Universidade do Estado da Bahia

Departamento de Ciências Exatas e da Terra

Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada

Determinação de bioativos fenólicos, atividade antioxidante e biológica em pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

Jamile da Cruz Caldas

Orientador: Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Celeste da Silva Sauthier

Salvador-BA

Março de 2020

Jamile da Cruz Caldas

Determinação de bioativos fenólicos, atividade antioxidante e biológica em pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade do Estado da Bahia para obtenção do título de Mestre em Química Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Celeste da Silva Sauthier

Salvador-BA

Março de 2020

Determinação de bioativos fenólicos, atividade antioxidante e biológica em pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

JAMILE DA CRUZ CALDAS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro Mesquita

Centro Tecnológico Agropecuário da Bahia - CETAB

Prof. Dr. Fábio de Souza Dias

Universidade Federal do Sul da Bahia – UFSB

Profa. Dra. Maria Celeste da Silva Sauthier

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Baiano - IFBAIANO

FICHA CATALOGRÁFICA

Sistema de Bibliotecas da UNEB
Dados fornecidos pelo autor

C145d Caldas, Jamile da Cruz

Determinação de bioativos fenólicos, atividade antioxidante e biológica em pimenta rosa (Schinus terebinthifolius Raddi). / Jamile da Cruz Caldas.-- Salvador, 2020.

70 fls : il.

Orientador(a): Pr. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos.
Coorientador(a): Pr. Dra. Maria Celeste da Silva Sauthier.
Inclui Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada - PGQA, Câmpus I. 2020.

1.Pimenta Rosa. 2.Bioativos fenólicos. 3.HPLC. 4.Atividade antimicrobiana. 5.Quimiometria.

CDD: 007

Dedico esta conquista as pessoas que abraçaram em todos os momentos da minha vida as minhas ansiedades, os meus problemas, minhas alegrias e triunfos: meus pais, Josias e Eleonice e a minha irmã Elen.

AGRADECIMENTOS

Não tem como iniciar esse agradecimento sem prestar honra e glória para o meu maior suporte em todos os momentos: Deus! A Ele toda honra e toda a glória!
Quero agradecer a minha família por ser, sem sombra de dúvidas, a minha base. Por me ajudar a crescer como pessoa e como profissional. Por me ajudar a ver a luz quando eu não conseguia enxergar uma saída. Por me ensinar a ponderar as propostas, equilibrar as atividades e acima de tudo aceitar os resultados das minhas escolhas. Como professora, sei que meus atos têm consequências, e por isso, saber lidar com eles me tornou a profissional que sou hoje. Quero agradecer a minha mãe, por ter compartilhado comigo o amor ao ensino e ter sempre encontrado uma forma de me ajudar, fazendo das tripas coração. Agradecer ao meu pai por me encorajar em absolutamente tudo! Por tornar sempre as coisas mais leves. Agradecer a minha irmã, porque ela foi em todo momento a minha referência. A calma dela equilibrava o meu nervosismo. Quero agradecer a Matheus, por toda paciência, atenção, compreensão e suporte. Obrigada de verdade! Aos meus amigos, em especial a Juliana, Igor e Luane, por estarem sempre comigo. Agradecer a minha família GPDQA: Isaac, por todo apoio nos testes realizados e por sua amizade. Jéssica (anjo) por nos alegrar com suas reclamações engraçadas. Bárbara, por ser a baixinha com o maior coração que já se ouviu falar. Levi, por nos encantar com sua dança. Geovane, por ser tão nobre e ajudador. José Jorge, por seu jeito despojado e afrontoso de ser. Débora, por ser incrivelmente divertida e inteligente, compartilhando sempre os seus conhecimentos. Celeste, por ter sido minha mãe científica e ter me ensinado com tanto amor a arte da cromatografia. A todos os demais componentes do grupo, pois sem vocês não teria graça nenhuma! E finalmente, ao “prof” mais querido e amado: Walter Nei Lopes. Obrigada por esse seu coração! Obrigada por nos adotar como filhos e nos ajudar a qualquer momento sem deixar a sua famosa frase de lado: Cadê os resultados?
Muito obrigada a todas as parcerias estabelecidas! Ao laboratório de Química Orgânica coordenado pela professora doutora Lourdes Cardoso. Obrigada, Rebeca, por ter sido perfeita em suas colocações. A dona Antônia, por ser uma técnica exemplar. Ao PGQA, por proporcionar a nós, estudantes sonhadores, uma vida com perspectiva e realizações.

RESUMO

A pimenta rosa (Schinus terebinthifolius Raddi) é um fruto bastante utilizado na culinária mundial, sendo rica em substâncias benéficas a saúde, como os compostos bioativos. Neste sentido, foi realizado um procedimento para extração e determinação das substâncias fenólicas (ácidos fenólicos e flavonoides) a nível traço, presentes em amostras comercializadas em Salvador-BA e regiões próximas. Foram empregadas as técnicas de: cromatografia líquida de alta eficiência com detector com arranjo de diodo (HPLC-DAD) para avaliação do perfil fenólico; espectrofotometria para avaliação da atividade antioxidante a partir da captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DDPH), teor de fenólicos totais e flavonóides totais (TPC e TFC), e a microdiluição em caldo para avaliação da atividade biológica frente a fungos e bactérias. Os resultados encontrados variaram entre 271,37 a 517,08 mg 100 g^{-1} para TPC, 100,97 a 283,35 mg 100 g^{-1} para TFC, 1,58 x 10^{-3} a 7,10 x 10^{-3} µM TE 100g^{-1} para DPPH. Já em relação ao perfil fenólico, os analitos que apresentaram maiores concentrações foram o ácido gálico e o kaempferol, sendo respectivamente 36,23 a 441,36 mg 100g^{-1} e 702,18 a 753,16 mg 100g^{-1}. Todas as bactérias Gram-positivas foram sensíveis aos extratos metanólicos, sendo que as bactérias Gram-negativas foram seletivas para *Salmonella choleraesius*. O teste de comparação das médias de Tukey possibilitou a avaliação da similaridade em relação a quantificação dos compostos bioativos determinados. As ferramentas quimiométricas: análise dos componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de agrupamentos (HCA), foram aplicadas aos resultados cromatográficos, possibilitando a discriminação das amostras em função da concentração de fenólicos.

Palavras chave: HPLC, Fenólicos, Pimenta rosa, Atividade antimicrobiana

ABSTRACT

Pink pepper (Schinus terebinthifolius Raddi) is a fruit widely used in world cuisine, being rich in substances beneficial to health, such as bioactive compounds. In this sense, a procedure was carried out for the extraction and determination of phenolic substances (phenolic acids and flavonoids) at the trace level, present in samples sold in Salvador-Ba and nearby regions. High-performance liquid chromatography techniques with a diode array detector (HPLC-DAD) were used to evaluate the phenolic profile, spectrophotometry to assess antioxidant activity from the capture of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil (DDPH), total phenolic content and total flavonoids (TPC and TFC), and broth microdilution to assess biological activity against fungi and bacteria. Results found ranged from 271.37 to 517.08 mg 100 g^{-1} for TPC, 100.97 to 283.35 mg 100 g^{-1} for TFC, 1.58 x 10^{-3} to 7.10 x 10^{-3} µM TE 100g^{-1} for DPPH. Regarding the phenolic profile, the analytes that showed the highest concentrations were gallic acid and kaempferol, being 36.23 to 441.36 mg 100g^{-1} and 702.18 to 753.16 mg 100g^{-1}, respectively. All Gram-positive bacteria were sensitive to methanolic extracts, and Gram-negative bacteria were selective for Salmonella choleraesius. The Tukey's means comparison test made it possible to compare the similarity in relation to the quantification of the determined bioactive compounds. The chemometric tools: principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA), were applied to the chromatographic results, enabling the discrimination of samples according to the concentration of phenolics.

Key words: HPLC, Phenolic, Pink pepper, Antimicrobian activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) localizada na cidade de Salvador-BA	17
Figura 2	Coloração azul obtida após adição do reagente de Folin.....	20
Figura 3	Estrutura dos ácidos fenólicos acompanhados dos seus respectivos comprimentos de onda de maior absorção.....	21
Figura 4	Estrutura dos flavonóides acompanhados dos seus respectivos comprimentos de onda de maior absorção.....	22
Figura 5	Localização das regiões de onde foram adquiridas as amostras.....	35
Figura 6	DPPH radicalar	41
Figura 7	DPPH não radicalar	41
Figura 8	Extratos de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) solubilizados em fração de dimetilsulfóxido a 20% em água.	44
Figura 9	Placa de Elisa	44
Figura 10	Análise da turbidez após a diluição seriada	45
Figura 11	Análise da concentração mínima bactericida.....	46
Figura 12	Cromatograma da amostra de pimenta rosa da região de Arembepe no comprimento de onda de 360nm.....	50
Figura 13	Cromatograma da amostra de pimenta rosa da região do Cabula no comprimento de onda de 280nm.....	53
Figura 14	Gráfico de scores PC1 vs PC2 da pimenta rosa (*Shinus terebinthifolius* Raddi) em relação ao teor de fenólicos totais	57
Figura 15	Gráfico de loading PC1 vs PC2 das amostras de pimenta rosa (*Shinus terebinthifolius* Raddi)	59
Figura 16	Dendrograma das amostras de P_A, P_C, P_I, P_M e P_N por HCA...	59
Figura 17	Dendrograma obtido a partir da análise de TPC, TFC e DPPH por HCA	60
Figura 18	Gráfico de scores PC1 vs PC2 em relação aos bioativos fenólicos mais efetivos na pimenta rosa (*Shinus terebinthifolius* Raddi)	61

