.ep.c20221825720

Francisca Crislândia Oliveira Silva
Maria Kueirislene Amâncio Ferreira
Antônio Wlisses da Silva
Hélcio Silva dos Santos
Francisco Ernani Alves Magalhães
Jane Eire Silva Alencar de Menezes

RESUMO

A dor envolve uma resposta fisiológica gerada após uma lesão tecidual, que pode ser estimulada por fatores generalizados, bem como, o envolvimento do processo neural. Para o tratamento da dor, são utilizadas duas classes de fármacos, os analgésicos e os anti-inflamatórios não esteroidais, os quais geralmente estão associados a efeitos colaterais como depressão respiratória, complicações renais e sangramento gastrointestinal. Dessa forma, os compostos isolados de plantas, tais como os triterpenos, são uma medida alternativa na busca do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da dor. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antinociceptiva do triterpeno 3β , 6β , 16β -trihidroxilup-20(29) -eno (CLF-1) isolado das folhas de *Combretum leprosum* em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. A toxicidade aguda foi realizada frente ao zebrafish adulto para determinar a Concentração Letal (CL_{50}) até 96h de análise. O teste de Campo aberto foi realizado em Placas de Petri contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de Cruzamento de Linhas (CL) de 0-5min. Posteriormente, CLF-1 foi submetido a testes de nocicepção aguda sob diferentes estímulos químicos: Formalina, cinamaldeído, glutamato, salina ácida, capsaicina e salina hipertônica (corneal). O mecanismo de neuromodulação de CLF-1 ainda foi verificado, utilizando diferentes antagonistas (naloxona, L- NAME, cetamina, cânfora, azul de metileno, vermelho de rutênio, amilorida, ácido mefanâmico e capsazepina). Como resultado, CLF-1 não apresentou toxicidade aguda ($CL_{50} > 1,0$ mg/mL) até 96h de análise, não alterou o sistema locomotor dos animais e reduziu o comportamento nociceptivo em todos os testes de atividade antinociceptiva com zebrafish adulto (ZFa). Além disso, o efeito de CLF-1 foi significativamente semelhante à morfina, usado como controle positivo. O efeito antinociceptivo de CLF-1 foi resistente ao azul de metileno, mas totalmente prevenido pelo tratamento com naloxona, L-NAME, ácido mefanâmico e vermelho de rutênio, e ainda, parcialmente inibido por cânfora, ketamina, amilorida e capsazepina. O efeito antinociceptivo corneal de CLF-1 também foi inibido por capsazepina. Portanto, CLF-1 apresentou potencial farmacológico para o tratamento da dor aguda e este efeito é modulado pelo sistema opióide, nitrérgico, receptores NMDA e canais TRPs e ASICs.

PALAVRAS-CHAVE: Triterpeno 3β , 6β . 16β -trihidroxilup-20(29) -eno. Antinocicepção. Zebrafish (*Danio rerio*) adulto.



INTRODUÇÃO

A dor envolve uma resposta fisiológica gerada após uma lesão tecidual, que pode ser estimulada por fatores generalizados, bem como, o envolvimento do processo neural (BENNETT *et al.*, 2019; SAŁAT *et al.*, 2015). Para que o estímulo doloroso se processe, é necessário que os nociceptores sejam ativados por estímulos mecânicos, físicos, térmicos ou químicos, por meio da mediação de agentes nociceptivos como a formalina, capsaicina, glutamato, salina ácida e solução salina hipertônica (BATISTA *et al.*, 2018; MAGALHÃES *et al.*, 2017) Além disso, a dor ocular do tipo corneal, é considerada um sintoma central de distúrbios inflamatórios, traumáticos e dolorosos, que afetam o segmento anterior do olho. Assim, o aumento da prevalência suceptiva da dor, a sua morbidade e o ônus social estão relacionados a um sério problema de saúde pública (BELMONTE *et al.*, 2015).

Portanto, para o tratamento de vários mecanismos fisiopatológicos típicos da dor são utilizados os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e as drogas analgésicas (LENARDÃO *et al.*, 2016). Embora sejam altamente eficazes, esses fármacos geralmente não estão dissociados de efeitos adversos, como depressão respiratória, sangramentos gastrointestinais e complicações renais (LIU *et al.*, 2015; ZAMANIAN *et al.*, 2016). Dessa maneira, é necessário elucidar medidas alternativas para o desenvolvimento de novos fármacos que visam o tratamento eficaz da dor. Nessa perspectiva, os compostos isolados de plantas como os triterpenos, encaixam-se como uma fonte promissora na pesquisa de moléculas com potencial atividade antinociceptiva (BARROT, 2012).

Assim, a planta foco desse estudo denominada *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae), é uma espécie vegetal arbustiva comumente encontrada no Norte e Nordeste do Brasil, na qual é conhecida popularmente por “mofumbo” ou “cipoaba” (LIRA *et al.*, 2003). O triterpeno pentacíclico 3β , 6β , 16β -tri-hidroxilup-20(29) -eno (CLF1) obtido para esse estudo, foi isolado das folhas de *C. leprosum* (EVARISTO *et al.*, 2014). Dessa forma, muitos estudos farmacológicos com CLF-1 já descritos na literatura, sugerem sua ação mediante os efeitos anti-inflamatórios, antinociceptivos, anticancerígeno, antibacteriano, antibiofilme, antioxidante e anti-proliferação (EVARISTO *et al.*, 2014, 2017; HORINOUCI *et al.*, 2017; LACOUTH-SILVA *et al.*, 2015; VIAU *et al.*, 2014;).

Em destaque, zebrafish (*Danio rerio*) conhecido popularmente como paulistinha, vem ganhando popularidade como um modelo animal usado para estudos de novos fármacos que atuam no Sistema Nervoso Central, em testes comportamentais, genéticos, toxicológicos e na



investigação dos mecanismos de diversas doenças humanas (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012; KALUEFF *et al.*, 2016), já que esse modelo oferece uma alternativa de manutenção de baixo custo, alta taxa de reprodução e mecanismos genéticos e bioquímicos evolutivamente conservados (RENNEKAMP; PETERSON, 2015). Além disso, evidências sugerem que o desenvolvimento e a organização de sistemas de processamento nociceptivo periférico e central são semelhantes entre zebrafish e outros vertebrados (DO NASCIMENTO *et al.*, 2018).

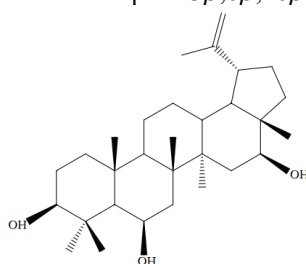
Nesse contexto, o objetivo principal desse estudo foi avaliar o efeito antinociceptivo de CLF-1 isolado das folhas de *C. leprosum* e seus possíveis mecanismos de ação, usando como modelo animal o zebrafish (*D. rerio*) adulto.

METODOLOGIA

OBTENÇÃO DO TRITERPENO 3β , 6β , 16β -TRI-HIDROXILUP-20(29) -ENO

O triterpeno pentacíclico 3β , 6β , 16β -tri-hidroxilup-20(29) -eno (CLF1) (Figura 1) foi isolado das folhas de *C. leprosum*. O material vegetal foi coletado em Sobral, Ceará- Brasil, identificado e catalogado no Herbário Francisco José de Abreu Matos, sob o nº de voucher 4573. As caracterizações e propriedades vibracionais do triterpeno foram realizadas por Evaristo *et al.* (2014). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 7210149/2016.

Figura 1: Estrutura química do triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxilup-20(29)- eno.



Fonte: Elaborada pelos autores.

AValiação da SEGURANÇA NÃO CLÍNICA

Toxicidade 96h

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish (*D. rerio*) adulto (ZFa), conforme as diretrizes da Organização de Cooperação Econômica e Método Padrão de Desenvolvimento (OECD, 1992). Os animais (n = 6/grupo) foram tratados por via



intraperitoneal (*i.p.*) com CLF-1 (0,1; 0,3 e 1 mg/mL; 20 µL) e grupo veículo (Controle, solução salina 0,9%; 20 µL). Após os tratamentos, foram observadas as taxas de mortalidade dos animais. A cada 24 h durante 96 h de análise, foi registrado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a concentração letal capaz de matar 50% dos animais (CL₅₀) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR, *et al.*, 2015).

Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Os animais (n= 6/grupo) foram tratados por via intraperitoneal (*i.p.*) com 20 µL de CLF-1 (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL) ou veículo (Controle, solução salina 0,9%). Além disso, foi incluído um grupo de animais não tratados (Naive). Após 30 min, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto (MAGALHÃES *et al.*, 2017), para avaliar possíveis alterações na coordenação motora dos ZFa. O número de Cruzamentos de Linhas (CL) dos animais foi registrado durante 0-5 min.

PROTOCOLO GERAL DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

No dia dos experimentos, os animais foram selecionados aleatoriamente, anestesiados com água fria (12°C-15°C) até ficarem imóveis, com todos os reflexos e controle muscular temporariamente prejudicados, transferidos para uma esponja úmida, submetidos à injeção intraperitoneal com a amostra teste ou grupo controle. Em seguida, os animais foram colocados individualmente em copos individuais (250 mL) contendo 150 mL de água parada do aquário. Para os tratamentos, em todos os testes nociceptivos, os animais (n = 6/grupo) foram pré-tratados intraperitonealmente (20 µL) com CLF-1 (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL), morfina (1, 0 e 2,5 mg/mL - controle positivo) ou veículo (solução salina 0,9%). O grupo Naive (n = 6/grupo) também foi incluído. Além disso, foi realizado o tratamento por via intramuscular (*i.m.*) ou por via tópica corneal de diferentes agentes indutores da nocicepção.

Comportamento nociceptivo induzido por agentes nocivos

Os animais foram pré-tratados por via intraperitoneal (20 µL) com CLF-1 (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL), morfina (1, 0 e 2,5 mg/mL - controle positivo) ou veículo (solução salina 0,9%), 30 minutos antes de receber os tratamentos para os estímulos nocivos: (1) Formalina (agonista de canal de cátions com potencial para receptor transitório, subfamília A, membro 1 [TRPA1] fases neuropáticas e neurogênicas; 0,1%; 5,0 µL); (2) Cinamaldeído (agonista de canal de cátions com potencial para receptor transitório, subfamília A, membro 1 [TRPA1]; 0,33 µM/5,0



μL); (3) Capsaicina (agonista de canal de cátions com potencial para receptor transitório 1 da subfamília V [TRPV1]; $40,93 \mu\text{M}/5,0 \mu\text{L}$); (4) Solução Salina Ácida (Agonista do canal iônico do sensor de ácido [ASIC]; ácido acético a 0,1% dissolvido em solução salina; pH 3,28/ $5,0 \mu\text{L}$); (5) Glutamato (agonista do receptor glutamatérgico; $12,5 \mu\text{M}/5,0 \mu\text{L}$). A porcentagem de analgesia foi analisada individualmente em diferentes tempos, conforme cada modelo nociceptivo, onde os animais foram colocados em placas de Petri ($10 \times 15 \text{ cm}$), divididas em quadrantes e contabilizados o número de CL dos animais. Posteriormente, o modelo de nocicepção induzido por capsaicina foi escolhido para avaliar o possível mecanismo de neuromodulação de CLF-1, pois foi observado um maior potencial comportamental do efeito antinociceptivo de CLF-1. Assim, em experimentos subsequentes, os animais ($n= 6/\text{grupo}$) foram pré-tratados intraperitonealmente ($5,0 \mu\text{L}$) com naloxona ($0,2 \text{ mg/mL}$), L -NAME ($1,0 \text{ mg/mL}$), azul de metileno ($1,0 \text{ mg/mL}$), cetamina ($0,01 \text{ mg /mL}$), cânfora ($0,76 \text{ mg/mL}$), vermelho de rutênio ($0,3 \text{ mg/mL}$), amilorida ($5,0 \text{ mg/mL}$) ou ácido mefenâmico (30 mM), 15 min antes do pré-tratamento intraperitoneal com a menor concentração efetiva de CLF-1 ($0,1 \text{ mg /ml}$; $20 \mu\text{L}$). A nocicepção foi induzida pela capsaicina ($5 \mu\text{L}$; *i.m.*) 30 min após o pré-tratamento com CLF-1 (BATISTA *et al.*, 2018; MAGALHÃES *et al.*, 2017; SOARES *et al* 2018).

Comportamento nociceptivo induzido por solução salina hipertônica

O comportamento de nocicepção da córnea foi induzido com solução salina hipertônica aplicada no olho direito dos animais ($n = 6/\text{grupo}$) 30 min após o pré-tratamento ($20 \mu\text{L}$; *i.p.*) com CLF-1 ($0,1$; $0,3$; $1,0 \text{ mg/mL}$), morfina (1 mg/mL ; controle positivo) ou veículo (Controle; solução salina a 0,9%). Um grupo de animais ($n=6/\text{grupo}$) não tratado (Naive) também foi incluído. A porcentagem de analgesia (A%) foi calculada individualmente durante 0-5 min. Esse modelo também foi escolhido para avaliar o possível envolvimento dos canais TRPV1. Assim, em um experimento subsequente, os animais ($n= 6/\text{grupo}$) foram pré-tratados intraperitonealmente com capsazepina, 15 min antes da administração intraperitoneal de CLF-1 ($0,1 \text{ mg/ml}$; $20 \mu\text{L}$) (MAGALHÃES *et al.*, 2018).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como valores da média \pm erro padrão da média para cada grupo de 6 animais. Após confirmação da normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA



unidirecional), seguido do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 5.01. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA NÃO CLÍNICA

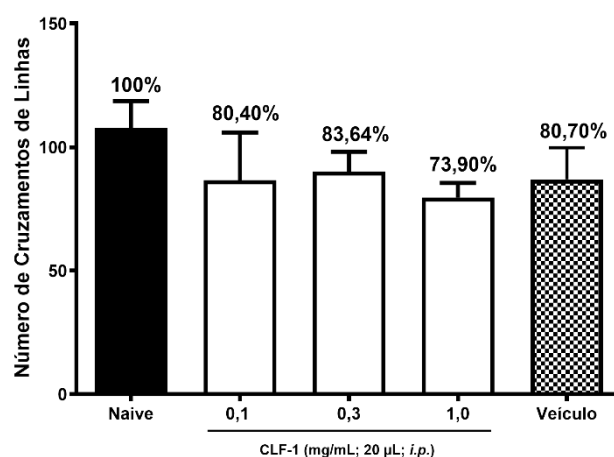
Toxicidade aguda frente ao Zebrafish (*Danio rerio*) adulto

A importância do uso do zebrafish em estudos de toxicidade tem permitido grandes avanços científicos voltadas para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas (MAGALHÃES *et al.*, 2017). Neste estudo, a possível toxicidade de CLF-1 foi analisada em zebrafish. Com base nos resultados, constatou-se que CLF-1 se mostrou seguro, pois não apresentou sinais de toxicidade frente à ZFa até 96 h de análise ($CL_{50} > 1$ mg/mL).

Avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Recentemente, o teste de campo aberto foi adaptado em placas de Petri para avaliar a atividade locomotora do Zebrafish sob ação de drogas analgésicas (BATISTA *et al.*, 2018; MAGALHÃES *et al.*, 2017). Nesse contexto, foi empregado o mesmo método para avaliar o efeito de CLF-1 no sistema locomotor do zebrafish adulto. Dessa forma, foi observado que no teste de campo aberto, CLF-1 não alterou a locomoção dos animais, pois mostrou atividade locomotora significativamente ($p > 0,05$) semelhante ao grupo naive (Figura 2).

Figura 2: Efeito de CLF-1 na atividade locomotora do Zebrafish (*D. rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5 min). Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média ($n = 6$ /grupo). Os números acima das colunas indicam a porcentagem de atividade locomotora (AL%). Naive (grupo não tratado). Veículo (Controle, solução salina 0,9%; 20 μ L; *i.p.*). ANOVA unidirecional com teste post-hoc de Tukey.



Fonte: Elaborada pelos autores.



ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Como resultado, todas as concentrações testadas de CFL-1 (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL) reduziram ($p < 0,01$ - $p < 0,001$ vs. Controle) o comportamento nociceptivo induzido pela formalina em ZFa na primeira fase do teste. Posteriormente, foi averiguado que na segunda fase do teste, apenas a concentração mais elevada de CLF-1 (1,0 mg/mL) inibiu ($p < 0,001$ vs. Controle) o comportamento nociceptivo induzido pela formalina em ZFa. Além disso, as concentrações de 0,3 e 1,0 mg/mL de CLF-1 reduziram o comportamento nociceptivo induzido por cinamaldeído ($p < 0,001$ e $p < 0,001$ vs. Controle; respectivamente). Em relação aos modelos nociceptivos induzidos por solução ácida, glutamato e capsaicina foi observado que todas as concentrações testadas de CFL-1 reduziram ($p < 0,01$ - $p < 0,001$ vs. Controle) a nocicepção em ZFa (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito antinociceptivo de CLF-1 em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$): ** $p < 0,01$ vs. controle; *** $p < 0,001$ vs. controle; ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$ vs. Morfina.

Tratamento (i.p.)	GRUPOS												
	Concentração (mg/mL)	Formalina (1ª fase) [#]		Formalina (2ª fase) [#]		Cinamaldeído [#]		Salina ácida [#]		Glutamato		Capsaicina [#]	
		%A	Cruzamentos de linhas	%A	Cruzamentos de linhas	%A	Cruzamentos de linhas	%A	Cruzamentos de linhas	%A	Cruzamentos de linhas	%A	Cruzamentos de linhas
Controle	-	-	38,2 ± 6,5	-	95,3 ± 2,72	-	36,8 ± 2,4	-	53,5 ± 2,8	-	42,8 ± 1,9	-	33,8 ± 4,3
CLF-1	0,1	52,12	125,5 ± 8,9 ^{***}	8,90	118,8 ± 8,64 ^c	12,60	58,8 ± 9,9 ^c	30,96	165,7 ± 30,4 ^c	38,88	118,5 ± 17,7 ^{***}	54,09	179,5 ± 23,6 ^{***}
CLF-1	0,3	51,04	123,7 ± 17,2 ^{***}	22,30	154,0 ± 10,73 ^a	33,28	95,0 ± 10,2 ^{***}	32,39	170,9 ± 15,7 ^{***}	38,19	117,3 ± 16,9 ^{***}	64,41	207,3 ± 16,3 ^{***}
CLF-1	1,0	46,86	116,7 ± 14,4 ^{***}	28,77	171,3 ± 10,28 ^b	37,40	102,2 ± 7,6 ^{***}	31,81	168,8 ± 11,7 ^{***}	48,14	136,7 ± 11,2 ^{***}	43,69	151,8 ± 8,7 ^{***}
Morfina	0,2 ^a - 1,0 ^b 2,5 ^{***}	60,95	140,3 ± 13,1 ^{***}	47,65	221,2 ± 16,67 ^{***}	42,72	111,5 ± 7,4 ^{***}	50,49	236,5 ± 11,2 ^{***}	64,19	168,0 ± 9,2 ^{***}	45,25	155,7 ± 4,0 ^{***}
Naive	-	-	167,5 ± 13,68 ^{***}	-	264,2 ± 23,62 ^{***}	-	174,8 ± 6,6 ^{***}	-	362,5 ± 29,54 ^{***}	-	195,0 ± 18,3 ^{***}	-	269,3 ± 15,3 ^{***}

Fonte: Elaborada pelos autores.

Contudo, embora o potencial antinociceptivo de diferentes partes de *C. leprosum* já tenha sido investigado (VIAU *et al.*, 2014), a presente pesquisa foi a primeira a relatar a avaliação da capacidade de CLF-1 em atenuar a nocicepção aguda comportamental em zebrafish adultos.

MECANISMO DE AÇÃO DO TRITERPENO CLF-1 SOB NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR CAPSAICINA

A menor concentração efetiva de CLF-1 (0,1 mg/mL) foi obtida no teste de capsaicina, com 54,09% de inibição do comportamento nociceptivo (Tabela 1). Portanto, este modelo foi escolhido para investigar os possíveis mecanismos de neuromodulação. Como resultado, o efeito antinociceptivo de CLF-1 foi completamente prevenido pela naloxona, L-NAME e



vermelho de rutênio, e parcialmente bloqueado pela cetamina, cânfora, amilorida e capsazepina. Contudo, CLF-1 foi resistente apenas ao azul de metileno, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Efeito do pré-tratamento com naloxona, L-NAME, azul de metileno, cetamina, cânfora, vermelho de rutênio e amilorida na antinocicepção induzida por CLF-1 em zebrafish adulto. Nocicepção induzida por capsaicina (40,93 μ M; 5 μ L; *i.m.*). ANOVA seguida de Teste de Tukey (^a $p < 0,001$; ^b $p < 0,01$ vs. Controle; [#] $p < 0,01$; ^{##} $p < 0,001$ vs. CLF-1).

Grupos	Concentração (mg/mL; 20 μ L <i>i.p.</i>)	Cruzamentos de linhas (10 – 20 min)	Analgesia (%)
Controle	Salina 0,9% (20 μ L)	37,50 \pm 1,69	-
CLF-1	0,1	197,2 \pm 12,13 ^a	62,52
Naloxona + CLF-1	0,2 + 0,1	58,33 \pm 2,89 ^{###}	10,95
L-NAME + CLF-1	1,0 + 0,1	23,67 \pm 1,33 ^{###}	2,10
Azul de metileno + CLF-1	1,0 + 0,1	164,00 \pm 12,05 ^a	50,19
Cetamina + CLF-1	0,01 + 0,1	121,7 \pm 5,31 ^{a###}	34,49
Cânfora + CLF-1	0,76 + 0,1	107,8 \pm 14,04 ^{b###}	29,32
Vermelho de rutênio + CLF-1	0,3 + 0,1	23,17 \pm 7,13 ^{###}	1,92
Amilorida + CLF-1	5,0 + 0,1	153,2 \pm 7,78 ^{a###}	46,18
Naive	Sem tratamento	269,3 \pm 15,31 ^{###}	-

Fonte: Elaborada pelos autores.

O mecanismo de ação antinociceptivo de triterpenos foi relatado anteriormente em diferentes modelos animais (LONGHI-BALBINOT *et al.*, 2011; PIETROVSKI *et al.*, 2006). Dessa forma, foi demonstrado que o triterpeno CLF-1 diminuiu o comportamento de nocicepção induzida por capsaicina em roedores, agindo nos receptores de TRPs (PIETROVSKI *et al.*, 2006) bem como demonstrado nesse estudo com ZFa. O triterpeno do tipo ácido oleanólico, também preveniu a nocicepção induzida pela capsaicina, modulando os canais TRPV1 em ZFa (SOARES *et al.*, 2018). Os canais TRPs, especialmente TRPV1 e TRPA1, constituem o maior grupo de canais iônicos nociceptivos, onde há um grau de interação entre eles e sua ativação ocorre em resposta a temperaturas elevadas, sob condições de pH < 5,9, e por substâncias como capsaicina e solução salina hipertônica (CALIXTO *et al.*, 2005; JARDIN *et al.*, 2017). Este efeito pode ser bloqueado quando um antagonista do canal TRPV1, como o vermelho de rutênio é usado (SOARES *et al.*, 2018).

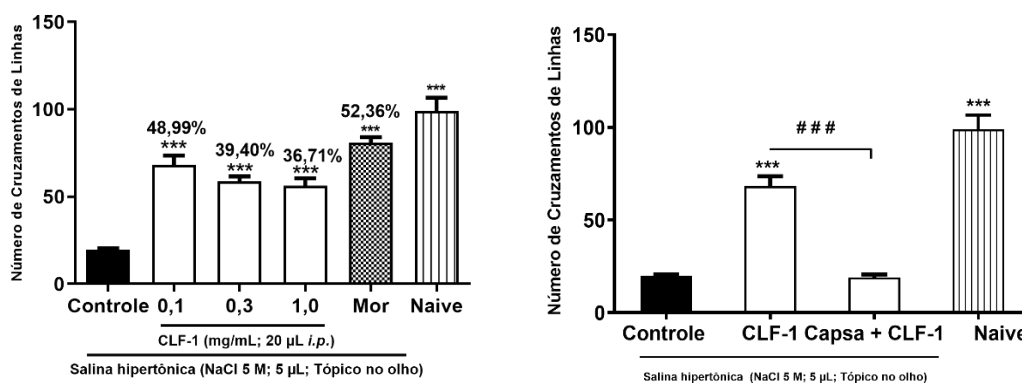
Longhi-Balbinot *et al.* (2009) avaliaram o envolvimento do sistema glutamatérgico (receptores NMDA e metabotrópicos de glutamato) na ação antinociceptiva causada pelo CLF-1 em camundongos. Além disso, CLF-1 também demonstrou modular os canais do sistema opióide e o sistema nitrérgico em camundongos (LONGHI-BALBINOT *et al.*, 2011). Outros triterpenos como tigenona e ácido oleanólico demonstraram envolvimento no sistema do óxido nítrico e ASICs (SOARES *et al.*, 2018; VELOSO *et al.*, 2015). Portanto, esses dados fornecem uma visão geral de que essa subclasse de moléculas está ligada à redução da modulação e sinalização dolorosa, e assim, pode atuar em diferentes alvos moleculares.



NOCICEPÇÃO CORNEAL INDUZIDA POR SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA

Como resultado, foi observado que todas as concentrações de CLF-1 (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL) também foram capazes de reduzir ($p < 0,001$ vs. Controle) o comportamento nociceptivo no modelo de dor corneal induzida por solução salina hipertônica em ZFa (Figura 3a), e este efeito foi prevenido pela capsazepina (Figura 3b).

Figura 3: (A) Efeito de CLF-1 na nocicepção corneana induzida por solução salina hipertônica (5 M NaCl) em Zebrafish adulto (0-5 min). (B) Efeito da Capsazepina (Cpsa) na ação antinociceptiva de CLF-1. Os números acima das colunas indicam a porcentagem de analgesia (% A). Controle: veículo (solução salina 0,9%; 20 μ L; *i.p.*). Naive - grupo não tratado. Mor – morfina (1,0 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*). Capsa (0,5 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*). ANOVA unidirecional com teste post-hoc de Tukey (** $p < 0,001$ vs. Controle).



Fonte: Elaborada pelos autores.

Os canais TRPV1 são sensores celulares envolvidos na formação da córnea e na detecção de sensações nocivas. Além disso, as fibras nociceptivas da córnea respondem coletivamente a diferentes estímulos químicos ativando os canais TRPV1 (LAUNAY *et al.*, 2016). Portanto, os resultados confirmam o valor potencial antinociceptivo de CLF-1 ativo nessa via.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que o triterpeno CLF-1 isolado das folhas de *C. leprosum* apresentou efeito farmacológico como inibidor do comportamento de nocicepção em zebrafish (*D. rerio*) adulto, sem apresentar alteração locomotora e sem causar toxicidade nos animais. Além disso, o comportamento antinociceptivo de CLF-1 foi mediado por receptores opióides, nitrérgicos, glutamatérgicos (NMDA) e canais TRPs e ASICS.

REFERÊNCIAS

- ARELLANO-AGUILAR, O.; *et al.* Use of the Zebrafish Embryo Toxicity Test for Risk Assessment Purpose: Case Study. **Journal of Fisheries Sciences.com**, v. 9, n. 4, P. 52-62, 2015.
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, n. 1, p. 39–50, 2012.



BATISTA, F. L. A.; *et al.* Antinociceptive activity of ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem, Meliaceae) fruit through opioid, glutamatergic and acid-sensitive ion pathways in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 408-416, 2018.

BELMONTE, C.; *et al.* What Causes Eye Pain? **Current Ophthalmology Reports**, v. 3, n. 2, p. 111–121, 2015.

BENNETT, M. *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic cancer-related pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 38-44, 2019.

CALIXTO, J. B.; *et al.* Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology & Therapeutics** v. 106, p. 179–208, 2005).

DO NASCIMENTO, J. E. T.; *et al.* The orofacial antinociceptive effect of 85 Kaempferol-3-O-rutinoside, isolated from the plant *Ouratea fieldingiana*, on adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 1030-1036, 2018.

EVARISTO, F. F. V.; *et al.* Antibacterial effect on mature biofilms of oral streptococci and antioxidant activity of $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene from *Combretum leprosum*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 12, p. 3296-3306, 2017.

EVARISTO, F. F. V.; *et al.* Antimicrobial effect of the triterpene $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxylup-20(29) -ene on planktonic cells and biofilms from gram positive and gram negative bacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

HORINOUCI, C. D. da S.; *et al.* Anti-proliferative and anti-inflammatory effects of $3\beta,6\beta,16\beta$ -Trihydroxylup-20(29)-ene on cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p. 298- 308, 2017.

JARDIN, I. *et al.* TRPs in Pain Sensation. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. 8, p. 392, 2017.

KALUEFF, A.V.; *et al.* Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 297–309, 2016.

LACOUTH-SILVA, F.; *et al.* The effect of $3\beta, 6\beta, 16\beta$ -trihydroxylup-20(29) -ene lupane compound isolated from *Combretum leprosum* Mart. on peripheral blood mononuclear cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, n. 420, p. 1-10, 2015.

LAUNAY, P. S.; *et al.* Ocular inflammation induces trigeminal pain, peripheral and central neuroinflammatory mechanisms. **Neurobiology of Disease**, v. 88, p. 16-28, 2016.

LENARDÃO, E. J.; *et al.* Antinociceptive effect of essential oils and their constituents: An update review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 3, p. 435–474, 2016.

LIRA, S. R. S.; *et al.* Preliminary Studies on the Analgesic Properties of the Ethanol Extract of *Combretum leprosum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 213–215, 2003.

LIU, X. B; *et al.* An *in vivo* and *in vitro* assessment of the anti-inflammatory, antinociceptive, and immunomodulatory activities of *Clematis terniflora* DC. extract, participation of auranitiamide acetate. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 169, n. 287-294, 2015.



LONGHI-BALBINOT, D. T.; *et al.* Further analyses of mechanisms underlying the antinociceptive effect of the triterpene 3β , 6β , 16β -trihydroxylup-20(29)-ene in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 653, p. 32-40, 2011.

LONGHI-BALBINOT, D. T. *et al.* Spinal antinociception evoked by the triterpene 3β , 6β , 16β -trihydroxylup-20(29)-ene in mice: evidence for the involvement of the glutamatergic system via NMDA and metabotropic glutamate receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 623, n. 30, p. 234-243, 2009.

MAGALHÃES, F. E. A.; *et al.* Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. **Zebrafish**, v. 4, n. 5, p. 422-429, 2017.

MAGALHÃES, F. E. A.; *et al.* Orofacial antinociceptive effect of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 1575–1585, 2018.

OECD. Fish, acute toxicity test. **Guideline for the testing of chemicals**, 1992.

PIETROVSKI, E. F.; *et al.* Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3β , 6β , 16β -trihydroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 83, n. 1, p. 90-99, 2006.

RENNEKAMP, A. J.; PETERSON, R. T. 15 Years of Zebrafish Chemical Screening. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 24, p. 58–70, 2015.

SALAT, K.; FILIPE, B. Antinociceptive activity of transient receptor potential channel TRPV1, TRPA1, and TRPM8 antagonists in neurogenic and neuropathic pain models in mice. **Journal of Zhejiang University-Science B**, v. 16, n. 3, p. 167–78, 2015.

SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4–5, 2012.

SOARES, I. C. R.; *et al.* Oleanolic acid promotes orofacial antinociception in adult zebrafish (*Danio rerio*) through TRPV1 receptors. **Chemico-Biological Interactions**, v. 299, p. 37-43, 2018.

VELOSO, C. C.; *et al.* Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K⁺ channels pathway activation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 755, p. 1-5, 2015.

VIAU, C. M.; *et al.* The natural triterpene $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxy-lup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 14, 2014.

ZAMANIAN, F.; *et al.* Morphine suppository versus indomethacin suppository in the management of renal colic: randomized clinical trial. **Pain Research and Treatment**, v. 2016, p. 498-585, 2016.



ARTIGO 8

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DO ESUDATO DA SIRIGUELA (*SPONDIAS PURPUREA L.*)

DOI 10.47402/ed.ep.c20221826820

Henety Nascimento Pinheiro

Flávia Freitas Veloso

Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu

RESUMO

Polissacarídeos extraídos de exsudatos de plantas são comumente estudados na comunidade acadêmica em sistemas de liberação de fármacos, como bioadsorvente, e outras finalidades. No Brasil existe uma grande busca por exsudatos que substituam outros que não possuem ocorrência na América Latina. Este trabalho teve como objetivo, extrair goma do exsudato de siriguela localizadas na região metropolitana de Fortaleza. A caracterização do polímero foi realizada por titulação potenciométrica, análises em espectroscopia de Infravermelho e RMN C13, além da determinação da viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica por viscosímetro Cannon-Feske. A extração da goma teve um rendimento médio de 63,83%. A titulação apresentou um grau de acidez de 6,27% em termos de ácido galacturônico e uma massa viscosimétrica de 712105.86 g/mol.

PALAVRAS-CHAVE: Polissacarídeos naturais; *Spondias purpurea L.*; Viscosidade.

INTRODUÇÃO

Gomas naturais são substâncias que podem ser definidas, de forma geral como polissacarídeos que podem se solubilizar ou absorver água, em diversas faixas de temperatura, podendo formar dispersões coloidais, soluções de alta viscosidade ou géis. (RODRIGUES, 1993). Gomas naturais podem ser extraídas de várias fontes, como exsudatos (HOSSEINI et al., 2015), sementes (DEEPAK et al., 2016), ou por processos de fermentação microbiana (REINOSO et al., 2019).

A Siriguela (*Spondias purpurea L.*) é uma planta da família das Anacardiáceas que pode ser encontrada em diversas regiões tropicais do mundo, em especial na América Latina. Uma grande parte das espécies é encontrada na Venezuela (TEIXEIRA et al., 2007), porém é uma planta muito presente, também, no México, Guatemala, Caribe e no Brasil, onde apresenta forte ocorrência na região nordeste. A Figura 1 mostra um exemplar da espécie de onde partiu o material obtido nesse estudo.



Figura 1: Siriguela, planta utilizada como material de estudo.



Fonte: elaborada pelos autores.

Essa planta carrega um importante valor econômico no cenário do cultivo de espécies frutíferas, embora não possua pomares comerciais para sua exploração, seu potencial de comercialização é considerável (GAMA et al. 2009). O último censo agropecuário realizado pelo IBGE em 1996, mostra dados importante sobre o cultivo da planta, a Tabela 1 mostra esses resultados.

Tabela 1: Produção de Siriguela no Brasil em toneladas e porcentagem por região em 1996.

	Toneladas	%
Brasil	3744	100,00
Nordeste	3372	90,06
Sudeste	184	4,91
Norte	120	3,21
Sul	35	0,93
Centro-Oeste	33	0,88

Fonte: Adaptado de IBGE (1996).

Tais resultados mostram que a espécie, na região Nordeste do Brasil, possui considerável visibilidade, porém, seu cultivo se resume a fins de comercialização da fruta, nesse sentido, o estudo e utilização de materiais extraídos de outros órgãos, como o exsudato do caule, se mostra como uma alternativa de aproveitamento da planta, na produção de polímeros naturais.

A literatura apresenta esse polissacarídeo como um material contendo galactose (59%), arabinose (9%), mannose (2%), xylose (2%) e rhamnose (2%). Existe uma fração de ácidos urônicos (26%) representado pelo ácido D-glucurônico além de material proteico residual. (MARTÍNEZ, et al. 2008). Estudos espectroscópicos da goma mostram que sua estrutura é baseada em b-D-galactopiranosose (1→3) e (1→6) ligados, bem como, arabinose, ramnose, ácido b-D-glucurônico e ácido 4-O-metil a-glucurônico como resíduos de cadeias terminais (GOTERA et al., 2005).



Este trabalho tem o objetivo de extrair exsudatos de plantas localizadas na região metropolitana de Fortaleza, assim como isolar, purificar e caracterizar a goma de acordo com seus grupamentos funcionais e suas propriedades reológicas.

METODOLOGIA

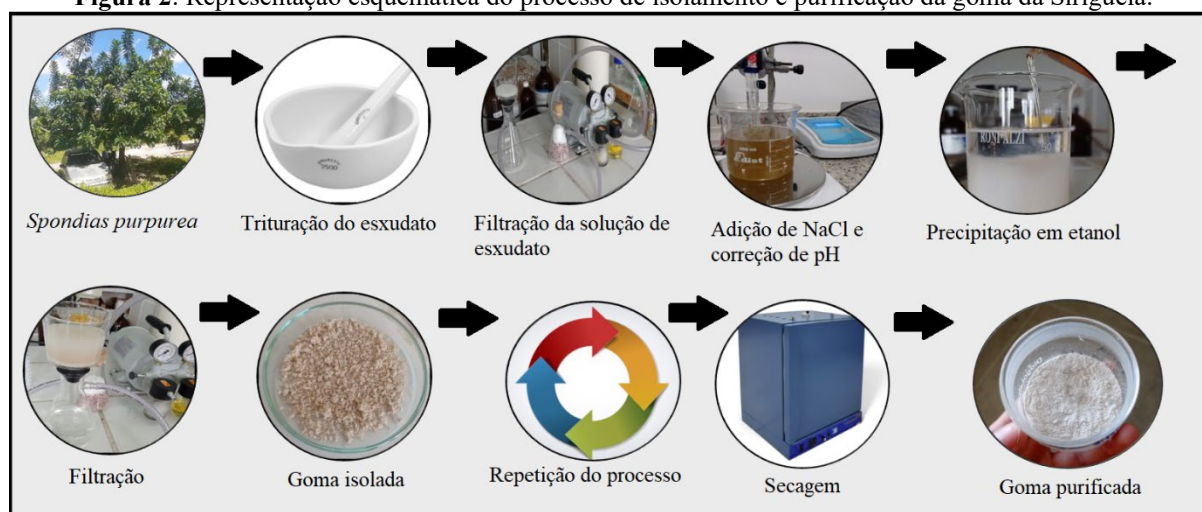
MATERIAIS

Para extração, purificação e caracterização da goma foi utilizado como reagentes: Cloreto de sódio (Neon), Etanol 96% (Neon), Acetona (Neon), hidróxido de sódio (Dinâmica) e hidróxido de potássio (Dinâmica).