Figura 19 Gráfico de loading scores PC1 vs PC2 em relação aos bioativos fenólicos mais efetivos na pimenta rosa (*Shinus terebinthifolius* Raddi) 61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Curva de calibração do Ácido Gálico para determinação do Teor de Fenólicos Totais (TPC)	39
Gráfico 2	Curva calibração da Quercetina para determinação do Teor de Flavonoides Totais (TFC)	40
Gráfico 3	Curva de DPPH$^{\bullet}$ para determinação da capacidade antioxidante	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Amostras de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) coletadas em diferentes pontos de Salvador-BA e regiões próximas	34
Tabela 2	Comprimento de onda e tempo de retenção das substâncias bioativas analisadas	36
Tabela 3	Valores obtidos após validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência	38
Tabela 4	Microrganismos testados com os extratos de pimenta rosa (*Shinus terebinthifolius* Raddi)	43
Tabela 5	Concentração dadas em: TPC (mg 100 g^{-1} EAG); TFC (mg 100 g^{-1} EQ); DPPH (µM TE 100g^{-1} de amostra seca) (medida ± desvio padrão, n = 3)	47
Tabela 6	Resultados para concentrações de flavonoides (mg 100g^{-1} DW) em pimenta rosa, por HPLC-DAD	51
Tabela 7	Resultados para concentrações de ácido fenólicos (mg 100g^{-1} DW) em pimenta rosa, por HPLC-DAD	52
Tabela 8	Atividade antimicrobiana da pimenta rosa (Shinus terebinthifolius Raddi)	55

ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – Coleção de Microrganismos Norte Americana – Do inglês *American Type Culture Collection.*

CCT – Coleção de Culturas Tropicais

CLSI – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais – Do inglês *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CMM – Concentração Microbicida Mínima – Do inglês *Center for Molecular Microbiology*

DAD – Detector com Arranjo de Diodo – Do inglês *Detector Diode Array*

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DMSO – Dimetilsulfóxido

DW – Sem água – Do inglês *Dry Water*

EAG – Equialente de ácido gálico

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Do inglês *High Performance Liquid Chromatograph.*

HCA – Análise de Agrupamentos Hierárquicos – Do inglês *Hierarchical Cluster Analysis.*

LD – Limite de Detecção

LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade – Do inglês *Low Density Lipoprotein*

LQ – Limite de Quantificação

MIC – Concentração Mínima Inibitória – Do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*

MBC – Concentração Bactericida Mínima – Do inglês *Minimum Bactericidal Concentration*

PCA – Análise de Componentes Principais – Do inglês *Principal Component Analysis*

pH – Potencial Hidrogeniônico

PM – Pimenta de Mangabeira

PC – Pimenta do Cabula

PI – Pimenta de Itapuan

PA – Pimenta de Arembepe

PN – Pimenta de Nazaré

QE – Equivalente de Quercetina

RP – Fase reversa – Do inglês *Reverse Phase*

RSD – Desvio Padrão Relativo – Do inglês *Relative Standard Deviation*

TPC – Teor de Fenólicos Totais – Do inglês *Total Phenolic Content*

TFC – Teor de Flavonoides Totais – Do inglês *Total Flavonoid Content*

UV-Vis – Ultravioleta – Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 18
2.1 PIMENTA ROSA 18
2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS 19
2.3 ÁCIDOS FENÓLICOS 20
2.4 FLAVONOIDES 22
2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 23
2.6 ESPECTROFOTOMETRIA 24
2.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) 25
2.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 26
2.8.1 *Staphylococcus aureus* 27
2.8.2 *Staphylococcus epidermidis* 27
2.8.3 *Bacillus subtilis* 28
2.8.4 *Bacillus cereus* 28
2.8.5 *Escherichia coli* 28
2.8.6 *Pseudomonas aeruginosa* 29
2.8.7 *Salmonella choleraesuis* 29
2.8.8 Cândida 30
2.8.8.1 Cândida albicans 30
2.8.8.2 Cândida glabrata 30
2.9 QUIMIOMETRIA 30
2.9.1 Análise de componentes principais - PCA 31
2.9.2 Análise de agrupamentos por métodos hierárquicos – HCA 31
3 JUSTIFICATIVA 33
4 OBJETIVOS 34
GERAL 34
ESPECÍFICOS 34
5 METODOLOGIA 34
5.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES 34
5.2 PREPARO DAS AMOSTRAS 35
5.3 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA 37
5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS – TPC 40
5.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS – TFC 40

5.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELA CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH 41
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 43
6 RESULTADOS 47
6.1 ESPECTROFOTOMETRIA 47
6.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA 51
6.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 55
6.4 QUIMIOMETRIA 58
CONSIDERAÇÕES FINAIS 63
REFERÊNCIAS 64

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas como meio medicinal vem se tornando uma prática cada vez mais popular no Brasil, sendo essas plantas utilizadas para a prevenção das mais variadas doenças. Dentre as espécies utilizadas, cabe citar a pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), também conhecida como aroeira-vermelha, aroeira mansa ou simplesmente aroeira. Pertencente à família *Anacardiaceae*, a espécie em questão é nativa da América do Sul e América Central, sendo utilizada de maneira significativa na culinária mundial como tempero, devido ao seu aroma característico e ao seu sabor específico (BARBIERI et. al., 2014; SALEM et. al., 2018; ULIANA et. al., 2016).

Além da utilização como condimento, a pimenta rosa também é utilizada para tratamento de doenças inflamatórias e hemostáticas. Estudos realizados indicam que a pimenta rosa apresenta em sua constituição compostos fenólicos, flavonoides, bioflavonoides, terpenos, entre outros. No que diz respeito as propriedades encontradas na mesma, podem-se destacar o potencial antimicrobiano, sendo já relatado que os compostos fenólicos podem ser utilizados para o controle de fungos patogênicos e anti-inflamatório (BARBIERI et. al., 2014; SALEM et. al., 2018).

Considerando então a importância desse fruto, e compreendendo a necessidade dos consumidores por estilos de vida mais saudáveis, investindo em alimentos que contribuem na prevenção de doenças (alimentos funcionais), o presente trabalho teve como objetivo a aplicação de um método analítico eficiente para a determinação de 11 substâncias polifenóicas por cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodo (HPLC-DAD), bem como a avaliação da atividade biológica pelo método de microdiluição em caldo frente a fungos e bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), além da avaliação da atividade antioxidante da espécie, e determinação, por métodos oficiais adaptados, das substâncias fenólicas (ácidos fenólicos e flavonoides) em amostras de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), comercializadas na cidade de Salvador- Ba e regiões próximas, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectrofotometria.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PIMENTA ROSA

A pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), também conhecida como Aroeira-pimenteira e Aroeira-vermelha, é um fruto advindo da Aroeira, árvore perene de porte médio (podendo atingir até dez metros), originária da costa brasileira, pertencente à família Anacardiacea, a qual possui mais de 70 gêneros e mais de 600 espécies, podendo esta ser encontrada muito facilmente entre parte do Nordeste (DANNENBERG et. al. 2016; ANDRADE et. al., 2017; SILVA, 2016).

Figura 1. Pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) localizada na cidade de Salvador-BA.

Fonte: Acervo pessoal

No que diz respeito às propriedades conferidas a este fruto, é relatada a sua ação antimicrobiana, além de apresentar propriedades antioxidantes, antitumoral e anti-inflamatória. Essas propriedades são atribuídas principalmente aos metabólitos secundários, produzidos pelas plantas em condições adversas, como mudanças climáticas e estresses bióticos (ambientais e microrganismos,

respectivamente) (DANNENBERG et. al., 2016; SILVA, 2016; DANNENBERG et. al., 2019).

Por se tratar de um condimento que possui coloração e odor característicos, a pimenta rosa é largamente utilizada como tempero culinário, além da possibilidade de substituição da pimenta-do-reino pela mesma, sendo já relatada a semelhança na composição química das duas espécies (ANDRADE et. al., 2017).

No que diz respeito às pimentas, uma das substâncias químicas que se destacam em sua composição são os capsaicinóides, substância essa cuja sua concentração está diretamente relacionada a sua pungência ou ardume. Porém, a pimenta rosa não possui essa substância em sua constituição química, não sendo tratada então como pimenta e sim como fruto (PINTO, C.M.F.; PINTO, C.L.O.; DONZELES, S.M.L., 2013).

2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos são constituintes naturais dos alimentos responsáveis por fornecer propriedades nutracêuticas e funcionais de benefício para a saúde humana. Os compostos cujas propriedades estão ligadas a funções nutracêuticas são considerados essenciais pois desempenham funções biológicas importantes no corpo humano e sua deficiência pode levar ao surgimento de doenças. Entre os compostos essenciais mais estudados cabe citar, as vitaminas A, B, C, D e E (BIESALSKY et. al., 2009; ORTEGA & CAMPOS, 2019; CHERNOFF, 2014).

Em contrapartida, há evidência de que alguns indivíduos apesar da ingestão ideal das substâncias consideradas nutracêuticas demonstram um alto risco de doenças como câncer ou doenças coronárias. Assim, os compostos considerados funcionais desempenham um papel importante tanto no fornecimento de propriedades biológicas essenciais como na prevenção de doenças de alto risco. Dentre os compostos bioativos considerados funcionais, cabe citar os fitoquímicos que são classificados de acordo com a natureza de sua estrutura química, como os terpenóides, polifenóis, organosulfarados,

fitoesteróis e alcaloides (BIESALSKY et. al., 2009; ORTEGA & CAMPOS, 2019; SOMANI et. al., 2015).

Durante a última década, o conhecimento do papel dos fitoquímicos têm aumentado devido ao efeito preventivo de doenças em estágios precoces como o câncer. Segundo estudos epidemiológicos a principal causa dessa doença está atrelada ao estresse oxidativo induzido por radicais livres. Assim, os fitoquímicos atuam aumentando a capacidade antioxidante do sangue através da ligação com os glóbulos vermelhos, prevenindo assim o desequilíbrio causados pelos radicais livres. Outra aplicação foi realizada na terapia de doenças inflamatórias intestinais, cujos medicamentos utilizados para o tratamento causam efeitos colaterais graves e complicações. Dessa forma, os fitoquímicos representam uma alternativa natural e menos agressiva ao organismo (SOMANI et. al., 2015; ZHANG et. al., 2015; KIM et. al., 2010).

Dentre a classe de fitoquímicos utilizados na terapia dessas doenças, cabe citar os fenólicos, sendo os principais: ácido caféico, elágico e vanílico. Este último, por sua vez, foi utilizado no estudo realizado por Kim et. al (2010) para o tratamento de úlcera em camundongos que apresentavam sintomas como perda de peso, diarreia e sangramento retal. Após a realização do experimento, foi possível observar que os sintomas reduziram consideravelmente nos camundongos tratados com ácido vanílico do que aqueles não tratados.

Os resultados obtidos pelo estudo de Kim et. al (2010) sugerem que o ácido vanílico pode reduzir consideravelmente os efeitos causados por doenças inflamatórias como a úlcera. Isto posto, a identificação de princípios ativos em vegetais é de fundamental importância para o desenvolvimento de fármacos com maior valor agregado e economicamente viáveis.

2.3 ÁCIDOS FENÓLICOS

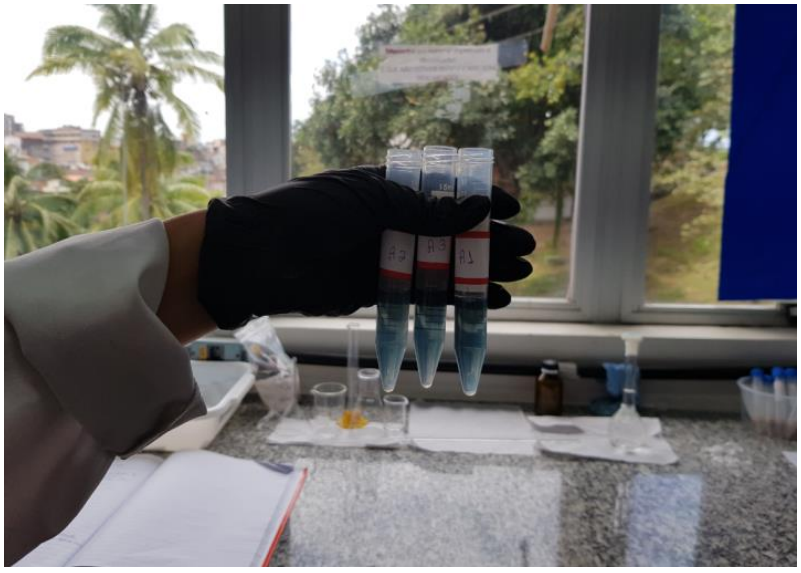
Os compostos fenólicos fazem parte dos principais grupos que constituem os metabólitos secundários, metabólitos esses que possuem atividades biológicas importantes, inclusive do ponto de vista farmacêutico, no qual existe um elevado número de substâncias farmacologicamente importantes. Esses compostos possuem um ou mais anéis aromáticos, possuindo uma grande variedade de estruturas, sendo responsáveis pelas principais características

organolépticas das plantas, principalmente cor e sabor, contribuindo também para o valor nutricional de alimentos como frutas e verduras (TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B., 2008; LIMA NETO et. al., 2015).

Um dos métodos espectrofotométricos mais utilizados para determinação desses compostos é o de Folin-Ciocalteau (ALVES et, al. 2015). No que diz respeito a ao reagente de Folin-Ciocalteau, o ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e o ácido fosfomolíbdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) fazem parte da sua composição, possuindo inicialmente coloração amarelada. A partir do contato com as substâncias de interesse presentes no extrato, as substâncias fenólicas (redutoras) levam a formação do ânion fenolato, que reduz o reagente de Folin formando o óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e o ácido molibdênio (Mo_8O_{23}), ambos de coloração azul, como indicado na figura 2.

Essa metodologia também pode ser utilizada empregando-se o reagente Folin-Denis, sendo o preparo do mesmo realizado a partir da mistura entre os óxidos de tungstênio e molibdênio, os quais, sob aquecimento, reagem com ácido fosfórico em fluxo por três horas. Sartori, Castro e Mori (2014), através de testes comparando o reagente de Folin-Denis e Folin-Ciocalteau em cascas de Angico-Vermelho, concluíram que o primeiro apresentava resultados maiores que o segundo, porém não havia diferença estatística entre os resultados, sendo então ambos recomendados para realização dos testes de TPC.

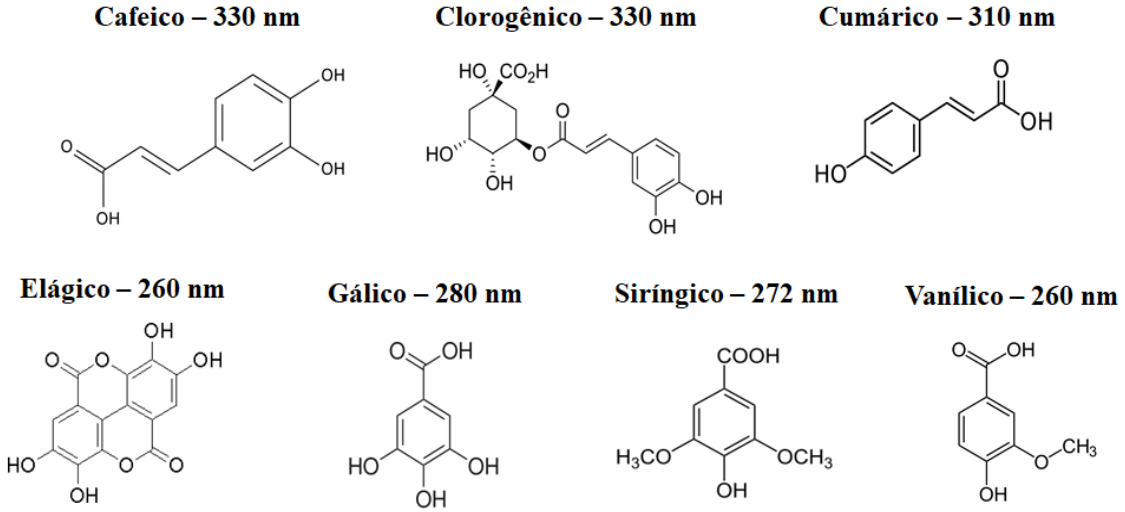
Figura 2. Coloração azul obtida após adição do reagente de Folin.



Fonte: Acervo pessoal

Dentre os ácidos fenólicos, cabe citar os ácidos: cafeico, clorogênico, cumárico, elágico, gálico, siríngico e vanílico, sendo esses uns dos mais determinados em análises de compostos bioativos, devido principalmente à sua ocorrência em plantas e frutos.

Figura 3. Estrutura dos ácidos fenólicos acompanhados dos seus respectivos comprimentos de onda de maior absorção.



Fonte: Acervo pessoal

2.4 FLAVONOIDES

Os flavonoides fazem parte de uma importante classe de polifenóis, presentes nos metabólitos secundários vegetais. São compostos heterocíclicos aromáticos oxigenados, que são comumente associados com glicosídeos. Os mesmos possuem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e são vasoprotetores, sendo presentes em diversos vegetais, conferindo uma coloração diversificada (do branco ao violeta intenso) as flores e frutos. Ainda se tratando desse grupo, o termo derivado do latim *"flavus"* que significa "amarelo", definiu a classe das substâncias em questão como "pigmento das flores" (SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N.P., 2011; FONSECA et. al, 2016).

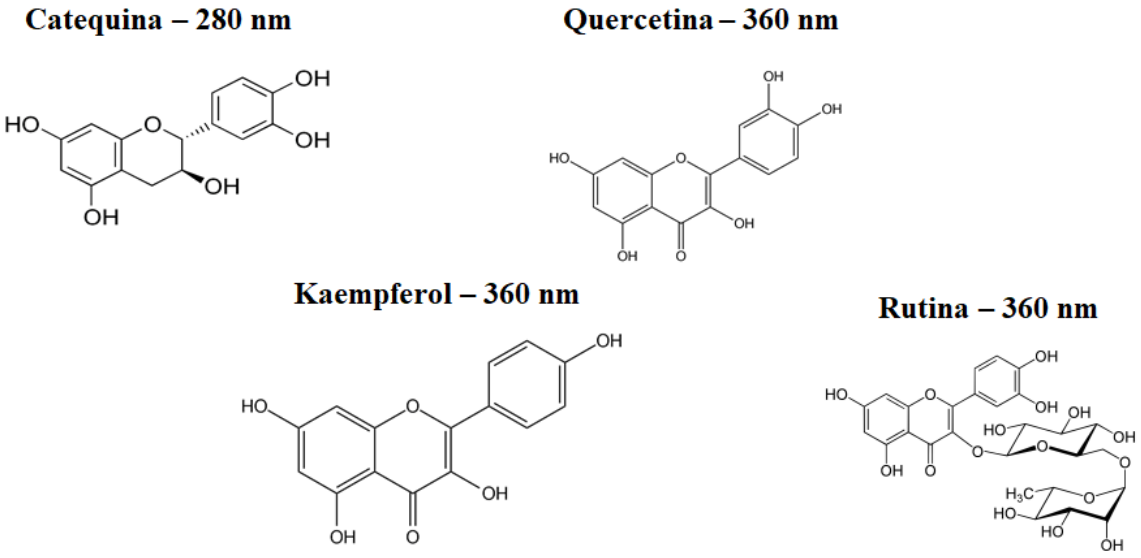
Os flavonoides de origem naturais em uma grande maioria de vezes são oxigenados, porém uma grande quantidade está ligada a açúcares. Sendo também heterosídeos, possuem um açúcar diferente da glicose, ligada a uma fração aglicona, sendo seus dois principais tipos as flavonas e os antociânicos.