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

O processo de isolamento e purificação da goma pode ser observado pela representação esquemática, descrita na Figura 2. Inicialmente houve a extração do exsudato, obtido por choque mecânico em partes do caule da árvore localizadas no município de Pacatuba-CE, o exsudato líquido foi coletado e seco em temperatura ambiente, em seguida, foi triturado em almofariz. O exsudato triturado foi solubilizado em água destilada e mantido sob agitação magnética por 24 horas. Realizou-se a primeira filtração a vácuo em funil de placa porosa G1, para retirada de resíduos. Adicionou-se à mistura 5 g de NaCl, seguido de correção de pH para 7,00. A mistura foi então precipitada em etanol 96% numa proporção de 1:4 de solução/etanol. O precipitado foi filtrado em funil G3 e lavado com etanol absoluto e acetona. O processo foi repetido por mais duas vezes como processo de purificação. Por último, a goma extraída foi seca em estufa à 50°C por 24 horas, pesada e armazenada em dessecador.

Figura 2: Representação esquemática do processo de isolamento e purificação da goma da Siriguela.



Fonte: elaborada pelos autores.



CARACTERIZAÇÃO

Titulação Potenciométrica

Para avaliar o teor de acidez na goma, em termos de ácido galacturônico, foi dissolvido 0,4g da goma em 100 ml de água destilada e em seguida titulada com KOH 0,1 M em pHmetro Luca-210. Uma curva de titulação foi obtida com os valores de pH em função do volume adicionado. Para calcular o grau de Acidez da cadeia, foi utilizado a equação 1:

$$Gacid. = \frac{178 \times V_{KOH} \times [KOH]}{C_{goma}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: V_{KOH} = volume de base gasto até o ponto de inflexão da curva, $[KOH]$ = concentração de base em Mol/L, C_{goma} = concentração de goma em g/L na amostra e 178 = massa molar do ácido galacturônico com a perda de hidroxila e hidrogênio ocasionada pela polimerização do monômero.

Viscosimetria

Os testes de viscosidade foram realizados de acordo com a metodologia de Abreu (2008). A Viscosidade específica do polímero foi obtida pela equação 2, e a viscosidade específica reduzida pela equação 3, utilizando um viscosímetro Cannon-Feske, com várias concentrações da solução diluídas em NaCl 0,2M a 25°C. Onde: η_{esp} = viscosidade específica; t = tempo de escoamento da solução; T_0 = tempo de escoamento do solvente e c = concentração percentual do polímero na solução.

$$\eta_{esp} = \left(\frac{t - t_0}{t_0} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\eta_{esp\ red} = \left(\frac{\eta_{esp}}{c} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

A viscosidade intrínseca foi obtida pelo limite da viscosidade específica reduzida, quando a concentração do polímero tende a zero, representada pela equação 4 e obtida graficamente. A massa molar viscosimétrica do polímero foi determinada pela equação de Mark-Kuhn-Houwink-Sakurada, como mostra a equação 5. Onde $a = 0,5406$ e $k = 0,01311$, valores obtidos em comparação com a goma arábica (MASUELLI, 2013).

$$\eta_{int\ rin\ sec\ a} = [\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\eta_{esp\ red} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

$$[\eta] = k (\overline{M}_v)^a \quad (\text{Eq. 5})$$



Análise de FTIR

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Shimadzu IR-tracer-100, com transformada de Fourier. Os experimentos foram realizados com amostra em pastilhas de KBr, com espectro registrado na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . Os dados por absorbância foram obtidos com 64 scans e resolução de 4 cm^{-1} .

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As amostras foram caracterizadas por RMN ^1H em um Espectrômetro Avance DRX 500 MHz (Bruker) usando água deuterada (D_2O) como solvente. Foram realizadas 128 transientes. 20 mg da amostra foram dissolvidos em 0,5 mL de solvente deuterado. Os espectros foram analisados usando o software TopSpin 3.6.2.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Seguindo toda a rota de extração e purificação, a obtenção da goma foi efetuada com sucesso, onde obteve-se em 5 lotes um rendimento médio de 63,83%. Os resultados das massas de exsudatos dissolvidos e de gomas obtidas, bem como rendimentos obtidos nos processos estão apresentados na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2: Massa de exsudato, massa da goma obtida e rendimento.

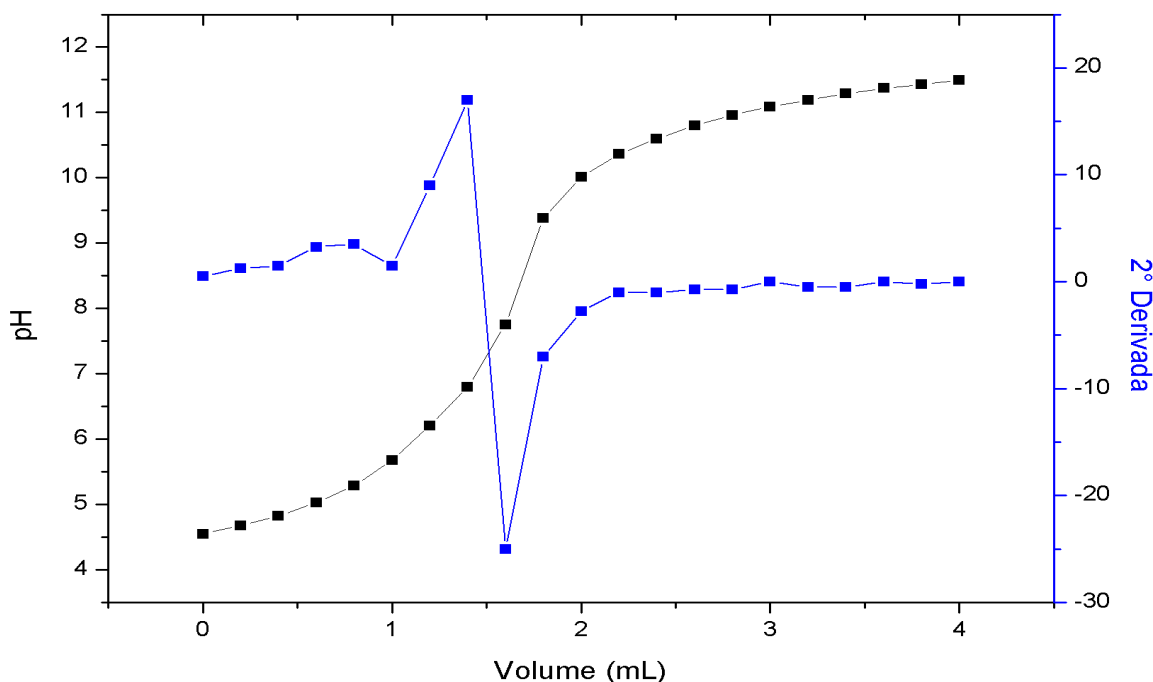
Massa de Exsudato	Massa de goma obtida	Rendimento (%)	
5,0021	3,5670	71,31	
5,0089	2,5207	50,32	
5,0105	3,4251	68,36	
5,0620	2,7851	55,02	
5,0008	3,1920	63,83	
Média	$5,0089 \pm 0,03$	$3,1920 \pm 0,44$	$63,83 \pm 0,09$

Fonte: elaborada pelos autores.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a produção da goma é viável e apresenta porcentagens de rendimento semelhantes a goma do cajueiro, como consta em um estudo feito por Rodrigues e colaboradores (1993). Dessa forma, em termos de produção, o exsudato da Siriguela pode ser uma fonte importante para o isolamento de polissacarídeos.

Titulação Potenciométrica

Após a realização da titulação, determinou-se o volume do ponto de inflexão graficamente utilizando Origin, através do método da Segunda derivada, com os dados dispostos na Figura 3.

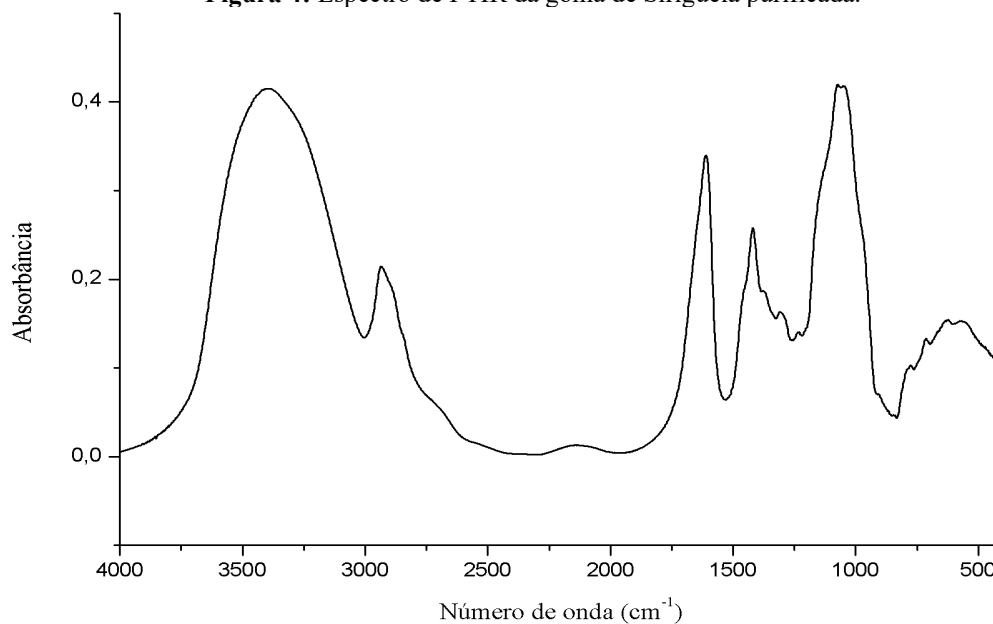
**Figura 3:** Curva de titulação da goma da siriguela purificada.

Fonte: elaborada pelos autores.

O ponto de inflexão determinado com o valor de 1,60 mL é referente à neutralização dos íons H_3O^+ presentes nos grupamentos de ácidos carboxílicos dos monômeros de ácido galacturônico. Com esse volume foi determinado o grau de acidez, cujo valor foi igual a 6,27%. Essa considerável influência no pH da solução de goma, corrobora com a alta porcentagem de ácidos urônicos na cadeia, citados anteriormente. Essa acidez relativa, pode estar relacionada com características da própria planta, onde estudos mostram que os frutos da siriguela possuem alta taxa de acidez (ORTEGA *et al.*, 2019).

Análise de FTIR

Os picos de absorção de grupamentos funcionais de importante determinação em polissacarídeos pode ser observadas na Figura 4. Onde São evidenciadas bandas na região de 3405 cm^{-1} pertencentes a deformação axial de grupamento hidroxila (-OH), grupamentos predominantes em polissacarídeos naturais, além disso, bandas em 2930 cm^{-1} são características de deformação axial e angular de hidrogênios (-H) ligados a carbonos sp^3 . Um pico intenso em 1608 cm^{-1} está relacionado ao estiramento simétrico do grupamento carboxilato (-COO-), bem como o pico na região de 1419 cm^{-1} , atribuído ao estiramento assimétrico do grupo, ambos oriundos de ácido galacturônico, que tem sua banda em 3000 cm^{-1} sobreposta por absorções de -OH que possuem predominância nos monômeros majoritários.

**Figura 4:** Espectro de FTIR da goma de Siriguela purificada.

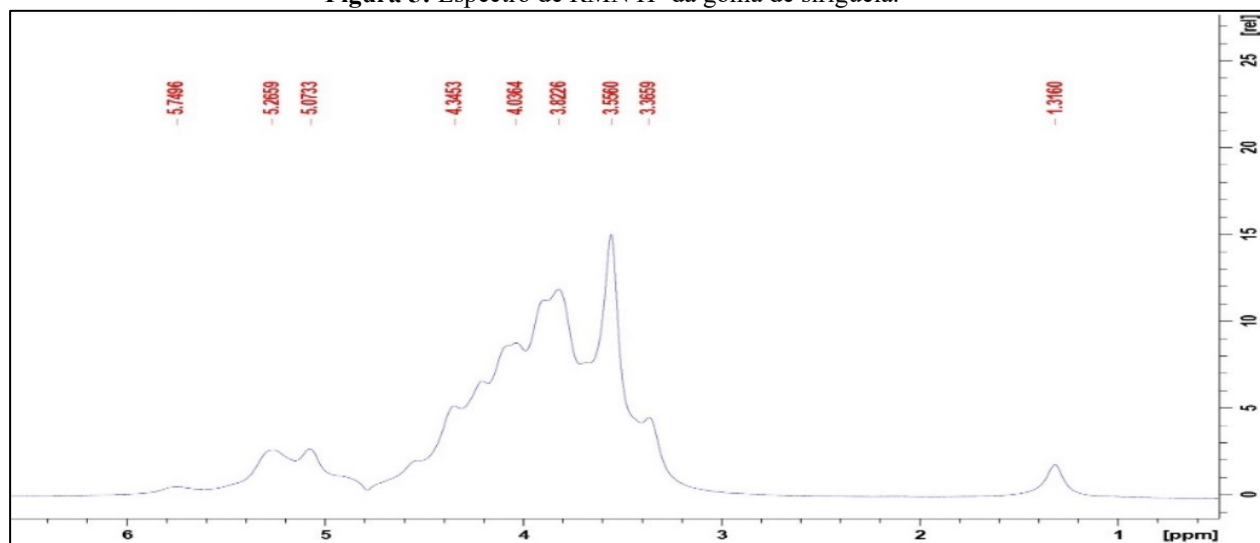
Fonte: elaborada pelos autores.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear RMN- ^1H

A Figura 5 revela o espectro de ressonância magnética nuclear para a goma de siriguela. De acordo com o espectro gerado nota-se a presença de prótons anoméricos característicos de polissacarídeos, onde podem ser observados na região 4,34 ppm até 6 ppm devido à presença de -D-glicose (5,75 ppm), -l-ramnose (5,27 ppm), -d-galactose (1 \rightarrow 3) (5,07 ppm) e ácido -d glucurônico (4,34 ppm), há também, deslocamentos químicos em 4,44 ppm e 4,95 ppm que são atribuídos a H-1 de galactose e ramnose, respectivamente. Os sinais H-2 a H-5 são sobrepostos nas regiões de 3,3 até 3,8 ppm, assim como o sinal em 1,32 ppm é devido aos prótons metil da ramnose. (LIMA, 2018)



Figura 5: Espectro de RMN H¹ da goma de siriguela.



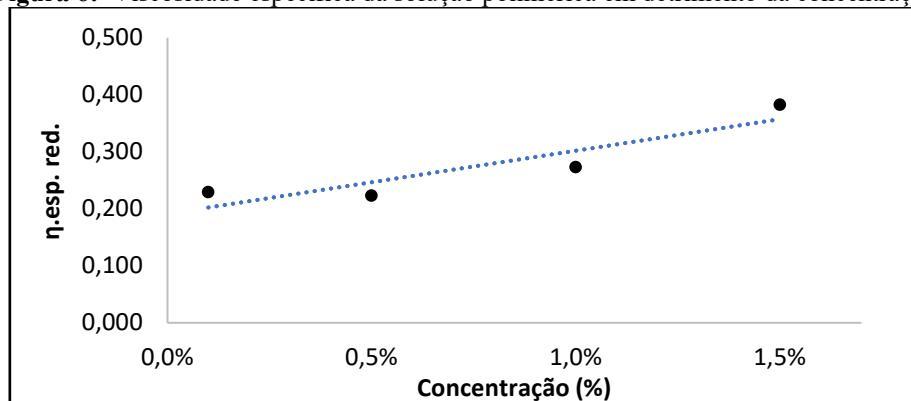
Fonte: elaborada pelos autores.

Viscosimetria

De acordo com as medidas de tempo de escoamento, aplicados a equação 2 e com os valores de viscosidade específica reduzida da equação 3, foi obtido o gráfico disposto na Figura 6.

A partir do gráfico e pela extrapolação da reta quando a concentração é zero, foi obtido o valor de viscosidade intrínseca de 19,12 ml/g, e a partir desse valor foi calculada uma massa molar de 712105.86 g/mol do polímero de acordo com a equação 5, comparando os valores de viscosidade com a goma arábica numa temperatura de 25°C.

Figura 6: Viscosidade específica da solução polimérica em detrimento da concentração.



Fonte: elaborada pelos autores.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Polissacarídeos Naturais são materiais extensamente explorados para diversas finalidades, um exemplo desses materiais são as gomas que são polissacarídeos solúveis em



água que podem ser de alta ou baixa viscosidade. A forma mais utilizada de extração e purificação é a partir do exsudato da planta e por precipitação em etanol. O trabalho teve o objetivo de purificar e caracterizar a goma quanto a acidez relativa, onde o resultado aponta a influência do ácido galacturônico nas cadeias terminais do polissacarídeo. Quanto as características reológicas, a goma apresentou, em temperatura ambiente, uma viscosidade intrínseca semelhante a goma arábica, outra goma natural obtida de exsudato. Essa semelhança de propriedade pode ser um ponto importante a ser considerado na utilização da goma da siriguela para substituir a goma arábica. O rendimento dos processos foi satisfatório, mostrando que a utilização desse polissacarídeo, pode ser uma alternativa sustentável no aproveitamento da planta quando cultivada no Brasil. Além disso, suas características estruturais foram confirmadas com sucesso pelas análises espectroscópicas por RMN H^1 , confirmando os monômeros, arabinose, galactose, ácido galacturônico e ramnose anteriormente constatados na literatura. Os grupamentos funcionais determinados por espectroscopia FTIR, apontam a presença de OH e COO⁻, confirmando a presença majoritária de cadeias de monômeros, comuns em outras gomas de origem natural. Tais dados mostram a goma como um polissacarídeo de fácil obtenção na região do semiárido brasileiro, e pode substituir polímeros importados como a goma arábica.

REFERÊNCIAS

ABREU, F. O. M. S. Síntese e caracterização de Hidrogéis biodegradáveis a base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos. 2008. 182 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

DEEPAK, M., SHEWETA B., KHATKAR B.S., Effect of partially hydrolyzed guar gum on pasting, thermo-mechanical and rheological properties of wheat dough, **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016.

GAMA, I. C. S. L. Seriguela (*spondias purpurea* l.): propriedades físico-químicas e desenvolvimento de geleia de doce de corte e aceitabilidade desses produtos. In: Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos, repositório. Seropédica-RJ, 2009.

GOTERA, O. G. *et al.* 1D- and 2D-NMR spectroscopy studies of the polysaccharide gum from *Spondias purpurea* var. *lutea*. **Food Hydrocolloids**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 37-43, jan. 2005.

HOSSEINI, A., JAFARI, S. M., MIRZAEI, H., ASGHARI, A., AKHAVAN, S., Application of image processing to assess emulsion stability and emulsification properties of Arabic gum, **Carbohydrate Polymers**, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo agropecuário 1995-1996: Brasil, Rio de Janeiro, 1998.



LIMA, M. R.; PAULA, H. C.B.; ABREU, F. O. M. S.; SILVA, R. B.C. da; SOMBRA, F. M.; PAULA, R. C. M. de. Hydrophobization of cashew gum by acetylation mechanism and amphotericin B encapsulation. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 108, p. 523-530, mar. 2018.

MARTÍNEZ, M. *et al.* New structural features of Spondias purpurea gum exudate. **Food Hydrocolloids**, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 1310-1314, out. 2008.

MASUELLI, M. A.; Hydrodynamic Properties of Whole Arabic Gum. **American Journal Of Food Science And Technology**, Chacabuco, v. 1, n. 3, p. 60-66, nov. 2013.

ORTEGA, N. F. *et al.* Características físicas e químicas dos frutos Spondias purpurea L. e Campomanesia adamantium. **Brazilian Journal Of Food Research**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 101, 1 jan. 2019. Universidade Tecnológica Federal do Parana (UTFPR).

REINOSO, D. *et al.* Rheological characterisation of xanthan gum in brine solutions at high temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, n. 8, p. 103-109, 2019.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. de; COSTA, S. M. O. Métodos de Isolamento de Gomas Naturais: Comparação Através da Goma do Cajueiro. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 31-36, 1993.

TEIXEIRA, D.M.A. *et al.* Spondias purpurea Exudate polysaccharide as affinity matrix for the isolation of a galactose-binding-lectin. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 70, n. 4, p. 369-377, nov. 2007.



ARTIGO 9

MICROENCAPSULAÇÃO DA RIBOFLAVINA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

DOI 10.47402/ed.ep.c20221827920

Silvana Silveira de Farias
Sônia Maria Costa Siqueira
Arcelina Pacheco Cunha
Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle
Selene Maia de Morais
Nágila Maria Pontes Silva Ricardo

RESUMO

A riboflavina (Rf) é uma vitamina hidrossolúvel essencial para os seres vivos, atua como cofatora em diversos processos metabólicos de oxido-redução no sistema celular, no entanto, apresenta pouca biodisponibilidade em alimentos, é fotossensível e pode sofrer reações de degradação. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi microencapsular a Rf pela técnica de “*spray drying*”, visando à preservação ou o aprimoramento das suas propriedades funcionais. Para microencapsulação utilizou-se como matriz de revestimento o biopolímero galactomanana (G), extraído de endospermas da *Delonix regia*, e o surfactante F127, nas concentrações de 0,10%. A Rf e as micropartículas produzidas (GRf e GRfF1) foram caracterizadas por meio de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV) e avaliadas quanto a sua atividade microbiológica contra os fungos *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans*, pela técnica de Microdiluição em caldo. O biopolímero (G) foi caracterizado através da análise de Ressonância Magnética de ¹H, em que foi determinada a relação manose/galactose de 4,13:1,00. A espectroscopia de IV mostrou as bandas de absorção presentes nas micropartículas, apontando que não houve interação química entre Rf e (G). A eficiência de encapsulação nas micropartículas foi de 87,14 - 88,53%. A atividade microbiológica das micropartículas (GRf) realizadas contra o *T. rubrum* mostrou que tanto a Rf quanto as micropartículas possuem capacidade inibitória do fungo.

PALAVRAS-CHAVE: Encapsulação. Vitamina B2. Antifúngico

INTRODUÇÃO

A microencapsulação pode ser definida como um processo no qual pequenas partículas ou gotículas são circundadas ou incorporadas por uma matriz de revestimento homogênea ou heterogênea (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Essa barreira serve para inibir interações químicas desfavoráveis e ajudar na liberação de ingredientes bioativos (KATOUIAN; JAFARI, 2016).

Diversos produtos de origem natural servem como matriz de revestimento para microencapsulação, tais como: amidos, proteínas, gomas, ciclodextrinas e lipossomas. Em geral, a técnica de microencapsulação protege o material encapsulado de reações, por exemplo,



com luz, oxigênio e água; melhora a manipulação e o fluxo da substância encapsulada, favorece a liberação controlada e é útil para mascarar sabores indesejáveis (JAFARI *et al.*, 2008).

O processo da microencapsulação se dá por métodos físicos, químicos e físico-químicos. Os métodos mais comuns são: atomização (*spray drying*), extrusão, leiteo fluidizado, coacervação, liofilização, secagem em tambor, inclusão molecular e inclusão em lipossomas (AZEREDO, 2008; KHADIRAM *et al.*, 2015). A escolha do método depende do tamanho, biocompatibilidade e biodegradabilidade das micropartículas, assim como das características do núcleo, matriz de revestimento, taxa de liberação do núcleo e custos de produção (NESTERENKO *et al.*, 2013).

O método de microencapsulação por atomização, também conhecido como *spray drying* é umas das tecnologias industriais mais utilizadas e tem como princípio de secagem a pulverização, onde o material é seco por aspersão de forma simples e rápida (DE VOS *et al.*, 2010; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

A microencapsulação de bioativos é de grande interesse para a indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. As micropartículas, nanocápsulas e nanoesferas produzidas por meio da microencapsulação servem como transportadores de droga, capazes de promover uma liberação de forma controlada (HONG; LEE; KIM, 2009; SANGUANSRI *et al.*, 2013). Na indústria alimentícia, a microencapsulação é adequada para produção de alimentos funcionais e nutracêuticos, melhora as propriedades e aumenta o período de vida útil da substância encapsulada (BETORET *et al.*, 2011; PÉREZ-MAZIÁ *et al.*, 2015).

As vitaminas são substâncias essenciais para os seres vivos, no entanto, elas são sensíveis a fatores como luz, temperatura, oxigênio e outros (DÍAZ *et al.*, 2009). Uma vez que a microencapsulação é definida como a criação de uma barreira para inibir interações químicas desfavoráveis e para liberação de ingredientes bioativos, no caso das vitaminas, a microencapsulação tem como principais características: protegê-las do ambiente externo, promover a liberação controlada, melhorar as propriedades de fluxo, reduzir excessos, mascarar cores e sabores indesejáveis (KATOUZIAN; JAFARI, 2016).

Nessa perspectiva, essa pesquisa visou microencapsular a riboflavina (vitamina B2) com galactomanana extraída da *Delonix regia*, determinar suas características físico-químicas, avaliar sua atividade microbiológica contra a espécie *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans*; para possíveis aplicações farmacológicas e ou nutracêuticas.



METODOLOGIA

EXTRAÇÃO DA GALACTOMANANA

A galactomanana foi obtida de endospermas das sementes da *D. regia*, coletadas na Universidade Estadual do Ceará, com exsicata registrada no Herbário Prisco Bezerra com n° 53140. As sementes foram submetidas a quatro extrações aquosas de 900 mL cada, sob uma temperatura de 75°C e 700 rpm em agitador magnético Fisatom modelo 710, conforme metodologia proposta por Vieira *et al.* (2007), com algumas adaptações.

PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

Uma solução aquosa de galactomanana 0,325% (m/v) foi preparada e mantida à 60°C por 6 horas, em agitador magnético modelo Fisatom 710 com 700 rpm de agitação para completa dissolução do polímero. Nesta solução foi adicionado 260 mg de riboflavina na proporção 10:1(G:Rf), a qual permaneceu sob agitação por 1 hora à 700 rpm, protegido da luz. Foram também produzidas micropartículas de Rf com G e F127 na concentração 0,10% (GRfF1), mantendo as mesmas condições das GRf.

Para produção das micropartículas de riboflavina encapsulada com galactomanana (GRf) as soluções foram submetidas à técnica de *spray drying* em mini *Spray-Dryer* modelo Büchi B-290, com temperatura de entrada de 130°C, temperatura de saída 100°C, fluxo de bomba 10% e eficiência do exaustor de 100%.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Ressonância Magnética Nuclear ¹H da galactomanana

A amostra de galactomanana da *D. regia* foi diluída em D₂O na concentração de 28 mg.1mL⁻¹ e mantida em água deuterada nessa concentração por 72 horas, sob a temperatura de 80°C. O espectro de RMN ¹H foi obtido em equipamento Bruker Avance DRX-500, equipado com uma sonda dual de 5 mm de diâmetro, detecção inversa, gradiente de campo no eixo z, magnitude de 10A.

Espectroscopia de infravermelho FTIR

Os espectros de infravermelho da Rf, G e micropartículas GRf foram realizados em espectrofotômetro modelo Shimadzu FT-IR 8300, as amostras foram trituradas com brometo de potássio (KBr) para obtenção de pastilhas. As bandas de absorção na região do infravermelho foram realizadas em uma janela espectral de 500 – 4000 cm⁻¹.



Curva padrão

Foi preparada uma solução padrão de riboflavina em água destilada com concentração de 100 ppm, dessa solução foram retiradas diferentes alíquotas as quais foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, a fim de se obter uma curva padrão nas seguintes concentrações, em ppm (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80,90, 100).

Todo o processo foi realizado sem exposição das amostras a luz. Cada solução foi submetida a espectroscopia na região do ultravioleta-visível UV-VIS em 444nm, acondicionadas em cubetas de quartzo, usando a água destilada como branco. Com a curva padrão obtivemos a equação de regressão linear entre os valores das absorbâncias e a concentração da riboflavina em ppm. Com a curva padrão obtivemos a equação (I) de regressão linear entre os valores das absorbâncias e a concentração da riboflavina em ppm.

$$Y = 0,0191 x + 0,1449 \text{ Equação (I); onde obtivemos } R^2 = 0,9871.$$

Eficiência de encapsulação

Foram preparadas soluções com 2 mg das micropartículas em 10 mL de água destilada, a fim de se obter uma solução de 200 ppm, essas soluções foram submetidas a espectroscopia na região do ultravioleta-visível em 444 nm.

A concentração de riboflavina foi determinada com base na curva padrão, e a eficiência de encapsulação foi obtida pela equação (II):

$$EE(\%) = \left[\frac{QTD}{QTA} \right] \times 100 \quad \text{Equação (III)}$$

Onde, EE= Eficiência de encapsulação; QTD=Quantidade de riboflavina determinada no sistema polimérico, QTA= Quantidade de riboflavina teoricamente adicionada ao sistema.

O teor de riboflavina encapsulada foi calculado através da equação (IV):

$$TGRf(\%) = \left[\frac{TTRf \cdot EE}{100} \right] \quad \text{Equação (IV)}$$

TGRf(%)= Teor de riboflavina encapsulada com galactomanana; TTRf= Teor teórico de riboflavina encapsulada; EE(%)= Eficiência de encapsulação.

Atividade microbiológica

Na realização da atividade antifúngica, o preparo do inóculo se deu a partir de cepas do *T. rubrum* e da *C. albicans* cultivadas em ágar Sabouraud durante 5 e 2 dias a 28°C,



respectivamente. Para o método da microdiluição em caldo, os inóculos de *C. albicans* foram padronizados em $(2,5 - 5 \times 10^3 \text{ UFC mL}^{-1})$ e *T. rubrum* $(5 \times 10^4 \text{ UFC.mL}^{-1})$. As suspensões foram diluídas na proporção 1:2000 para *C.albicans* e 1:500 para *T. rubrum*, no meio de cultura RPMI 1640, de forma que as concentrações finais dos inóculos mantivessem o valor similar ao padrão.

A concentração inibitória mínima (CIM) para *C. Albicans* foi determinada por meio do método de microdiluição em caldo, conforme o Instituto Europeu de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI M27-A3, 2008). O ensaio de microdiluição para o *T.rubrum* foi realizado em concordância com o documento M38 - A2 (CLSI M38- A2, 2008). O cetoconazol foi utilizado como droga controle e todos os testes foram realizados em duplicata. As concentrações fungicidas mínimas (CFM) tanto para *C. albicans* e *T. rubrum* foram determinados segundo Fontenelle *et al.* (2007, 2008) .

Análise estatística

Os dados da eficiência de encapsulação foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste Turkey ao nível de 5% de probabilidade, usando o programa de estatística Assistat 7.7 beta.

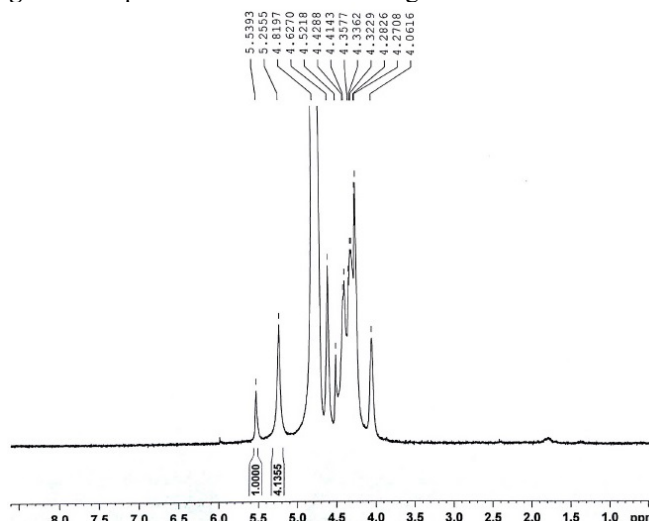
RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H (RMN ^1H)

O espectro de RMN ^1H para o polímero galactomanana mostrou sinais relativos aos hidrogênios anoméricos da manose em 5,25 ppm; e da galactose em 5,53 ppm, os quais foram integrados para obtenção da razão manose/galactose da galactomanana que foi estimada em 4,13:1,00 (Figura 1).



Figura 1: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear ^1H da (G).



Fonte: Elaborada pelos autores.

As atribuições dos picos de ressonância foram feitas de acordo com a literatura que apresentou resultados similares aos encontrados para galactomananas extraídas da *D. regia* (SOUZA *et al.*, 2015; TAMAKI; TEREYUA, TAKO, 2010). Galactomanana obtida de outra espécie de planta (*Cassia fastuosa*) apresentou razão similar, que foi de 4,0:1,0 (TAVARES, 1994), entretanto, a razão observada para *Cassia javanica* foi menor (3,2:1,0) (ANDRADE *et al.*, 1999).

Na região anomérica foram observados dois sinais diferentes, o sinal em 5,25 ppm e 5,53 ppm, identificados como correspondente ao anel β - D manopirranose e α - D galactopirranose, valores semelhantes foram encontrados para galactomananas de outras espécies (VIEIRA *et al.*, 2005).

ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO – FTIR

O espectro de infravermelho da galactomanana (Figura 2) mostrou uma banda larga de absorção em 3398 cm^{-1} devido ao estiramento vibracional dos grupos (O – H) presentes na molécula. Na região de 2910 cm^{-1} houve absorção referente as ligações (C – H). A absorção em 1150 cm^{-1} é relacionada ao estiramento vibracional (C – O) do anel pirranose, o pico em 958 cm^{-1} é atribuído à deformação axial (C – OH) do C – 4 do anel, bandas de absorção em 815 e 876 cm^{-1} estão relacionadas a ligações anoméricas dos grupos α – D – Galactopirranose e β – D – manopirranose, respectivamente.

Essas duas bandas espectrais apontam a presença de ligações glicosídicas α e β , características de polímero tipo galactomanana. As frequências de absorções estão de acordo

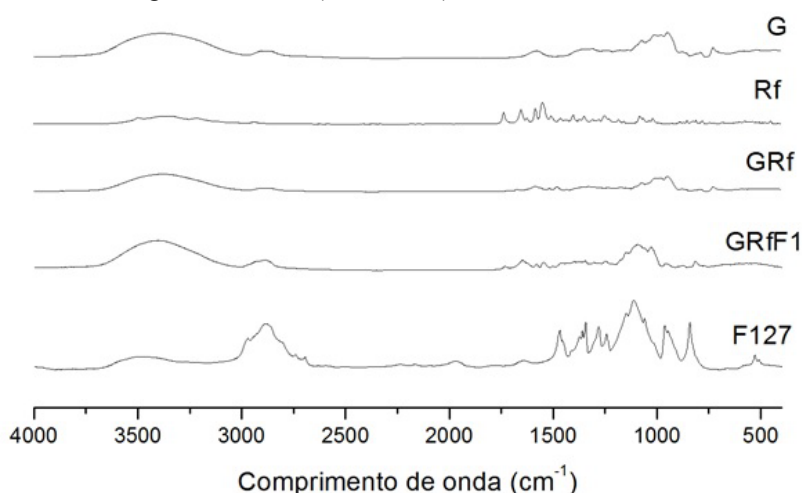


com as estruturas típicas de galactomanana da *D. regia* e de outras espécies (CERQUEIRA *et al.*, 2011; FIGUEIRO *et al.*, 2004; SIQUEIRA *et al.*, 2015).

O espectro de infravermelho da riboflavina (Figura 2) mostra uma banda de absorção característica de modos de estiramento (O – H) em 3490, 3351 e 3211 cm^{-1} . A ligação (N – H) presente na molécula absorve na mesma região. As bandas de estiramento (C = O) carbonila de amida em 1733 cm^{-1} , (C = N) sistema conjugado em 1545 cm^{-1} e (C – N) em 1393 cm^{-1} . Absorções similares são reportadas na literatura como característica dos grupos funcionais presentes na riboflavina (MALELE *et al.*, 2010; REFAT; MOUSSA; MOHAMED, 2011).

Os espectros de infravermelho das micropartículas não apresentaram novas bandas de absorção, nem mudanças significativas na posição dos picos de absorção, o que sugere que não houve interação química entre a vitamina, a galactomanana e o F127; resultados semelhantes são reportados na literatura (SAGIRI; PAL; BASAK, 2014; PIROOZANIA *et al.*, 2012).

Figura 2: Espectro de infravermelho da galactomanana (G), riboflavina (Rf), micropartículas de riboflavina com galactomanana (GRf, GRf1) e surfactante F127.



Fonte: Elaborada pelos autores.

A presença da riboflavina nas micropartículas pode ser confirmada pela banda em 1545 cm^{-1} presente tanto nas GRf como na GRf1, característico do sistema conjugado C=N da vitamina, isso denota que parte dos cristais da riboflavina estão adsorvidos nas superfícies das micropartículas.

EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A concentração total de fármaco é geralmente determinada pela completa dissolução das nanopartículas em um solvente adequado. Por conseguinte, a concentração de fármaco



associada às microestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre.

Através das equações (I) e (II) foi possível calcular a eficiência de encapsulação da riboflavina com a galactomanana (Tabela 1) na proporção 10:1 (G: Rf) e o teor de riboflavina incorporado ao sistema polimérico.

Tabela 1: Eficiência de encapsulação das micropartículas de riboflavina/galactomanana.

Amostra	TTGRf (%)	EE(%)	TGRf (%)	TGRf (mg)
GRf	10%	87,22±0,84 ^b	8,72±0,12 ^b	0,174±0,09 ^a
GRfF1	10%	88,53±0,65 ^a	8,85±0,10 ^a	0,177±0,10 ^a

GRf: Riboflavina encapsulada com galactomanana

GRfF1: Riboflavina encapsulada com galactomanana e F127 (0,10%)

TTRf: Teor teórico de riboflavina encapsulada com galactomanana

EE: Eficiência de encapsulação

TGRf: Teor de riboflavina encapsulada

^{a,b} As letras sobrescritas quando são iguais denotam que não houve diferenças significativas entre as amostras (p<0,05)

Fonte: Elaborada pelos autores.