O primeiro possui maior importância terapêutica, no qual a aglicona é uma flavona possuindo coloração amarelada, e o segundo, o qual a aglicona é uma antocianina, possui uma coloração azul. Esses compostos podem ser encontrados em diversas formas estruturais, sendo que a maioria dos representantes desta classe possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo (SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N.P., 2011).

No que diz respeito ao interesse econômico pelos flavonoides, o mesmo é advindo a propriedades como a coloração, podendo ser utilizados como pigmentos, além da importância farmacológica, oriunda de algumas substâncias pertencentes a essa classe, conferindo propriedades importantes como: antitumoral e antiviral (SIMÕES et. al., 2003).

Dentre os flavonoides mais estudados, podem-se destacar a catequina, quercetina, rutina e kaempferol, sendo este último um exemplo de flavonoide abundante em plantas, incluindo vegetais e algumas frutas. Estudos indicam que o mesmo possui propriedades antidiabéticas, antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-hipertensivas (ZHANG, Y.; LIU, D., 2011).

Figura 4. Estrutura dos flavonoides acompanhados dos seus respectivos comprimentos de onda de maior absorção.



Fonte: Acervo pessoal

2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são substâncias capazes de estabilizar ou até mesmo desativar as espécies radicalares antes mesmo de causarem algum efeito nas células. Ou seja, os mesmos podem retardar de maneira significativa a oxidação do substrato. Dessa forma, protegem o sistema biológico dos efeitos causados pelos radicais livres (SOUSA et. al., 2007; RUFINO et. al., 2007).

A produção de radicais livres, que se trata de espécies altamente reativas, possuindo um número ímpar de elétrons na sua última camada, possui grande influência no envelhecimento da pele e nas doenças degenerativas (câncer, doenças cardiovasculares, declínio do sistema imune, entre outros). A produção dos radicais livres pode se originar no interior de organismos ou sob influência de fatores externos, incluindo dietas, podendo causar lesões oxidativas no organismo, sendo o estresse oxidativo correspondente ao desequilíbrio entre a produção dos oxidantes e a sua degeneração, sendo essas espécies controlada pelos seres vivos a partir dos compostos antioxidantes (SOUSA et. al., 2007; VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S., 2007).

O fato dos alimentos, que possuem em sua constituição compostos antioxidantes, auxiliarem na prevenção de doenças, fez com que houvesse uma crescente busca pelos mesmos, e por sua vez pela análise de seus benefícios, aumentando cada vez mais o número de métodos para a sua determinação. Um dos métodos determinados para este fim é a captura do radical livre DPPH (RUFINO et. al., 2007).

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S., 2007).

2.6 ESPECTROFOTOMETRIA

A espectrofotometria se trata de uma técnica analítica que tem como finalidade a medida da absorção da luz pelas substâncias. Dessa forma, existem instrumentos que são necessários para que a medida da absorção seja possível. Tratando inicialmente dos espectrômetros, os mesmos são instrumentos espectroscópicos que convertem as intensidades radiantes em sinais elétricos

através do auxílio de um monocromador ou de um policromador. Por sua vez, os espectrofotômetros são espectrômetros que medem a razão entre os feixes, para que seja possível medir a absorbância (SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 2002).

Os espectrofotômetros possuem a vantagem de permitir o uso de diferentes comprimentos de onda (em sua maioria UV/visível) durante o processo de análise, além de ter relativo baixo custo, robustez e de serem simples de manusear (SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 2002). Técnica intensamente utilizada na determinação de compostos bioativos, a espectrofotometria permite que a quantificação de fenóis totais, se baseando em métodos que utilizam reagentes como Folin-Denis e Folin-Ciocalteau (ensaios colorimétricos) sejam possíveis. Essa possibilidade ocorre principalmente pela possibilidade do uso de diferentes comprimentos de onda (SIMÕES et. al., 2003).

2.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das técnicas de separação mais utilizadas para este fim, devido a possibilidade de identificar e quantificar os analitos de interesse, além de possuir boa sensibilidade e possibilitar a análise de espécies não voláteis e termicamente estáveis (SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 2002).

Para utilização desta técnica, é necessário o uso de duas fases essenciais: fase estacionária e móvel. A fase estacionária é aquela na qual os analitos ficarão retidos para posterior eluição. Retenção essa realizada pela coluna. A coluna é o equipamento preenchido com um material cuja estrutura e comportamento químico sejam conhecidos, sendo a escolha da mesma dependente do que se deseja separar (SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica bastante empregada para determinação de substâncias fenólicas, principalmente devido a possibilidade de identificação de cada substância desejada, através da utilização de padrões, tempo de retenção de cada analito, sendo possível assim quantificar essas substâncias até mesmo em matrizes complexas (SAGDIC, et. al., 2011).

No que diz respeito a fase móvel, a mesma é responsável por carrear (eluir) os analitos. Essa eluição pode ocorrer de forma isocrática ou por gradiente. Se tratando da forma isocrática, a eluição ocorre com apenas um único solvente ou com uma mesma mistura de solventes no início do processo. Dessa forma, a polaridade do processo será a mesma do início ao fim. Já na forma de gradiente, a eluição ocorre com a utilização de dois ou mais solventes que diferem entre si na sua polaridade, sendo que a razão entre os dois solventes varia de forma programada durante o processo de separação. No que diz respeito às substâncias fenólicas, e considerando a variedade de substâncias de interesse que existem, a eluição por gradiente geralmente melhora a eficiência da separação.

Em um trabalho realizado por Santos e colaboradores (2017), para determinação de compostos bioativos em goiaba (*Psidium guajava*) através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, foi possível identificar e quantificar todos os analitos de interesse, utilizando a fase móvel por gradiente. Desta forma, a eficiência desse tipo de eluição é comprovada.

2.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Devido ao aumento da resistência dos microrganismos, o uso de antibióticos tem sido intensificado nos últimos anos, trazendo assim a necessidade de se buscar por novas fontes de substancias que possibilitem os mesmos ou melhores resultados. Desta forma, o uso dos metabólitos secundários das plantas vem se tornando uma alternativa viável, por se tratar de uma fonte de compostos que podem agir contra esses microrganismos (FARR et. al., 2001).

As ações para se produzir a resistência antimicrobiana variam de acordo com o micróbio e o medicamento. Dependendo da concentração, a presença do fármaco pode induzir a resistência ao medicamento, também podendo gerar resistência a outros antibióticos. Existe também a possibilidade da combinação do medicamento e do micróbio ser construtiva, fazendo com que a resistência persista com a presença ou não do medicamento microrganismos (FARR et. al., 2001).

A boca é um dos ambientes do corpo mais exposto a diferentes microrganismos (mais de 350 espécies) devido a diferentes fatores, como a constante oferta de nutrientes e carboidratos, além da mudança de pH. Quando essas espécies estão equilibradas com o sistema imunológico do hospedeiro em questão, ajudam a prevenir diferentes tipos de doença (BARBIERI et. al., 2014).

Os microrganismos devem ser cultivados no meio de cultura (material nutriente), favorecendo o seu crescimento. Em relação as bactérias, a escolha do meio de cultivo se baseiam na tentativa da aproximação do seu habitat natural. Já em relação aos fungos, como eles não possuem a capacidade de produzir o seu próprio alimento, muitos podem crescer em misturas simples contendo açúcar, uma fonte de nitrogênio inorgânico ou orgânico, e alguns minerais (PELCZAR et. al., 1997).

2.8.1 *Staphylococcus aureus*

A bactéria Staphylococcus *aureus* é um microrganismo Gram-positivo, que possui forma de esfera, podendo crescer de maneira aeróbica e anaeróbica, em temperaturas de 18°C a 40°C. No que diz respeito as patologias associadas a mesma, devido principalmente ao fato de estar presente na flora humana normal, bem como em regiões hospitalares, o acesso a corrente sanguínea pode desencadear em infecções graves, podendo-se destacar as infecções cutâneas, sendo que normalmente não causa infecção em uma pele saudável, pneumonia e infecções ósseas. Além disso, A *Staphylococcus aureus* pode produzir diferentes toxinas, dentre elas as enterotoxinas estafilocócicas, sendo essas responsáveis por intoxicações alimentares (TAYLOR, T, A., UNAKAL, C, G., 2019; HORVÁTH et. al., 2019)

2.8.2 *Staphylococcus epidermidis*

A bactéria *S. epidermidis* é uma das espécies mais encontradas na pele humana, sendo também uma das principais responsáveis por infecções, tendo como característica a sua natureza crônica. Esse microrganismo ocupa o primeiro lugar entre os causadores de infecções nosocomiais, sendo geralmente adquiridas em pacientes predispostos submetidos a cirurgia ou que possuem algum comprometimento imunológico (OTTO, 2014; OTTO, 2009).

As infecções por *S. epidermidis* raramente evoluem para doenças que podem causar riscos a vida. Em contrapartida, o fato de ser extremamente difícil de se tratar, gera dificuldades a saúde pública. Isso porque a presença de genes específicos gera resistência a antibióticos (OTTO, 2009).

2.8.3 *Bacillus subtilis*

Sendo uma das bactérias Gram-positivas mais estudadas, a *Bacillus subtilis*, também conhecida como “habitante do solo”, tem como habitat natural o solo, podendo também habitar em locais onde os esporos se acumulam de forma a encontrar condições adequadas para germinação e proliferação. A mesma pode isolada em diferentes ambientes (terrestre e aquático), pois pode se adaptar a diferentes ambientes na biosfera (EARL, A.M.; LOSICK, P.; KOLTER, R., 2008; EARL, A.M.; LOSICK, P.; KOLTER, R., 2007; FILHO, R. L.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C., 2010).

Esse microrganismo tem sido utilizado comercialmente para biocontrole de enfermidades de plantas, além de aumentar a produtividade de culturas (FILHO, R. L.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C., 2010).

2.8.4 *Bacillus cereus*

Amplamente distribuída pelo ambiente, *Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positiva que existe como formadora de esporos e célula vegetativa ao colonizar o corpo humano. Desprovido de atividade metabólica, o esporo do *B. cereus* é refratário a condições ambientais extremas, como altas e baixas temperaturas, além da radiação, sendo também considerado como agente infeccioso (BOTTONE, E, J. 2010).

2.8.5 *Escherichia coli*

Se trata de uma bactéria do gênero *Escherichia* que contém principalmente bacilos Gram-negativos, sendo um anaeróbio predominante da flora colônica humana. A mesma coloniza o trato gastrointestinal infantil em questão de horas, obtendo, e dando também ao hospedeiro, benefícios.

Geralmente permanece inofensiva confiada ao lúmen intestinal, porém, quando o hospedeiro se encontra debilitado ou quando essa barreira intestinal é violada, podem causar infecções. Infecções devido a *Escherichia coli* patogênica podem se limitar a superfícies mucosas ou disseminar por todo o corpo. Essas infecções podem gerar três síndromes clínicas: infecção do trato urinário, sepse e infecção entérica. (NATARO, J, P. KAPER, J, B. 1998).

2.8.6 *Pseudomonas aeruginosa*

É uma bactéria que tem a possibilidade de crescer tanto em pântanos e ambientes marinhos, quanto em plantas e tecidos animais, sendo uma grande parte das infecções registradas provenientes de esgotos e outros reservatórios. O surgimento da *P. aeruginosa* como causadora de doenças pode ser consequência da forte resistência a antibióticos e até mesmo desinfetantes, na tentativa de eliminar outras bactérias. No período de 1980 a 1990, a *Pseudomonas aeruginosa* permaneceu como segunda mais frequente bactéria Gram-negativa, causando infecções em pacientes hospitalizados (STOVER et. al., 2000; CAMPA, M. BERDINELLI, M. FRIEDMAN, H., 1993).

A *P. aeruginosa* é uma fonte significativa de bactérias na corrente sanguínea em pacientes que foram vítimas de queimaduras e infecções no trato urinário, sendo também uma das causas de morbimortalidade em pacientes com fibrose cística (CAMPA, M. BERDINELLI, M. FRIEDMAN, H., 1993).

2.8.7 *Salmonella choleraesuis*

As *S. Choleraesuis* são organismos importantes tanto em seres humanos como em animais, podendo a Salmonella se destacar as duas espécies do gênero existente: S. entérica e S. bongori. Algumas dessas bactérias se adaptam facilmente aos seres humanos, enquanto outras tem a possibilidade de infectar o hospedeiro. No que diz respeito as infecções, as mesmas podem se invasivas, sendo um dos organismos mais comuns para infecções endovasculares e aneurismas. Além disso, podem causar paratifoide. A resistência alguns antibióticos, como os de fluoroquinina, vem se tornando um motivo de preocupação (CHIU et. al., 2005).

2.8.8 Cândida

O gênero *Cândida* é um dos mais frequentes em ocorrência de infecções fungicas humanas, contendo mais de 150 espécies heterogêneas, sendo apenas uma pequena parte responsável pela candidose humana. Devido ao fato desses fungos não conseguirem se desenvolver em temperaturas que excedem 37°C, os mesmos se tornam patógenos promissores (SILVA et. al., 2012).

2.8.8.1 *Cândida albicans*

Trata-se de uma espécie polimórfica, sendo também conhecidas como germes tubo positivo. É um fungo membro da microbiota saudável, não constituindo sintomas quando coloniza o trato gastrointestinal, reprodutivo, a cavidade oral e a pele da maioria dos seres humanos, ou seja, em indivíduos com sistema imunológico saudável, se torna inofensivo. Em contrapartida, quando ocorrem alterações na microbiota do hospedeiro, o crescimento da *C. albicans* se torna possível, podendo desencadear infecções, como candidíase, levedura vaginal e assaduras (SILVA et. al., 2012; NOBILE, C, J., 2015)

2.8.8.2 *Cândida glabrata*

Diferentemente da *albicans, a glabrata* não é polimórfica, de modo que a mesma só cresce como blastoconídeos. Forma colônias de coloração creme, assimilando apenas glicose e trealose, sendo a segunda espécie mais comum da *cândida* na corrente sanguínea. As infecções relacionadas a este fungo são comumente encontradas em idosos e diabéticos, além de ser um agente causador das infecções do trato urinário (SILVA et. al., 2012; KUMAR et. al., 2019).

2.9 QUIMIOMETRIA

A quimiometria se trata de uma área que busca obter o máximo de informações relevantes sobre o processo, tendo o auxílio de planejamentos experimentais para minimizar custos e tempo, aumentando as análises e a confiabilidade dos resultados adquiridos (FERREIRA, 2015; RODRIGUES E LEMMA, 2009).

Um dos métodos amplamente utilizados para se otimizar o processo de análise do sistema avaliado, é o planejamento experimental, que consiste em projetar um experimento para que, no final do processo, ele consiga fornecer as informações que se deseja. Para tal, é necessário a integração de três fatores: processo, estatística e bom senso. Esses três fatores englobam tanto os responsáveis pela montagem do planejamento, quanto os que vão pôr em prática os que foi planejado (NETO, B. R., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E., 2010; FERREIRA, 2015).

O planejamento experimental vem sendo utilizado também para melhorar as metodologias analíticas, possibilitando que análises, como as realizadas no HPLC, por exemplo, tenham uma melhor performance, de modo que os picos obtidos após o processo de separação obtenham melhores resoluções, minimizando o uso de reagentes e garantindo uma maior confiabilidade dos resultados (NETO, B. R., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E., 2010; FERREIRA, M.M.C., 2015).

2.9.1 Análise de componentes principais - PCA

A análise de Componentes Principais (PCA) se trata de um método para se trabalhar com projeções de dados multivariados com a menor dimensão espacial possível, porém, sem que ocorra algum tipo de modificação nas amostras trabalhadas. A ideia do uso de uma dimensão menor é separar as informações mais relevantes do processo e expor de forma mais clara ao analista, sendo possível então analisar os dados e fazer as interpretações pertinentes acerca dos mesmos. Além disso, se torna possível verificar as relações existentes entre as amostras e consequentemente as diferenças entre elas (FERREIRA, M.M.C., 2015.

2.9.2 Análise de agrupamentos por métodos hierárquicos – HCA

A análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) diz respeito a um método de análise e reconhecimento de padrões, que podem ser ditos como naturais, nas amostras trabalhadas a partir do perfil multivariado. Assim como na Análise de Componentes Principais, a HCA permite reduzir as dimensões dos dados

obtidos, podendo assim inferir quais as semelhanças e diferenças no conjunto de dados, sendo um dos métodos mais práticos e também eficiente para se trabalhar com inúmeras informações, reunindo-as de forma que pertençam a um mesmo grupo. Essa reunião é possível principalmente por ser tratar de uma técnica aglomerativa, na qual cada amostra representa um grupo (FERREIRA, M.M.C., 2015).

3 JUSTIFICATIVA

Estudos comprovam que a pimenta rosa possui propriedades benéficas a saúde, devido principalmente a presença dos compostos bioativos. Dessa forma, quatro fatores foram fundamentais para o estudo mais detalhado da pimenta rosa.

O primeiro fator a ser considerado se refere a dados obtidos a partir da Organização Pan-Americana de Saúde, a qual revela que a resistência aos antibióticos tem sido uma das maiores ameaças a nível global (OPAS, 2017). Desta forma, a busca por novas fontes de substâncias que gerem os mesmos ou melhores resultados é imprescindível. O segundo ponto fundamental para o estudo foi o fato de apesar de haverem diversos estudos sobre a pimenta rosa, no geral, as informações trazidas são limitadas a poucas quantidades de compostos ou de microrganismos. Ou seja, é necessário um estudo mais detalhado, principalmente aqui no Nordeste, que esse fruto é encontrado em diversas regiões.

O terceiro fator, que corrobora com os demais para o estudo da pimenta rosa, é que como poucos conhecem o fruto, ou até conhecem, mas não conhecem as suas propriedades ou a sua abundância na região, esse fruto é vendido por preços que variam de 120 a 250 reais o quilo, sendo que, considerando a variedade desse fruto na região, o preço reflete a falta de conhecimento da população. E o último fator é o pouco conhecimento sobre o valor nutricional do fruto, porque poucos conhecem as ações benéficas que esse fruto pode trazer. Pensando em pessoas que vivem em condições de vulnerabilidade social, que, entre outros, não possuem condições financeiras para comprar medicamentos a todo momento, poderiam utilizar dessas informações a seu favor.

Desta forma, considerando todos as pontos citados, este trabalho consistiu em determinar o teor de bioativos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides), atividade antioxidante e a atividade biológica nas amostras de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodo (HPLC-DAD), espectrofotometria UV-Vis e a microdiluição em caldo.