A eficiência de encapsulação (EE) nas condições propostas aponta que as micropartículas de GRf e GRfF1 não sofreram grandes alterações, tiveram um teor de eficiência considerável, variando de 88,53 a 87,22%. Na presença do surfactante F127 (0,10%), as micropartículas apresentaram um aumento da eficiência de encapsulação. Os valores de EE encontrados em ambos os casos GRf e GRfF1 são superiores ao citado na literatura por Azevedo *et al.* (2014), em que no processo de encapsulação da vitamina B₂ com nanopartículas de alginato/quitosana por pré-gelificação ionotrópica obtiveram 55,9 ±5,6% de eficiência.

Os resultados obtidos nessa pesquisa estão em consonância com os encontrados por Bou *et al.* (2014) ao encapsularem a riboflavina através de emulsões com diferentes lipídios, onde a maior eficiência de encapsulação foi com óleo de chia, cerca de 85,4% ± 0,79.

ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

O crescimento fúngico das cepas leveduriformes de *C. Albicans* não foi inibido pela ação da Rf e das micropartículas encapsuladas com galactomanana (GRf). Já as cepas do fungo dermatofítico *T. Rubrum* mostraram-se sensíveis a riboflavina e as micropartículas de Rf encapsuladas com biopolímero G (Tabela 2).

**Tabela 2:** Concentração Inibitória Mínima das micropartículas encapsuladas com galactomana (GRf e GRfF1) e Rf frente ao *Trychophyton rubrum*.

Cepas	1. GRf(mg/mL)		2. GRfF1(mg/mL)		3. Rf(mg/mL)		Cetoconazol (ug/ml)
	CIM	FMC	CIM	FMC	CIM	FMC	
LABMIC 0205	0,009	0,019	0,15	0,31	0,004	0,008	1,0
LABMIC 0206	0,019	0,039	0,15	0,31	0,009	0,018	2,0

GRf: Riboflavina encapsulada com galactomanana; GRfF1: Riboflavina encapsulada com galactomanana e F127 (0,10%); Rf: Riboflavina LABMIC: Laboratório de Microbiologia; MIC: Concentração inibitória mínima; MFC: Concentração fungicida mínima.

Fonte: Elaborada pelos autores.

O CIM obtido pelas micropartículas variou de 0,009-0,15 mg/mL, esses resultados apontaram que o processo de microencapsulação manteve a atividade antifúngica da riboflavina contra o *T. rubrum* e revelaram não haver necessidade do acréscimo do F127 nas micropartículas para que haja inibição do crescimento fúngico nas cepas testadas.

ENDO *et al.* (2012) verificaram que as micropartículas produzidas a partir do processo de microencapsulação do extrato de romã com alginato ou quitosana por *spray drying* preservaram a atividade antifúngica contra *C. albicans*. Na microencapsulação do tioconazol, também houve retenção da atividade antifúngica contra *C. albicans*, os processos de desidratação nos quais nanocápsulas e nanoemulsões são submetidos não modificam sua atividade, o que denotou a manutenção de sua ação (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Desta forma, as micropartículas relatadas nesse trabalho tornam-se promissoras para elaboração de formulações capazes de inibir o *T. rubrum*, apenas com o biopolímero G e a Rf, pois ambos apresentam boas características de biocompatibilidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de microencapsulação da Rf com G por *Spray Dryer* mostrou ser satisfatório, o método usado apontou eficiência de encapsulação de 87,22-88,53%. A técnica de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H permitiu analisar a estrutura do biopolímero utilizado e a espectroscopia de infravermelho possibilitou o reconhecimento das impressões digitais das micropartículas, as quais revelaram não haver interação química entre a Rf e a G, devido não haver o surgimento de novas bandas de absorção nos espectros.

No entanto, assim como Schaffazick *et al.* (2003) reportaram, um dos desafios da encapsulação é a elucidação da forma de associação do bioativo com a matriz polimérica, para que sejam otimizados a taxa de associação e o perfil de liberação dessas substâncias.



A atividade microbiológica das micropartículas contra o fungo *T. rubrum* torna relevante novos ensaios em pesquisas futuras, de forma que possa ser associado o valor nutricional de alimentos fortificados com riboflavina como uma alternativa para inibição de doenças causadas por esse tipo de fungo.

O estudo da eficiência de encapsulação revelou que a (G) é um biopolímero compatível para o processo de microencapsulação da riboflavina, e que não há necessidade de adição do F127, o que melhora ainda mais o processo, pois torna mais baixo o custo e possibilita que sejam produzidas micropartículas apenas com excipiente biodegradável. Portanto, a microencapsulação da Rf com (G) é viável do ponto de vista comercial e apresenta aplicabilidade que vão desde o uso em formulações farmacêuticas como também alimentares.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, C. T.; *et al.* Solution properties of the galactomannans Extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 181-185, 1999.

AZEREDO, H. M. C. D. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2008.

AZEVEDO, M. A.; *et al.* Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B 2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 141-146, 2014.

BOU, R.; COFRADES, S.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Physicochemical properties and riboflavin encapsulation in double emulsions with different lipid sources. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 621-628, 2014.

BETORET, E.; *et al.* Functional foods development: trends and technologies. **Trends in Food Science; Technology**, v. 22, n. 9, p. 498-508, 2011.

CERQUEIRA, M. A.; *et al.* Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 179-185, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 3rd ed., CLSI Standard. M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008a. 13 p.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**. 2nd ed. CLSI Standard M38. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b. 14 p.

DE VOS, P.; *et al.* Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.



DÍAZ, A. S.; *et al.* Estabilidad de vitaminas en nutrición parenteral. **Nutrición Hospitalaria**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2009.

ENDO, E. H.; *et al.* Activity of spray-dried microparticles containing pomegranate peel extract against *Candida albicans*. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10094-10107, 2012.

FIGUEIRO, S. D.; *et al.* On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan–collagen films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 3, p. 313-320, 2004.

FONTENELLE, R. O. S.; *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

FONTENELLE, R. O. S.; *et al.* Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 1383-1390, 2008.

GHARSALLAOUI, A.; *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

HONG, Y. J.; LEE, H. Y.; KIM, J. C. Preparations and temperature-dependent release properties of Pluronic F127-containing microcapsules prepared by a double emulsion technique. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 758-762, 2009

KHADIRAN, T.; *et al.* Encapsulation techniques for organic phase change materials as thermal energy storage medium: A review. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 143, p. 78-98, 2015.

KATOZIAN, I.; JAFARI, S. M. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. **Trends in Food Science; Technology**, v. 53, p. 34-48, 2016.

JAFARI, S. M.; *et al.* Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816-835, 2008.

MALELE, C. N.; RAY, J.; JONES, W. E. Synthesis, characterization and spectroscopic study of riboflavin–molybdenum complex. **Polyhedron**, v. 29, n. 2, p. 749-756, 2010.

NESTERENKO, A.; *et al.* Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469-479, 2013.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

PÉREZ-MASIÁ, R.; *et al.* Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. **Food Chemistry**, v. 168, p. 124-133, 2015.



PIROOZANIA, N.; *et al.* Encapsulation of alpha-1 antitrypsin in PLGA nanoparticles: in vitro characterization as an effective aerosol formulation in pulmonary diseases. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2012.

RIBEIRO, R. F.; *et al.* Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded polymeric nanocapsules compared to with lyophilized products. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 875-884, 2016.

REFAT, M. S.; MOUSSA, M. A. A.; MOHAMED, S. F. Synthesis, spectroscopic characterization, thermal analysis and electrical conductivity studies of Mg (II), Ca (II), Sr (II) and Ba (II) vitamin B2 complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 994, n. 1, p. 194-201, 2011.

SAGIRI, S. S.; PAL, K.; BASAK, P. Encapsulation of animal wax-based organogels in alginate microparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 20, p. 49010, 2014.

SANGUANSRI, L.; *et al.* Encapsulation of mixtures of tuna oil, tributyrin and resveratrol in a spray dried powder formulation. **Food Function**, v. 4, n. 12, p. 1794-1802, 2013.

SCHAFFAZICK, S. R.; *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SIQUEIRA, N. M.; *et al.* Gelatin and galactomannan-based scaffolds: Characterization and potential for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 8-18, 2015.

SOUZA, C. A. G.; *et al.* Encapsulação do ácido l-ascórbico no biopolímero natural galactomanana por *spray-drying*: preparação, caracterização e atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 38, n.7, p. 877-883, 2015.

TAMAKI, Y.; TERUYA, T.; TAKO, M. The chemical structure of galactomannan isolated from seeds of *Delonix regia*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, n. 5, p. 1110-1112, 2010.

TAVARES, G. A. Estrutura e propriedades Físico-Químicas da Galactomanana de Sementes de *Cassia fastuosa*, Willd (Cássia). Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, 1994.

VIEIRA, Í. G. P.; *et al.* NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 70-73, 2007.



ARTIGO 10

QUALIDADE, COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE A MATURAÇÃO DE QUATRO FRUTAS NATIVAS DA RESTINGA CEARENSE

DOI 10.47402/ed.ep.c202218281020

Nigéria Pereira Gonçalves
Eliseu Marlônio Pereira de Lucena

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo quantificar a qualidade, os compostos bioativos e a atividade antioxidante durante a maturação de quatro frutas nativas da Restinga cearense. Os frutos da murta (*Eugenia punicifolia* (Kunth) DC.) foram colhidos no Parque Estadual Botânico do Ceará, em Caucaia-CE e os do guajiru (*Chrisobalanus icaco* L.), do manipuçá (*Mouriri cearensis* Huber) e do murici-pitanga (*Byrsonima gardneriana* A. Juss.) no Jardim Botânico de São Gonçalo, em São Gonçalo do Amarante-CE. Os frutos foram coletados em diferentes estádios (E) e transportados ao Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, sendo caracterizados, depois processados e congelados para as avaliações. Utilizou-se o programa ESTAT nas análises estatísticas. Concluiu-se que os frutos do guajiru e do manipuçá atingiram a maturidade fisiológica no estágio 3 e os frutos do murici-pitanga e da murta atingiram no estágio 4, portanto, estes foram os estádios ideais para a colheita dos frutos. Nos compostos bioativos o fruto do murici-pitanga foi superior para vitamina C, carotenoides totais e antocianinas totais, enquanto o fruto da murta foi superior para clorofila e flavonoides amarelos. O teor de polifenólicos teve o maior e o menor valor para o fruto guajiru, embora para a atividade antioxidante total, o maior valor foi no fruto manipuçá e o menor valor, no fruto guajiru.

PALAVRAS-CHAVE: *Eugenia punicifolia*. *Chrisobalanus icaco*. *Mouriri cearensis*. *Byrsonima gardneriana*.

INTRODUÇÃO

A aparência dos frutos é um dos critérios utilizado para avaliar a qualidade através dos consumidores (KRAUSE *et al.*, 2012). Uma fruta é considerada de qualidade, quando atende às expectativas dos diferentes segmentos consumidores, em suas características internas e externas, atendendo aos padrões para que atinjam a qualidade desejada nos mercados (OCAMPO *et al.*, 2013).

As frutas proporcionam uma importante fonte de moléculas bioativas. Por este motivo, o seu consumo colabora para benefícios à saúde humana, como a prevenção de doenças cardiovasculares e câncer (MORAIS *et al.*, 2015).

A frequência e o desenvolvimento de doenças crônicas são, em parte, devido ao desequilíbrio dos componentes funcionais nos parâmetros biológicos, dentre eles, compostos fenólicos, carotenoides, flavonoides, antocianinas, terpenos, vitamina C e outros fitoquímicos



presentes em quase todos os frutos encontrados nas espécies frutíferas brasileiras. Em quantidades adequadas, as substâncias contidas nos frutos podem ser responsáveis pela proteção de células, prevenção de infecções e doenças, propiciando a sustentabilidade, a manutenção de metabolismos reparatórios e compensadores, como a função antioxidante (ROCHA *et al.*, 2013).

Inúmeras espécies de plantas produzem compostos bioativos que podem desempenhar papéis importantes na manutenção do corpo humano. Embora, as variações sazonais e ambientais, tipo de solo e idade da planta associados a dificuldades de propagação de certas espécies podem limitar a disponibilidade de muitos compostos bioativos e restringir uma investigação mais aprofundada das suas propriedades (CASTRO *et al.*, 2016).

A presente pesquisa teve como objetivo quantificar a qualidade, os compostos bioativos e a atividade antioxidante durante a maturação de quatro frutas nativas da Restinga cearense.

METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal-ECOFISIO, da Universidade Estadual do Ceará-UECE e no Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita, da Embrapa Agroindústria Tropical, ambos em Fortaleza-CE, no período de fevereiro de 2013 a novembro de 2014.

Os frutos da murta foram coletados no Parque Estadual Botânico do Ceará, em Caucaia, e os frutos do guajiru, manipuçá e murici-pitanga, foram colhidos no Jardim Botânico de São Gonçalo, em São Gonçalo do Amarante, ambos localizados na Restinga cearense.

No ECOFISIO retiraram-se as sementes dos frutos, depois a polpa foi processada e congelada em freezer à $-20^{\circ}\text{C} \pm 1$, para fazer as seguintes análises: sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT), pH e relação SST/ATT (RSA) (BRASIL, 2005); vitamina C (VC) (STROHECKER; HENNING, 1967); clorofila (CL) e carotenoides totais (CA) (LICHTENTHALER, 1987); antocianinas totais (AN) e flavonoides amarelos (FL) (FRANCIS, 1982); polifenólicos extraíveis totais (POL) (LARRAURI; RUPÉREZ; SAURA-CALIXTO, 1997); e atividade antioxidante total (AAT) (RUFINO *et al.*, 2007).

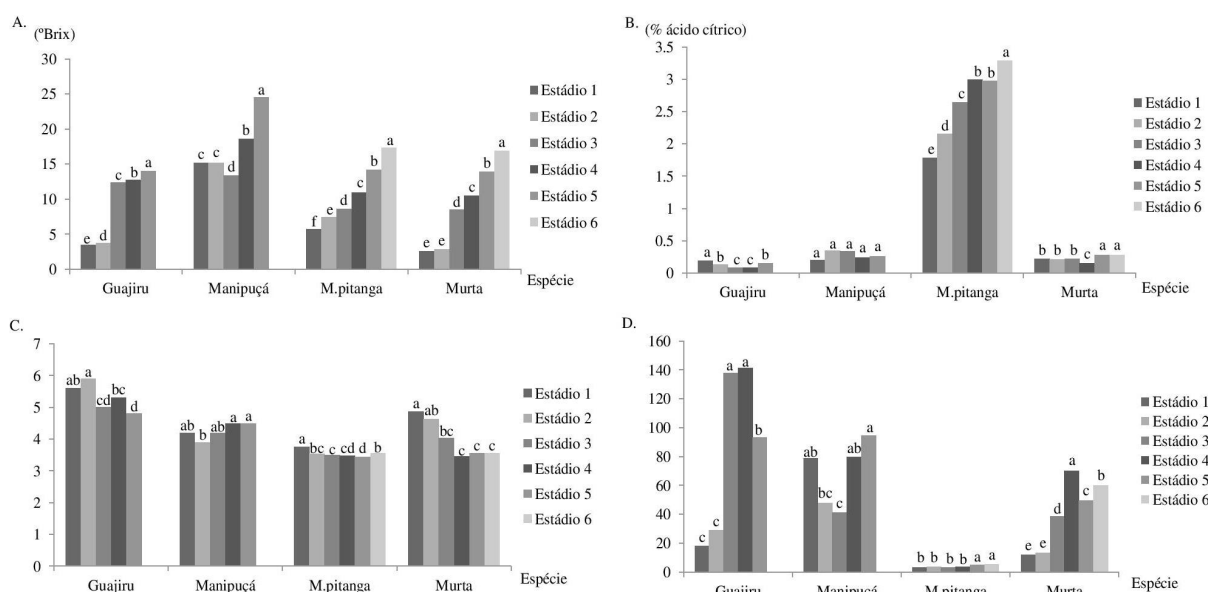
O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco ou seis tratamentos e quatro repetições de 200 frutos cada. Foi feita a análise de variância e o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sistema para Análises Estatísticas <V.1.0> - ESTAT.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se que os SST (Figura 1A) e a RSA (Figura 1D) foram crescentes para todas as frutas; a ATT (Figura 1B) foi crescente para murici-pitanga e murta, decrescente para guajiru e constante para manipuçá; o pH (Figura 1C) foi crescente para manipuçá e decrescente para as demais frutas ao longo da maturação.

Figura 1: Mudanças físicas e químicas durante a maturação de quatro frutas nativas do litoral cearense: (A) Sólidos solúveis totais (SST); (B) Acidez total titulável (ATT); (C) pH; (D) Relação SST/ATT (RSA). *Médias seguidas por uma mesma letra na mesma espécie, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Garcia *et al.* (2011) avaliando os SST de frutos de manipuçá (*Mouriri cearensis* Huber) provenientes de São Gonçalo do Amarante, CE obteve valor semelhante em relação ao primeiro estágio de maturação destes frutos no estudo em pauta, já para os frutos maduros, o resultado foi inferior ao da presente pesquisa.

Nascimento, Cardoso e Coccozza (2014) estudando a ATT frutos maduros da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) obtiveram valor superior ao obtido neste estudo, porém, inferior em relação aos frutos do murici-pitanga, as diferenças supracitadas tiveram a influência dos fatores ambientais climáticos, pedológicos e geomorfológicos.

Aguiar *et al.* (2011) estudando o pH dos frutos maduros do guajiru (*Chrysobalanus icaco* L.) obtiveram o valor semelhante ao obtido no fruto maduro do guajiru neste trabalho, o que coaduna, também com o resultado obtido por Gondim *et al.* (2013) ao estudarem os frutos da umbu-cajazeira (*Spondias* sp.).

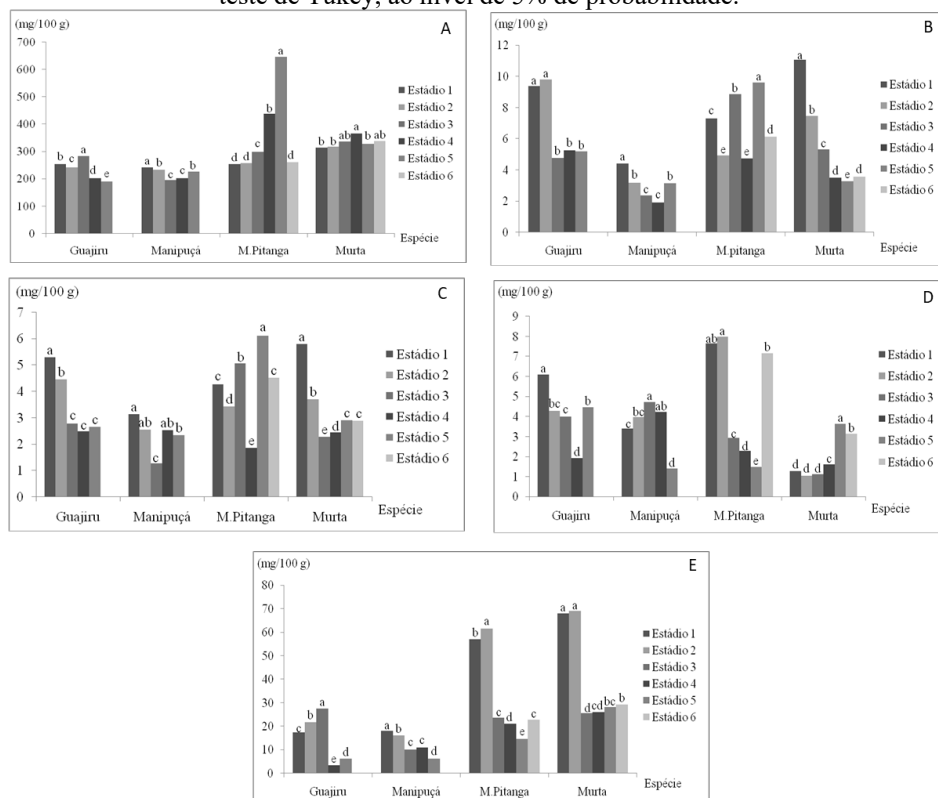


Souza *et al.* (2014) pesquisando três clones de acerola para a RSA, obtiveram valores superiores aos obtidos no fruto murici-pitanga nesta pesquisa, apesar de as duas cultivares pertencerem à mesma família, elas diferiram em seus resultados, pois as características do local das plantas, o período de colheita e os aspectos edafoclimáticos influenciaram.

Observa-se que a VC (Figura 2A) foi crescente para murici-pitanga e murta, e decrescente para guajiru e manipuçá; a CL (Figura 2B) foi decrescente para todas as frutas; os CA (Figura 2C) foram crescentes para murici-pitanga e decrescentes para as demais; as AN (Figura 2D) foram decrescentes para guajiru e murici-pitanga, e crescentes para manipuçá e murta; os FL (Figura 2E) foram crescentes para o guajiru e decrescentes para as demais frutas ao longo da maturação.

Pereira *et al.* (2012) analisando o teor de VC nos frutos maduros de guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg) e para os frutos maduros da uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) apresentam valores inferiores em relação aos frutos maduros da murta neste trabalho no último estágio de maturação.

Figura 2: Mudanças nos compostos bioativos durante a maturação de quatro frutas nativas do litoral cearense: (A) Vitamina C (VC); (B) Clorofila (CL); (C) Carotenoides Totais (CA); (D) Antocianinas Totais (AN); (E) Flavonoides amarelos (FL). *Médias seguidas por uma mesma letra na mesma espécie, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: Elaborada pelos autores.



Egea (2014) estudando frutos maduros nativos da Floresta Atlântica obteve no teor de CL para os frutos da uvaia, valores superiores aos frutos da murta neste trabalho.

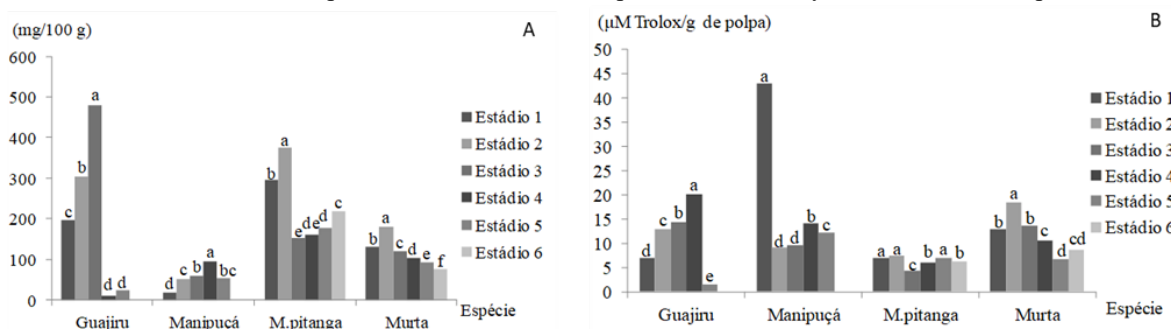
Aquino *et al.* (2011) estudando variedades de frutos maduros de acerola obteve no CA valor superior ao encontrado para os frutos maduros do murici-pitanga neste ensaio.

Rocha *et al.* (2013) pesquisando frutos maduros do Cerrado piauiense, dentre eles a cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) obtiveram para a AN valores inferiores ao obtido nos frutos da murta madura neste trabalho.

Também Rocha *et al.* (2013) estudando frutos maduros da cagaita obteve teor de FL inferior ao obtido nos frutos maduros da murta em estudo nesta pesquisa.

Constata-se que os POL (Figura 3A) foram crescentes para guajiru e manipuçá, e decrescentes para murici-pitanga e murta; a AAT (Figura 3B) foi crescente para guajiru e decrescente para as demais frutas ao longo da maturação.

Figura 3: Mudanças nos compostos polifenólicos e a atividade antioxidante durante a maturação de quatro frutas nativas do litoral cearense: (A) Polifenólicos (POL); (B) Atividade Antioxidante (AAT). *Médias seguidas por uma mesma letra na mesma espécie, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Façanha (2012) analisando os POL obtidos nos frutos da viuvinha (*Myrcia splendens* (Sw.) DC.) e nos frutos da mapirunga, estes valores foram superiores ao máximo obtido nos frutos da murta neste estudo.

Morais *et al.* (2013) avaliando a AAT dos frutos maduros do murici (*Byrsonima verbascifolia*) obteve o valor superior ao obtido no fruto maduro do murici-pitanga neste trabalho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto a qualidade, foram observadas que nos frutos do guajiru os resultados foram superiores para pH, para relação sólidos solúveis totais e acidez total titulável, já nos frutos do



manipuçá o destaque foi nos sólidos solúveis totais e nos frutos do murici-pitanga foram apresentados maiores teores de acidez.

Em relação aos compostos bioativos, o fruto do murici-pitanga foi superior para vitamina C, carotenoides totais e antocianinas totais e o fruto da murta foi superior para clorofila e flavonoides amarelos.

Maiores valores de polifenólicos foram encontrados nos frutos do guajiru e para atividade antioxidante, destacou-se o estágio 1 de maturação do fruto do manipuçá em relação aos outros frutos pesquisados, embora este estágio tenha apresentado o menor teor de polifenólicos, o que sugere a ação de outros antioxidantes, tais como: vitaminas C e E, clorofila e carotenoides.

Os frutos do guajiru e do manipuçá podem ser utilizados para uma alimentação mais saudável, pois o guajiru possui os maiores valores de polifenólicos e o manipuçá a maior atividade antioxidante, portanto, ambos podem ser recomendados para serem explorados comercialmente pelo setor de alimentação.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, T. M.; SABAA-SRUR, A. U. O.; SAMICO, G. F. Potencial nutritivo e características físicas e químicas do abajeru. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, p. 102-109, 2011.

AQUINO, A. C. M. S.; MÓES, R. S.; CASTRO, A. A. Estabilidade de ácido ascórbico, carotenoides e antocianinas de frutos de acerola congelados por métodos criogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 2, p. 154-163, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 119 p.

CASTRO, A. H. F.; *et al.* Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae). **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 143-151, 2016.

EGEA, Mariana Buranelo. **Frutos nativos da floresta atlântica com potencial de maior utilização pela população e pela indústria: caracterização nutraceutica e aromática**. 2014. 136 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

FAÇANHA, Rafaela Vieira. **Qualidade e potencial antioxidante de frutas nativas do litoral cearense em diferentes estágios de maturação**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.



FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, p.181-207, 1982.

FUNCEME - Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. **Calendário de chuvas**. Disponível em: <http://www.funceme.br/app/calendario/produto/municipios/maxima/diario?data=2015-2-3>. Acesso em: 25 jan. 2015.

GARCIA, R. C. G.; *et al.* Parâmetros físico-químicos dos frutos de manipuçá em cinco estádios de maturação. **Revista Educação Agrícola Superior**, v. 26, p. 109-112, 2011.

GONDIM, P. J. S.; *et al.* Qualidade de frutos de acessos de umbu-cajazeira (*Spondias* sp.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 17, n. 11, p. 1217-1221, 2013.

KRAUSE, W.; *et al.* Produtividade e qualidade de frutos de cultivares de maracujazeiro amarelo com ou sem polinização artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 1737-1742, 2012.

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

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, n. 22, p. 350-382, 1987.

MORAIS, D. R.; *et al.* Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, v. 77, n. 3, p. 392-399, 2015.

MORAIS, M. L.; *et al.* Determinação do potencial antioxidante *in vitro* de frutos do Cerrado brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 355-360, 2013.

NASCIMENTO, R. S. M.; CARDOSO, J. A.; COCOZZA, F. D. M. Caracterização física e físico-química de frutos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) no Oeste da Bahia. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 18, n. 8, p. 856-860, 2014.

OCAMPO, J.; *et al.* Exploración de la variabilidad genética del maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) como base para un programa de fitomejoramiento en Colombia. **Acta Agronómica**, v. 62, p. 352-360, 2013.

PEREIRA, M.C.; *et al.* Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3061–3067, 2012.

ROCHA, M. S.; *et al.* R. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado Piauiense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 933-941, 2013.

RUFINO, M. S. M.; *et al.* **Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS●+**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical (Comunicado Técnico), 2007. 4 p.



SOUZA, K. O.; *et al.* Antioxidant compound and total antioxidant activity in fruits of acerola from cv. Flor Branca, Florida Sweet and BRS 366. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 294-304, 2014.

STROHECKER, R.; HENNING, H. M. **Análisis de vitaminas: métodos comprobados**. Madrid: Paz Montalvo, 1967. 428 p.



ARTIGO 11

BIOPROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DA CHALCONA N-{4'-[(2E)-3-(4-FLUOROFENIL)-1-(FENIL) PROP-2-EN-1-ONA]}ACETAMIDA EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GABAÉRGICO

DOI 10.47402/ed.ep.c202218291120

Maria Kueirislene Amâncio Ferreira
Antônio Wlisses da Silva
Atilano Lucas dos Santos Moura
Joyce do Nascimento Martins Cardoso
Hélcio Silva dos Santos
Francisco Ernani Alves Magalhães
Jane Eire Silva Alencar de Menezes

RESUMO

A ansiedade é um transtorno comportamental, o qual vem sendo estudada pela neurociência a fim de compreender o modo como os circuitos neuronais modulam este comportamento. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial ansiolítico da chalcona n-{4'-[(2E)-3-(4-fluorofenil)-1-(fenil) prop-2-en-1-ona]}acetamida, utilizando o zebrafish (*Danio rerio*) como modelo animal. A toxicidade aguda foi realizada frente ao zebrafish adulto para determinar a DL₅₀ até 96h de análise. O teste de Campo aberto foi realizado para avaliar a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas em placas de petri. No efeito ansiolítico-símile e mecanismo foi explorado o Teste Claro; Escuro, em umaquário com zona clara e uma escura. A chalcona foi usado no tratamento da ansiedade induzida pela abstinência do álcool. A interação chalcona /receptor GABA_A foi analisada *in silico* usando simulação de *docking* molecular. A chalcona PAAPFBA não foi tóxica frente à ZFa até 96 h de análise (DL₅₀>40 mg/kg). Todas as doses analisadas diminuíram a atividade locomotora dos animais. O flumazenil (40 mg/Kg; *i.p.*) reverteu significativamente o efeito ansiolítico-símile da PAAPFBA (40 mg/Kg; *i.p.*), bem como reverteu significativamente o efeito ansiolítico-símile do diazepam. A reversão da ansiólise por flumazenil sugere um possível envolvimento do receptor GABA_A nos efeitos ansiolíticos da PAAPFBA. No tratamento da ansiedade induzida pela retirada de álcool, a PAAPFBA (40 mg/Kg; *i.p.*) se mostrou efetiva, pois os animais tratados permaneceram maior parte do tempo de análise na zona clara. No *docking* molecular, foi possível observar uma interação da PAAPFBA com os aminoácidos no receptor GABA_A. A chalcona PAAPFBA apresentou segurança não clínica e efeito ansiolítico em zebrafish adulto, eficaz no tratamento da ansiedade induzida pela abstinência do álcool. Os resultados sugerem que o efeito ansiolítico da chalcona é mediado via sistema GABAérgico.

PALAVRAS-CHAVE: Tratamento da ansiedade. Abstinência do álcool. GABA.

INTRODUÇÃO

A ansiedade é um transtorno comportamental multidimensional, a qual vem sendo estudada na neurociência a fim de compreender o modo como os circuitos neuronais modulam este comportamento (KYSIL *et al.*, 2017). Os fármacos mais utilizados para o tratamento desta patologia são os benzodiazepínicos, porém, causam diversos efeitos colaterais, como



sonolência, sedação e diminuição da coordenação motora que ao ser usado cronicamente pode ocasionar tolerância ou dependência, além de causar síndrome de abstinência. Em altas doses, esses medicamentos podem ser fatais, principalmente se forem utilizados com outros depressores do Sistema Nervoso Central (SNC) (BRUNTON; KNOLLMAN; BJÖRN CHABNER, 2012). Contudo, a presença dos efeitos adversos demonstrados para estes fármacos aliada a prevalência dos distúrbios de ansiedade na sociedade denota a importância da busca por novas moléculas efetivas para o tratamento da ansiedade.

Modelos animais alternativos estão sendo utilizados para mensurar a ansiedade através do rastreio de drogas e avaliar a eficácia de substâncias em desenvolvimento, já que ensaios clínicos são de alto custo (HARRO, 2018), especialmente no que se refere à terapêutica do SNC (FRANTZ, 2004). Atualmente, o zebrafish vêm se tornando popular em uma variedade de áreas da neurociência, incluindo pesquisas envolvendo o comportamento cerebral e psicofarmacologia (HARRO, 2018).

Neste contexto, as chalconas, precursores produzidos durante a via de biossíntese de flavonoides mostraram atividades antioxidante (VANANGAMUDI; SUBRAMANIAN; THIRUNARAYANAN, 2017), antiacetilcolinesterase (LIU *et al.*, 2014) e anticonvulsivante (BEYHAN *et al.*, 2013). Essas atividades são decorrentes do sistema carbonila α,β -insaturado em chalconas, o que as torna biologicamente ativos (MISHRA *et al.*, 2016) e a exclusão do sistema carbonílico os torna biologicamente inativos, garantindo a estabilidade nas formas *cis* e *trans*.

Vale ressaltar que as pesquisas mencionadas anteriormente foram realizadas em camundongos ou ratos, no entanto, o Zebrafish (*Danio rerio*), popularmente conhecido como paulistinha, tornou-se importante organismo modelo experimental, quando comparado com roedores por ser de baixo custo, e devido aos seus mecanismos genéticos e bioquímicos evolutivamente conservados. É considerado um modelo significativo principalmente porque seu genótipo apresenta 70% de homologia exclusiva nos receptores de neurotransmissores para mamíferos segundo (ANICHTCHIK *et al.*, 2007), além do seu pequeno tamanho, alto poder de proliferação, desenvolvimento transparente e rápido que pode facilitar significativamente a descoberta de drogas em estudos utilizando este animal como modelo (FACCIOL; TRAN; GERLAI, 2017).

Essas características fazem do zebrafish, um importante modelo animal na triagem de novas drogas, assim como a quantidade de compostos necessários para realização dos



bioensaios (GHENO *et al.*, 2016). Portanto, o modelo vem sendo utilizado em estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e na investigação dos mecanismos de diversas doenças humanas, na busca por novos agentes terapêuticos (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). Assim sendo, o objetivo principal deste trabalho foi investigar a atividade ansiolítica da chalcona sintetizada PAAPFBA, utilizando o zebrafish, bem como o mecanismo de ação dessa atividade.

METODOLOGIA

A chalcona N - {(4'- [(E) -3- (4-fluorofenil) -1- (fenil) prop-2-en-1-ona]} acetamida (PAAPFBA) foi sintetizada através da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt em meio básico usando *p*-aminoacetofenona e *p*-fluorobenzaldeído, seguido pela reação de acetilação com anidrido acético em meio tamponado (ácido acético/acetato de sódio) em pH 4,5 sob agitação magnética (DE CAMPOS-BUZZI *et al.*, 2007). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 7210149/2016.

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA NÃO CLÍNICA

Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Os animais foram tratados com a chalcona sintetizada PAAPFBA, e em seguida foram submetidos ao teste de campo aberto (MAGALHÃES *et al.*, 2017) para avaliar se houve alteração na coordenação motora dos ZFa. Dessa maneira, os animais (n=6/grupo) foram tratados, via intraperitoneal com a chalcona (4; 12 e 40 mg/kg; *i.p.*). Simultaneamente, foram inclusos grupos de animais (n=6/grupo) tratados, via intraperitoneal, com veículo (Controle, DMSO 3%, 20 µL) ou diazepam (40 mg/Kg; *i.p.*) e um grupo de animais (n=6/grupo) sem tratamentos (Naive). Após 30 min dos tratamentos, os animais foram adicionados em placas de Petri (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL). O valor de CL do grupo Naive foi usado como linha de base (100%), portanto foi calculada a porcentagem de cruzamentos de linha (CL%) individualmente durante 0-5 minutos.

Toxicidade 96h

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish adulto de acordo com a Organização de Cooperação Econômica e Método Padrão de Desenvolvimento OECD (1992) para determinar a DL₅₀-96h. A mortalidade foi controlada de 12 em 12 h após o início dos



testes. Os indivíduos mortos foram removidos imediatamente. Quatro grupos de animais ($n=6/\text{grupo}$) foram tratados, via intraperitoneal, com a chalcona sintetizada PAAPFBA (4 ou 12 ou 40 mg/kg; *i.p.*), além do veículo (Controle, DMSO 3%, 20 μL *i.p.*). Após 96 h, foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a dose letal capaz de matar 50% dos animais (DL_{50}) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR, 2015).

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANSIOLÍTICO-SÍMILE

O efeito ansiolítico-símile foi explorado no Teste Claro e Escuro, o qual foi realizado em um aquário de vidro (30 x 15 x 20 cm) com uma zona clara e uma escura. O aquário foi cheio com 3 cm de água da torneira e pré-tratada com anticloro. Os animais ($n=6/\text{grupo}$) foram tratados com a chalcona sintetizada PAAPFBA (4 ou 12 ou 40 mg/kg; *i.p.*). Neste teste também foram inclusos animais ($n=6/\text{grupo}$) tratados com veículo (Controle, DMSO 3%, 20 μL *i.p.*); diazepam (40 mg/kg; *i.p.*) e um grupo de animais ($n=6/\text{grupo}$) sem tratamentos (Naive). Após 30 min dos tratamentos, os animais foram, individualmente, adicionados na zona clara do aquário e o efeito ansiolítico-símile foi quantificado como porcentagem de permanência na zona clara (%PZC), durante 5 min de análise.