4 OBJETIVOS

GERAL

Determinar o teor de bioativos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides), atividade antioxidante e a atividade biológica nas amostras de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), adquiridas na cidade de Salvador-Ba e regiões próximas, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodo (HPLC-DAD), espectrofotometria UV-Vis e a microdiluição em caldo.

ESPECÍFICOS

- Analisar o teor de fenólicos totais (TPC) e flavonoides totais (TFC), empregando métodos oficiais, através da espectrofotometria UV-Vis;

- Avaliar a atividade antioxidante em extrato de pimenta rosa empregando método oficial (DPPH);

- Estudar a atividade biológicas do extrato de pimenta rosa frente a fungos e bactérias, utilizando a técnica de microdiluição em caldo;

- Utilizar ferramentas quimiométricas para compreensão dos resultados adquiridos.

5 METODOLOGIA

5.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Equipamentos

- Centrífuga: NT 810 (Nova tecnica, Brasil);
- Cromatógrafo (CLAE) (Shimadzu SIL 20 A, Japão);
- Estufa incubadora (Quimis);
- Fluxo unidirecional vertical (FUV 12 – Veco);
- Liofilizador (Liotop – K202, Brasil);

- Mesa agitadora (QUIMIS – Q 225-M, Brasil);
- Purificador de água (Millipore, Bedford, EUA)

Reagentes

- Metanol e Ácido Acético Glacial grau HPLC (J.T.Baker, EUA);
- Ácido clorídrico (Merck, Alemanha);
- Padrões analíticos: ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido cumárico, ácido transcinâmico, ácido vanílico, ácido ferúlico, catequina, quercetina, rutina e kempferol. (Sigma Chemical Company St. Louis, EUA);
- Dimetilsulfóxido P.A – (Vetec).

5.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Foram adquiridas amostras de pimenta rosa (aproximadamente 500 g) em diferentes pontos de Salvador-Ba e regiões próximas, como indicado na tabela 1 e figura 5, visando estabelecer sua capacidade antimicrobiana e antioxidante, avaliando o conteúdo de substâncias como ácidos fenólicos e polifenóis em toda a fruta.

Tabela 1. Amostras de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) coletadas em diferentes pontos de Salvador-BA e regiões próximas.

Pontos de coleta	**Indicadores**	**Coleta**
Arembepe	P_A	Orgânica
Itapuã	P_I	Mercado de produtos naturais.
Mangabeira	P_M	Orgânica
Nazaré	P_N	Orgânica
Cabula	P_C	Orgânica

Figura 5. Localização das regiões de onde foram adquiridas as amostras.

Fonte: Google Maps

As amostras in natura foram higienizadas com água corrente e água ultra pura. Depois foram secas a temperatura ambiente, sendo então fracionadas e submetidas ao congelamento e liofilização, utilizando um liofilizador (K202, Liotop, Brasil) durante 48 horas. Posteriormente as amostras foram moídas em liquidificador para redução do tamanho e então peneiradas em peneira de 100 mesh. A estabilidade das espécies nas amostras tem que ser cuidadosamente considerada para evitar sua alteração durante manipulação e estocagem por longo tempo. A amostragem padrão foi realizada empregando recipientes plásticos de polietileno devidamente descontaminados por solução de ácido nítrico e água deionizada. As amostras liofilizadas foram preservadas que em dessecador.

No que diz respeito ao processo de extração (otimizado), o procedimento para a execução do mesmo consiste em: agitação, filtração e secagem do solvente (metanol) em rotaevaporador. Foram pesados, em uma balança analítica (Sartorius, ALC / 210.4, EUA), 0,5 g da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) liofilizada, sendo então adicionados 30 mL do solvente (metanol) e uma gota de ácido clorídrico concentrado. As amostras foram submetidas à agitação por 30 minutos, em uma mesa agitadora (0225M, Quimis, Brasil), sendo o solvente posteriormente evaporado em rotaevaporador (IKA RV 10, Brasil) nas condições de 60ºC e 15 RPM, sendo o material resultante

ressuspenso em 1,5 mL de metanol, filtrado e diluído antes das determinações. Os procedimentos foram realizados em triplicata para todas as etapas.

5.3 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As substâncias fenólicas foram avaliadas utilizando uma coluna de fase reversa (RP) utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC (modelo LC - 20AD rominence, Shimadzu Scientific Instruments, Japão), equipado com quatro bombas de alta pressão (modelo LC - 20AD, Shimadzu, Japão), detectores de arranjo de diodos (DAD, modelo SPD - 20A, Shimadzu, Japão) dispostos em série, interface (modelo CBM-20A, Shimadzu, Japão). As separações foram realizadas com uma coluna “Lichorspher” RP C_{18} 100 (250mm x4,6 mm, 5,0 µm de diâmetro da partícula). As variáveis instrumentais otimizadas foram:

- Vazão: 1 $mL.min^{-1}$;
- Temperatura: 40°C;
- Volume de injeção: 20µL.

Em relação a fase móvel, solventes utilizados foram:

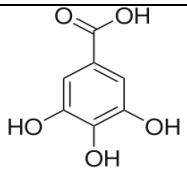
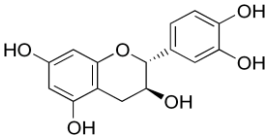
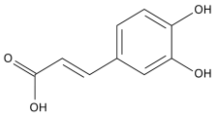
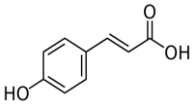
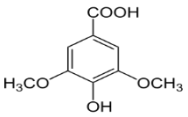
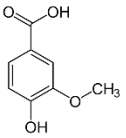
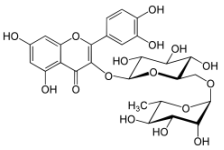
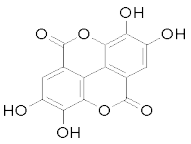
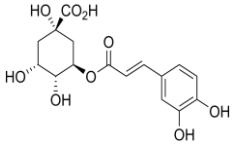
- A: ácido acético (1% v/v)
- B: metanol. O gradiente empregado foi:

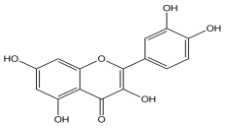
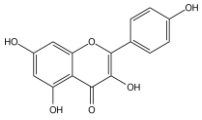
No que diz respeito ao gradiente selecionado para a separação:

- 0 - 5 min 100% A;
- 5 - 10 min 70% A;
- 10 -15 min 10% A;
- 15 - 17 min 70% A;
- 17 – 20 min 100% A.

Os comprimentos de onda dos diferentes analitos avaliados, bem como o tempo de retenção de cada um, foram dispostos na tabela 2, sendo a identificação e análises qualitativas realizadas comparação com os padrões.

Tabela 2. Comprimento de onda, tempo de retenção e estrutura das substâncias bioativas analisadas.

Substância bioativa	Comprimento de onda (nm)	Tempo de retenção (min)	Estrutura
Ácido Gálico	280	7,043	
Catequina	280	9,857	
Ácido Cafeico	330	11,260	
Ácido Cumário	310	11,348	
Ácido Siríngico	272	11,600	
Ácido Vanílico	260	12,466	
Rutina	360	13,032	
Ácido Elágico	260	13,420	
Ácido Clorogênico	330	13,600	

Quercetina	360	14,793	
Kaempferol	360	15,730	

O método desenvolvido foi previamente validado, sendo que os valores encontrados para: limites de detecção (LD); limites de quantificação (LQ), valores dos coeficientes de determinação (R^2) para as curvas dos diversos analitos, assim como os respectivos tempos de retenção e comprimentos de onda estão na tabela 3. A exatidão do método foi testada com testes de adição e recuperação dos padrões em três faixas de concentrações diferentes (1 a 9 $mg.L^{-1}$). Os resultados da destes testes variaram de 80% a 120%. A precisão intra-dia e inter-dia foi estabelecida pela repetição por três vezes no mesmo dia e em dias diferentes das determinações com uma amostra verde e outra madura. Os valores obtidos para o desvio padrão relativo (RSD) das medidas foi menor que 20%, o que demonstra que o método é preciso (SANTOS et. al., 2017).

Tabela 3. Valores obtidos após validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência.

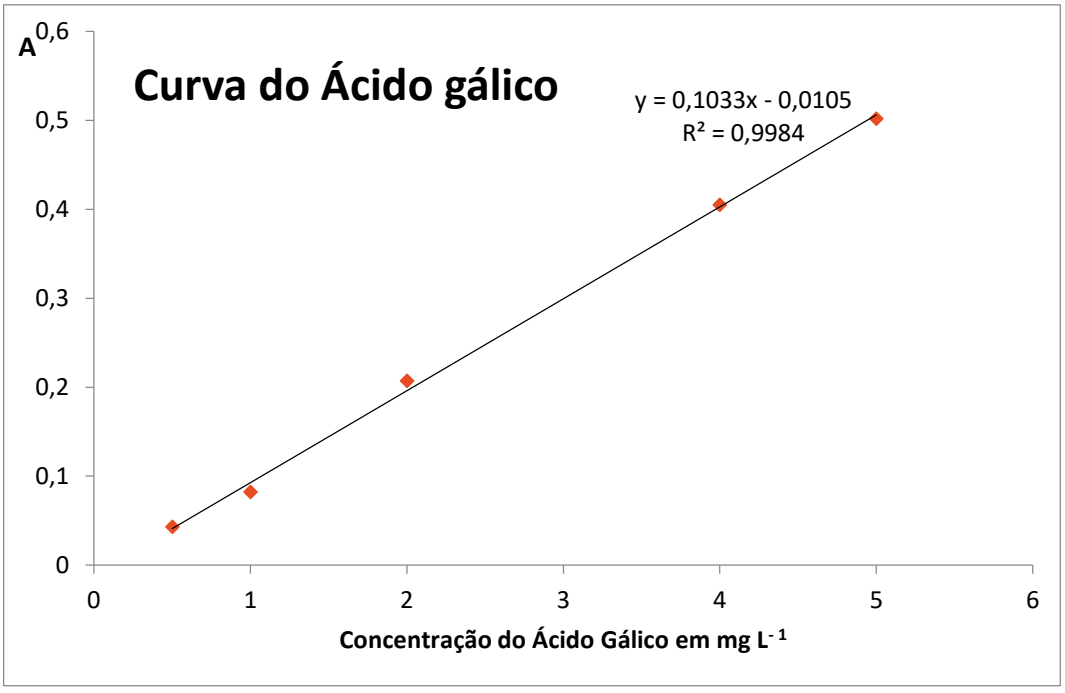
Substâncias bioativas	**Curva analítica**	**R^2**	**LD (mg L^{-1})**	**LQ (mg L^{-1})**
Ácido gálico	y = 15575x - 31509	0,995	1,03	3,12
Catequina	y = 3478x + 1184	0,991	0,59	1,78
Ácido clorogênico	y = 2722x + 1427	0,991	1,04	3,14
Ácido cafeico	y = 28525x - 778,9	0,998	0,28	0,83
Ácido cumárico	y = 33905x - 32651	0,999	0,39	1,20
Ácido siríngico	y = 21580x - 6670	0,993	1,00	3,00
Ácido vanílico	y = 8700x - 7784	0,996	0,91	2,75
Rutina	y = 2740x - 647,8	0,994	0,78	2,37
Ácido elágico	y = 5886x + 38,20	0,999	0,26	0,80
Quercetina	y = 13268x - 5478	0,998	0,48	1,45