Mecanismo de ação ansiolítica e docking molecular

Sistema GABAérgico

O envolvimento do sistema GABAérgico da chalcona sintetizada (menor dose efetiva do teste de avaliação do efeito ansiolítico-símile) foi explorado no Teste Claro e Escuro, após pré-tratamento com flumazenil, um antagonista $GABA_A$ (BENNEH *et al.*, 2017). Os animais ($n=6/\text{grupo}$) foram tratados, via intraperitoneal, com a chalcona sintetizada PAAPFBA (40 mg/Kg; *i.p.*) ou diazepam (40 mg/kg; *i.p.*). Outros animais ($n=6/\text{grupo}$) foram pré-tratados com flumazenil (4 mg/kg; *i.p.*), 15 min antes de ser tratado com a chalcona sintetizada PAAPFBA (40 mg/kg; *i.p.*) ou diazepam (40 mg/kg; *i.p.*), bem como um grupo de animais ($n=6/\text{grupo}$) sem tratamentos (Naive). Após 30 min, os animais foram, individualmente, adicionados na zona clara do aquário e o efeito ansiolítico-símile foi quantificado como porcentagem de permanência na zona clara (%PZC), durante 5 min de análise. A interação entre chalcona PAAPFBA e o receptor $GABA_A$ foi analisada usando docking molecular.

ANSIEDADE INDUZIDA PELA RETIRADA DO ÁLCOOL



A ansiedade induzida por retirada do álcool foi investigada em zebrafish adulto, baseando-se em métodos descritos por (HOLCOMBE *et al.*, 2013) com adaptações. O Teste do Claro e Escuro foi utilizado como parâmetro de análise para avaliar o efeito ansiolítico-símile durante 7 dias de análise, de 10 dias consecutivos. Como adaptação do método, foi utilizada a Aguardente de Cana de Açúcar Amarela (ACAA) como fonte de etanol (EtOH 38%). Inicialmente, a toxicidade do ACAA foi investigada. Os animais ($n = 6$ / grupo) foram tratados por via oral (v.o.), do dia 1 ao dia 5, com 20 μL de ACAA (EtOH; 0,38 ou 3,8 ou 38%; v/v). Como controle do teste, outro grupo de animais ($n = 8$) foi tratado por via oral com água destilada (20 μL). A mortalidade foi avaliada do dia 1 ao dia 11, conforme descrito no item 2.1.2. Em seguida, o teste de claro e escuro foi realizado para caracterizar o efeito do tipo ansiolítico por 11 dias consecutivos. Os animais ($n = 6$ / grupo) foram divididos em sete grupos:

Grupo I - Naïve (sem tratamentos); Grupo II - Veículo - DMSO 3% (20 μL ; *i.p.*); Grupo III - 1° ao 5° dia: ACAA (20 μL ; v.o.); Grupo IV - 1° ao 5° dia: ACAA (20 μL ; v.o.); 11° dia: PAAPFBA (4 mg / kg; 20 μL ; *i.p.*); Grupo V - 1° ao 5° dia: ACAA (20 μL ; p.o.); 11° dia: PAAPFBA (12 mg / kg; 20 μL ; *i.p.*); Grupo VI - 1° ao 5° dia: ACAA (20 μL ; p.o.); 11° dia: PAAPFBA (40 mg / kg; 20 μL ; *i.p.*); Grupo VII - 1° ao 5° dia: ACAA (20 μL ; v.o.); 11° dia: Diazepam (40 mg / kg; 20 μL ; *i.p.*).

Após 1h dos tratamentos orais e 30 min dos tratamentos intraperitoneais, os animais foram colocados individualmente na zona de luz do aquário e o efeito do tipo ansiolítico foi caracterizado pela permanência dos animais na zona de luz durante 5 min de análise. Somente no 11° dia a reversão da ansiedade foi ocasionada pela abstinência de ACAA por meio do percentual de tempo gasto na zona leve (% PZC) após o pré-tratamento com a PAAPFBA (4 ou 12 ou 40 mg /kg; *i.p.*) ou DZP (40 mg/kg; *i.p.*).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como valores da média \pm erro padrão da média para cada grupo de 6 animais. Após confirmação da normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 5.01. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).



RESULTADOS E DISCUSSÕES

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA NÃO CLÍNICA

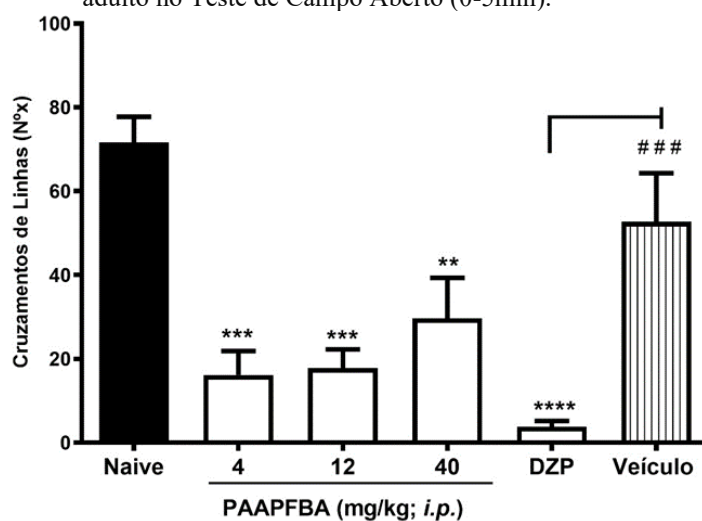
Toxicidade aguda frente ao Zebrafish (*Danio rerio*) adulto

O zebrafish apresenta-se como modelo vertebrado viável para avaliar toxicidade durante uma triagem inicial de drogas (CABALLERO; CANDIRACCI, 2018). Dessa forma, empregou-se este modelo animal para avaliar a toxicidade aguda das chalconas e seus respectivos materiais de partida. Com base nos resultados, constatou-se que todas as amostras se mostraram seguras, pois não foram tóxicas frente à ZFa até 96 h de análise ($DL_{50} > 40$ mg/kg).

Avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Ao analisar o comportamento do ZFa frente a chalcona PAAPFBA (4 ou 12 ou 40 mg/kg; *i.p.*), foi observado que os animais sofreram uma mobilização, pois diminuíram significativamente a atividade locomotora em relação ao controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Naive). Dessa maneira, a ação da chalcona foi significativamente semelhante ($p > 0,05$) ao diazepam (40 mg/Kg; 20 μ L *i.p.*) ($p < 0,001$ vs. Naive) (Figura 1).

Figura 1: Efeito da chalcona sintetizada PAAPFBA sob a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5min).



Fonte: Elaborada pelos autores.

A diminuição da atividade locomotora em zebrafish adulto causada pelas chalcona sintetizada (PAAPFBA,) sugere uma possível ação sedativa, tais como os benzodiazepínicos (drogas ansiolíticas), os quais diminuem atividade locomotora (mobilidade) de zebrafish (*Danio rerio*) adulto em campo aberto (BENNEH *et al.*, 2017; GUPTA *et al.*, 2014). Nesse contexto, investigamos o possível efeito ansiolítico e seu mecanismo de ação da chalcona.

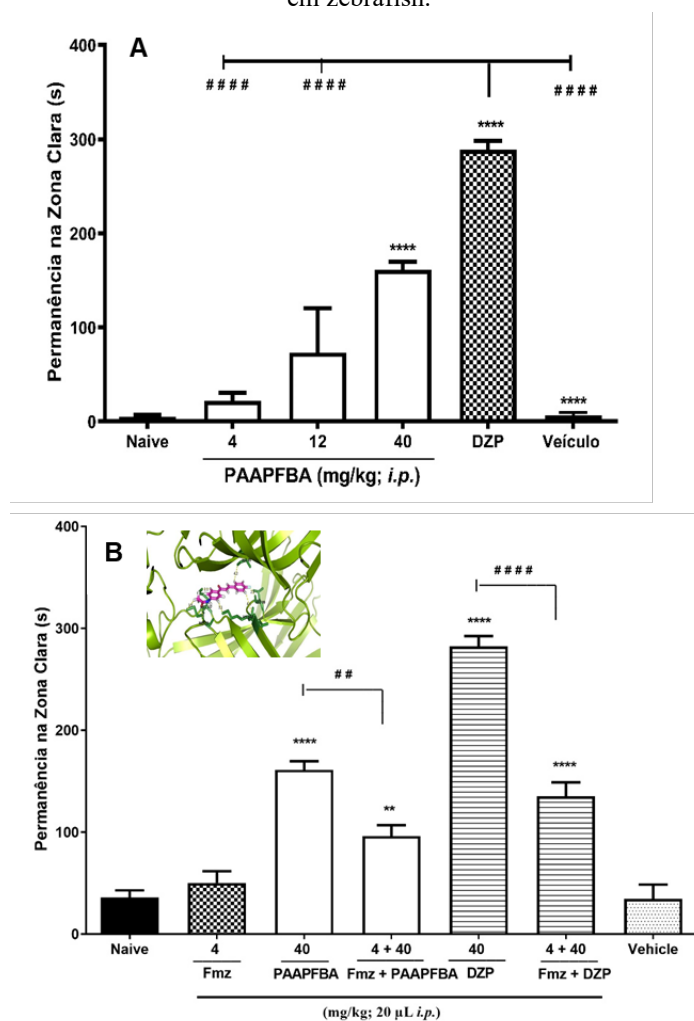


EFEITO ANSIOLÍTICO E DOCKING MOLECULAR

Como resultado, a chalcona PAAPFBA apresentou efeito ansiolítico-símile, pois os ZFa tratados com essa chalcona (40 mg/kg; *i.p.*) (Figura 2A) permaneceram maior parte do tempo de análise na zona clara ($PZC_{PAAPFBA} = 53,7\%$), significativamente ($p > 0,05$) semelhante ao diazepam (40 mg/kg; 20 μ L; *i.p.*), controle ansiolítico ($PZC_{DZP} = 81,5\%$).

Os resultados do mecanismo de ação ansiolítica mostraram que, o pré-tratamento com flumazenil (4 mg/kg; 20 μ L; *i.p.*) reverteu significativamente ($p < 0,01$) o efeito ansiolítico-símile da PAAPFBA (40 mg/kg; 20 μ L; *i.p.*), bem como reverteu significativamente ($p < 0,001$) o efeito ansiolítico-símile do diazepam (40 mg/kg; 20 μ L; *i.p.*). Neste caso, houve diminuição da permanência na zona clara dos animais tratados com flumazenil e PAAPFBA ($PZC_{Fmz + PAAPFBA} = 32\%$), significativamente ($p > 0,05$) semelhante aos animais tratados com flumazenil e diazepam ($PZC_{Fmz + DZP} = 45,1\%$), como poder ser visto na Figura 2B.

Figura 2: (A) Efeito ansiolítico-símile e (B) Efeito do flumazenil sob o efeito ansiolítico-símile da PAAPFBA em zebrafish.



Fonte: Elaborada pelos autores.



O teste do claro e escuro é indicado para avaliar novos agentes ansiolíticos do tipo benzodiazepínico (GEBAUER *et al.*, 2011a) e foi validado para uso em ratos e camundongos (MAXIMINO *et al.*, 2010a). No teste com peixe-zebra, a ansiedade é caracterizada pela aversão inata do peixe-zebra às áreas iluminadas, como enfatizado por (GEBAUER *et al.*, 2011b). Estudos semelhantes mostraram que zebrafish que não foram tratados com drogas ansiolíticas exibem o mesmo comportamento em camundongos (GEBAUER *et al.*, 2011a; MAXIMINO *et al.*, 2010a, 2010b). Neste sentido, Benneh *et al.* (2017) realizaram uma análise comparativa do comportamento semelhante à ansiedade em peixes-zebra adultos usando os testes Claro e escuro e novo tanque, e sugeriram que o claro e escuro é mais sensível a tratamentos farmacológicos em comparação com o novo tanque.

Assim, a reversão da ansiólise por pré-tratamento com flumazenil sugere um possível envolvimento do receptor $GABA_A$ nos efeitos ansiolíticos da PAAPFBA, assim como reverteu significativamente ($p < 0,05$) o efeito ansiolítico- do diazepam (40 mg/kg; 20 μ L; *i.p.*), controle ansiolítico. Dessa forma, essa interação foi vista pelos resultados obtidos no docking molecular, onde sugere-se uma compatibilidade química, espacial e energética entre o receptor $GABA_A$ e PAAPFBA, com interações de Van der Waals e pontes de hidrogênio (Figura 2B).

ANSIEDADE INDUZIDA PELA RETIRADA DO ÁLCOOL

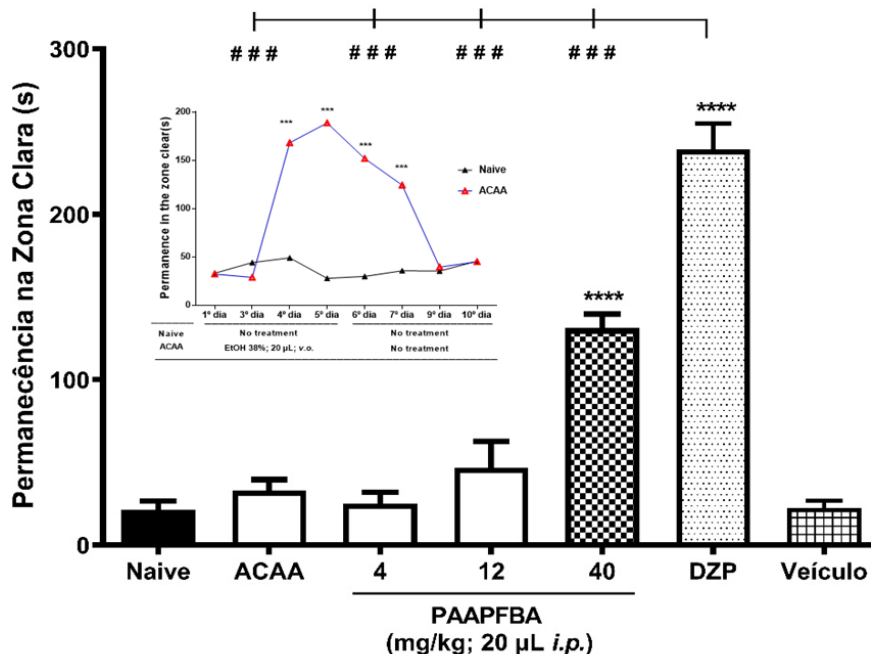
Neste teste, foi analisado o efeito da Aguardente de Cana de Açúcar Amarela (ACAA) administrada (20 μ L; *v.o.*) nos animais durante cinco dias consecutivos (1^o-5^o), e retirada por mais cinco dias (6-10). Como resultado, a ACAA (EtOH 38%; 20 μ L) apresentou efeito ansiolítico-símile no 4^o e 5^o dia após administração via oral, significativamente ($p < 0,001$) diferente do Naive (Controle, animais sem tratamento), como visualizado na Figura 3. Neste caso, o efeito ansiolítico-símile foi caracterizado pela maior permanência dos animais na zona clara, como descrito por (BENNEH *et al.*, 2017). Este efeito também foi observado no 6^o e 7^o dia, mesmo sem a administração da ACAA. A retirada do álcool (ACAA) no 9^o e 10^o dia deixou os animais mais ansiosos, significante ($p > 0,05$) semelhante ao Naive.

No 11^o dia, foi realizado o tratamento da ansiedade induzida pela retirada do álcool com a PAAPFBA e o diazepam. Como resultado, os animais tratados permaneceram maior parte do tempo de análise na zona clara ($PZC_{PAAPFBA} = 43,7,7\%$), significativamente ($p < 0,001$) diferente do Naive ($PZC_{Naive} = 7,1\%$), Veículo ($PZC_{Veículo} = 7,5\%$) e ACAA ($PZC_{ACAA} = 11\%$). Vale salientar que tais resultados corroboraram com os resultados de atividade ansiolítica aguda



(Figura 2A), pois só a maior dose da PAAPFBA (40 mg/kg; 20 µL; *i.p.*) teve ação ansiolítica (Figura 3).

Figura 3: Efeito da PAAPFBA sob a ansiedade em zebrafish adulto induzida pela retirada do álcool no Teste do Claro ; Escuro (0-5min).



Fonte: Elaborada pelos autores.

Os modelos de ansiedade de abstinência de álcool já foram estabelecidos em roedores (ALONGKRONRUSMEE; CHIANG; VAN RIJN, 2016; XIAO *et al.*, 2018), bem como em peixes-zebra adultos (BENNEH *et al.*, 2017; HOLCOMBE *et al.*, 2013). Portanto, o peixe-zebra se tornou um modelo importante para o estudo dos efeitos neurocomportamentais do uso crônico de álcool. Como esperado, a chalcona PAAPFBA (40 mg /kg, *i.p.*) foi eficaz porque diminuiu a ansiedade em peixes-zebra adultos induzida por abstinência de álcool. O teste de ansiedade crônica foi realizado neste estudo porque o consumo agudo de álcool em concentrações relativamente baixas pode resultar em efeitos "prazerosos", como relaxamento e alívio do estresse ou ansiedade (HOFFMAN; MATHEW, 2008). Por esse motivo, o teor de álcool diário (20 µL) foi equivalente à proporção de etanol 38% por cinco dias consecutivos, com o objetivo de causar dependência dos peixes, o que aumenta o estresse e a ansiedade com a abstinência do álcool.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo confirmou que N- {4' - [(E) -3- (4-Fluorofenil) -1- (fenil) prop-2-en-1-ona]} acetamida (PAAPFBA) foi atóxico e mostrou efeito sedativo e do tipo ansiolítico no



zebrafish, bem como mostrou-se eficiente no tratamento da ansiedade induzida pela abstinência de álcool. Nossos achados sugerem que esse efeito do tipo ansiolítico é mediado pelo sistema GABAérgico, também demonstrado no estudo *in silico*, evidenciado pela formação de um complexo estável GABA_A / PAAPFBA.

REFERÊNCIAS

ALONGKRONRUSMEE, D.; CHIANG, T.; VAN RIJN, R. M. Involvement of delta opioid receptors in alcohol withdrawal-induced mechanical allodynia in male C57BL/6 mice. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 167, p. 190–198, 2016.

ANICHTCHIK, O.; *et al.* Express 10,000 Genes. **Comparative and General Pharmacology**, v. 1156, n. August 2006, p. 1138–1156, 2007.

ARELLANO-AGUILAR, OMAR Use of the Zebrafish Embryo Toxicity Test for Risk Assessment Purpose: Case Study. **Journal of Fisheries Sciences.com**, v. 9, n 4, p. 52-62, p. 2015.

BENNEH, C. K.; *et al.* Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebra fish — Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, n. May, p. 129–145, 2017.

BEYHAN, Nagihan; *et al* Synthesis and anticonvulsant activity of some 2-pyrazolines derived from chalcones. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 10 S2073-S2081, 2017.

BRUNTON, L. L.; KNOLLMAN, C.; BJÖRN CHABNER, B. A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH. 2112 p.

CABALLERO, M. V.; CANDIRACCI, M.. Zebrafish as Toxicological model for screening and recapitulate human diseases. **Journal of Unexplored Medical Data**, v. 3, n. 2, p. 4, 2018.

DE CAMPOS-BUZZI, F.; *et al.* 4'-Acetamidochalcone derivatives as potential antinociceptive agents. **Molecules**, v. 12, n. 4, p. 896–906, 2007.

FACCIOL, A.; TRAN, S.; GERLAI, R. Re-examining the factors affecting choice in the light – dark preference test in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 327, p. 21–28, 2017.

FRANTZ, S. Therapeutic area influences drug development costs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 6, p. 466–466, 2004

GEBAUER, Daiane L.; *et al.* Effects of anxiolytics in zebra fish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 99, p. 480–486, 2011.

GEBAUER, D. L.; *et al.* Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 3, p. 480–486, 2011.

GHENO, Ediane Maria; *et al.* Zebrafish in Brazilian Science: Scientific Production, Impact,



and Collaboration. **Zebrafish**, v. 13, n. 3, p. 217–225, 2016.

GUPTA, Pankaj; *et al.* Assessment of locomotion behavior in adult Zebrafish after acute exposure to different pharmacological reference compounds. **Drug Development and Therapeutics**, v. 5, n. 2, p. 127, 2014.

HARRO, Jaanus. Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. **Behavioural Brain Research**, v. 352, p. 81–93, 2018.

HOFFMAN, E. J.; MATHEW, S. J. Anxiety disorders: A comprehensive review of pharmacotherapies. **Mount Sinai Journal Of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine**, v. 75, n. 3, p. 248-262, 2008.

HOLCOMBE, Adam; *et al.* Reversed Scototaxis during Withdrawal after Daily-Moderate, but Not Weekly-Binge, Administration of Ethanol in Zebrafish. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–8, 2013.

KYSIL, E. V. *et al.* Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. **Zebrafish**, v. 14, n. 3, p. 197–208, 2017.

LIU, H. R.; *et al.* Design, synthesis and pharmacological evaluation of chalcone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6124–6133, 2014.

MAGALHÃES, F. E. A. *et al.* Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. **Zebrafish**, v. 14, n. 5, p. 422-429, 2017.

MAXIMINO, C.; *et al.* Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. **Behavioural Brain Research**, v. 210, n. 1, p. 1–7, 2010a.

MAXIMINO, C.; *et al.* Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 221–228, 2010b.

MISHRA, C. B.; *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of N-(5-methyl-isoxazol-3-yl/1,3,4-thiadiazol-2-yl)-4-(3-substitutedphenylureido) benzenesulfonamides as human carbonic anhydrase isoenzymes I, II, VII and XII inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, p. 174-179, 2016.

OECD. Fish, acute toxicity test. **Guideline for the testing of chemicals**, 1992.

SILVEIRA, T. R. Da; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4–5, 2012.

VANANGAMUDI, G.; SUBRAMANIAN, M.; THIRUNARAYANAN, G Synthesis, spectral linearity, antimicrobial, antioxidant and insect antifeedant activities of some 2,5-dimethyl-3-thienyl chalcones. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1254–S1266, 2017.

XIAO, H. W.; *et al.* Gut microbiota modulates alcohol withdrawal-induced anxiety in mice. **Toxicology Letters**, v. 287, n. January, p. 23–30, 2018.



ARTIGO 12

FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ÓLEO DE PEQUI POR GELIFICAÇÃO IÔNICA EM MATRIZ POLIMÉRICA DE ALGINATO/QUITOSANA

DOI 10.47402/ed.ep.c202218301220

Rachel Menezes Castelo
Luana Carvalho da Silva
Joana de Barros Alexandre
Gabrielle Albuquerque Freire
Carlúcio Roberto Alves
Roselayne Ferro Furtado

RESUMO

O óleo de pequi (*Caryocar coriaceum*) possui alto teor de compostos bioativos, o que lhe confere excelente potencial para uso nas indústrias alimentícia e farmacêutica. A microencapsulação do óleo oferece condições favoráveis de armazenamento e liberação controlada para manter suas características funcionais por mais tempo. A tecnologia de microencapsulação de bico vibracional foi aplicada à produção de micropartículas de óleo de pequi usando matriz de alginato de sódio. Após o encapsulamento, foi realizada a complexação eletrolítica das partículas com quitosana. As partículas formadas apresentaram diâmetro médio de 1562, 65 μ m e eficiência de encapsulamento de 96,17%. A complexação eletrolítica das partículas de alginato com quitosana pode melhorar o reforço da matriz e favorecer uma futura aplicação na indústria.

PALAVRAS-CHAVE: Microencapsulação. Gelificação iônica. Alginato. Quitosana. Complexação eletrolítica.

INTRODUÇÃO

O gênero *Caryocar*, conhecido popularmente como Pequi, possui uma ampla distribuição e pode ser encontrado em vários biomas brasileiros, como Cerrado, Mata Atlântica, Amazônia e Caatinga (ASCARI; TAKAHASHI; BOAVENTURA, 2013; CARVALHO; PEREIRA; ARAÚJO, 2015). O óleo extraído de *Caryocar coriaceum* tem sido utilizado como composto antibacteriano, anticonvulsivo, na cicatrização de feridas, como agente anti-inflamatório, e no tratamento de doenças do trato respiratório, incluindo tosse, afecções brônquicas e asma (BATISTA *et al.*, 2010; DE LACERDA NETO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2017; RIBEIRO, 2010; ROESLER *et al.*, 2008; ROSANE *et al.*, 2016; SARAIVA *et al.*, 2011).

O óleo da polpa do pequi é constituído majoritariamente pelos ácidos graxos palmítico (35,17%) e oleico (55,87%). O total de ácidos graxos saturados soma em torno de 38%37,9% e de insaturados 62% (DE LIMA *et al.*, 2007). Esse elevado percentual de ácidos graxos insaturados é muito importante, já que o consumo de ácidos graxos insaturados é benéfico à



saúde (ASCHERIO *et al.*, 1996). O óleo de pequi pode ser considerado uma fonte de β -caroteno, precursor da vitamina A. O uso de métodos que mantenha as características funcionais de compostos bioativos presentes no óleo por um tempo maior é interessante quando se busca uma aplicação nutracêutica e funcional do produto.

A proteção de compostos que exibam instabilidade oxidativa está sendo demonstrada em muitas pesquisas, através do processo de microencapsulação. Neste processo, o material facilmente oxidado (material de recheio ou núcleo) é envolvido por uma matriz homo ou heterogênea (material de parede ou revestimento) (MATTA, 2013; TUPUNA *et al.*, 2018). A encapsulação confere proteção ao material encapsulado inibindo ou reduzindo o processo oxidativo, preservando sabor e aroma e, mantendo a sua qualidade nutricional por um tempo maior (LENGYEL *et al.*, 2019; MOHAMMADI *et al.*, 2016). Além da proteção, a encapsulação aumenta a estabilidade, solubilidade e pode permitir o controle da liberação do material de recheio (MATTA, 2013).

No processo de microencapsulação, várias técnicas podem ser empregadas, dentre elas a gelificação iônica ou gelificação ionotrópica. Esta técnica é baseada na habilidade de polieletrólitos (alginato, pectinas, goma gelana, carragena) formarem géis na presença de íons. Por exemplo, a interação de íons, como Ca^{+2} , com os grupos carboxilas das cadeias poliméricas de polissacarídeos resulta na formação de reticulados insolúveis (RACOVITĂ *et al.*, 2009).

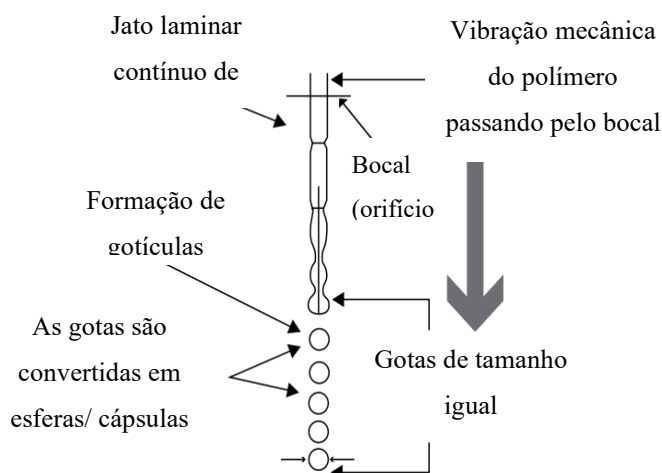
Na formação de microencapsulados utilizando a técnica de gelificação iônica por extrusão, a tecnologia de vibração do bico pode ser também utilizada de forma a favorecer a homogeneidade e reprodutibilidade das gotas injetadas através do bico. É baseada na quebra de uma corrente de líquido laminar em gotículas por uma vibração mecânica sobreposta (Figura 1). A tecnologia ganhou interesse significativo para fins de produção de microesferas reproduzíveis e homogêneas, com tamanhos definidos, produzindo partículas uniformes e monodispersas (BUCHI, 2014; RÁZGA *et al.*, 2014). Em complemento, na formação das gotas, o jato pode ser submetido a um campo elétrico, onde, atingindo uma certa tensão, são criadas partículas com forças repulsivas que impedem sua agregação antes da extrusão deles pelo bico de injeção, a chamada extrusão eletrostática (MANOJLOVIC *et al.*, 2006).

Como forma de produzir matrizes com maior potencial de retenção do núcleo e controle de liberação do núcleo, biopolímeros são utilizados na formação de um estável complexo (MCCLEMENTS, 2017). O complexo alginato-quitosana é formado a partir da interação eletrostática dos grupos amino da quitosana com os grupos carboxílicos do alginato (THAYA



et al., 2018; YADAV *et al.*, 2018). Neste trabalho, óleo da polpa de pequi foi microencapsulado em matriz polimérica de alginato e Ca^{2+} para formação das partículas seguido de complexação eletrostática para o reforço da matriz encapsulante com quitosana.

Figura 1: Princípio operacional dos encapsuladores que usam frequências vibracionais para a separação controlada de um jato de líquido laminar em gotas de igual tamanho.



Fonte: Buchi (2014) (Adaptado).

FORMAÇÃO DAS PARTÍCULAS

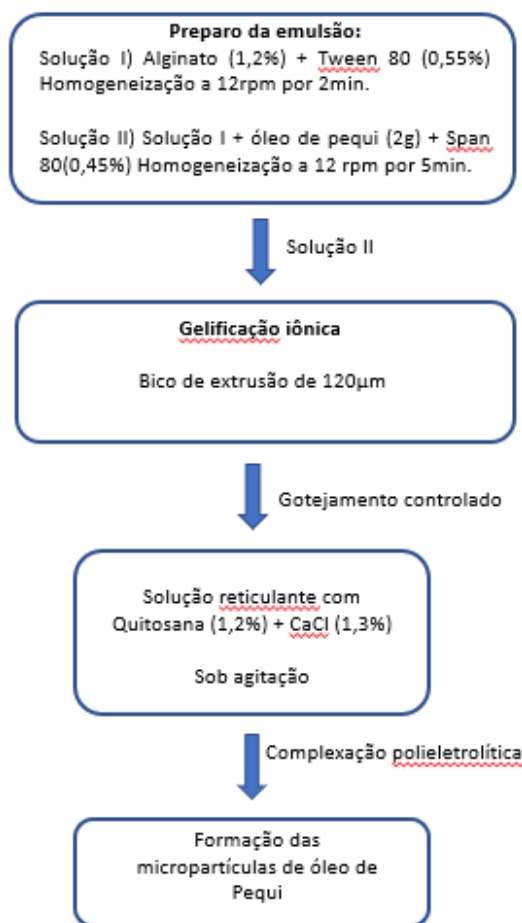
Foram utilizados os seguintes materiais: alginato de sódio de viscosidade média, 90% puro (Dinâmica®), quitosana de baixo peso molecular (75-85% de desacetilação) da Sigma-Aldrich, Cloreto de cálcio (Dinâmica®), Surfactantes Span 80 (Sigma-Aldrich), Tween 80 (Vertec), Span 20 e Tween 20 (Chemical Dynamics). O óleo de pequi (*C. coriaceum*) foi extraído da polpa do fruto e adquirido diretamente de produtores locais.

Para a produção dos microencapsulados, inicialmente, alginato foi disperso em água destilada (1,2% p/v), permanecendo sob agitação por 24h. Tween 80 (0,55% v/v) foi adicionado à solução, a qual foi submetida a homogeneização em Ultra-Turrax® a 12.000 rpm por 2 min (T-25 digital, IKA®). Ao final, óleo de pequi (2% p/v) armazenado a temperatura ambiente (25°C) e tensoativo Span 80 (0,45% v/v) foram adicionados à solução de alginato e homogeneizado em rotor-estator Ultra-Turrax® a 12.000 rpm por 5 minutos. Para produção das partículas por gelificação iônica foi utilizada a técnica de extrusão, utilizando o equipamento Encapsulador B-395 (Büchi, Essen, Alemanha).

A emulsão foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio 1,3% (p/v) e quitosana 1,2% (p/v) (Figura 2). Utilizou-se um bico de gotejamento com diâmetro de 120 μm , frequência de 120Hz, voltagem de 300v e agitação de 80%.



Figura 2: Fluxograma com etapas para formação de micropartículas de óleo de Pequi.



Fonte: Elaborada pelos autores.

A eficiência de encapsulamento das micropartículas de óleo de pequi foi determinada relacionando o teor de óleo total e superficial de acordo com equação 1 (CARNEIRO *et al.*, 2013). O óleo total refere-se à quantidade total de óleo (2 g) em 100 mL emulsão. O teor de óleo superficial foi determinado a partir de lavagens de partículas (32,51 g) com 10mL de hexano e o óleo quantificado por espectrofotômetro a 450 nm. Anteriormente, a calibração foi estabelecida através de uma curva para o óleo de pequi em hexano.

$$EE (\%) = \frac{(total\ oil - surface\ oil)}{total\ oil} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esferas homogêneas e reprodutíveis foram obtidas com tamanho de 1562, 65µm, cerca de 13 vezes o diâmetro do orifício do bico de extrusão (Figura 3). Trabalhos semelhantes foram relatados por De Prisco *et al.* (2014) usando a tecnologia de vibração do bico de extrusão e encapsularam o probiótico *Lactobacillus reuteri* em uma matriz de polímero de alginato/quitosana e obtiveram partículas esféricas usando a frequência de 1740 Hz. Benucci *et*



al. (2019) encapsularam leveduras para aplicação em vinho espumante utilizando alginato/quitosana e obtiveram microesferas a 2700 Hz.

Figura 3: Micropartículas de óleo de pequi em matriz polimérica de alginato e quitosana. Microscopia óptica, magnitude de aumento 2,5x.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Determinar a eficiência de encapsulamento é um parâmetro importante para conhecer o percentual de ingrediente ativo aprisionado internamente na micropartícula. A eficiência de encapsulação do óleo de pequi em microesferas úmidas em uma matriz polimérica de alginato e quitosana foi de 96,17%. Estudos semelhantes foram relatados na literatura, embora a eficiência de encapsulamento encontrado neste trabalho tenha sido aparentemente maior. Yadav *et al.* (2018) relataram que a eficiência de partículas contendo drogas (Ornidazol e Doxiciclina) na matriz de alginato/quitosana foi de 86,20%. Sanches *et al.* (2020) produziram nanopartículas com óleo essencial de citronela utilizando alginato/quitosana, apresentando uma eficiência de aproximadamente 80%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Partículas padronizadas de óleo de pequi foram produzidas por gelificação iônica combinada com tecnologia de vibração do bico, seguida de complexação eletrolítica com quitosana. As microesferas de óleo de pequi têm potencial para aplicação em alimentos ou bebidas, necessitando de estudos mais específicos, principalmente sobre liberação controlada para direcionar a uma aplicabilidade adequada das micropartículas produzidas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

ASCARI, J.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. The phytochemistry and biological aspects of Caryocaraceae family. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15,



n. 2, p. 293–308, 2013.

ASCHERIO, A. *et al.* Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: Cohort follow up study in the United States. **British Medical Journal**, v. 313, n. 7049, p. 84–90, 1996.

BATISTA, J. S. *et al.* Evaluation of the Healing Activity of Pequi (*Caryocar Coriaceum Wittm*) Oil in Cutaneous Wounds. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 441–447, 2010.

BENUCCI, I. *et al.* Yeast cells in double layer calcium alginate–chitosan microcapsules for sparkling wine production. **Food Chemistry**, v. 300, n. July, p. 125174, 2019.

BUCHI, B. L. A. **Encapsulador B-390 / B-395 Pro** - Laboratory Guide. 2014. 58 p.

CARNEIRO, H. C. F. *et al.* Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 443–451, 2013.

CARVALHO, L. S. DE; PEREIRA, K. F.; ARAÚJO, E. G. DE. Características botânicas, efeitos terapêuticos e princípios ativos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 19, n. 2, p. 147–157, 2015.

DE LACERDA NETO, L. J. *et al.* Modulation of antibiotic activity by the hydroalcoholic extract from leaves of *Caryocar coriaceum WITTM.* **Natural Product Research**, v. 32, n. 4, p. 477–480, 2018.

DE LIMA, A. *et al.* Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695–698, 2007.

DE PRISCO, A. *et al.* Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 452–462, 2014.

LENGYEL, M. *et al.* Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 3, p. 20, 2019.

MANOJLOVIC, V. *et al.* Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: A model system for potential application in medicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 163–171, 2006.

MATTA, Lucidarcy Martins da. **Retenção do óleo de pequi em micropartículas de concentrado protéico de soro de leite e maltodextrina**. 2013. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, 2013.

MCCLEMENTS, D. J. Designing biopolymer microgels to encapsulate, protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 240, p. 31–59, 2017.

MOHAMMADI, A. *et al.* Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the



oxidative stability of soybean oil. **Food Chemistry**, v. 190, p. 513–519, 2016.

OLIVEIRA, C. C. *et al.* Anticonvulsant activity of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil against pentylenetetrazol- induced seizures. **Neurological Research**, v. 39, n. 8, 667-674, 2017.

RACOVITĂ, Ș. *et al.* Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 54, n. 9, p. 709–718, 2009.

RÁZGA, F. *et al.* Production of Ca-alginate microspheres using buchi encapsulator B-395 PRO. **Polymer Institute SAS**, n. September, p. 10–11, 2014.

RIBEIRO, Milton Cosme. **Óleo de pequi: qualidade físico- química, teor de carotenóides e uso em animais com carência de vitamina A**. 2010, 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 711–717, 2008.

ROSANE, P. *et al.* *Caryocar coriaceum* Wittm. (Pequi) fixed oil presents hypolipemic and anti-inflammatory effects *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 87–94, 2016.

SANCHES, M. *et al.* Chitosan-sodium alginate polyelectrolyte complex coating pluronic® F127 nanoparticles loaded with citronella essential oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 4, p. 803-812, 2020.

SARAIVA, R. A. *et al.* Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (*Caryocaraceae*) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 504–510, 2011.

THAYA, R. *et al.* Synthesis of chitosan-alginate microspheres with high antimicrobial and antibiofilm activity against multi-drug resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 17–24, 2018.

TUPUNA, D. S. *et al.* Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 846–855, 2018.

YADAV, S. K. *et al.* Design, optimization and characterizations of chitosan fortified calcium alginate microspheres for the controlled delivery of dual drugs. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. 6, p. 1180–1193, 2018.



ARTIGO 13

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *MENTHA* E RELAÇÃO COM SUAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTICOLINESTERÁSICA E ANTIFÚNGICA

DOI 10.47402/ed.ep.c202218311320

Alexandre de Sousa Barros
Selene Maia de Moraes
Pablito Augusto Travassos Ferreira
Ícaro Gusmão Pinto Vieira
Afrânio Aragão Craveiro
Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle
Jane Eire Silva Alencar de Menezes
Francisco Walber Ferreira da Silva
Halisson Araújo de Sousa
Hortência Ribeiro Liberato
Cleonilda Cláita Carneiro Pinto
Rita de Cássia Alves Pereira

RESUMO

O gênero *Mentha*, pertencente à família Lamiaceae, tem ampla distribuição no planeta, e suas várias espécies são conhecidas por suas características aromáticas e por serem detentoras de óleos essenciais com aplicações em alimentos, cosmética e principalmente na medicina popular. Suas aplicações farmacológicas se devem às suas características antimicrobianas, antivirais, anestésicas, carminativas e gastro-sedativas. O presente trabalho visou contribuir para o estudo de espécies do gênero *Mentha*, analisando e estabelecendo uma relação entre as composições químicas dos óleos essenciais de algumas espécies do gênero e suas atividades antioxidante, antiacetilcolinesterase e antifúngica. A composição dos óleos foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As atividades antioxidantes foram determinadas pelo método de sequestro do radical livre DPPH e pela inibição da co-oxidação no sistema β -caroteno/ácido linoleico. A ação inibitória da enzima acetilcolinesterase e a atividade antifúngica frente *Trycophytum rubrum*, *Mycrosporium canis* e *Candida albicans* também foram avaliadas. Na composição dos óleos essenciais observou-se um maior teor de monoterpenos oxigenados, com predominância da isomentona, mentol, mentofurano, D-neoisomentol, D-carvona, linalol, acetato de linalila, pulegona, óxido de piperitona, limonenol e 1,8-cineol (eucaliptol). A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi moderada com destaque para os óleos de *M. spicata* (hortelã caseira), *M. arvensis* (ginger mint) e *M. longifolia* (himalayan silver mint). Os óleos de *M. piperita* (chocolate mint) e *M. spicata* (mentol mint) apresentaram forte inibição da acetilcolinesterase e esta inibição deve-se ao sinergismo dos constituintes ativos. A atividade antifúngica contra *T. rubrum* e *M. canis* dos óleos essenciais foi moderada, destacando-se o óleo de *M. spicata* (mint de Ciudad del leste). As propriedades biológicas dos óleos de *Mentha* estudados devem-se provavelmente aos seus princípios constituintes bioativos.

PALAVRAS-CHAVE: *Mentha*. Acetilcolinesterase. Sinergismo. Monoterpenos oxigenados.



INTRODUÇÃO

A utilização de plantas na medicina vem acompanhando a evolução humana desde os primórdios da humanidade. A utilização das plantas primeiramente como alimento, a observação de determinados efeitos por meio dessa ingestão e a disseminação por meio da cultura iniciou de forma empírica o uso medicinal das plantas. Assim, o conhecimento empírico das propriedades medicinais de plantas foi inicialmente a base da medicina caseira ou popular. Esse conhecimento e uso popular possibilitou a descoberta de muitos fármacos e sua utilização na medicina tradicional (FIRMO *et al.*, 2011; PEIXOTO *et al.*, 2009).

As plantas medicinais têm contribuído fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. A exploração racional dos recursos biológicos é hoje uma das principais ferramentas da Ciência e tem seus fundamentos no aproveitamento da diversidade oferecida pela natureza. A importância do aproveitamento dos recursos naturais está diretamente relacionada a fatores econômicos como a minimização de custos e a fatores sócio-culturais como a valorização do meio, da sua diversidade e de suas tradições. O crescimento dos estudos com produtos naturais demonstra assim, a importância desses compostos para a ciência e tecnologia.

Dentre os gêneros pertencentes à família Lamiaceae, o gênero *Mentha* destaca-se por suas aplicações terapêuticas e industriais. Suas plantas possuem distribuição em todo o mundo, tendo como centro de origem a Europa meridional e a região do Mediterrâneo, suportando temperaturas baixas, mas bem adaptadas ao clima tropical. São plantas perenes, com folhas opostas, pecioladas e pubescentes (MATTOS, 2000).

As mentas destacam-se pelo uso culinário ou em chás medicinais, para combater parasitas intestinais e distúrbios digestivos (LORENZI; MATOS, 2002). As folhas aromáticas das *Menthas* são usadas frescas e secas como aromatizantes ou especiarias em uma ampla variedade de alimentos. Eles contêm componentes biologicamente ativos (GRACINDO *et al.*, 2006). O principal produto da mentha é o seu óleo essencial, que pode ser obtido por diferentes métodos de extração (MONTEIRO, 2009). Óleos essenciais são constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de muitas plantas. Podem ser obtidos de flores, folhas, frutos, sementes, gramas, raízes, rizomas e caules das plantas (MORAIS *et al.*, 2006). Os óleos essenciais podem conter cerca de 20-60 componentes em concentrações bastante diferentes e



são caracterizados por dois ou três componentes principais em concentrações relativamente elevadas em comparação com outros componentes presentes (CROTEAU *et al.*, 2000).

A composição química do óleo essencial de *Mentha* varia de acordo com a idade da planta, variedade da espécie, região geográfica e as condições de processamento. Os principais compostos identificados no óleo essencial do gênero são o mentol (33-60%), mentona (15-32%), isomentona (2-8%), 1,8-cineol (eucaliptol) (5-13%), acetato de mentila (2-11%), mentofurano (1-10%), limoneno (1-7%), β -mirceno (0,1-1,7%), β -cariofileno (2-4%), pulegona (0,5-1,6%) e carvona (1%) (PITTLER; ERNEST, 1998; XU *et al.*, 2003). Também é relatado a presença de óxido de piperitona, óxido de piperitenona e linalol nos seus óleos essenciais. Dos principais compostos encontrados nos óleos essenciais do gênero *Mentha* pode-se destacar o mentol com propriedade anestésica local suave, antisséptica, e internamente como carminativo e sedativo gástrico. A mentona que é utilizada em produtos de higiene oral. (GRACINDO *et al.*, 2006; HUSSAIN *et al.*, 2010; OUMZIL *et al.*, 2002).

Os óleos essenciais das espécies do gênero *Mentha* despertam grande interesse em função de suas propriedades biológicas e seu valor comercial. Dentre as propriedades biológicas destacam-se a sua atividade antioxidante e sua atividade antimicrobiana (MIMICA-DUKIC *et al.*, 2003; SCHMIDT *et al.*, 2003). Desta forma, o presente trabalho objetivou contribuir para o estudo de variedades de espécies do gênero *Mentha*, analisando e estabelecendo uma relação entre as composições químicas dos óleos essenciais e suas propriedades biológicas, tais como atividade antioxidante, antiacetilcolinesterase e antifúngica.

METODOLOGIA

MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

As espécies vegetais foram cultivadas no horto da Embrapa Agroindústria Tropical (Ceará), localizado no campus da Universidade Federal do Ceará (Ceará-Brasil). As mudas das espécies foram obtidas a partir do banco de germoplasma da Embrapa Produtos Genéticos (Brasília-Brasil). E os óleos essenciais das folhas das plantas foram coletados pelo período da manhã e extraídos por hidrodestilação.

ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA GASOSA / ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-MS)

A análise química dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada em cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas acoplado modelo Shimadzu QP-2010 utilizando as seguintes condições: Coluna: DB-5 MS (Agilent, parte nº 122-5532) com revestimento da



coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 milímetros x 0.25 μm); Gás transportador: He com vazão de 1 mL/min, no modo de velocidade linear constante; Temperatura do injetor foi de 250°C, no modo split (1:100), e a temperatura do detector foi de 250°C. A programação de temperatura da coluna foi de 35 - 180°C a 4°C/min, em seguida, 180 - 280°C a 17°C/min, e a 280°C por 10 min; Espectros de massas com impacto de elétrons de 70 eV. O volume de amostra injetado foi de 1 mL.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-RADICAIS LIVRES PELO MÉTODO DPPH (1,1-DIFENIL, 2-PICRILHIDRAZIL)

Utilizou-se o método desenvolvido por Yopez *et al.* (2002), onde 0,1 mL de solução de metanol de cada amostra (10.000 – 1 ppm) foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 3,9 mL de solução de metanol DPPH $6,5 \times 10^{-5}$ M. O teste foi realizado em triplicata e após 1 hora, a absorbância da mistura foi medida em 515 nm.

DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE – SISTEMA DE CO-OXIDAÇÃO DE β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

O ensaio de clareamento com β -caroteno foi realizado de acordo com o método desenvolvido por Wettasinghe e Shahidi (1999). 2mL de solução de β -caroteno (0,2 mg/mL de clorofórmio) foi pipetado para um frasco de fundo redondo contendo 20 μL de ácido linoleico e 200 μL de Tween 40. A mistura foi evaporada à temperatura ambiente para remover o clorofórmio. Após evaporação, a mistura foi imediatamente adicionada a 100 mL de água destilada. A mistura foi agitada vigorosamente para formar uma emulsão. Alíquotas de 0,2 mL de soluções das amostras foram adicionadas a 5 mL da solução de ácido β -caroteno-linoleico. As misturas foram incubadas a 50°C durante 2 horas e medidas em UV a 470 nm.

INIBIÇÃO DA AChE

A inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Ellman, posteriormente adaptada por Rhee *et al.* (2001). O ensaio consiste na aplicação da amostra em cromatoplas e pulverização da placa com reagente de Ellman. A cromatoplasca foi posteriormente pulverizada com enzima AChE (3U/mL). Após 3 min, a inibição da enzima foi observada pela presença de manchas brancas na placa amarela. Após 10 minutos os diâmetros foram medidos para determinação do halo de inibição. A fisostigmina foi usada como controle positivo.



ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Preparação de inóculo para testes de sensibilidade a antifúngicos

O inóculo foi preparado a partir de cepas cultivadas em ágar Sabour e dermatofítico por 5 dias a 35°C e cepas de levedura por 35 h a 24°C. Um fragmento de *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans* foi transferido para tubos contendo 9 mL de soro fisiológico para obter uma turbidez equivalente ao padrão 5×10^4 mL⁻¹ ou 0,5 McFarland na escala UFC. As suspensões foram diluídas a 1:2 para *Candida albicans* e 1:5 para *M. canis* e *T. rubrum*, ambos com meio RPMI 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7,0 com ácido morfolinopropano sulfônico 0,165 M, para obter o tamanho do inóculo de aproximadamente $2,5 - 5 \times 10^3$ UFC/mL para *Candida albicans* e 5×10^4 UFC/mL para *M. canis*.

Método de microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (MFC) dos óleos essenciais contra microrganismos dermatófitos e leveduriformes foram realizadas pelo método de microdiluição em caldo utilizando placas de 96 poços para microdiluição de acordo com o CLSI M27A2 (2002). Os óleos foram preparados em óleo mineral na concentração de 2,5 mg/mL diluídos em 100 µL de meio RPMI 1640 e testados em uma faixa de concentração de 9,7 - 2500 µg/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição química dos óleos essenciais das espécies *Mentha* spp está apresentada na Tabela 1 e Tabela 2. Foram identificados 50 compostos nos óleos e a porcentagem de compostos identificados variou de 87,45 a 98,80%. Os óleos essenciais das espécies *Mentha* apresentaram predominantemente monoterpenos oxigenados. Um teor significativo de hidrocarbonetos monoterpenicos também foi observado no óleo essencial de *M. spicata* (Botucatu).



Tabela 1: Composição percentual relativa dos óleos essenciais das espécies *Mentha*.

Compostos	RI _{Lit.}	RI _{Exp.}	<i>M. piperita</i> Chocolate mint	<i>M. piperita</i> Grapefruit mint	<i>M. canadensis</i> Japanese mint	<i>M. arvensis</i> Ginger mint	<i>M. longifolia</i> Himalayan silver mint
α-Pineno	939	945	1.11	-	0.70	0.65	1.65
Sabineno	975	973	0.93	-	0.34	0.89	1.31
β-Pineno	980	979	1.69	-	0.75	1.37	1.92
Mirceno	990	987	-	0.79	0.62	0.97	2.51
3-Octanol	994	994	-	-	0.75	-	-
1-Limoneno	1029	1022	3.04	1.81	4.26	0.80	13.81
1,8-Cineol	1031	1024	4.76	0.98	-	10.04	1.48
cis-Ocimeno	1040	1028	-	-	-	0.55	-
trans-β-Ocimeno	1044	1038	-	-	-	0.44	-
L-Linalol	1099	1091	-	25.43	0.82	34.57	-
Mentone	1155	1148	17.27	3.68	3.00	-	-
Isomentona	1163	1153	-	-	29.07	-	-
Mentofurano	1164	1154	23.70	4.03	-	-	-
Neomentol	1166	1163	2.87	-	1.84	-	-
Isopulegona	1174	1167	-	-	0.19	-	-
1-Mentol	1175	1170	-	2.69	46.98	-	-
α-Terpineol	1188	1172	-	0.88	0.40	2.38	-
Neomentol	1192	1174	14.35	-	-	-	-
Pulegone	1207	1229	10.74	1.90	1.45	-	-
Carvone D	1244	1247	-	-	-	0.96	5.21
cis-piperitone oxido	1254	1249	-	-	-	-	1.44
Linalil acetato	1257	1253	-	51.35	1.42	39.72	-
Piperitona	1262	1254	-	-	1.46	-	-
Mentol acetato	1295	1292	-	1.25	4.34	-	-
Iso-Mentil acetato	1298	1294	6.37	-	-	-	-
Nerila acetato	1361	1357	-	0.75	0.19	0.58	-
Óxido de Piperitenona	1363	1363	2.13	-	-	-	60.79
Geranyl acetate	1381	1386	-	1.29	0.22	1.28	-
β-Cariofileno	1418	1420	4.56	1.03	0.75	1.88	4.69
β-Farneseno	1457	1461	0.99	0.69	-	0.64	-
Germacreno D	1485	1483	5.48	1.46	-	0.82	5.18
Elemol	1549	1552	-	-	-	1.10	-
% Total identificados			99.98	99.47	99.55	88.80	99.99

IRlit- Índice de retenção da literatura; IRExp - Índice de retenção experimental



Tabela 2: Composição percentual relativa dos óleos essenciais das espécies *Mentha* (continuação)

Compostos	IR _{Lit.}	IR _{Exp}	<i>M. aquatic</i>	<i>Mentha x</i>	<i>M. spicata</i>	<i>M. spicata</i>	<i>M. spicata</i>
			Lavander mint	<i>piperita</i> Peppermint	Large leaf spearmint	Hortelã caseira	Ciudad del Leste mint
α-Pineno	939	945	1.09	1.08	1.69	1.14	1.05
Camfeno	954	957	-	-	0.71	-	-
Sabineno	975	973	0.82	0.81	1.43	0.77	1.04
β-Pineno	980	979	1.38	1.50	4.27	1.19	1.63
Mirceno	990	987	1.21	1.21	1.67	1.05	1.31
3-Octanol	994	994	0.24	-	-	-	-
Limoneno	1029	1022	28.29	37.18	22.10	28.81	2.04
1,8-Cineol	1031	1024	-	2.41	2.62	-	8.10
cis-Ocimeno	1040	1028	0.36	-	-	-	-
β-Ocimeno	1044	1038	-	-	-	-	0.28
γ-Terpineno	1059	1047	-	-	0.36	-	-
L-linalol	1099	1091	-	-	-	0.53	-
Mentona	1155	1148	-	-	0.46	-	11.60
Isomentona	1163	1154	-	-	-	-	4.46
Neomenthol	1166	1163	-	-	-	-	2.28
Borneol L	1169	1165	-	-	1.02	-	-
Isopulegone	1174	1167	-	-	-	-	1.29
1-Mentol	1175	1170	-	0.84	-	-	-
4-Terpineol	1177	1172	-	-	0.37	0.61	-
α-Terpineol	1188	1174	-	0.30	-	-	-
Methyl chavicol	1195	1193	-	-	0.61	2.60	-
Pulegone	1207	1229	-	-	6.68	-	53.95
trans-Carveol	1216	1230	0.33	-	-	0.44	-
Carvone D	1244	1247	58.79	49.27	31.35	54.94	-
Piperitone	1262	1254	-	1.19	-	-	-
Bornil acetate	1283	1284	-	-	0.42	-	-
Piperitenona	1343	1337	-	-	-	-	1.13
β-Bourbonene	1388	1384	1.08	1.00	5.37	1.39	-
β-Elemeno	1390	1392	-	-	0.33	-	-
β-Cariofileno	1418	1420	1.93	1.16	3.09	2.02	1.08
α-Humuleno	1452	1457	-	-	-	0.40	-
β-Farneseno	1457	1461	0.61	-	0.49	-	-
Germacreno D	1485	1483	1.72	0.59	1.00	2.03	0.57
Spatulenol	1578	1576	-	-	0.45	-	-
Viridiflorol	1592	1593	0.60	-	-	-	-
Fitol	1949	1838	-	-	0.96	-	-
% Total identificados			98,44	98,53	87,45	98,64	92,81

IR_{Lit.} - Índice de retenção da literatura; IR_{Exp} - Índice de retenção experimental

A avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais das espécies *Mentha* é apresentada na Tabela 3. Os óleos essenciais das espécies de *Mentha* apresentaram bons resultados no método do sistema β-caroteno/ácido linoleico, o que é esperado uma vez que o caráter hidrofóbico é um fator importante para a exibição de atividade antioxidante conforme descrito por Lagouri e Boskou (1995).

O teste de atividade antioxidante mostrou que os óleos com resultados próximos ao do padrão Trolox (IC₅₀ = 0,13 ± 0,01 mg/mL) foram o de *M. spicata* (Hortelã caseira) com IC₅₀ =



0,23 ± 0,01 mg/mL, tendo como constituintes principais limoneno e carvona. Resultados interessantes também os de *M. spicata* (large leaf spearmint) com IC₅₀ = 0,96 ± 0,06 mg/mL e *M. aquática* (Lavander) com IC₅₀ = 1,62 ± 0,05 mg/mL apresentando composição semelhante. Outros óleos com propriedades antioxidantes próximas foram os de *M. arvensis* (ginger mint), *M. piperita* (Grapefruit) contendo como principais constituintes o linalol e linalil acetato. A *M. longifolia* (Himalayan silver mint) também se destacou com IC₅₀ = 0,64 ± 0,02 mg/mL, tendo como constituintes majoritários limoneno e óxido de piperitenona.

Os compostos limoneno, linalol e linalil acetato apresentam vários hidrogênios alílicos que possuem um caráter ácido ou um potencial antioxidante. Já o óxido de piperitenona e a carvona possuem hidrogênios alílicos a duplas como também hidrogênio ligados a carbono alfa às carbonilas que conferem um maior caráter ácido ou maior poder antioxidante a estes hidrogênios.

Tabela 3: Atividade antioxidante pelo método do β-Caroteno/ácido linoleico e inibição da acetilcolinesterase das espécies de *Mentha*

Mentha	β-Caroteno CI₅₀ (mg/mL)	AChE Inibição (cm)
<i>M. piperita</i> (Chocolate mint)	1,82 ± 0,05	1.0
<i>M. piperita</i> (Grapefruit mint)	1,52 ± 0,05	NI
<i>Mentha x piperita</i> (Peppermint)	3,57 ± 0,22	NI
<i>M. aquatica</i> (Lavander mint)	1,62 ± 0,05	0.7
<i>M. canadensis</i> (Japanese mint)	3,48 ± 0,13	NI
<i>M. longifolia</i> (Himalayan silver mint)	0,64 ± 0,02	0.7
<i>M. arvensis</i> (Ginger mint)	0,33 ± 0,03	0.6
<i>M. spicata</i> (Larg leaf spearmint)	0,96 ± 0,06	0.7
<i>M. spicata</i> (Hortelã caseira)	0,23 ± 0,01	0.6
<i>M. spicata</i> (Ciudad del Leste mint)	2,65 ± 0,03	NI
Trolox	0,13 ± 0,01	-
Physostigmina	-	0.9

NI: nenhuma inibição.

Em geral, os compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais como timol e carvacrol apresentam maior atividade antioxidante, porém, no óleo essencial de *M. spicata* os hidrocarbonetos insaturados estão em maior proporção. A presença de monoterpenos oxigenados como os álcoois alílicos, compostos carbonílicos apresentando hidrogênios na posição alfa e hidrocarbonetos terpênicos insaturados como limoneno tem atividade significativa (Ruberto e Baratta, 2000).

A avaliação da ação inibidora da enzima acetilcolinesterase dos óleos, na Tabela 3, mostrou-se positiva para os óleos essenciais de *M. piperita* (chocolate mint) com principais



constituintes mentona e mentofurano, *M. aquatica*, *M. spicata* (Large leaf) e *M. spicata* (Hortelã caseira) os constituintes majoritários foram limoneno e carvona e *M. longifolia* os constituintes principais foram limoneno e óxido de piperitenona. Observa-se que os óleos essenciais de menta foram avaliados por Miyazawa *et al.* (1998) e mostraram forte atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, e alguns compostos majoritários foram testados como 1,8-cineol, óxido de piperitenona, mentona, mentofurano, linalol, linalil acetato, carvona e limoneno que apresentaram atividade moderada, o que sugerem os autores que a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase dos óleos de *Mentha* está relacionada a um mecanismo sinérgico que ocorre entre os constituintes.

A atividade antifúngica dos óleos essenciais das espécies *Mentha* é apresentada na Tabela 4. Pode-se observar que o óleo de *M. spicata* (hortelã Ciudad del Leste) se destaca por suas fortes propriedades antifúngicas, inibindo o crescimento e matando as colônias de *T. rubrum* e *M. canis*, com valores de CIM (concentração inibitória mínima) menor que o controle e CFM (concentração fungicida mínima) próximo ao controle. Nenhum dos óleos testados apresentou atividade antifúngica para *Candida albicans*. A boa atividade antifúngica do óleo essencial de *M. spicata* (hortelã Ciudad del Leste) está provavelmente relacionada ao alto teor do composto pulegona (53,95%) descrito na literatura como um potente fungicida (Oumzil *et al.*, 2002).



Tabela 4: Atividade antifúngica de óleos essenciais de *Mentha*.

	Microorganismos											
	<i>T. rubrum</i> CEMM 5-1-08		<i>T. rubrum</i> CEMM 5-1-034		<i>M. canis</i> LABMIC 1-1-01		<i>M. canis</i> LABMIC 1-1-02		<i>C. Albicans</i> LABMIC 2-1-01		<i>C. Albicans</i> LABMIC 2-1-02	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>M. piperita</i> Chocolate mint	NI	-	0.62	1.25	NI	-	2.5	-	NI	-	NI	-
<i>M. piperita</i> Grapefruit mint	2.5	-	0.62	1.25	0.62	1.25	NI	-	NI	-	NI	-
<i>M. aquatica</i> Lavander mint.	NI	-	0.62	1.25	1.25	2.5	1.25	2.5	NI	-	NI	-
<i>M. canadensis</i> Japanese mint	NI	-	1.25	2.5	2.5	-	2.5	-	NI	-	NI	-
<i>M. x piperita</i> Peppermint	NI	-	1.25	2.5	0.62	1.25	NI	-	NI	-	NI	-
<i>M. arvensis</i> Ginger mint	NI	-	1.25	2.5	0.62	1.25	NI	-	NI	-	NI	-
<i>M. spicata</i> Larg leaf spearmint	NI	-	0.62	1.25	NI	-	2.5	-	NI	-	NI	-
<i>M. longifolia</i> Himalayan silver mint	NI	-	1.25	2.5	0.31	0.62	NI	-	NI	-	NI	-
<i>M. spicata</i> Hortelã caseira	NI	-	0.62	1.25	2.5	-	2.5	-	NI	-	NI	-
<i>M. spicata</i> Ciudad del Leste mint	2.5	-	0.31	0.62	0.62	1.25	1.25	2.5	NI	-	NI	-
Controle	4,0	8,0	1,0	0,5	1,0	0,5	2,0	4,0	1,0	2,0	2,0	4,0

CIM: concentração inibitória mínima expressa em mg.ml⁻¹; CFM: Concentração fungicida mínima em mg.ml⁻¹;
NI: não inibe; (-): indica que não há maneira de determinar CFM porque a CIM foi observada na mais alta
concentração; Duas replicatas foram feitas para cada experimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição dos óleos essenciais das plantas do gênero *Mentha* avaliadas apresentam predominância de monoterpenos oxigenados, com destaque para os compostos isomentona, mentol, mentofurano, D-neoisomentol, 1,8-cineol (eucaliptol), D-carvona, linalol, linalil acetato, óxido de piperitenona, pulegona e também limoneno, um hidrocarboneto monoterpênico. A atividade antioxidante em espécies de *Mentha* está relacionada a presença nos compostos com ligações duplas com hidrogênios alílicos e carbonilas com hidrogênios alfa que possuem um caráter ácido ou um potencial antioxidante. Em relação à atividade antiacetilcolinesterase observou-se que a ação inibitória da enzima deve ocorrer através de um mecanismo sinérgico entre os componentes majoritário e minoritário, onde a presença de óxido de piperitenona, mentofurano, 1,8-cineol, carvona, linalol e limoneno como componentes majoritários, destaca essa ação inibitória. As propriedades antifúngicas dos óleos essenciais de



Mentha apresentaram atividade moderada, na qual a composição também tem relação direta com essa atividade. A presença do composto antifúngico pulegona em alta concentração no óleo de *M. spicata* (Ciudad del Leste mint) confere suas melhores propriedades antifúngicas.

REFERÊNCIAS

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites), *In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry; Molecular Biology of Plants*, Oxford, UK: Willey, 2000, cap. 24, p. 1132-1206.

FIRMO, W.C.A.; *et al.* Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v.18, p.90-95, 2011.

GRACINDO, L. A. M. B.; *et al.* Chemical characterization of mint (*Mentha* spp.) germplasm at Federal District, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais-Botucatu**, v. 8 n. Special, p. 5-9, 2006.

HUSSAIN, A. I.; *et al.* Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistan. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 1, p. 78-84. 2010.

LAGOURI, V.; BOSKOU, D. **Screening for antioxidant activity of essential oils obtained from spices**. *Developments in Food Science*, v. 37, n. C, p. 869-879, 1995.

LORENZI H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 542 p.

MATTOS, Sergio Horta. **Estudos Fitotécnicos da *Mentha arvensis* L. var. *piperacens* Holmes para produção de mentol no Ceará**. 2000. 98 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

MIMICA-DUKIC, N.; *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. **Planta Medica**. v. 69, p. 413-419, 2003.

MIYAZAWA, M.; *et al.* Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of mentha species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3431-3434, 1998.

MONTEIRO, Rodrigo. **Desenvolvimento de menta e produção de óleo essencial sob diferentes condições de manejo**. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MORAIS S. M.; *et al.* Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

OUMZIL, H.; *et al.* Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 8, p. 727-731. 2002.



PEIXOTO, I. T. A.; *et al.* Potential pharmacological and toxicological basis of the essential oil from *Mentha* spp. **Journal of the Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 3, p. 235–239, 2009.

PITTLER, M. H.; ERNST, E. Peppermint oil for irritable bowel syndrome: a critical review and metaanalysis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 93, p. 1131-5, 1998.

RHEE I. K.; *et al.* Screening for acetylcholinesterase inhibitors from *Amaryllidaceae* using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, p. 217-223, 2001.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, p. 167-174, 2000.

SCHMIDT, E.; *et al.* Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of essential oil from *Mentha x piperita*. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 8, p. 1107–1112, 2009.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 1801-1812, 1999.

XU, P.; *et al.* Studies on components and quality of essential oil from *Mentha piperita* L. produced in Xinjiang, China. **Chemistry and Industry of Forest Products**, v. 23, p. 43-45, 2003.

YEPEZ, B.; *et al.* Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by super-critical fluid extraction. **Fluid Phase Equilibre**. v. 194, p. 879-884, 2002.



ARTIGO 14

PROSPECÇÃO, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO NO SENSORIAMENTO DE Co^{2+}

DOI 10.47402/ed.ep.c202218321420

Bruno Peixoto de Oliveira
Isadora Moreira Sampaio
Joice Farias do Nascimento
Nathália Uchôa de Castro Bessa
Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu

RESUMO

Pontos quânticos de carbono (PQCs) também chamados de carbon-dots, sintetizados a partir de matrizes carbonáceas naturais são uma boa alternativa aos PQ de origem inorgânica devido a sua baixa citotoxicidade. Neste trabalho, o pequi (*Caryocar coriaceum*) foi escolhido como matéria prima vegetal para produção de PQCs. Inicialmente foi realizada uma prospecção afim de identificar qual porção do pequi (casca, mesocarpo e amêndoa) tinha maior potencial para produção dos PQCs. Posteriormente foram preparados PQCs via pirólise de micro-ondas a partir da amêndoa do pequi. As propriedades dos PQC sintetizados foram investigadas através das seguintes técnicas: teste qualitativo fluorescência em câmara escura, espectroscopia UV-Vis e espectroscopia de fluorescência. Os resultados iniciais mostraram que a parte da amêndoa do pequi foi a que exibiu melhores propriedades de fluorescência, tanto no teste qualitativo da câmara escura quanto na espectroscopia de fluorescência. Os resultados preliminares da síntese de PQCs a partir da amêndoa do pequi em função do tempo mostrou que a amostra com tempo de síntese de 6 min não apresentou perfil de fluorescência, diferente das amostras sintetizadas em 2 e 4 min. A amostra sintetizada em 4 min apresentou fluorescência superior. Em um segundo estudo, sintetizou-se PQCs usando outras condições de síntese para aplicação como sensores para a detecção de Co^{2+} . Os resultados obtidos mostraram que a amostra apresentou fluorescência característica bem como bandas de absorção em 280 nm e 320 nm no espectro UV consistentes com outros pontos quânticos de carbono relatados na literatura. Os testes para sensoriamento de Co^{2+} revelaram que na interação dos PQCs houve um aumento da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de Co^{2+} . Com isso, conclui-se que o pequi é uma fonte promissora para produção de PQCs para aplicação no sensoriamento de íons metálicos.

PALAVRAS-CHAVE: Pontos quânticos de carbono. Pequi. Fluorescência. Sensoriamento.

INTRODUÇÃO

O pequi (*Caryocar coriaceum*) é uma fruta tropical tipicamente cultivada no semiárido nordestino, normalmente utiliza-se o fruto na indústria cosmética, lubrificantes, e na indústria farmacêutica (NASCIMENTO, 2018), e o óleo extraído da amêndoa na produção de doces, sorvetes e licores (ALMEIDA; SILVA, 1994). Na literatura, não são encontrados relatos da utilização do pequi como fonte precursora para a síntese dos pontos quânticos de carbono, no entanto, optamos por usar essa fonte carbonácea natural, por seu baixo valor de mercado, grande



importância econômica regional e suas versatilidades de uso. Além de uma nova possibilidade para o aproveitamento deste recurso natural, agregando ainda mais valor e potencialidade ao uso do pequi e a síntese de pontos quânticos de carbono.

Pontos quânticos de carbono (PQCs) são nanopartículas fluorescentes com tamanho abaixo de 10 nm que exibem forte fluorescência com emissão ajustável dependendo do tamanho, estrutura da superfície, comprimento de onda de excitação ajustável, biocompatibilidade e baixa citotoxicidade (BAKER; BAKER, 2010). Desde sua descoberta acidental em 2004, os PQCs têm adquirido popularidade e sendo cada vez mais analisados a fim de compreender sobre suas propriedades ópticas, mecanismos de formação e aplicação (WANG *et al.*, 2014).

Os pontos quânticos (PQ) baseados em precursores inorgânicos e metais pesados, como cádmio, apresentam problemas de citotoxicidade quando empregados em larga escala (PAWAR; UPADHAYA; PATRAVALE, 2018). Uma alternativa a esses PQs são os PQCs sintetizados a partir de precursores de biomassa. As vantagens dessa abordagem são a utilização de condições mais brandas na síntese, a baixa toxicidade do material produzido, alta solubilidade, biocompatibilidade incluindo o menor preço e sua grande abundância.

Sendo assim, os pontos quânticos de carbono possuem aplicações diversas como na geração de energia, em células solares, bioimagem e sensores químicos (JELINEK, 2016; LI *et al.*, 2018). Na aplicação de sensoriamento os pontos quânticos de carbono interagem com o analito de interesse, gerando assim a diminuição da fluorescência ou aumento dela (LIU *et al.*, 2019). A pesquisa foi baseada em sensor de Co^{2+} visto que esse íon é essencial para o ser humano e possui papel biológico importante, onde os seres humanos apresentam uma grande dependência em decorrência da presença do mesmo na vitamina B₁₂. Essa vitamina participa de processos bioquímicos importantes como a síntese de aminoácidos, ácidos nucleicos e formação de glóbulos vermelhos no sangue. (ALVES; ROSA, 2003). Portanto, propõe-se sínteses de pontos quânticos de carbono a base de pequi.

METODOLOGIA

MATERIAIS

Para a realização da síntese foram utilizados materiais listados na Tabela 1 abaixo:



Tabela 1: Materiais usados na produção de PQC's a base de Pequi.

Pequi (<i>Caryocar coriaceum</i>)
Álcool Etilico PA (DINÂMICA)
Água destilada
Solução Ácido Fosfórico 40%
Etilenodiamina
Solução NaOH 2 mol/L
Micro-ondas doméstico (PHILCO)

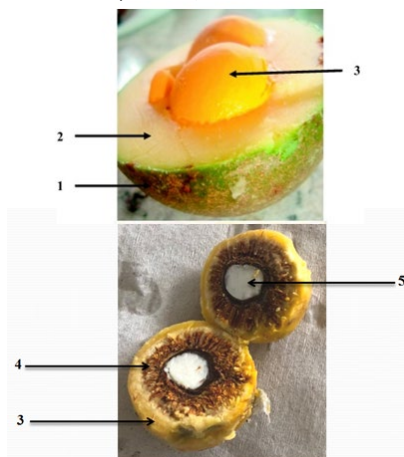
Fonte: Elaborada pelos autores.

SÍNTESES DE PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO

Prospecção dos PQC's a partir do pequi

Inicialmente foi realizado o tratamento do fruto fazendo a separação de suas partes como, exocarpo ou casca, mesocarpo (endocarpo ou tegumento) e semente ou amêndoa (Figura 1) para encontrarmos a melhor parte do fruto e realizar a síntese dos pontos quânticos de carbono. Para isso foram feitos testes na parte da casca, mesocarpo e amêndoa (Tabela 2).

Figura 1: 1. Exocarpo (casca externa verde); 2. mesocarpo (parte interna amarelada da casca); 3. endocarpo (polpa laranja / amarelada); 4. tegumento (marrom e duro, coberto por uma camada de espinhos finos que penetram no endocarpo); e 5. semente (branca, incluindo o embrião, tegumento e endosperma).



Fonte: Leão *et. al.* (2017).



Tabela 2: Condições experimentais dos testes feitos nas partes da casca, mesocarpo e amêndoa respectivamente seguindo a metodologia de Gong *et al.*, (2015) com adaptações.

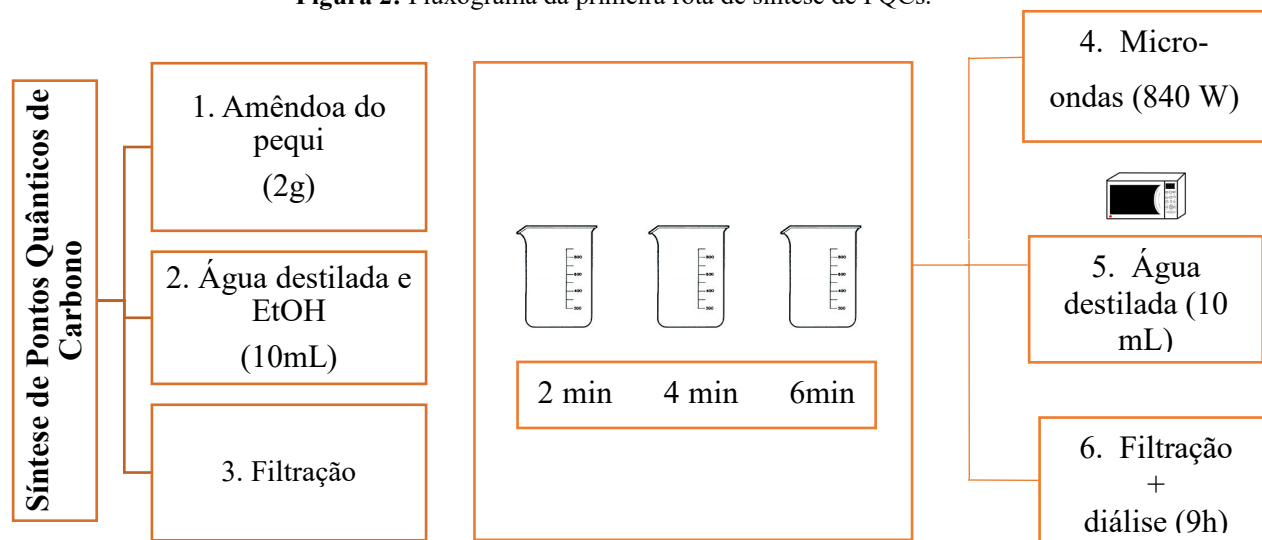
Parte do pequi	Massa (g)	Água (mL)	Micro-ondas (W/min.)	Centrifuga (rpm/min.)	Fluorescência visível
CANMAX12	2	10	1400/12	4000/30	-
MESNMAX12	2	10	1400/12	4000/30	-
AMNMAX12	2	10	1400/12	4000/30	+

Fonte: Elaborada pelos autores.

Influência do tempo de síntese para produção de PQC's a partir da amêndoa do pequi

Os PQC's foram preparados seguindo o método de Bhamore *et al.*, (2018) com adaptações. Pesou-se aproximadamente 2g da amêndoa pequi em 3 béqueres diferentes, macerou-se a amêndoa com um almofariz e pistilo. Acrescentou-se 10 mL de água destilada em cada béquer e 10 mL de álcool etílico, filtrou-se as amostras em béqueres de 100 mL, em seguida as amostras foram para o micro-ondas na potência de 840 W cada uma em tempos diferentes 2, 4 e 6 minutos constantes, em seguida foram adicionados mais 10 mL de água destilada para dissolver o produto resultante, as amostras foram filtradas e dialisadas por 9 horas seguidas (Figura 2).