Kaempferol	y = 11147x - 1884	0,994	0,63	1,91

5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS – TPC

O teor de polifenóis totais (TPC) foi determinado pelo método de Folin–Ciocalteau, utilizando o reagente de Folin–Denis, com adaptações. Foi transferida uma alíquota de 20 µL do extrato para um balão de 5 mL. Adicionou-se 500 µL do reagente de Folin-Denis, 400 µL de carbonato de sódio 7,5% (m/v), sendo então aferido com água ultra-pura. Após 30 minutos foi realizada a leitura da absorbância a 760 nm, em espectrofotômetro UV-Vis. A curva de calibração empregou ácido gálico nas concentrações de 0,5 a 6 mg L^{-1} e os resultados foram dados em equivalentes de ácido gálico por 100g (EAG .100g), como indicado no gráfico 1.

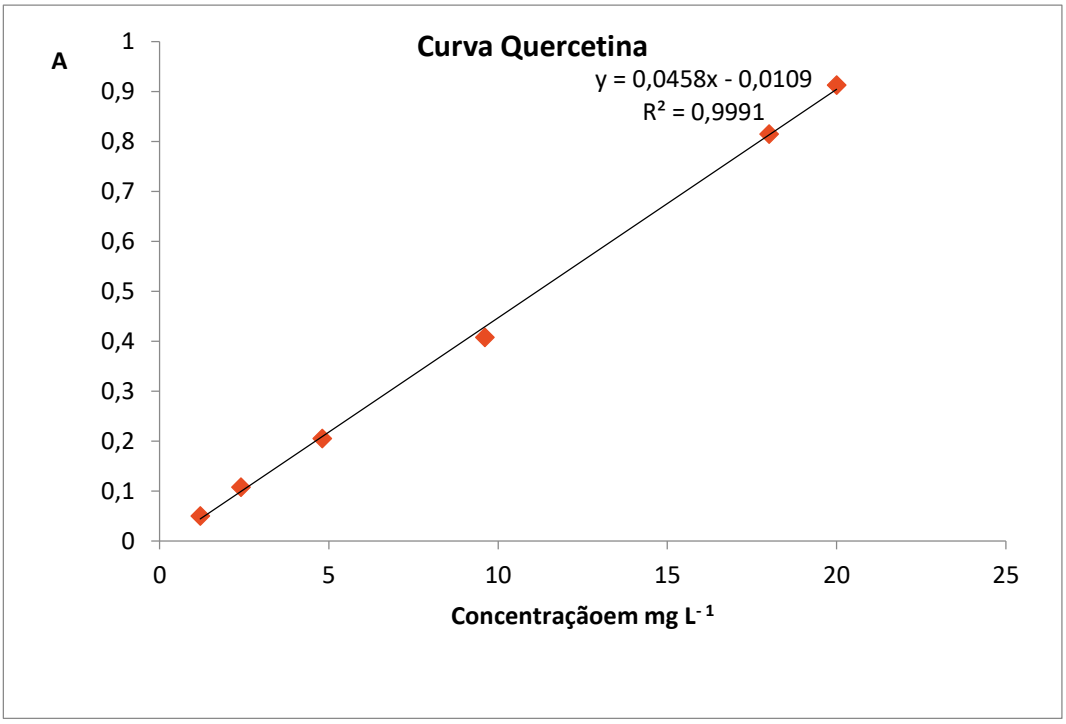
Gráfico 1. Curva de calibração do Ácido Gálico para determinação do Teor de Fenólicos Totais (TPC).



5.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS – TFC

O teor total de flavonoides (TFC) foi determinado a partir da utilização do cloreto de alumínio. 100 µL do extrato metanólico de cada amostra foram utilizados em triplicado, transferidos para frascos volumétricos de 5 mL, 3,0 mL de cloreto de alumínio anidro a 2,0% (p/v em metanol), sendo aferido com metanol. Considerando a cinética da reação, após 30 minutos as leituras foram realizadas a 415 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis. A quercetina foi utilizada como padrão para a construção de uma curva de calibração (0,5-20 mg L^{-1}) e os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina por 100 g de peso seco (QE 100 g^{-1} DW), como indicado no gráfico 2.

Gráfico 2. Curva de calibração da Quercetina para determinação do Teor de Flavonoides Totais (TFC)



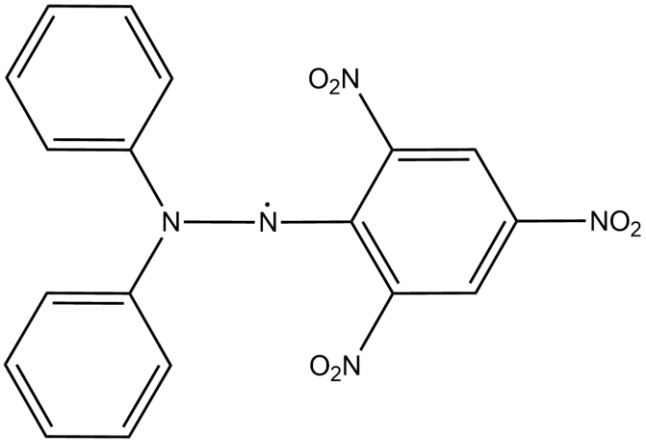
5.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELA CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH

Um dos principais métodos para determinar atividade antioxidante em extratos de frutas é o DPPH, que consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH),

que possui o radical livre (figura 6), e apresenta coloração púrpura. O ensaio então se baseia na medida da capacidade da substância, no caso em questão, da substância fenólica, sequestrar esse radical, reduzindo à hidrazina (figura 7). Quando o átomo de hidrogênio é doado e forma a hidrazina, a coloração muda de púrpura para amarelo bem claro, e pode ser monitorada pelo decréscimo da absorbância.

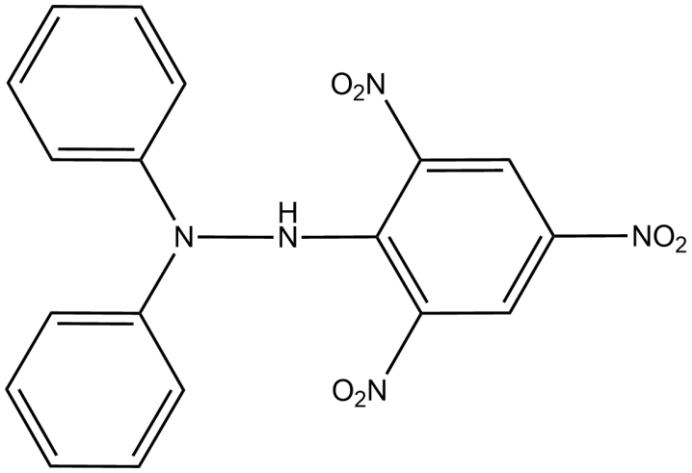
Para determinação da atividade antioxidante foi adicionado a um balão de 5 mL,100 µL do extrato, 3,9 mL do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), sendo então aferido com água ultra-pura. Após 20 minutos (avaliado através do teste de cinética) foi realizada a leitura da absorbância á 515 nm, em espectrofotômetro UV-Vis. Para a determinação quantitativa foi empregada a curva de calibração com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (gráfico 3).