Figura 2: Fluxograma da primeira rota de síntese de PQC's.



Fonte: Elaborada pelos autores.

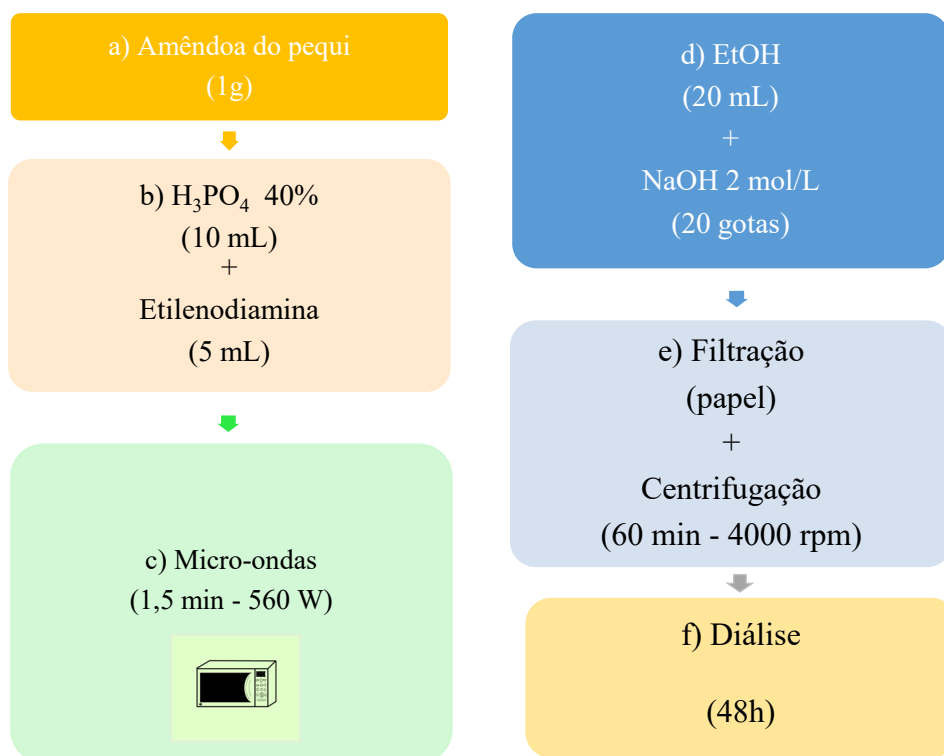
Síntese dos PQC's para sensoriamento de Co^{2+}

A síntese adotada de pontos quânticos de carbono para o sensoriamento foi adaptada ao proposto por Raji *et al.*, 2019. Foi pesado e macerado 1g da amêndoa do pequi. Em um béquer adicionou-se à amêndoa macerada 10 mL da solução de ácido fosfórico 40%, e 5mL do agente



dopante (etilenodiamina). A amostra foi levada para o micro-ondas a uma potência de 560W por 1,5 min. Após o resfriamento, a amostra foi dispersa em 20mL de etanol, e 20 gotas de NaOH 2 mol/L foram adicionadas para ajuste de pH. Após filtração com papel de filtro, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 60 min e postas para diálise por 48 horas seguidas. (Figura 3).

Figura 3: Fluxograma da segunda rota de síntese de PQCs



Fonte: Elaborada pelos autores

CARACTERIZAÇÕES

Teste de fluorescência qualitativa em câmara escura

Após cada síntese as amostras foram colocadas em uma câmara escura com uma luz ultravioleta para fazer o teste qualitativo de fluorescência, se a amostra ficar fluorescente é um indicativo que a síntese dos carbon-dots foi bem-sucedida.

Espectroscopia de fluorescência

Para as varreduras de emissão de fluorescência foi utilizado um espectrofluorímetro RF600 (Shimadzu), utilizando lâmpada de arco de Xenônio de 75 W. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 10mm. Os testes de sensoriamento foram realizados a partir



da leitura inicial da intensidade de fluorescência da amostra sem adição de Co^{2+} com 3 mL de PQC de pequi. O sensoriamento foi feito com a adição de 2 mL da amostra de pontos quânticos de pequi com 1 mL de solução de Co^{2+} em diferentes concentrações (5×10^{-4} , 1×10^{-3} , $1,5 \times 10^{-3}$, 2×10^{-3} , $2,5 \times 10^{-3}$ mol/L) e observou-se a resposta da intensidade de fluorescência dos pontos quânticos de carbono.

ESPECTROSCOPIA UV-VIS

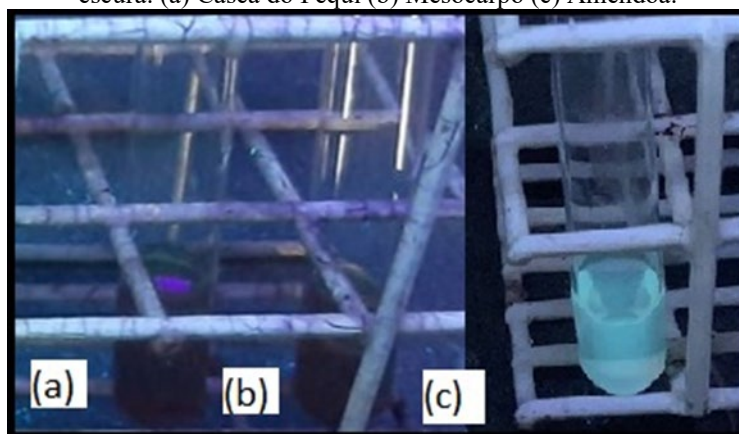
As análises de UV-Vis foram realizadas em espectrofotômetro UV-1800 da Shimadzu, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm, e varredura de 200 a 800 nm, com incremento de 0,5 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PROSPECÇÃO DOS PQC'S A PARTIR DO PEQUI

A Figura 4 representa as amostras CANMAX12, MESNMAX12, AMNMAX12 na câmara escura. Verifica-se que as amostras CANMAX12 e MESNMAX12 não emitem nenhuma fluorescência na presença da luz ultravioleta, indicando que não houve a formação dos pontos quânticos de carbono. A amostra AMNMAX12 exibiu uma fluorescência intensa, revelando ter potencial como fonte precursora de pontos quânticos de carbono.

Figura 4: Teste qualitativo das soluções de pontos quânticos de carbono de diferentes partes do Pequi na câmara escura. (a) Casca do Pequi (b) Mesocarpo (c) Amêndoa.



Fonte: Elaborada pelos autores.

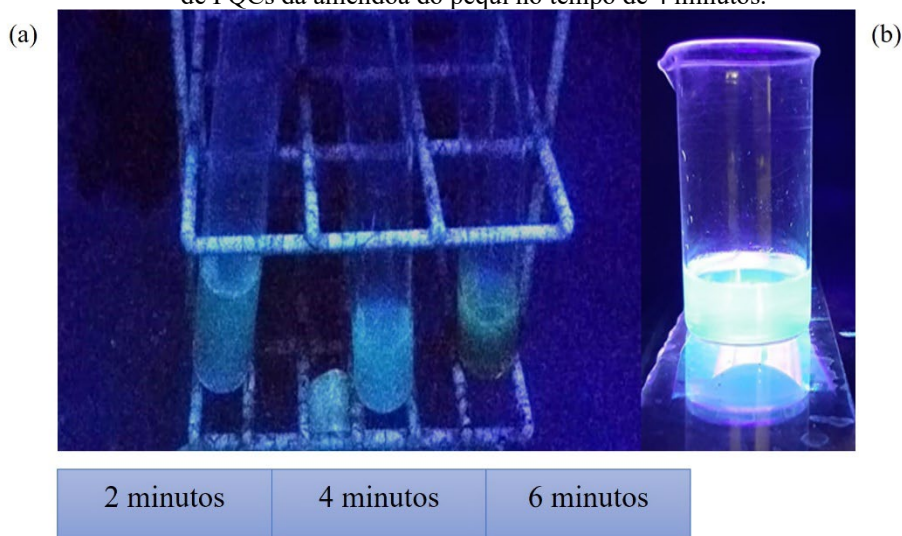
INFLUÊNCIA DO TEMPO DE SÍNTESE NAS PROPRIEDADES DOS PQC'S

Uma vez definido que a amêndoa é a melhor fonte precursora do pequi para a síntese dos PQC's, foi estudado a influência do tempo de síntese nas propriedades dos PQC's. Na Figura 5 (a) temos as amostras AM2', AM4' e AM6' respectivamente onde se pode observar uma fluorescência intensa nas amostras AM2' e AM4'. Na amostra AM6' a luz emitida é de baixa



intensidade. A Figura 5 (b) temos a amostra AM4' tendo a maior intensidade luminosa. Portanto, nas amostras é justificado a síntese de pontos quânticos de carbono.

Figura 5: Amostras da amêndoa em diferentes tempos de síntese. (a) Tempos diferentes de síntese. (b) Amostra de PQC's da amêndoa do pequi no tempo de 4 minutos.



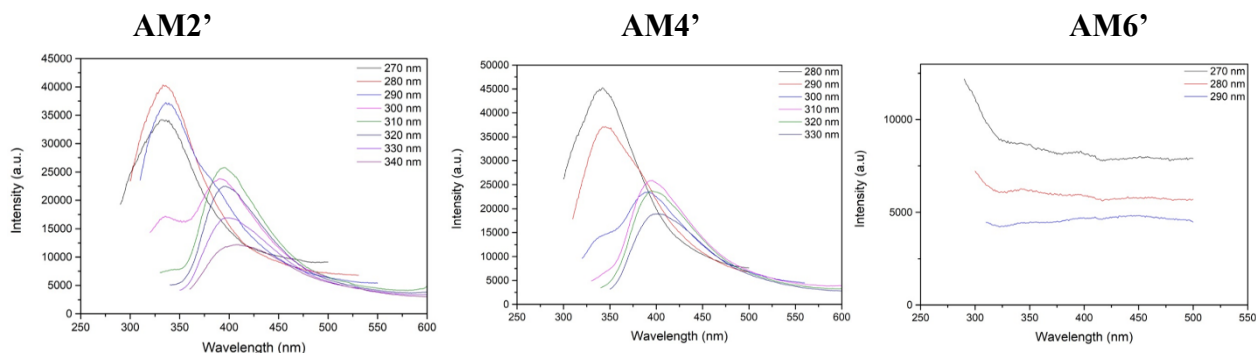
Fonte: Elaborada pelos autores.

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Na sequência da Figura 6 temos os espectros de fluorescência de intensidade versus comprimento de onda das amostras AM2' e AM4' e AM6' (2 – 4 – 6 minutos) respectivamente. A amostra AM2' contém um pico bem acentuado próximo a $\cong 340$ nm com intensidade maior que 40.000 a.u com bandas bastante intensas tendo um perfil de fluorescência indicado pelo pico formado. A amostra AM4' compreende um pico bem acentuado próximo ao comprimento de onda de 330 nm com intensidade maior que 45.000 a.u tornando-se a amostra com maior intensidade de fluorescência. Por outro lado, a amostra AM6' não contém perfil de fluorescência já que não apresenta um pico acentuado de intensidade. Conclui-se então que nas condições realizadas, o tempo de 4 minutos exibiu melhores propriedades de fluorescência em função do perfil da espectroscopia de fluorescência.



Figura 6: Espectroscopia de Fluorescência das amostras AM2', AM4', AM6'.



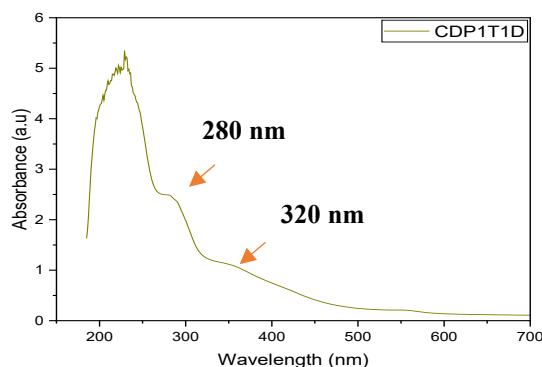
Fonte: Elaborada pelos autores.

PROPRIEDADES DOS PQC_s PRODUZIDOS PARA SENSORIAMENTO DE Co²⁺

Espectroscopia UV-vis e de fluorescência

Na Figura 7 é possível observar que existem dois picos de absorção um a 280 nm e outro em torno de 320 nm. Quase todos os CDs produzidos a partir das mais diversas técnicas apresentam banda de absorção na faixa 260-320 nm (CAO *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2009). Os picos correspondem à transição eletrônica $\pi-\pi^*$ aparece devido ao grupo carbonila e aos carbonos sp^2 (C=C) e a banda de transição $n-\pi^*$ presença de heteroátomos, respectivamente. O surgimento dessas bandas pode ser considerado um forte indício da formação de carbon dots (ZHU *et al.*, 2015).

Figura 7: Espectro na região do ultravioleta-visível da amostra de PQC_s de pequi produzida para o sensoriamento.

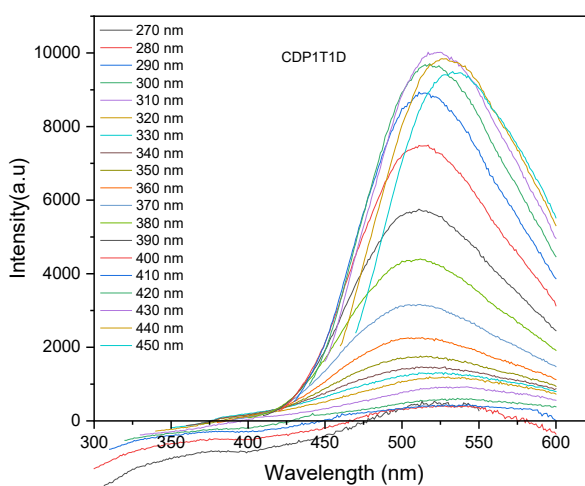


Fonte: Elaborada pelos autores.

Os PQC_s particularmente produzidos para o sensoriamento também foram caracterizados e os resultados constam na Figura 8. O espectro de fluorescência revelou que o ponto mais alto da curva de fluorescência apresentou intensidade por volta de 10.000 u.a. Essa intensidade máxima de emissão foi observada quando o comprimento de onda de excitação era de 430 nm. A emissão foi detectada em 520 nm, correspondendo assim a região do verde no espectro eletromagnético.



Figura 8: Espectroscopia de fluorescência da amostra de PQC's de pequi produzida para o sensoriamento.



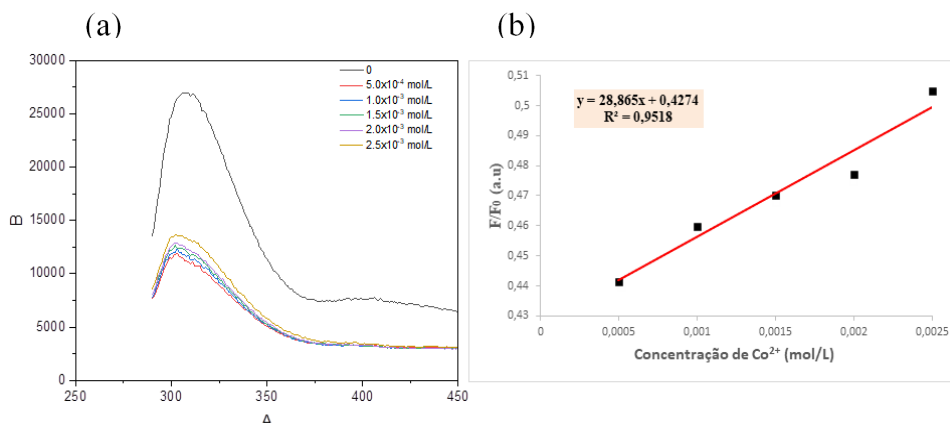
Fonte: Elaborada pelos autores.

SENSORIAMENTO DE Co^{2+}

De acordo com Aberasturi *et al.* (2012) os pontos quânticos podem atuar na detecção de íons por meio da ligação direta dos íons com a nanopartícula. Nesse processo pode causar um aumento ou diminuição da fluorescência. A Figura 9 (a) mostra o espectro de fluorescência da amostra de PQC's na presença de Co^{2+} . No sensoriamento, é possível observar a diminuição da intensidade no primeiro momento de adição da solução de Co^{2+} , fato que pode ter relação com a transferência de energia entre o analito e o sensor. A partir do aumento da concentração de Co^{2+} , houve o aumento da intensidade de fluorescência. Esse aumento pode estar associado ao efeito de coordenação entre os grupos funcionais presentes na superfície dos PQC's e o metal, o que gera uma passivação da superfície, elevando assim, a intensidade de fluorescência (LIU *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2020).



Figura 9: (a) Espectro de fluorescência da amostra de PQC's de pequi na presença de concentrações de Co^{2+} . (b) Curva analítica da relação de intensidade de fluorescência (F/F_0) dos PQC's sintetizados versus diferentes concentrações de cobalto.



Fonte: Elaborada pelos autores.

A Figura 9 (b) mostra a curva analítica entre o valor da relação da intensidade fluorescência a partir da presença e ausência do analito (F/F_0) e a concentração de cobalto das soluções. A equação da reta obtida apresentou boa correlação linear de $R^2 = 0,9518$ na faixa das concentrações abordadas. A faixa de resposta obtida pela regressão linear da curva é considerada linear quando seu coeficiente (R^2) é igual ou superior a 0,90 (ANVISA, 2003).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluiu-se que através do estudo exploratório que a amêndoa é o único precursor com potencial para a síntese de PQC's. No estudo preliminar das investigações das condições de síntese observou-se que as propriedades dos PQC's são dependentes do tempo de síntese. Foi comprovada por meio dos testes que a amostra AM6' não possui perfil de fluorescência. Já as amostras AM2' e AM4' apresentaram o perfil de fluorescência, sendo a melhor a amostra AM4' por possuir uma luminosidade mais intensa mostrando ser a melhor precursora para a síntese.

Assim sendo, fica claro que os testes mostram características como a fluorescência e picos nos espectros batem com a literatura. Os PQC's a base de pequi se mostra promissores no sensoriamento de íons Co^{2+} . Gerando assim, um entendimento maior desses nanomateriais tão recentes.

REFERÊNCIAS

ABERASTURI, D. J.; *et al.* Optical Sensing of Small Ions with Colloidal Nanoparticles. **Chemistry of Materials**. v.24, p.738-745, 2012.

ALMEIDA, S. P; SILVA, J. A. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. **Embrapa Cerrados-Documentos** (INFOTECA-E), 1994.



ALVES, A. N. L.; ROSA, H. V. D. Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 2, p. 1-11, 2003.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos**. Resolução – RE Nº 899, de 29 de maio de 2003.

BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. **Angewandte Chemie**, v. 49, p. 6726–6744, 2010.

BHAMORE, J. R.; *et al.* Fluorescence sensing of Cu²⁺ ion and imaging of fungal cell by ultra-small fluorescent carbon dots derived from Acacia concinna seeds. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 277, p. 47-54, 2018.

CAO, L.; *et al.* Carbon Dots for Multiphoton Bioimaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 37, p. 11318–11319, 2007.

GAO, X.; *et al.* Carbon quantum dot-based nanoprobe for metal ion detection. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 4, p. 6927-6945, 2016.

JELINEK, R. **Carbon Quantum Dots: Synthesis, Properties and Applications**. Tuscaloosa: Springer International Publishing, 2016. 130 p.

LEÃO, D. P.; *et al.* Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. **Food Chemistry**, v. 225, p.146-153, 2017.

LI, L.; *et al.* Addressable TiO₂ nanotubes functionalized paper-based cyto- sensor with photocontrollable switch for highly-efficient evaluating surface protein expressions of cancer cells. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 23, p. 13882-13890, 2018.

LIU, M. L.; *et al.* Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and detection applications. **Green Chemistry**, v. 21, p. 449-471, 2019.

NASCIMENTO, Lizie Martins do. **Óleo de pequi: um nutracêutico com propriedades antioxidantes: uma revisão de literatura**. 2018. 54 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

PAWAR, R. S.; UPADHAYA, P. G.; PATRAVALE, V. B. Quantum Dots: novo domínio na indústria biomédica e farmacêutica. **Manual de nanomateriais para aplicações industriais**. p. 621-637, 2018.

RAJI, K.; *et al.* Facile and green synthesis of highly fluorescent nitrogen-doped carbon dots from jackfruit seeds and its applications towards the fluorimetric detection of Au³⁺ ions in aqueous medium and in *in vitro* multicolor cell imaging. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 29, p. 11710-11719, 2019.

SUN, Z.; *et al.* A yellow-emitting nitrogen-doped carbon dots for sensing of vitamin B12 and their cell-imaging. **Dyes and Pigments**. v.176, p. 108227, 2020.



WANG, Y.; *et al.* Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, n. 34, p. 6921-6939, 2014.

YANG, S.-T. *et al.* Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 42, p. 18110–18114, set. 2009.

ZHU, H.; *et al.* Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties. **Chemical Communications**, v. 7, n. 34, p. 5118, 2009.

ZHU, S.; *et al.* The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. **Nano Research**, v. 8, n. 2, p. 355-381, 2015.



ARTIGO 15

ESTRATÉGIA PARA O ECODSIGN DA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

DOI 10.47402/ed.ep.c202218331520

Renata de Araújo e Silva
Ana Iraidy Santa Brígida
Morsyleide de Freitas Rosa
Raimundo Marcelino da Silva Neto
Wilma Aparecida Spinosa
Ednaldo Benício de Sá Filho
Maria Cléa Brito de Figueirêdo

RESUMO

A celulose bacteriana (CB), obtida a partir da fermentação microbiana, é um produto com inúmeras aplicações e em pleno processo de desenvolvimento tecnológico, com inúmeras rotas de produção atualmente disponíveis em escala laboratorial. A integração sistemática de avaliações de desempenho ambiental nesse estágio inicial do desenvolvimento desses processos é importante para permitir escolhas e realizar melhorias que resultem em melhor desempenho ambiental desse produto quando produzido em escala industrial. Esse trabalho apresenta e aplica uma estratégia para o ecodesign da produção de CB, baseada na realização de duas ACVs para seleção de rotas e implementação de melhorias em rota específica. Parte-se da avaliação de três rotas alternativas de produção de CB (melaço de soja hidrolisado - MSH, melaço de soja diluído - MSD, suco de caju suplementado SCS) em comparação a uma rota de referência (meio sintético Hestrin&Schramm - HS), todas em escala laboratorial. Essa avaliação permitiu selecionar a rota MSH como mais promissora, assim como a troca de reagentes para redução de impactos. Em seguida, as rotas MSH e HS foram simuladas em escala industrial e novamente comparadas, reforçando o melhor desempenho da rota MSH. Os resultados obtidos nesse estudo permitiram indicar a rota MSH para implementação em planta piloto, assim como otimizar a estratégia de ecodesign originalmente proposta. Essa estratégia pode ser adaptada para inserção da avaliação ambiental no processo de desenvolvimento de outras tecnologias.

PALAVRAS-CHAVE: ecodesign; celulose bacteriana; ACV.

INTRODUÇÃO

O ecodesign traz a avaliação de desempenho ambiental para o processo de concepção e desenvolvimento tecnológico, antecipando possíveis impactos ambientais negativos e melhorando o desempenho ambiental de novas rotas e produtos. O ecodesign vem sendo promovido por instituições governamentais em todo o mundo, como a União Europeia com a Diretiva para o Ecodesign (EU, 2009), por gerar otimizações nos processos produtivos, melhorando a eficiência no uso dos recursos, reduzindo poluentes, e gerando novos produtos com menor impacto ambiental.



Nesse contexto, a celulose bacteriana (CB), obtida a partir da fermentação microbiana, é um exemplo de produto com processo de produção em investigação, visando ampliação de escala (JANG *et al.*, 2017). A produção de CB em escala piloto, a um custo acessível, é um desafio perseguido por equipes de pesquisa e desenvolvimento em todo mundo (GULLO *et al.*, 2017). Atualmente, o elevado custo do processo de produção de CB em meio estático, utilizando meio fermentativo sintético, inibe sua produção em escala industrial.

A diversidade de meios e sistemas de cultivo promissores para produção de CB requerem uma decisão sobre qual processo empregar para que os potenciais impactos ambientais da CB sejam menores ou pelo menos iguais aos de produtos similares. A realização de avaliações ambientais durante o processo de desenvolvimento tecnológico pode auxiliar a escolha sobre materiais e rotas de produção mais promissoras para investimentos em plantas piloto.

Esse trabalho apresenta e aplica uma estratégia para o ecodesign da produção de CB, baseada na realização de avaliação de ciclo de vida (ACV), para seleção de rotas e implementação de melhorias em rota específica em escala laboratorial e simuladas industrialmente. Os resultados da aplicação são empregados para otimização da estratégia de ecodesign de processos de produção de CB, podendo ser adaptada para o ecodesign de outras tecnologias em estágio inicial de desenvolvimento.

METODOLOGIA

ESTRATÉGIA PARA O ECODESIGN de processos de produção de CB

A estratégia proposta para o ecodesign de processos de produção de CB abrange a realização de avaliações técnicas e ambientais, na fase de experimentação do processo de desenvolvimento tecnológico. Inicialmente, são identificadas as rotas que produzem CB em quantidade e qualidade próxima à obtida por rota identificada como de referência por meio de revisão da literatura.

Identificadas as rotas de produção de CB em escala laboratorial, iniciam-se as avaliações ambientais comparativas dessas rotas com a de referência. Essas avaliações são baseadas nas normas NBR ISO 14040 (2014a) e 14044 (2014b) que estabelecem etapas e critérios de qualidade para estudos de avaliação de ciclo de vida (ACV).

A primeira ACV proposta é baseada em inventários de processos de produção de CB testados em laboratório e é indicada para o caso de muitas rotas de produção terem sido



identificadas e precisarem serem selecionadas. A produção de CB pode ocorrer em diferentes meios de cultura, incluindo efluentes ricos em açúcares e disponíveis em diversas regiões, gerando-se muitas rotas de produção alternativas e o dilema sobre qual rota privilegiar para elevação da sua maturidade tecnológica. Assim, essa avaliação inicial tem como objetivo selecionar a rota tecnológica cujo desempenho ambiental seja significativamente melhor que o das demais rotas avaliadas, incluindo uma de referência, mais consolidada na literatura.

Para que a rota selecionada possa avançar no processo de desenvolvimento tecnológico ela precisa ser simulada em escala industrial, adaptando-se equipamentos e fontes de energia para a produção industrial. A definição de novos equipamentos costuma alterar o consumo energético e de água, além do tempo de produção (HETHERINGTON *et al.*, 2014; PICCINNO *et al.* 2016), modificando o desempenho ambiental das rotas avaliadas em escala laboratorial.

Assim, propõe-se realizar uma segunda ACV comparativa entre rotas, utilizando dados de inventário de uma planta simulada em escala industrial. Como na primeira avaliação, propõe-se que a segunda ACV também analise os pontos críticos da rota alternativa, modelada em escala industrial. É possível que outras etapas dessa rota, diferentes das apontadas na ACV 1, passem a ser relevantes nessa escala de produção, como apontado por Piccinno *et al.* (2016). Assim, essa análise permite a identificação de outros pontos críticos e novas investigações visando a melhoria de desempenho ambiental.

APLICAÇÃO DA ESTRATÉGIA DE ECODESIGN

A estratégia de ecodesign foi aplicada na escolha de rotas tecnológicas em desenvolvimento nos laboratórios de Tecnologia da Biomassa da Embrapa Agroindústria Tropical e de Análise de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, no Brasil. De acordo com a literatura (ÇAKAR *et al.*, 2014), a rota mais utilizada de produção de CB, considerada referência nesse trabalho, foi a de produção em meio sintético Hestrin;Schramm (HS), composto por uma mistura de glicose, peptona, extrato de levedura, ácido cítrico e fosfato de sódio (HESTRIN; SCHRAMM, 1954).

As seguintes rotas foram investigadas: melaço de soja hidrolisado (MSH), melaço de soja diluído (MSD) e suco de caju suplementado (SCS). Além de utilizarem diferentes meios de cultivos, essas rotas diferem nos seguintes aspectos: tipo de bactéria, quantidade de inóculo, suplementação, tempo de cultivo, concentração de reagente e condições de secagem.



Objetivo e escopo das ACVs

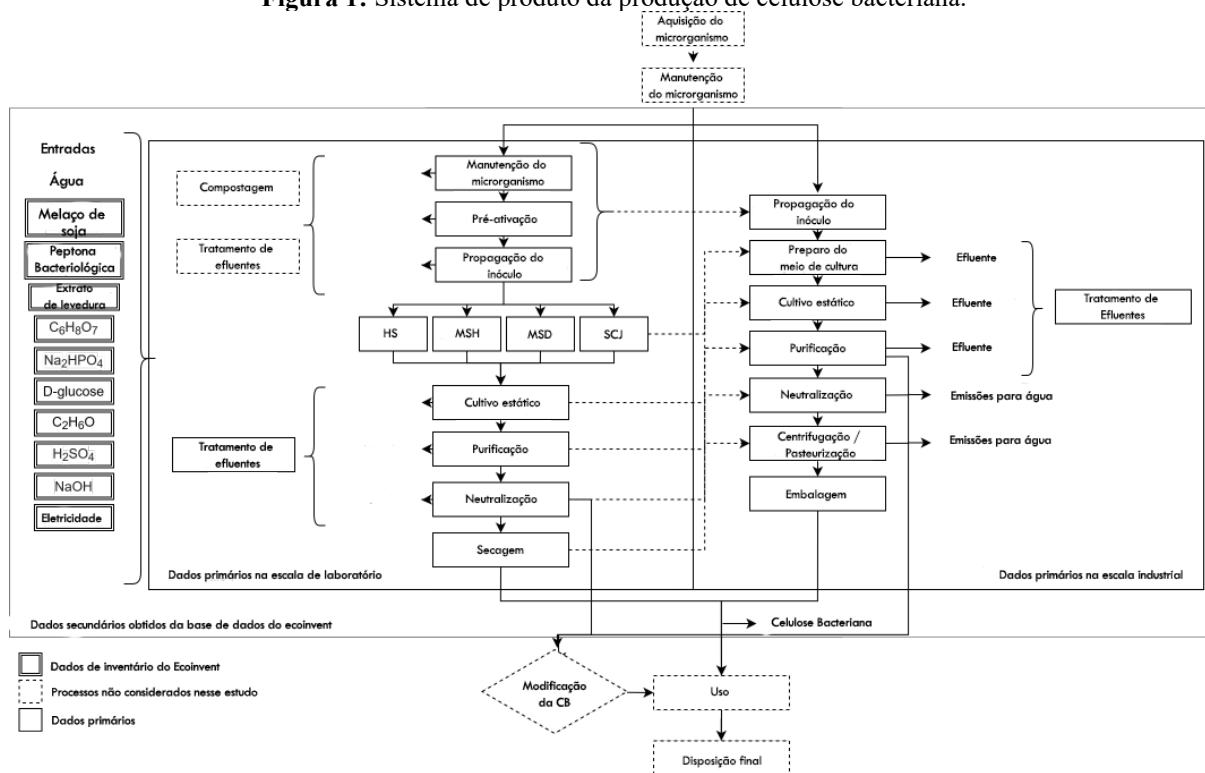
Na ACV 1 (escala laboratorial), foram comparadas as rotas alternativas MSH, MSD e SCS com a rota HS. Na ACV 2 (modelagem na escala industrial), a rota de menor impacto (selecionada na ACV 1) foi comparada com a rota de referência HS. Ambas ACVs (1 e 2) foram do berço ao portão, incluindo as etapas de extração de matérias-primas, produção de insumos e produção de CB. O transporte de insumos até a unidade de produção de CB foi desconsiderado nesse trabalho devido não haver estudos que mostrem a possível localização dessa unidade produtiva nesse nível de desenvolvimento da tecnologia.

A unidade funcional empregada na ACV 1 foi a produção de 1 g de CB, em 35 dias. Na ACV 2, a unidade funcional foi a produção de 1 kg de CB (80% de umidade), considerando 1 ano de produção.

Nas ACVs 1 e 2, as seguintes etapas de produção de CB foram consideradas: manutenção do microrganismo, pré-ativação, propagação do inóculo, preparo do meio de cultivo, cultivo estático, purificação, neutralização e secagem das películas, e tratamento de efluentes (Figura 1). A compostagem de resíduos sólidos foi realizada apenas na ACV 2, uma vez que a quantidade de resíduos sólido na escala laboratorial foi desprezível. O escopo das ACVs se diferenciou devido à: i) agregação na ACV2 das etapas de manutenção do microrganismo, pré-ativação e propagação do inóculo separadas na ACV1 e ii) consideração na ACV 2 da etapa de embalagem de CB em plástico laminado.



Figura 1: Sistema de produto da produção de celulose bacteriana.



Fonte: elaborada pelos autores.

Coleta de dados de inventário

Dados Primários

Na ACV 1, a quantificação dos insumos, efluentes e produção das rotas HS, SCS e MSH foi realizada entre 2016 e 2018. A descrição detalhada da produção de CB nas rotas HS e MSH está em (CHAGAS, 2018), na rota MSD em (GOMES, 2017) e na rota SCS, em (PINHEIRO, 2016).

Na ACV 2, a rota com menor impacto ambiental (identificada na ACV 1) e a rota de referência (HS) foram modeladas no software SuperPro Designer®, versão 10 (Intelligen Inc. - New Jersey, US). Os dados referentes as condições de fermentação para a produção de CB em escala laboratorial, relacionados a temperatura e tempo de reação, quantidade de insumos em cada etapa, e produção de CB por litro de meio de cultivo foram utilizados nessa modelagem. O projeto conceitual para o processo de produção em escala industrial de CB elaborado por Dourado *et al.* (2016) serviu como base para escolha da capacidade de produção da planta.



Dados secundários

Os inventários de produção do meio HS, produção do suco de caju, produção do suco de caju suplementado e produção do melão de soja foram construídos a partir de dados de literatura, assim como utilizando as bases de dados ecoinvent v.3.0 (WEIDEMA *et al.*, 2013) e Agri-footprint v. 1.0 (Blonk Agri-footprint BV 2014).

Os inventários do suco de caju suplementado e da rota SCS foram obtidos de Pinheiro *et al.* (2017). Já o inventário da produção agrícola de caju foi oriundo de Figueirêdo *et al.* (2016). Os inventários agrícola e de produção do melão de soja foram provenientes da base de dados do Agri-footprint v. 1.0 (Blonk Agri-footprint BV 2014). Os inventários relacionados à produção dos insumos utilizados nas rotas avaliadas, assim como tratamento de efluentes, foram obtidos na base de dados ecoinvent v.3.0 (WEIDEMA *et al.*, 2013).

Avaliação de impactos ambientais

Os métodos escolhidos para a avaliação de impactos nas ACVs 1 e 2 foram o ILCD 2011 Midpoint V1.05, considerando 7 categorias de impacto (mudança climática, acidificação do solo, ecotoxicidade de água doce, toxicidade humana câncer e não câncer, eutrofização de água doce e marinha) e AWARE V1.00 para a categoria de escassez hídrica. Essa avaliação foi realizada no software SimaPro® versão 9.0.0.35 (PRÉ-CONSULTANTS, 2019).

Análise de incerteza

O método de Monte Carlo foi utilizado para análise de incerteza na comparação entre rotas de produção de CB. Considerou-se que os dados de inventário possuem distribuição log-normal. O desvio padrão de cada dado de inventário foi calculado utilizando-se a matriz Pedegree (GOEDKOOOP *et al.*, 2013).

Na comparação entre duas rotas ou produtos (A e B), calculou-se quantas vezes o produto A apresentou menor impacto ambiental que B, avaliando-se o impacto de $A - B < 0$ em 1000 simulações (GOEDKOOOP *et al.*, 2016). Se $A-B < 0$ em pelo menos 95% das simulações, concluiu-se que A causou impacto significativamente menor que B.

RESULTADOS e DISCUSSÕES

ANÁLISE DA VIABILIDADE TÉCNICA DAS ROTAS DE PRODUÇÃO DE CB

Todas as rotas pré-selecionadas (MSH, MSD e SCS) foram consideradas tecnicamente viáveis por produzirem CB em quantidade e qualidade similares a CB oriunda da rota HS,

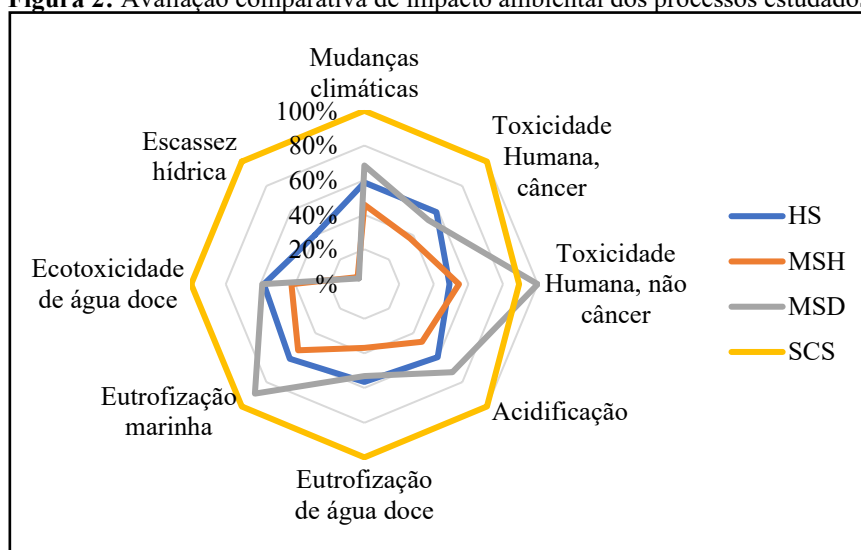


credenciando-as a aplicações típicas desse biopolímero natural (TROVATTI *et al.*, 2011; TSOUKO *et al.*, 2015).

AVALIAÇÃO AMBIENTAL DAS ROTAS NA ESCALA LABORATORIAL (ACV 1)

Ao comparar as rotas de produção de CB, observa-se que a MSH é potencialmente a menos impactante em todas as categorias de impacto avaliadas, enquanto a SCS é a mais impactante (Figura 2). O maior impacto da rota SCS decorre principalmente do menor rendimento de CB obtida por volume de meio de cultivo utilizado (4.6 g L^{-1}). A rota MSH foi a que apresentou melhor rendimento em relação as demais (11.7 g L^{-1}).

Figura 2: Avaliação comparativa de impacto ambiental dos processos estudados.



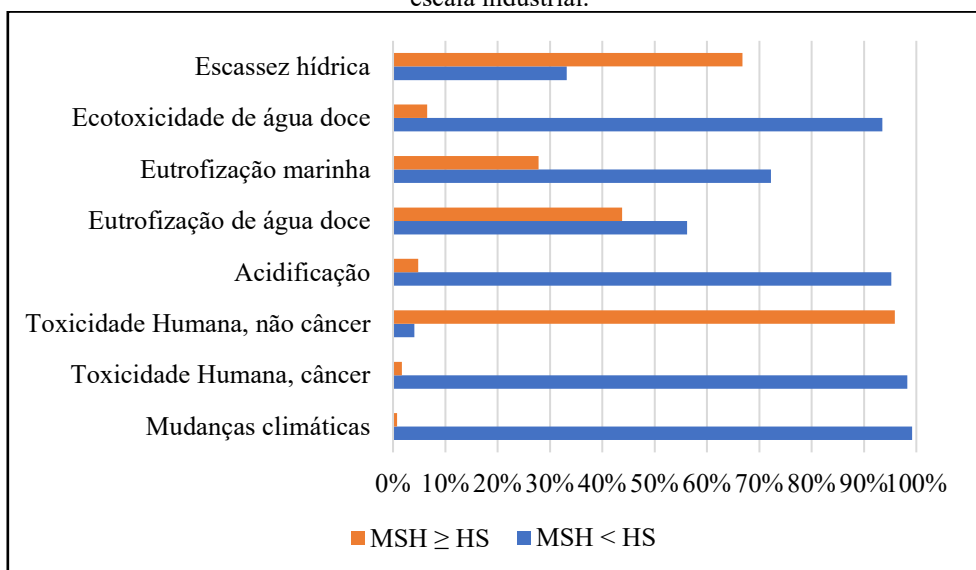
Fonte: Elaborada pelos autores.

AVALIAÇÃO AMBIENTAL DAS ROTAS MODELADAS EM ESCALA INDUSTRIAL (ACV 2)

A comparação dos potenciais impactos ambientais decorrentes da produção de 1 kg de CB na rota MSH (selecionada na ACV 1) e na HS (referência), ambas simuladas em escala industrial, mostra que a rota MSH apresentou menor impacto ambiental significativo nas categorias mudanças climáticas e toxicidade humana câncer (Figura 3). A rota HS apresentou menor impacto ambiental significativo apenas para a categoria toxicidade humana não câncer, considerando um índice de confiança de 95%. Para as demais categorias não houve diferença significativa entre as rotas avaliadas.



Figura 3: Comparativo dos potenciais impactos ambientais da produção de 1 kg de CB na rota MSH e na HS em escala industrial.

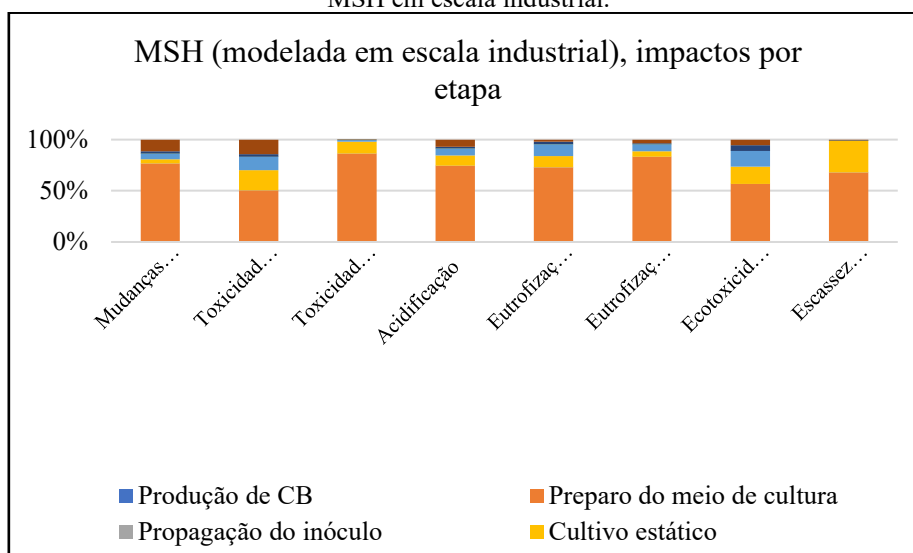


Fonte: Elaborada pelos autores.

Análise de pontos críticos e oportunidades de redução de impactos

Analisando a contribuição das etapas na rota MSH, observa-se que o preparo do meio de cultivo foi a etapa mais relevante em todas as categorias de impactos (Figura 4). Na avaliação de contribuição dos insumos, observou-se a importância do melão de soja, etanol e NaOH.

Figura 4: Contribuição das etapas do processo para os impactos ambientais da produção de 1kg de CB na rota MSH em escala industrial.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Os impactos foram devidos principalmente ao melão de soja, com produção de soja afetando quase todas as categorias. Também se observou impactos devido ao etanol e ao hidróxido de sódio (NaOH), com maior contribuição de impacto na escassez hídrica. Com base



nesses resultados, avaliaram-se possibilidades de mudanças nos processos críticos junto à equipe de P, D;I.

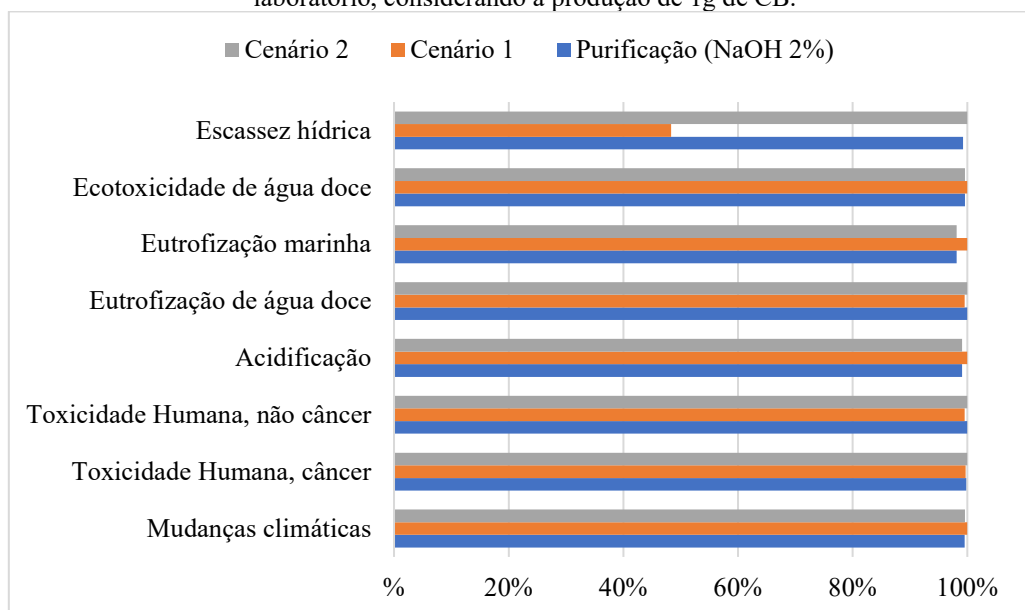
A quantidade de melão de soja e o binômio tempo e temperatura já haviam sido otimizados em laboratório na rota MSH. Assim, não foi encontrada possibilidade de redução desse insumo na etapa de preparo do meio de cultivo.

Foram realizados experimentos em laboratório para avaliar a possibilidade de redução ou eliminação do etanol. Observou-se que sem a adição de etanol, ocorreu redução de aproximadamente 54% na produção de CB, assim, não houve possibilidade de redução desse insumo.

Por fim, investigou-se a possibilidade de troca do NaOH na etapa de purificação. Dois cenários foram propostos para a etapa de purificação por pesquisadores responsáveis pela experimentação: 1) substituição do NaOH 2% (v/v) por KOH na mesma concentração e quantidade e 2) inserção do H₂O₂ 1% (v/v) na primeira lavagem com NaOH 2% (v/v), a fim de diminuir a quantidade de lavagens básicas nas CBs.

Observou-se que o cenário 1 levou ao decréscimo de 50% do impacto na escassez hídrica. Embora tenha aumentado o impacto em outras categorias, a mudança foi insignificante. O cenário 2 não acarretou mudança nos impactos (Figura 5). Assim, a mudança de reagente proposta no cenário 1 foi implementada na rota MSH.

Figura 5: Análises de cenário da substituição de reagentes químicos no processo de purificação em escala de laboratório, considerando a produção de 1g de CB.



Fonte: Elaborada pelos autores.



PRINCIPAIS MUDANÇAS COM O ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO

O escalonamento da produção de CB do laboratório para a planta industrial alterou o consumo de água e energia, assim como a magnitude dos impactos em todas as categorias avaliadas da rota MSH. Além disso, alterou a identificação das etapas críticas. Os insumos mais impactantes se mantiveram em ambas as escalas de avaliação.

Com relação à energia, observou-se redução total de 79% na rota MSH. Essa redução ocorreu apesar do aumento de 100% do consumo nas etapas de neutralização (realizada manualmente em laboratório) e empacotamento (desconsiderado no laboratório). Os reatores empregados no preparo do meio de cultura foram responsáveis pela maior elevação do consumo de energia (94.32%) nessa rota. A redução no consumo total de energia com o escalonamento da produção foi também observado por Hetherington *et al.* (2014), Piccinno *et al.* (2018b) e Bartolozzi *et al.* (2019).

Com relação ao consumo de água, ocorreu aumento de 86% no volume total utilizado em MSH, quando se passou da escala laboratorial para a industrial. O alto consumo de água observado na etapa de neutralização mostra a necessidade de caracterização do efluente gerado e definição de tratamento que permita reuso da água nessa mesma etapa.

No que se refere a magnitude dos impactos, os valores dos impactos relacionados à produção de 1 kg de CB também diminuiram com a mudança de escala, em todas as categorias avaliadas. Piccinno *et al.* (2018b), avaliando a produção de nanocelulose, e Bartolozzi *et al.* (2019), a de nanoesponjas de celulose, também observaram redução significativa nos valores dos impactos quando compararam a produção em escala laboratorial com a simulada em escala piloto.

ANÁLISE DA ESTRATÉGIA DE ECODSIGN PROPOSTA

Analisando a estratégia de ecodesign proposta, aspectos positivos e oportunidades de simplificação afloram. Um aspecto positivo dessa estratégia foi a seleção de rota tecnológica na escala laboratorial. Essa ação reduziu substancialmente os recursos necessários nas próximas etapas, relacionadas ao estudo de mudanças em pontos críticos e modelagem em escala industrial. Além disso, a modelagem de processos em escala industrial é fundamental para identificação de etapas críticas, devido as mudanças principalmente relacionadas a maior eficiência do uso de energia e água na produção modelada em escala industrial, com redução da importância desses aspectos ambientais na avaliação de impactos. O escalonamento da



produção também permite a comparação da CB com celulose vegetal, amplamente utilizada na indústria de papel e celulose.

Uma questão que deve ser analisada nesse modelo é o elevado tempo e recursos tecnológicos demandados para relação de duas ACVs previstas nessa abordagem de ecodesign. Uma possibilidade para minimizar esse tempo é a utilização de abordagens simplificadas para comparação de rotas tecnológicas em escala laboratorial, utilizando ferramentas simplificadas de avaliação baseadas no pensamento de ciclo de vida, mas não na ACV tradicional, como proposta na abordagem de ecodesign desse trabalho (ACV1). Hung *et al.* (2018) propuseram uma estratégia para desenvolvimento de avaliação simplificada de ciclo de vida de tecnologias em estágio inicial de desenvolvimento. Entretanto, não foram identificadas ferramentas ágeis disponíveis, baseadas nessa estratégia, que pudessem ser empregadas na comparação de rotas para obtenção de CB ou de outros produtos em desenvolvimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho apresentou uma estratégia para o ecodesign da produção de CB baseada na realização de duas ACVs. Essa estratégia foi aplicada em estágio inicial do processo de desenvolvimento de rotas de produção de CB, considerando levantamentos realizados em escala laboratorial e simulados em escala industrial.

A primeira avaliação ambiental de rotas alternativas de produção de CB em comparação a rota sintética de referência mostrou que a rota MSH apresentou melhor desempenho ambiental na produção de CB em cultivo estático.

A modelagem das rotas MSH e HS em escala industrial permitiu uma segunda comparação de desempenho ambiental dessas rotas que reforçou o melhor desempenho da rota MSH. Observou-se que o escalonamento reduziu consideravelmente o consumo de energia e a magnitude dos impactos ambientais em todas as categorias avaliadas da rota MSH. Entretanto, ocorreu aumento do consumo de água na produção de CB.

Essas conclusões permitem indicar a rota MSH para produção em planta piloto. Para que o desenvolvimento de tecnologias de produção de CB ocorra com máximo desempenho ambiental, indica-se realizar ACV em escala de laboratório (TRL 4) para selecionar rota tecnológica menos impactante. Em seguida, deve-se modelar a melhor rota de laboratório em escala industrial para realização de nova ACV com o objetivo de identificar as etapas críticas, melhorando a eficiência no consumo de água e energia nessas etapas.



REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 14040**: Gestão ambiental - Avaliação do ciclo de vida - Princípios e estrutura. Rio de Janeiro, 2014a. 10 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 14044**: Gestão ambiental - Avaliação do ciclo de vida - Requisitos e orientações. Rio de Janeiro, 2014b. 46 p.

BARTOLOZZI, I.; *et al.* Life cycle assessment of emerging environmental technologies in the early stage of development: a case study on nanostructured materials. **Journal of Industrial Ecology**, v. 24, n. 1, p. 101-115, 2020.

BLONK AGRI-FOOTPRINT BV **Agri-Footprint, Part 2: description of data—version 1.0**. Gouda: Blonk Agri-footprint BV, 2014. 174 p.

BRASIL. **Ministério de Minas e Energia. Agência Nacional de Energia Elétrica. Atlas de energia elétrica do Brasil**. 3. ed. Brasília: Aneel, 2008. 236 p.

ÇAKAR, F.; *et al.* Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 7–13, 2014.

DOURADO, F.; *et al.* Process modeling and techno-economic evaluation of an industrial bacterial nanocellulose fermentation process. **Bacterial Nanocellulose: From Biotechnology to Bio-Economy**, p. 199–214, 2016.

EUROPEAN COMMISSION, E ENVIRONMENT DIRECTORATE-GENERAL. **ECO-INNOVATION: The key to Europe's future competitiveness**. Publications Office, 2013. Disponível em: <https://data.europa.eu/doi/10.2779/4155>

EUROPEAN UNION (2019) Brief on the use of Life Cycle Assessment (LCA) to evaluate environmental impacts of the bioeconomy. European Commission. Disponível em: https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC109817/lca_brief_final_online.pdf.

EUROPEAN UNION (EU). Directive 2009/125/EC of the European parliament and of the council establishing a framework for the setting of ecodesign requirements for energy-related products. European Union, 2009.

GOEDKOOP, M.; *et al.* **Introduction to LCA with SimaPro**. San Francisco, California: Pré-consultants, 2016. 80 p.

GULLO, M.; *et al.* Increased production of bacterial cellulose as starting point for scaled-up applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 8115–8127, 2017.

HETHERINGTON A. C.; *et al.* Use of LCA as a development tool within early research: challenges and issues across different sectors. **International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 19, n. 1, p. 130–143, 2014.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345–352, 1954.



HUNG, C. R.; ELLINGSEN, L. A. W.; MAJEAU-BETTEZ, G. L: A framework for early-stage life cycle screening of emerging technologies. **Journal of Industrial Ecology**, v. 24, n. 1, p. 26-37, 2018.

JANG, W. D., *et al.* Opinion Bacterial cellulose as an example product for sustainable production and consumption. **Microbial Biotechnology**, v. 10, p. 1181–1185, 2017.

PICCINNO, F.; *et al.* From laboratory to industrial scale: a scale-up framework for chemical processes in life cycle assessment studies. **Journal of Cleaner Production**, v. 135, p. 1085-1097, 2016.

PICCINNO, F.; *et al.* Eco-efficient process improvement at the early development stage: identifying environmental and economic process hotspots for synergetic improvement potential. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 5959–5967, 2018a.

PICCINNO, F.; *et al.* Predicting the environmental impact of a future nanocellulose production at industrial scale: application of the life cycle assessment scale-up framework. **Journal of Cleaner Production**, v. 174, p. 283-295, 2018b.

TROVATTI, E.; *et al.* Gluconacetobacter sacchari: An efficient bacterial cellulose cell-factory. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1417–1420, 2011.

TSOUKO, E.; *et al.* Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 14832–14849, 2015.

WEIDEMA, B. P.; *et al.* **Overview and methodology:** Data quality guideline for the ecoinvent database. 3 ed. St. Gallen: The Ecoinvent Centre, 2013. 169 p.



ARTIGO 16

MÉTODOS DE CONTROLE DE *CRYPTOSTEGIA MADAGASCARIENSIS* BOJER EX DECNE EM BOSQUES DA PALMEIRA *COPERNICIA PRUNIFERA* (MILL.) H. E. MOORE.) NO NORDESTE DO BRASIL

DOI 10.47402/ed.ep.c202218341620

José Vagner Rebouças Filho
Oriel Herrera Bonilla

RESUMO

Cryptostegia madagascariensis Bojer, é uma planta nativa de Madagascar (África), conhecida popularmente por “unha-do-cão” ou “boca de leão” no Nordeste Brasileiro. Nessa região, essa espécie é considerada invasora e vem causando sérios danos a biodiversidade nativa, especialmente na Caatinga, quando associada a uma palmeira endêmica e de grande importância econômica e ecológica, a *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore.). Diante desse cenário, o objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência de diferentes métodos no controle de populações *C. madagascariensis* em um bosque de *C. prunifera* no município de Pacatuba, Ceará, Brasil. Para realização desse trabalho, foi demarcada uma área no município de Pacatuba-Ceará, onde foram delimitados quatro blocos compostos por 4 parcelas, e selecionados 5 indivíduos por parcela para o monitoramento do número de brotos e tempo de realização dos métodos de controle, corte, corte e destoca, corte e herbicida e corte e óleo lubrificante usado. A análise estatística da eficiência dos métodos de controle e os tempos de realização (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias) de cada método foi feita a partir do delineamento em blocos casualizados (DBC), com um esquema fatorial 4x6 para a análise de eficiência dos métodos de controle, sendo 4 tratamentos e 6 tempos de monitoramento, não houve fatorial para análise do tempo de realização dos métodos de controle. Os resultados indicaram que o tempo para realização dos métodos de controle variou de 100 (Corte e Corte e óleo lubrificante) a 128 segundos (Corte e destoca e Corte e herbicida) e que o tratamento de corte e destoca foi o único que causou a morte de indivíduos de *C. madagascariensis*. Assim, conclui-se que não houve diferença estatística relacionado ao tempo de controle dos métodos testados, e que o tratamento mais eficiente no controle de *C. madagascariensis* foi o de corte e destoca.

PALAVRAS-CHAVE: Invasora. Biodiversidade. Caatinga.

INTRODUÇÃO

No Nordeste do Brasil já foi constatada a ocorrência de várias espécies invasoras no bioma Caatinga (PINTO *et al.*, 2020). Essas espécies impactam negativamente a biodiversidade e ecossistemas em todo o mundo devido ao grande número de populações, amplas distribuições e graus variados de impacto, precisando assim de diferentes estratégias de controle que variam a partir das condições ambientais em que essas espécies estão submetidas (WEBSTER *et al.*, 2007). Uma dessas espécies consideradas invasoras é a *Cryptostegia madagascariensis* Bojer, originária da África, essa planta vem causando sérios danos na Caatinga (REBOUÇAS FILHO *et al.*, 2021).



Brito *et al.* (2015), ressaltaram que a *Cryptostegia madagascariensis* Bojer é certamente umas das espécies invasoras mais agressivas do Nordeste brasileiro. Nativa da Ilha de Madagascar (África), é uma espécie arbustiva trepadeira, heliófila, que possui uma grande área de ocorrência que vai desde o nível do mar até regiões mais secas como as savanas, distribuindo-se principalmente em áreas perturbadas, matas ciliares e/ou em outros ambientes com grande disponibilidade de água (KLACKENBERG, 2001).

Além da *C. madagascariensis*, há também outra espécie muito similar que pertence a esse mesmo gênero, trata-se da *Cryptostegia grandiflora* R.Br., uma espécie que já causou sérios danos ambientais sobre à biodiversidade nativa da Austrália (STARR *et al.*, 2003; BEBAWI *et al.*, 2002). Entretanto, Tomley e Evans (2004) relataram que o controle dessa espécie foi feito com sucesso a partir do programa de controle biológico clássico. Os mesmos autores indicaram que essa conquista se deu a partir da introdução de dois inimigos naturais dessa espécie em Madagascar e na Austrália: o fungo ferrugem *Maravalia cryptostegiae* (Cummins) Y. Ono, e o inseto *Euclasta whalleyi* (Popescu Gorj & Constantinescu) (MCFADYEN *et al.*, 2002).

Já o controle efetivo da *C. madagascariensis* ainda não foi alcançado, talvez pelo fato dessa espécie conseguir se estabelecer em diversos ambientes diferentes (KLACKENBERG, 2001; PINTO *et al.*, 2020). Brito *et al.* (2015), indicaram que essa invasora possui uma grande plasticidade fenotípica, o que a confere a capacidade de alterar sua forma de crescimento e alocação de biomassa, permitindo-lhe assim se estabelecer em diferentes ecossistemas.

Sem um controle efetivo para essa espécie, a preocupação aumenta devido aos problemas ambientais causados por essa invasora, especialmente nos bosques da palmeira *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore., uma espécie endêmica do Nordeste do Brasil, sendo ainda considerada uma espécie de grande relevância para a economia desta região, por ser altamente produtora de cera natural, porém suas populações naturais estão morrendo por causa da presença massiva da *C. madagascariensis*, que consegue escalar e impedir que a radiação solar chegue as folhas da palmeira, levando-as assim a morte (BRITO *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2015).

Sousa *et al.* (2015), salientaram a importância da *C. prunifera* como fonte de renda para os agricultores extrativistas do semiárido do Nordeste do Brasil. Estes autores relataram que a economia gerada em torno dessa espécie se dá a partir da extração da cera que está presente nas folhas durante a estação seca, podendo ser utilizada na indústria alimentícia, cosméticos, dentre



outras. Elucidaram ainda que devido a sua capacidade de adaptação às condições climáticas da região, tem gerado emprego e renda para a população nos períodos de estiagem.

Queiroga (2017) indicou que o Brasil é o único país do mundo que produz cera vegetal de *C. prunifera* de alta qualidade, usada para conservação de frutas, géis e condicionadores de cabelo. O autor ressaltou também que a economia gerada em torno dessa palmeira na região Nordeste é responsável pela geração de mais de 400 mil empregos diretos, sendo muitas vezes a principal fonte de renda da população, principalmente na época seca, quando a disponibilidade de atividades remuneradas no campo é reduzida.

Segundo a Grand View Research (GRV) (2019), a indústria é altamente dependente das matérias-primas de origem vegetal, e que esse mercado é muito importante do custo operacional dos fabricantes. Além disso, o mesmo autor indica que essa é uma das principais matérias-primas no Nordeste do Brasil fornecida principalmente pelos agricultores e proprietários de terras, empregando técnicas culturais para a extração de cera, que lhes conferem muitas vezes a única renda para sua sobrevivência.

Apesar disso, Silva *et al.* (2008), ressaltaram que ainda há uma grande dificuldade em combater as infestações causadas por espécies do gênero *Cryptostegia*. De acordo estes autores, a remoção mecânica dessa planta é antieconômica e perigosa devido à natureza tóxica da sua seiva leitosa, enquanto o uso de herbicidas é caro demais para as populações pobres da região e ecologicamente indesejável nessa vegetação natural. O controle de plantas invasoras pode ser através de muitos métodos diferentes: manual / mecânico, químico e biológico (LOVE; ANDERSON, 2011; MCFADYEN *et al.*, 2002; KETTENRING; ADAMS, 2011).

O controle biológico através da introdução de agente biológicos pode ser muito eficaz e gerar menos danos ambientais (WEBSTER *et al.*, 2007), porém o controle de plantas invasoras com herbicidas também é uma das práticas mais comuns e isso ocorre devido a sua eficácia, praticidade e boa relação custo/benefício (MERVOSH; GUMBART, 2018). Gonçalves *et al.* (2015), ressalta que além dos métodos de controle mecânicos, tem-se também os químicos a base de óleos minerais que possuem efeito herbicida.

Os mesmos autores dizem ainda que os herbicidas mais utilizados no manejo de plantas perenes têm sido a base de Picloram em solução aquosa. Outro método de controle químico é o uso do óleo lubrificante de descarte, que causa efeitos fitotóxicos físicos e químicos, cuja intensidade pode variar como tipo e a quantidade, bem como com a espécie (CARMONA *et*



al., 2001). Diante de uma espécie com um alto potencial bioinvasor nos ecossistemas naturais como a *C. madagascariensis*, torna-se importante estudos direcionados as suas técnicas de controle (GONÇALVES *et al.*, 2015).

O desenvolvimento e o uso desses métodos poderão ter grande significância para o manejo populacional dessa espécie, reduzindo assim os danos provocados sobre a biodiversidade, criando ainda condições para que as espécies nativas possam se reestabelecer (FLORY; CLAY, 2009; FIRN *et al.*, 2015). A presença de um método de controle eficaz para essa espécie irá contribuir também para a economia do Nordeste do Brasil, uma vez que a *C. madagascariensis* prejudica direta e indiretamente a *C. prunifera* (GONÇALVES *et al.*, 2015). Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência de diferentes métodos no controle de populações *C. madagascariensis* em um bosque de *C. prunifera*.

METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada em um bosque de *C. prunifera*, infestada com *C. madagascariensis* em área de Caatinga, localizado no município de Pacatuba-CE, nas coordenadas geográficas 04° 00' 18" S e 38° 35' 09" WO, com elevação de 63 m. O estudo ocorreu durante os meses de junho-setembro de 2019. Segundo a classificação climática de Köppen o clima predominante da região é o semiárido, quente e seco ou BSh, podendo ter também o BShw, com chuvas de verão (ALVARES *et al.*, 2013). Entre os meses de janeiro a maio, a média pluviométrica é de aproximadamente 1.479,5 mm, com uma temperatura média anual entre 26 a 28° C e apresentando predominantemente solo podzólico (IPECE, 2009).

A área total para este estudo foi de 160 metros, sendo dividida em 4 blocos com características distintas: Bloco I – caracterizado como ambiente mais seco; Bloco II – uma área mais úmida; Bloco III - um ambiente intermediário entre o seco e o úmido; Bloco IV – Área próxima a um riacho. Cada bloco contém 4 parcelas delimitadas como unidades amostrais, apresentando dimensão de 10 m² cada, totalizando 16 parcelas. Após a demarcação dos blocos, foram selecionados 5 indivíduos de *C. madagascariensis* por parcela com diâmetro ao nível do peito (DNS) \geq 10 cm para cronometragem do tempo para realização de cada método de controle. No total foram monitorados 80 indivíduos de *C. madagascariensis*. Para realização dos tratamentos no campo, foi contratado um trabalhador rural extrativista sazonal das folhas de *C. prunifera*.



Os tratamentos foram sorteados para cada 5 indivíduos selecionados em cada parcela sendo: corte; corte e destoca; corte e herbicida e corte e óleo lubrificante. O herbicida utilizado foi o Tordon, o qual foi utilizado 0,5 L do seu conteúdo em 15 L de água, como recomendado para o controle de dicotiledôneas indesejáveis de porte arbustivo e subarbustivo (CARMONA *et al.*, 2001). No tratamento de corte, a planta teve apenas seu caule cortado com o auxílio de uma foice (Figura 1a); já no corte e destoca, após o corte, a planta foi retirada do solo juntamente com suas raízes (Figura 1b); no tratamento corte e herbicida, primeiramente houve o corte do caule e posteriormente feita à aspersão sobre sua superfície com o floema ainda ativo, com o auxílio de um pulverizador costal (Figura 1c) e no tratamento de corte e óleo lubrificante de carro usado, após o corte houve um pincelamento sobre o toco (Figura 1d).

Figura 1: Métodos de controle de *C. madagascariensis*. a – Corte; b – Corte e destoca; c – Corte e herbicida. d – Corte e óleo lubrificante.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Visando saber a eficácia dos métodos de controle nos indivíduos selecionados, foram monitorados o número de brotos emitidos pelos tocos e raízes e/ou sua mortalidade por parcela dos blocos a cada quinze dias (15, 30, 45, 60, 75, 90 dias) durante os meses de julho a setembro de 2019. Em relação a porcentagem de controle de cada tratamento, Frans e Talbert (1977) e Carmona *et al.* (2001), consideram o nível de 100% como controle total; 90-99%, controle eficiente; 80-89%, controle aceitável; 50-79%, controle não aceitável; e 0-49%, controle insuficiente. No campo, a morte dos indivíduos foi constatada quando os tecidos do floema se apresentaram completamente secos e pela ausência de brotações.

Neste estudo, utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso (DBC), com um esquema fatorial 4x6, sendo 4 tratamentos e 6 tempos de monitoramento (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias) dos tratamentos de métodos de controle. Para análise do tempo gasto para fazer cada tratamento foi utilizado um DBC sem fatorial, onde foram analisados quatro tratamentos (corte; corte e destoca; corte e herbicida; corte e óleo lubrificante). Os resultados foram submetidos a análise

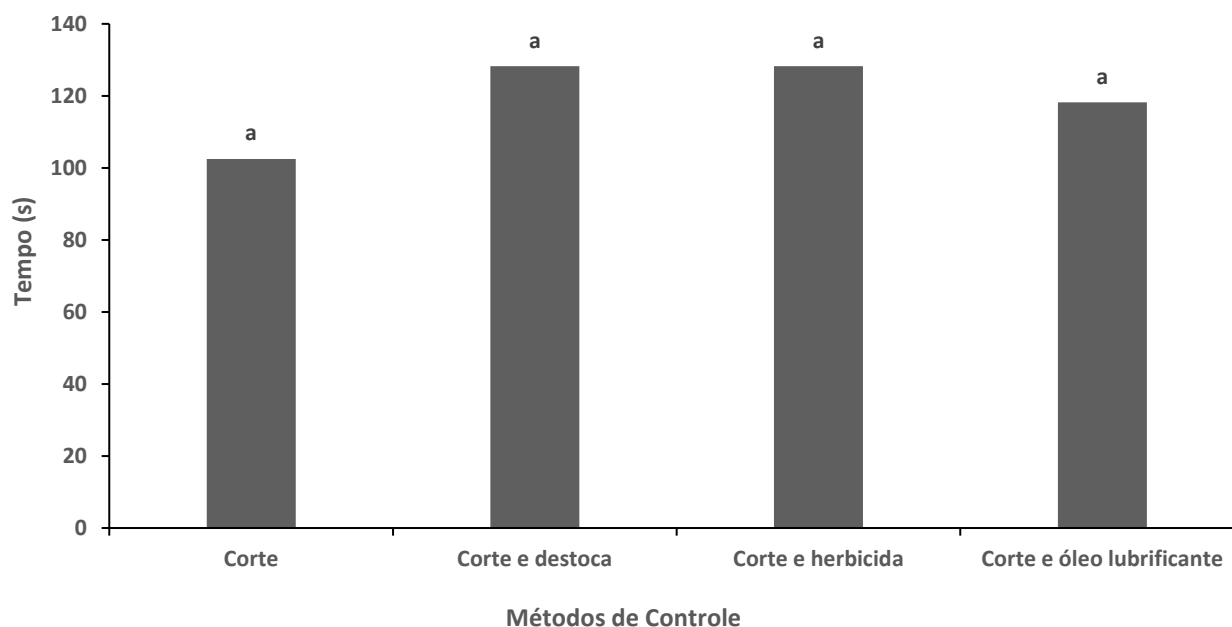


de variância e teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software Statistical Analysis System V. 1.0 (ESTAT).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicaram que não houve diferença estatística em relação ao tempo médio para realização dos métodos de controle de *C. madagascariensis* (Figura 2), uma vez que houve uma baixa variação no tempo de realização dos tratamentos, de 100 (Corte e Corte e óleo lubrificante) a 128 segundos (Corte e destoca e corte e herbicida).

Figura 2: Médias dos tempos de tratamentos no controle de *C. madagascariensis* na população estudada.



* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pelos autores.

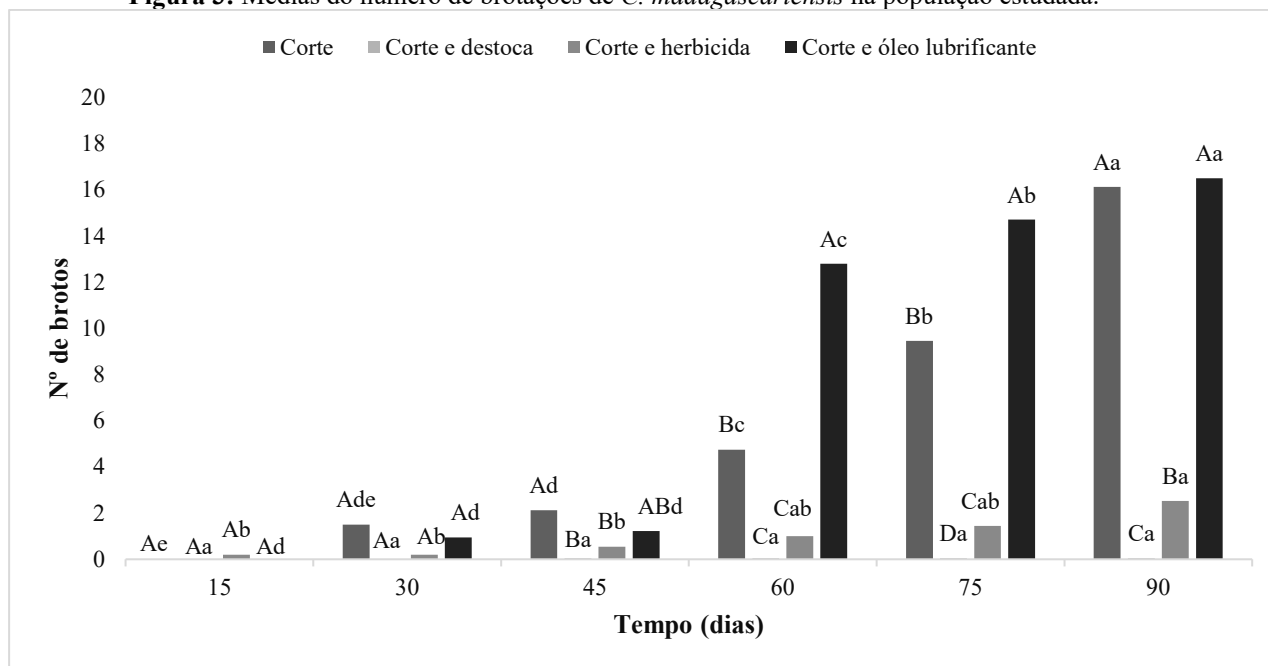
Baker *et al.* (2019), indicam que aspectos relacionados ao tempo de controle de espécies invasoras podem influenciar direta e indiretamente em planos de manejo de áreas invadidas e otimização dos resultados a longo prazo, contribuindo para conservação do ambiente. No contexto dos bosques de *C. prunifera*, o controle da *C. madagascariensis* torna-se essencial para reestruturação da comunidade vegetal e facilitação da extração sustentável das folhas de *C. prunifera* (QUEIROGA *et al.*, 2017).

Além disso, o experimento demonstrou que, para as variáveis avaliadas, houve variação estatística no comportamento de *C. madagascariensis* em relação aos tratamentos de controle. O tratamento de corte e destoca foi o mais eficiente no controle da invasora, conforme constatou-se aos 75 e 90 dias após a execução do controle, também para este tratamento não se



verificou diferença estatística entre os tempos de avaliação, o que ratifica a sua eficiência (Figura 3). De acordo com os critérios de Frans e Talbert (1977) e Carmona *et al.* (2001), o método de corte e destoca é o mais eficiente para o controle dessa fitoinvasora, pois foi o único que causou mortalidade nas plantas, enquanto os demais apresentam-se insuficientes devido à ausência de indivíduos mortos.

Figura 3: Médias do número de brotações de *C. madagascariensis* na população estudada.



*Letras minúsculas iguais nas linhas e letras maiúsculas iguais nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pelos autores.

A partir da análise da Figura 3 pode-se observar que houve interação entre o tempo de tratamento e o número de brotos de *C. madagascariensis*. O tratamento de corte e destoca foi o mais eficiente no controle da *C. madagascariensis*, uma vez que até 30 dias não havia nenhum brotamento, e após os 90 dias de monitoramento, houve apenas um brotamento, diferentemente do observado nos tratamentos de corte, corte e herbicida e corte e óleo lubrificante, que apresentaram número de brotos crescentes no decorrer dos dias.

O tratamento de corte não causou mortalidade nos indivíduos de *C. madagascariensis*, similarmente ao apresentado por Gonçalves *et al.* (2015), em que o mesmo método foi testado na *Prosopis juliflora* (Sw.) DC., isolado e também se mostrou um método ineficiente no combate à invasora, pois a maioria dos indivíduos rebrotou e sobreviveu. Outros estudos também retrataram a ineficiência desse tratamento no controle de plantas invasoras como indicado por Carmona *et al.* (2001) e Love e Anderson (2009).



Love e Anderson (2009), ressaltaram ainda que as plantas estão mais susceptíveis ao corte quando os níveis de carboidratos nas raízes são mínimos, ou seja, logo após a formação de folhas, flores e frutos. Dias (1993), indica que o corte do sistema aéreo de muitos arbustos e árvores, de modo geral, não apresentam controle satisfatório, uma vez que ao ser cortado o caule rebrota facilmente, não sendo possível um controle em longo prazo.

Gonçalves *et al.* (2015), indicaram que a técnica de corte com óleo para o controle de *P. juliflora* apresentou efeito herbicida, principalmente em plantas adultas, nas quais foi observada maior mortalidade. Os mesmos autores ressaltaram ainda que o método de corte e aplicação de herbicida apresentou morte total das populações de *P. juliflora* no semiárido brasileiro. No presente trabalho, esses métodos não apresentaram mortalidade nos indivíduos de *C. madagascariensis*, visto que a planta constantemente emitia novos brotos (Figura 4).

Figura 4: Brotos de *C. madagascariensis*, 30 dias após a aplicação do óleo no toco.



Fonte: Elaborada pelos autores.

O resultado apresentado neste estudo corrobora com outros feitos com a *Acacia farnesiana* Wall. e *Mimosa pteridifolia* Benth., os quais o uso do óleo não causou nenhum dano às plantas (CARMONA *et al.*, 2001), revelando-se ineficiente para o controle destas espécies. Para Lin e Mendelssohn (1996) o óleo lubrificante pode causar efeitos fitotóxicos físicos e químicos, cuja intensidade pode variar com o tipo e a quantidade, bem como com a espécie.

Vitelli *et al.* (2009), realizaram estudos com o controle químico da liana invasora *Hiptage benghalensis* (L.) Kurz no norte de Queensland, Austrália, através do herbicida picloram. Os autores obtiveram êxito nos testes, uma vez que a taxa e mortalidade das plantas foi total assim como apresentado por Gonçalves *et al.* (2015), porém diferente dos resultados



encontrados no presente estudo para *C. madagascariensis*, em que não houve mortalidade com esse tratamento.

Mervosh e Gumbart (2018), ressaltaram que a combinação de corte e aplicação direcionada de herbicida fornecerá opções de gerenciamento eficazes e ambientalmente corretas para várias espécies de plantas invasoras, uma vez que o herbicida não irá infiltrar no solo e prejudicar o crescimento e desenvolvimento de outras espécies. Especialistas da área de manejo de espécies invasoras, concluíram que os métodos químicos e mecânicos são os mais práticos e eficazes para o controle de *C. grandiflora* em Queensland, Austrália, entretanto o uso de químicos implica em maiores custos (OSUNKOYA *et al.*, 2019). Tais resultados corroboram em parte com presente trabalho, pois foi um método mecânico (Corte e destoca) o mais eficaz no controle da espécie invasora *C. madagascariensis*.

Ainda que o controle mecânico seja um dos métodos mais utilizados pelos agricultores e pecuaristas, sua baixa eficiência é observada na maioria das vezes (CARMONA *et al.*, 2001), porém, no presente estudo o tratamento mecânico de corte e destoca foi o de maior eficiência. Esta técnica inclui o corte, que pode ser realizado em diferentes partes da planta como, caule, ramos ou até mesmo arrancar a planta do solo, porém necessita-se de mais conhecimento sobre a eficácia dessas medidas de controle para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo da vegetação (KETTENRING; ADAMS, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2015).

Starr *et al.* (2003) indicaram o controle físico como o melhor para plantas do gênero *Cryptostegia*, assim como comprovou-se no presente estudo, sendo o controle mecânico de corte e destoca o mais eficiente. Os mesmos autores enfatizam que o corte do toco é considerado um método econômico na Austrália, embora também o mais trabalhoso, e que o controle químico também pode ser feito com uma variedade de produtos químicos, porém o controle químico apresentado neste estudo mostrou-se ineficiente. O fogo também já foi usado como método de controle dessa planta na Austrália (RADFORD *et al.*, 2008), porém, o método mais eficaz foi o de controle biológico (MCFADYEN *et al.*, 2002).

Os mesmos autores relataram que na Austrália foi utilizado também um tratamento com uso do fogo, em diferentes regimes e que todos foram eficazes na redução do número e da biomassa de arbustos e trepadeiras de *C. grandiflora*, sendo assim um método eficiente para o controle, mas que por outro lado pode causar danos ambientais maiores, uma vez que caso não seja controlado pode se alastrar com facilidade e causar a morte de animais, plantas, dentre outros.



Porém, o uso do fogo no Nordeste do Brasil pode ser muito perigoso devido à presença de uma vegetação seca em determinada época do ano, o que facilmente poderia causar grandes incêndios caso não fosse controlado pela população local e/ou por pessoas especializadas. Com base em observações de campo, foi possível perceber o quão difícil é o controle de indivíduos adultos de *C. madagascariensis* devido à formação de densas populações emaranhadas que dificultam o acesso dos trabalhadores e de animais de criação, além da presença de caules lenhosos e abundância de látex que pode ser tóxico e causar sérios danos à saúde humana como irritação na pele e coceira nos olhos.

Após a realização de todas as técnicas apresentadas no presente trabalho, deve-se recolher as partes cortadas da planta e armazenar até secar, pois caso fique no solo pode haver rebrota. Deve-se ter cuidado também com os ramos que ainda ficam suspensos na planta para que eles não entrem em contato com o solo, uma vez que pode haver rebrota. A estação seca é ideal para realização de controle de plantas invasoras no Nordeste do Brasil, uma vez que é um período em que a planta está passando por estresse hídrico, há desfoliação natural e parcial das plantas e possui uma menor quantidade de látex, tornando-a assim mais suscetível ao controle (GONÇALVES *et al.*, 2012). Além disso, no Nordeste brasileiro ainda não há um plano de manejo para os bosques de *C. prunifera*, apesar de ser centenária a sua utilidade e exploração para fins sociais e econômicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise dos resultados deste estudo pode-se concluir que não houve diferença significativa para o tempo de realização dos métodos de controle da *C. madagascariensis* em bosques de *C. prunifera*, e que o tratamento mais eficiente no controle da *C. madagascariensis* é o de corte e destoca.

REFERÊNCIAS

- ALVARES, C. A.; *et al.* Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- BEBAWI, F.; CAMPBELL, S. Impact of early and late dry-season fires on plant mortality and seed banks within riparian and subriparian infestations of rubber vine (*Cryptostegia grandiflora*). **Jornal Australiano de Agricultura Experimental**, v. 42, n. 1, p. 43-48, 2002.
- BRITO, S. F.; *et al.* Influência da luz no crescimento inicial da invasora *Cryptostegia madagascariensis* Bojer no semiárido Brasileiro. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 3, p. 385-392, 2015.



CARMONA, R.; NETO, B. S. C. A. PEREIRA, R. C. Controle de *Acacia farnesiana* e de *Mimosa pteridofita* em pastagem. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1301-1307, 2001.

COCKEL, C. P.; GURNELL, A. M. An investigation of the composition of the urban riparian soil propagule bank along the River Brent, Greater London, UK, in comparison with previous propagule bank studies in rural areas. **Urban Ecosystems**, v. 15, n. 2, p. 367-387, 2012.

DIAS, F. N. B. **Invasoras em pastagens**. São Carlos: Embrapa-CPPSE; 1993. 13 p.

FABRICANTE, J. R.; *et al.* Respostas da *Parkinsonia aculeata* L. ao corte e queima em área invadida no agreste paraibano. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, n. 3, p. 293-297, 2009.

FIRN, J.; *et al.* Priority threat management of non-native plants to maintain ecosystem integrity across heterogeneous landscapes. **Journal of Applied Ecology**, v. 52, n. 5, p. 1135-1144, 2015.

FLORY, S. L.; CLAY, K. Invasive plant removal method determines native plant community responses. **Journal of Applied Ecology**, v. 46, n. 2, p. 434-442, 2009.

FRANS, R. E.; TALBERT, R. **Measuring plant responses**. 2 ed. New York: Southern Weed Science Society, 1977. 225 p.

GONÇALVES, G. S.; *et al.* Métodos de controle de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. (Fabaceae) em áreas invadidas no semiárido do Brasil. **Ciência Florestal**, v. 5, n. 3, p. 645-653, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA 2020. **Cidades e estados**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados>. Acesso em: setembro de 2020.

IPECE - INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ. **Perfil básico municipal**. Pacatuba: IPECE, 2009. 17 p.

KETTENRING, K. M., ADAMS, C. R. Lessons learned from invasive plant control experiments: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Applied Ecology**, v. 48, n. 4, p. 970-979, 2011.

KLACKENBERG, J. Revision of the genus *Cryptostegia* R. Br. (Apocynaceae, Periplocoideae). **Adansonia**, v. 23, n. 2, p. 205-218, 2001.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: Ed. Universitária da UFPE; 2003. 807 p.

LIN, Q.; MENDELSSOHN, I. A. A comparative investigation of the effects of south Louisiana crude oil on the vegetation of fresh, brackish and salt marshes. **Boletim de Poluição Marinha**, v. 32, n. 2, p. 202-209, 1996.

LOVE, J. P.; ANDERSON, J. T. Seasonal effects of four control methods on the invasive morrow's honeysuckle (*Lonicera morrowii*) and initial responses of understory plants in a Southwestern Pennsylvania old field. **Restoration Ecology**, v. 17, n. 4, p. 549-559, 2009.



MCFADYEN, R. E. C.; VITELLI, M.; SETTER, C. Host specificity of the rubber vine moth, *Euclasta whalleyi* Popescu-Gorj and Constantinescu (Lepidoptera: Crambidae: Pyraustinae): field host-range compared to that predicted by laboratory tests field results. **Australian Journal of Entomology**, v. 41, n. 4, p. 321-323, 2002.

MERVOSH, T. L.; GUMBART, D. Cutting and herbicide treatments for control of oriental bittersweet, pale swallow-wort and Morrow's honeysuckle. **Natural Areas Journal**, v. 35, n. 2, p. 256-265, 2015.

OSUNKOYA, O. O.; FROESE, J. G.; NICOL, S. Management feasibility of established invasive plant species in Queensland, Australia: a stakeholders' perspective. **Journal of Environmental Management**, v. 246, p. 484-495, 2019.

PINTO, A. *et al.* Invasive plants in the Brazilian Caatinga: a scientometric analysis with prospects for conservation. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 15, n. 503-520, 2020.

QUEIROGA, V. P.; *et al.* **Carnaubeira: tecnologias de plantio e aproveitamento industrial**. Paraíba: Editora da Universidade Federal de Campina Grande, 2017. 261 p.

RADFORD, I. J.; *et al.* Impacts of changed fire regimes on tropical riparian vegetation invaded by an exotic vine. **Ecologia Austral**, v. 33, n. 2, p. 151-167, 2008.

REBOUÇAS FILHO, J. V. Fitossociologia de dois bosques de caatinga utilizados para extração foliar da *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore e infestados por *Cryptostegia madagascariensis* Bojer. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 14, n. 2, p. 784-800, 2021.

SHEPPARD, J.; YOUNG, W. Agility literature review: classifications, training and testing. **Journal of Sports Science**, v. 24, n. 9, p. 919-932, 2005.

SILVA, J. L.; BARRETO, R. W.; PEREIRA, O. L. *Pseudocercospora cryptostegiae-madagascariensis* sp. nov. on *Cryptostegia madagascariensis*, an exotic vine involved in major biological invasions in Northeast Brazil. **Micopatologia**, v. 166, n. 2, p. 87-91, 2008.

SIQUEIRA FILHO, J. A. **Flora das Caatingas do Rio São Francisco: História Natural e Conservação**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio; 2012. 551 p.

SOUSA, R. F.; *et al.* Etnoecologia e etnobotânica da palmeira carnaúba no semiárido Brasileiro. **Cerne**, v. 21, n. 4, p. 587-594, 2015.

SOUZA, M. P.; *et al.* Composição e estrutura da vegetação de caatinga no sul do Piauí, Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 12, n. 2, p. 210-217, 2017.

STARR, F.; KIM, S.; LLOYD, L. *Cryptostegia* spp. Rubber vine Asclepiadaceae. United States Geological Survey-Biological Resources Division Haleakala Field Station, Maui, Hawaii. 2003.

TOMLEY, A. J.; EVANS, H. C. Establishment of, and preliminary impact studies on, the rust, maravalia cryptostegiae, of the invasive alien weed, cryptostegia grandiflora in queensland, australia. **Plant Pathology**, V.53, P. 475-484, 2004.



VITELLI, J. S.; *et al.* Control of the invasive liana, *Hiptage benghalensis*. **Weed Biology and Management**, v. 9, n. 1, 54-62, 2009.

WEBSTER, C. R.; JENKINS, M. A.; JOSE, S. Invasion biology and control of invasive woody plants in eastern forests. **Native Plants Journal**, v. 8, n. 2, p. 97-106, 2007.

ZENNI, RD, ZILLER, SR. An overview of invasive plants in Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 34, n. 3, p. 431-446, 2011.



ARTIGO 17

MICROENCAPSULAMENTO DE ÓLEO DE PEQUI EM MATRIZ DE GOMA DE CAJUEIRO/GELATINA POR COACERVAÇÃO COMPLEXA SEGUIDO DE SECAGEM POR *SPRAY DRYING* OU LIOFILIZAÇÃO

DOI 10.47402/ed.ep.c202218351720

Marília Alves do Nascimento
Luana Carvalho da Silva
José Maria Correia da Costa
Roselayne Ferro Furtado
Carlucio Roberto Alves

RESUMO

O óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Witt) é sensível a agentes físicos, químicos e biológicos, como altas temperaturas, presença de oxigênio e enzimas. O uso da tecnologia de microencapsulamento permite preservar as características físico-químicas do material e proteger suas propriedades terapêuticas e nutricionais. A secagem das microcápsulas amplia a sua gama de aplicação por estender seu tempo de armazenamento. O presente estudo teve o objetivo de avaliar o microencapsulamento do óleo de pequi, por coacervação complexa, em revestimento de goma de cajueiro/gelatina e posterior secagem por liofilização e *spray drying*, tendo como controle a matriz de revestimento goma arábica/gelatina. As microcápsulas secas foram avaliadas com relação à eficiência de encapsulamento, solubilidade e rendimento. A secagem por *spray drying* apresentou melhor eficiência de encapsulamento, porém menores taxas de rendimento e solubilidade do que a microcápsulas secas por liofilização, em ambos os tratamentos. As cápsulas em matriz de goma de cajueiro e gelatina mostraram desempenho aproximado às cápsulas com revestimento de goma arábica e gelatina, nas mesmas análises. Foi possível concluir, portanto, que a liofilização é o método de secagem mais apropriado para estas microcápsulas e que a goma de cajueiro apresenta potencial de uso como matriz de encapsulamento, sendo uma alternativa a goma arábica.

PALAVRAS-CHAVE: Coacervação complexa. Goma de cajueiro. Óleo de pequi. *Spray drying*. Liofilização.

INTRODUÇÃO

Caryocar coriaceum Witt é uma espécie de pequizeiro endêmica do Brasil, tendo sua ocorrência registrada no Cerrado e, sobretudo, nas chapadas do domínio da Caatinga, especialmente na Chapada do Araripe, onde a atividade extrativista representa fonte de renda para inúmeras famílias do cariri cearense que se reúnem, nos meses de dezembro a abril, no entorno da Floresta Nacional do Araripe-Apodí, para a colheita dos frutos.

Popularmente conhecida como pequi, piqui ou pequi branco, a espécie possui fruto comestível do tipo drupa ovoide, pirenos geralmente 1-2, rígidos, com endocarpo espinhoso (MEDEIROS; AMORIM, 2015) bastante utilizado na alimentação devido seu alto teor de vitaminas (A, E, B1, B2, B3) e minerais (CARDOSO *et al.*, 2013), no preparo de pratos quentes,



doces, licores e conservas. Do fruto é produzido um óleo rico em ácido palmítico (GARCIA *et al.*, 2007), oleico (LOPES *et al.*, 2008) e carotenoides (AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004), com propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e redutoras de colesterol (OLIVEIRA *et al.*, 2015; FIGUEIREDO *et al.*, 2016).

Nesse estudo foi realizado o encapsulamento de óleo de pequi, considerando que a aplicação desta técnica reduz as interações do material encapsulado com os fatores ambientais, proporcionando proteção e estabilidade físico-química (SILVA *et al.*, 2018). Além disso, o encapsulamento é capaz de mascarar características como cor, aroma e sabor do núcleo e viabilizar a liberação do ingrediente para o meio ao longo do tempo, assegurando a dosagem ótima e estendendo as possibilidades de uso e aplicação dessas substâncias (GOUIN, 2004).

O microencapsulamento foi realizado por coacervação complexa, método que consiste na mistura de polieletrólitos de cargas opostas em solução aquosa, resultando numa separação de fases: uma densa rica em polímero (coacervado) e outra diluída pobre em polímero (BLACK *et al.*, 2014). Esse método é comumente usado para encapsular substâncias hidrofóbicas (ALVIM; GROSSO, 2010).

Dentre os materiais mais comumente usados como materiais de parede em microcápsulas (SHAHIDI; HAN, 1993) estão as gomas. A goma arábica é a mais utilizada nesses processos, porém apresenta alto custo e, por vezes, apresenta dificuldade de fornecimento relacionada a problemas climáticos, econômicos e políticos na região africana onde é produzida (ANDRADE *et al.*, 2013). A goma de cajueiro surge, então, como material com grande potencial de substituição à goma arábica pela semelhança estrutural (ramificações), química (açúcares componentes) e físico-química. Rodrigues (2004) ressalta em seu estudo a ampla disponibilidade da goma de cajueiro, especialmente na região Nordeste do Brasil, além da rapidez e baixo custo para o isolamento. Estudos recentes como o de Gomez-Estaca *et al.* (2016), Oliveira, Paula e Paula (2014), Rodrigues e Grosso (2008) confirmam a eficiência da goma de cajueiro como matriz encapsulante.

Assim, considerando o alto custo da goma arábica, bem como problemas de disponibilidade e obtenção por ser um produto importado, o uso rotineiro de goma de cajueiro poderá trazer benefícios à balança comercial brasileira, reduzindo a importação da goma arábica e tornando o país um exportador desse polissacarídeo. Além disso, viabilizar formas mais tecnológicas de uso e aplicação do óleo de Pequi é estratégico para atrair o investimento da indústria (farmacêutica, cosmética e alimentícia, por exemplo) e garantir a viabilidade



econômica dessa cadeia produtiva e a continuidade dessa atividade tradicional, acarretando em melhores ganhos para todos os atores envolvidos, como agricultores(as) familiares, pequenos produtores e comunidades rurais.

O presente trabalho teve, portanto, o objetivo de avaliar o microencapsulamento do óleo de pequi revestido de goma de cajueiro/gelatina por coacervação complexa e submetidas à secagem por liofilização ou *spray drying*, tendo como controle a matriz de revestimento goma arábica/gelatina.

METODOLOGIA

MATERIAIS

O polissacarídeo foi coletado de plantas de cajueiro do Campo Experimental da Embrapa Agroindústria Tropical em Pacajus, Ceará, Brasil. A goma arábica foi adquirida da JB Química Indústria e Comércio Ltda e a gelatina 225H tipo B da Rousselout®. O óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) foi obtido na região do Cariri, na cidade do Crato, Ceará, Brasil. Os reagentes utilizados foram água destilada, etanol, hexano, metanol, clorofórmio e sulfato de sódio, com grau analítico. Para o controle de pH das soluções, foram utilizadas ácido clorídrico (2M) e hidróxido de sódio (2M), com grau analítico.

MÉTODOS

Isolamento da goma de cajueiro

Para o isolamento dos polissacarídeos foi utilizada a metodologia descrita por Torquato *et al.* (2004) com modificações. O exsudato do cajueiro foi triturado em moinho de facas e, em seguida, solubilizado em água na proporção de 300 g da amostra para um litro de água. Após a solubilização, a amostra foi filtrada e centrifugada (15.303 xg à 25°C por 10 min) para retirada de resíduos.

Após esse tratamento, a amostra foi precipitada em etanol (proporção 1:3 amostra/etanol), durante 24 horas, sob refrigeração. O excesso de etanol foi retirado e o precipitado foi seco em estufa de circulação de ar a 60°C. Por fim, o material seco foi triturado resultando na goma de cajueiro isolada.

Formação das microcápsulas com o óleo de Pequi

Utilizou-se o processo de coacervação complexa para formação das microcápsulas. As proporções de material de revestimento e o pH foram definidos após investigação da carga



elétrica dos biopolímeros, por meio de análise de potencial Zeta, e avaliação de rendimento, conforme Nascimento (2016). Para o complexo goma de cajueiro e gelatina, adotou-se a proporção de 2:1 (m/m) em pH 4,5 e para goma arábica e gelatina adotou-se a proporção 1:3 (m/m) e pH 4,5.

Para formação das microcápsulas de goma de cajueiro/gelatina, foi preparada solução de 100 mL de goma de cajueiro, na concentração acima citada, e homogeneizada em ultra turrax 10.000 rpm por 3 minutos. Em seguida, foi adicionado 1g de óleo de pequi e homogeneizou-se novamente. Posteriormente, 100 mL de solução de gelatina foram adicionadas à mistura e homogeneizada. Então, adicionou-se 400 mL de água destilada à solução e homogeneizou-se novamente. Todas as homogeneizações foram feitas em ultraturrax à 10.000 rpm por 3 minutos. Por fim, o pH da mistura foi ajustado com HCl 2 M e a solução foi submetida a refrigeração por 24 horas.

Esse processo foi reproduzido para a formação de microcápsulas de goma arábica/gelatina adaptando-se as proporções dos biopolímeros e utilizando 2,5g de óleo de pequi.

Secagem das microcápsulas por atomização (Técnica *Spray drying*)

O material refrigerado produzido pelo processo descrito anteriormente foi centrifugado (15.303 x g, 10 min a 25°C) para retirada do excesso de água e pesado. Para padronizar a umidade do material a ser seco, a amostra foi solubilizada novamente em água destilada na proporção de 1:10 da amostra:água (p/v). Em seguida, o material foi seco pelo aparelho *spray dryer* (LM MSD 1.0 Labmaq Brasil). Para escolha das condições ideais de secagem foram realizados testes em diversas condições e assim foram escolhidas aquelas que apresentaram melhores resultados em relação ao rendimento de secagem. As condições definidas foram: Temperatura de entrada: 170°C; Vazão do ar de atomização: 4,2 m³/min; Vazão do ar de secagem: 30,0 L/min; Vazão de alimentação: 0,5 L/h.

Secagem das microcápsulas por Liofilização

O material refrigerado produzido pelo processo descrito anteriormente foi centrifugado (10.000 rpm 10 min 25°C) para retirada do excesso de água e congelado em ultrafreezer por 24h. Após congelamento, o material foi liofilizado pelo aparelho Liotop K1005 até total secagem das microcápsulas.



Eficiência de Encapsulamento

As microcápsulas secas foram avaliadas com relação a eficiência de encapsulamento, solubilidade, rendimento.

A eficiência de encapsulamento foi determinada pela seguinte equação: $EE (\%) = (OT - OS) / OT \times 100$, onde OT é a concentração de óleo total e OS é a concentração de óleo superficial.

Determinação do Óleo Total (OT)

Foi utilizado o método de Bligh-Dyer descrito por Cecchi (2003), com modificações. Pesou-se 0,1 g das microcápsulas secas e adicionou-se 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. A mistura foi colocada em agitador magnético durante 30 minutos. Então, adicionou-se 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5% à mistura e agitou-se por 2 minutos. Posteriormente, o material foi transferido para o funil de separação onde ficou em repouso até completa separação das fases. Em seguida, foi retirado 15 mL da fase orgânica a qual foi adicionada 1 g de sulfato de sódio. O material foi filtrado e transferida uma alíquota de 1 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com hexano. A mistura foi quantificada por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450nm.

Determinação do Óleo Superficial (OS)

Realizada de acordo com Higueta (2013), com modificações. Misturou-se 0,1 g de microcápsulas e 10 mL de hexano, em tubo de ensaio, e agitou-se por 1 minuto em agitador vortex. A amostra foi, então, filtrada e quantificada por leitura em espectrofotômetro (aparelho UV-Vis) no comprimento de onda de 450 nm.

Solubilidade

A solubilidade das microcápsulas secas foi determinada conforme descrito por Canocha *et al.* (2005), com modificações. Pesou-se 0,25 g de microcápsulas as quais foram acondicionadas em erlenmeyer e adicionado 25 mL de água destilada. A solução foi agitada por um minuto e centrifugada (4276,4 x g por 5 min a 25°C). Foi, então, retirada uma alíquota de 15 mL do sobrenadante e colocada em placa de petri, previamente pesada, e seca em estufa de circulação de ar por 5h a 105°C. A solubilidade foi expressa em percentual e calculada por meio da diferença de massas.



Rendimento

Calculado de acordo com estudo de Huang *et al.* (2012). Aplicou-se a fórmula $R = \frac{m_i}{m_0} \times 100$, em que R é o rendimento (em porcentagem), m_i corresponde ao valor da massa seca (em gramas) e m_0 o valor da massa inicial (massa da goma + massa da gelatina + massa do óleo), em gramas.

Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e submetidas às análises de variância ANOVA e teste de Tukey ao nível de significância 5% ($p < 0,05$) para comparação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Eficiência de Encapsulamento

A eficiência de encapsulamento foi calculada a partir da relação entre o teor de óleo superficial e óleo total das microcápsulas. Os resultados estão retratados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores para eficiência de encapsulamento dos tratamentos Goma de Cajueiro/Gelatina (GC+G) 2:1 em pH 4,5 com 1 g de óleo de pequi e Goma Arábica/ Gelatina (GA+G) 1:3 em pH 4,5 com 2,5 g de óleo de pequi, após processo de secagem por *spray drying* e liofilização.

	Eficiência de Encapsulamento (%)	
	<i>Spray Drying</i>	Liofilização
GC+G 2:1 com 1 g de óleo	90,70 ± 0,25 ^{Aa}	72,53 ± 4,80 ^{Cb}
GA+G 1:3 com 2,5 g de óleo	94,61 ± 0,35 ^{Bc}	82,77 ± 6,09 ^{Dd}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as médias e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre as médias.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Em ambos os tratamentos, o material seco por *spray drying* apresentou melhor eficiência de encapsulamento do que o material seco por liofilização. As cápsulas secas por *spray drying* apresentaram eficiência de encapsulamento altas quando comparadas, por exemplo, com o estudo de Hu *et al.* (2016) que encapsulou óleo de *Brucea javanica* em matriz de goma arábica/gelatina e atingiu eficiência de encapsulamento em torno de 82,9% e de Prata e Grosso (2015) que atingiu 89,6%.

Além disso, a eficiência das microcápsulas de óleo de pequi em revestimento de goma arábica/gelatina foi maior do que a eficiência das cápsulas revestidas por goma de cajueiro/gelatina. Tang e Li (2013) explicam tal comportamento afirmando que a retenção de óleo na cápsula é influenciada pela espessura da parede de revestimento, de modo que o uso de maior quantidade de material de parede pode favorecer a retenção de óleo e, conseqüentemente,



melhorar a eficiência de encapsulamento. Dessa maneira, como o tratamento goma de cajueiro/gelatina tem um número de massa, em gramas, menor do que o tratamento goma arábica/gelatina pode resultar também em uma menor eficiência.

Solubilidade

As médias de solubilidade das microcápsulas secas estão expressas na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de solubilidade das microcápsulas de óleo de pequi em matrizes de Goma de Cajueiro/Gelatina (GC+G) 2:1 em pH 4,5 com 1 g de óleo de pequi e Goma Arábica/ Gelatina (GA+G) 1:3 em pH 4,5 com 2,5 g de óleo de pequi após processo de secagem por *spray drying* e liofilização.

	Solubilidade (%)	
	<i>Spray Drying</i>	Liofilização
GC + G 2:1 com 1 g de óleo	77,88 ± 1,30 ^{Aa}	93,50 ± 2,40 ^{Cb}
GA + G 1:3 com 2,5 g de óleo	87,78 ± 1,39 ^{Bc}	98,46 ± 0,08 ^{Dd}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as médias e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre as médias.

Fonte: Elaborada pelos autores.

As microcápsulas secas por *spray drying* são menos solúveis do que as secas por liofilização, considerando que as médias de solubilidade de ambos os tratamentos e técnicas de secagem são, estatisticamente, diferentes. Por meio da análise estatística, é possível concluir que as microcápsulas de óleo de pequi em matriz de goma arábica/gelatina são mais solúveis que as de matriz de goma de cajueiro/gelatina.

A solubilidade está inversamente relacionada a eficiência de encapsulamento de modo que quanto maior a eficiência, maior a quantidade de material retido no interior da cápsula e, conseqüentemente, menor solubilidade. Assim, os resultados da análise de solubilidade estão de acordo com a eficiência de encapsulamento.

Rendimento

Os rendimentos foram calculados relacionando a massa inicial (material de parede juntamente com o óleo) e a massa seca final. Os valores estão indicados na Tabela 3.



Tabela 3: Valores de rendimento das microcápsulas de óleo de pequi em matrizes de Goma de Cajueiro/Gelatina (GC+G) 2:1 em pH 4,5 com 1 g de óleo de pequi e Goma Arábica/ Gelatina (GA+G) 1:3 em pH 4,5 com 2,5 g de óleo de pequi após processo de secagem por *spray drying* e liofilização

	Rendimento após Secagem (%)	
	<i>Spray Drying</i>	Liofilização
GC+G 2:1 com 1 g de óleo	2,85 ± 0,32 ^A	53,15 ± 3,52 ^{Cb}
GA+G 1:3 com 2,5 g de óleo	4,61 ± 1,74 ^{Bc}	78,75 ± 2,98 ^{Dd}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as médias e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre as médias.

Fonte: Elaborada pelos autores.

As secagens por liofilização, em ambos os tratamentos, apresentaram maior rendimento, estatisticamente, do que as secagens por *spray drying*, e o rendimento das microcápsulas de goma arábica e gelatina 1:3, em pH 4,5, com 2,5 g de óleo de pequi, foi maior do que o rendimento das microcápsulas de goma de cajueiro e gelatina 2:1, em pH 4,5, com 1 g de óleo, nos dois tipos de secagem.

Os baixos rendimentos das microcápsulas secas por *spray drying* podem estar associados à quebra das cápsulas durante o processo por sensibilidade à altas temperaturas e agregação do material na câmara de secagem. Além disso, o fato de a temperatura de secagem ser maior do que a temperatura de transição vítrea dos biopolímeros utilizados também pode afetar negativamente o rendimento. Segundo Conto, Grosso e Gonçalves (2013), as cápsulas produzidas por coacervação apresentam baixa resistência térmica e mecânica devido à natureza iônica das interações entre os polímeros de parede, de modo que o uso de reticulantes apresenta potencial para otimizar o rendimento por reforçar a parede das cápsulas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, as cápsulas secas por *spray drying* apresentaram menor rendimento e solubilidade e maior eficiência de encapsulamento do que as secas por liofilização, em ambos os tratamentos. As cápsulas de matriz de goma de cajueiro e gelatina mostraram desempenho aproximado às cápsulas com revestimento de goma arábica e gelatina nas mesmas análises.

Assim, goma de cajueiro apresenta potencial de uso como matriz de encapsulamento, sendo uma alternativa a goma arábica, podendo, desse modo, contribuir para a valoração deste coproduto. Além disso, a formação de microcápsulas de óleo de pequi agrega valor a produção deste fruto devido a vasta possibilidade de aplicação deste material pelas indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas.



REFERÊNCIAS

ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1069-1076, 2010.

ANDRADE, K. C.; *et al.* Goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*): Avaliação das modificações químicas e físicas por extrusão termoplástica. **Polímeros**, v. 23, n. 5, p. 667-671, 2013.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 385-396, 2004.

BLACK, K. A.; *et al.* Protein Encapsulation via Polypeptide Complex Coacervation. **American Chemical Society Macro Letters**, v. 3, p. 1088-1091, 2014.

CANO-CHAUCA, M.; *et al.* Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by *spray drying* and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 429-438, 2005.

CARDOSO, L. de E. M.; *et al.* Chemical characteristics and bioactive compounds of cooked pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) from the brazilian Savannah. **Fruits**, v. 68, n. 1, p.3-14. 2013.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos** 2.ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp. 2003. 206 p.

CONTO, L. C.; GROSSO, C. R. F.; GONÇALVES, L. A. G. Chemometry as applied to the production of omega-3 microcapsules by complex coacervation with soy protein isolate and gum Arabic. **LWT- Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 218-224, 2013.

FIGUEIREDO, P. R. L.; *et al.* *Caryocar coriaceum* Wittm. (Pequi) fixed oil presentes hypolipemic and anti-inflammatory effects in vivo and in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 87-94, 2016.

GARCIA, C. C.; *et al.* Thermal stability studies of some cerrado plant oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 645-648, 2007.

GOMEZ-ESTACA, J.; *et al.* Encapsulation of an astaxanthin-containing lipid extract from shrimp waste by complex coacervation using a novel gelatin-cashew gum complex. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 155-162, 2016.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science; Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.

HIGUITA, Diana Maria Cano. **Microencapsulação de oleoresina de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em misturas de goma arábica, maltodextrina e amido modificado**. 2013. 87f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto - SP, 2013.



HUANG, G. Q.; *et al.* Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. **Food Chemistry**, v. 135, p. 534-539, 2012.

HU, L., *et al.* Microencapsulation of *Brucea javanica* oil: Characterization, stability and optimization of spray drying conditions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 36, p. 46-54, 2016.

LOPES, P. S., *et al.* Evaluation of in vitro percutaneous enhancement effect of papain and pequi oil on diclofenac sodium permeation through human skin. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 225-231, 2008.

MEDEIROS, H.; AMORIM, A.M.A. 2015. Caryocaraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16719>. Acesso em 09 jan. 2022.

NASCIMENTO, Marília Alves. **Obtenção e caracterização de microcápsulas de óleo de pequi em matriz de goma de cajueiro e gelatina por coacervação complexa**. 2016. 65f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016.

OLIVEIRA, F. F. B.; *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caryocar coriaceum* Wittm. fruit pulp fixed ethyl acetate extract on zymosan-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 452-463, 2015.

OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B; PAULA, R. C. M. Alginate/cashew g gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 146-151, 2014.

PRATA, A. S., GROSSO, C. R. F. Production of microparticles with gelatin and chitosan. **Carbohydrate polymers**, v. 116, p. 292–299, 2015.

RODRIGUES, Rodney Alexandre Ferreira. **Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por *spray-drying*, contendo extrato de café crioconcentrado**. 2004. 204f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2004.

RODRIGUES, R. A. F.; GROSSO, C. R. F. Cashew gum microencapsulation protects the aroma of coffee extracts. **Journal of microencapsulation**, v. 25, n. 1, p. 13-20, 2008.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501–547, 1993.

SILVA, L. C.; *et al.* Microencapsulamento de Óleo de Pequi Revestido com Goma de Cajueiro/Quitosana por Coacervação Complexa Seguida de Secagem por Spray Drying ou Liofilização. **Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 168, 2018.

TANG, C. H.; LI, X. R. Microencapsulation properties of soy protein isolate and storage stability of the correspondingly spray-dried emulsions. **Food research international**, v. 52, n. 1, p. 419-428, 2013.



TORQUATO, D. S.; *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 20, p. 505-507, 2004.

ORGANIZADORA



FLAVIA OLIVEIRA MONTEIRO DA SILVA ABREU

Profª. Adjunta na área de Química Analítica (40H/DE) no Curso de Química na Universidade Estadual do Ceará e Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais.

Possui graduação em Bacharelado em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2000) e graduação em Licenciatura em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (2005). Possui Mestrado (2004) e Doutorado (2008) em Engenharia, com área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais (PPGEM/UFRGS). Tem experiência na área de Ciência de Materiais e Química, com ênfase em desenvolvimento de novos materiais poliméricos, atuando principalmente nos seguintes temas: Desenvolvimento de hidrogéis polissacarídicos em micro e nanoescala para liberação controlada de princípios ativos, Planejamento e Análise Fatorial para otimização de sistemas, modificação química de polissacarídeos, blendas de materiais poliméricos com elastômeros e na caracterização física e química de materiais poliméricos.

www.editorapublicar.com.br
contato@editorapublicar.com.br
@epublicar
facebook.com.br/epublicar

COLETÂNEA DE ARTIGOS

DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIENCIAS NATURAIS - PPGCN

FLÁVIA OLIVEIRA MONTEIRO DA SILVA ABREU
ORGANIZADORA



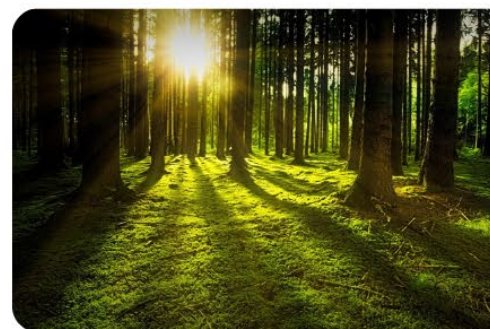
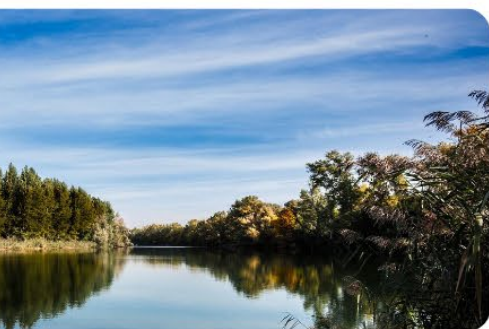
2022

www.editorapublicar.com.br
contato@editorapublicar.com.br
@epublicar
facebook.com.br/epublicar

COLETÂNEA DE ARTIGOS

DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIENCIAS NATURAIS - PPGCN

FLÁVIA OLIVEIRA MONTEIRO DA SILVA ABREU
ORGANIZADORA



2022