Figura 6. DPPH radicalar



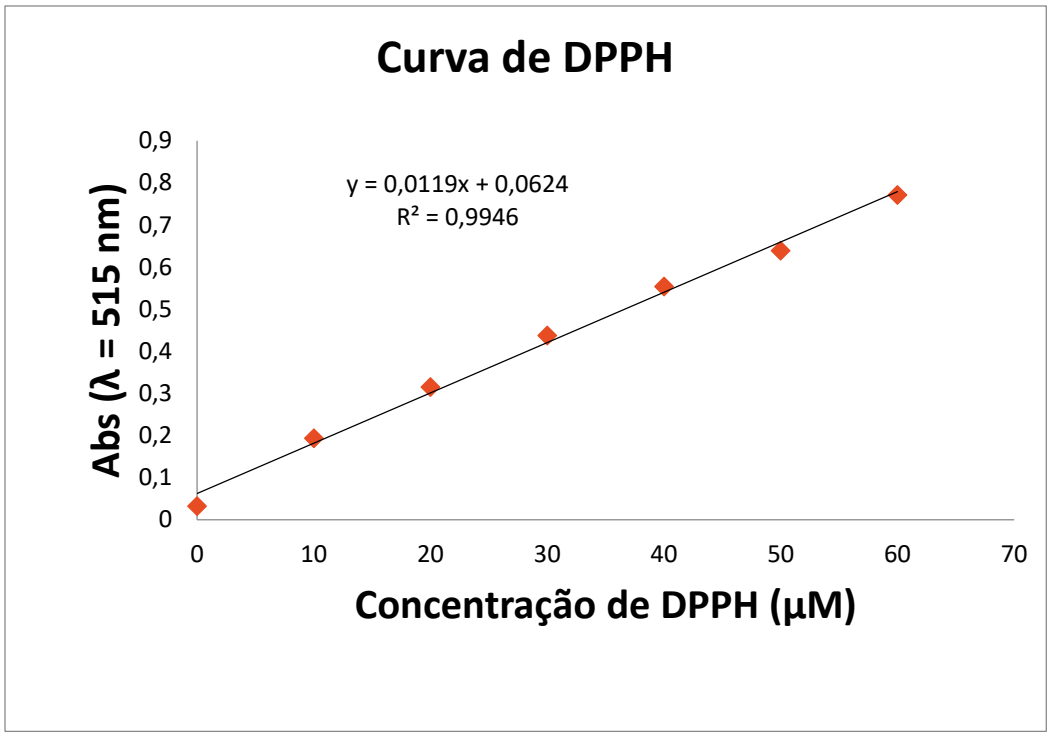
Fonte: Acervo pessoal

Figura 7. DPPH não radicalar



Fonte: Acervo pessoal

Gráfico 3. Curva de DPPH• para determinação da capacidade antioxidante



5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios antimicrobianos foram realizados seguindo o método da microdiluição em caldo, segundo as normas do Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI, 2015). Os extratos e frações foram testados frente a nove microrganismos (tabela 4) a fim de determinar os valores de concentração inibitória mínima (MIC) e microbicida mínima (CMM):

Tabela 4. Microrganismos testados com os extratos de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas	Fungos
Bacillus subtilis (ATCC 6633)	*Escherichia coli* (ATCC 94863)	*Candida albicans* (ATCC 18804)
Bacillus cereus (Nº CCT 0096)	*Pseudomonas aeruginosa* (No CCT 0090; ATCC 27853);	*Candida glabrata* (CCT 0728)
Staphylococcus aureus (ATCC 6538)	*Salmonela choleraesuis* (ATCC 14028)	---
Staphylococcus epidermidis (Nº CCT 1488; ATCC 12228)	---	---

As amostras de extratos foram solubilizadas em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 20% em água (figura 8), para preparo das soluções estoques na concentração de 2000 µg mL^{-1} para extratos. Como controles positivos, foram utilizados cloranfenicol e benzi-penicilina (para bactérias Gram-positivas), geramicina (para bactérias Gram-negativas) e ciclopirox olamina (para fungos). Para a determinação da concentração inibitória mínima, os meios de cultivo utilizados foram da Difco, sendo o meio de cultivo para bactérias constituído de: caldo nutriente e água destilada, e para os fungos: glicose, extrato de levedura, extrato de malte e água destilada.

São adicionados 100µL do meio de cultivo em todos os poços da placa de Elisa (figura 9) com o auxílio da micropipeta multicanal. Em seguida, na primeira fileira (A) são adicionados 100µL da amostra em triplicata, 100µL do controle positivo, antibiótico ou antifúngico, 100µL da solução de DMSO 20%, controle negativo, obtendo assim um volume de 200µL na primeira fileira da placa. Posteriormente, é realizada a diluição seriada, na qual 100µL da primeira fileira são transferidos, após homogeneização, para a fileira seguinte, sendo o material resultante da última fileira descartado.

Após a diluição seriada, é feito o preparo do inóculo no qual o microrganismo é adicionado a um tubo de ensaio com água autoclavada, e a sua

turbidez é comparada com a da escala 0.5 de McFarland, que consiste na concentração de aproximadamente 1,5 10^8 unidades formadoras de colônia (ufc mL^{-1}) (OLIVEIRA et. al., 2006)

Figura 8. Extratos de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) solubilizados em dimetilsulfóxido a 20% em água.

Fonte: Acervo pessoal

Figura 9. Placa de Elisa.

Fonte: Acervo pessoal

1 a 9: amostras em triplicata; 10: controle positivo; 11: DMSO 20%; 12: meio de cultivo + microrganismo + controle -.

100µL do inóculo para cada 10 mL do meio de cultivo é preparado. 100µL dessa solução são adicionados em todos os poços da placa de 96 poços. Logo após, a placa é fechada, vedada e colocada para incubação por 24 horas a 36ºC para bactérias e 72 horas a 27ºC para os fungos.

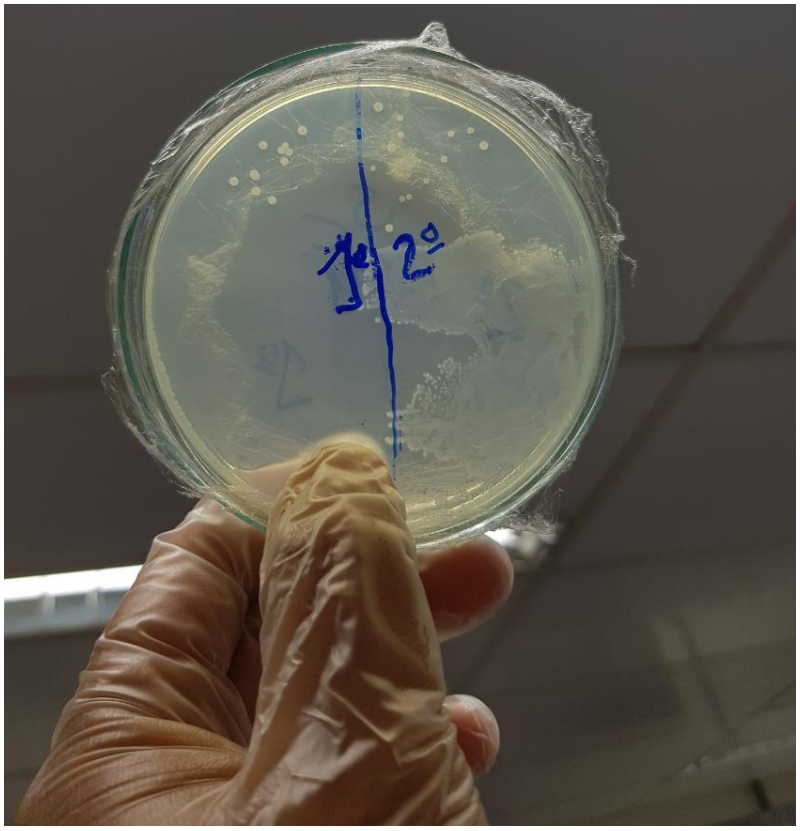
Após o tempo de incubação, as placas são lidas visualmente, sendo observada a presença ou não da turbidez nos poços (figura 10). Os poços que não apresentarem turbidez indicam que ocorreu inibição do crescimento do microrganismo testado. São então retirados 10µL desses poços (que apresentaram inibição) e transferidos para placas de Petri com meios de cultivo sólidos. O meio de cultivo sólido é preparado da mesma forma que o meio líquido, a diferença está na adição de ágar nutriente.

As placas de Petri são posteriormente vedadas e colocadas para incubação a temperatura e tempo adequados. A leitura é realizada observando o crescimento ou não do microrganismo (figura 11), resultando na concentração microbicida mínima. A ausência de crescimento indica que a amostra não só inibiu o microrganismo como também matou.

Figura 10. Análise da turbidez após diluição seriada.

Fonte: Acervo pessoal

Figura 11. Análise da concentração mínima bactericida.



Fonte: Acervo pessoal

6 RESULTADOS

6.1 ESPECTROFOTOMETRIA

As análises por espectrofotometria foram realizadas em espectrofotômetro (SP-22, Biospectro, Brasil), sendo obtidos os resultados indicados na tabela 5, utilizando o método Folin-Ciocalteau com modificações, que se trata de um método relativamente simples, o qual se baseia na interação entre o reagente em questão e as substâncias responsáveis pela redução (PIRES et. al., 2017).

Tabela 5. Concentração dadas em: TPC (mg 100 g^{-1} EAG); TFC (mg 100 g^{-1} EQ); DPPH (µM TE 100g^{-1} de amostra seca) (medida ± desvio padrão, n = 3)

	TPC	TFC	DPPH (10^{-3})
P_M	517,08^{a} ± 5,18	100,97^{d} ± 2,75	7,10^{a} ± 0,25
P_C	372,26^{b} ± 6,20	240,53^{c} ± 2,50	1,58^{b} ± 0,25
P_I	274,37^{d} ± 10,86	201,06^{c} ± 2,78	1,94^{b} ± 0,42
P_A	328,37^{c} ± 7,05	239,42^{b} ± 9,78	2,06^{b} ± 0,06
P_N	367,87^{b} ± 1,67	283,35^{a} ± 4,32	1,70^{b} ± 0,59

P_M: Pimenta Mangabeira; P_C: Pimenta Cabula; P_I: Pimenta Itapuã; P_A: Pimenta Arembepe; P_N: Pimenta Nazaré.
A média de cada composto seguido por pelo menos uma letra da coluna não difere em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Entendendo que quanto maior for a concentração das substancias fenólicas no extrato, mais intensa será a coloração azul, indicando que os ácidos participantes da reação sofreram redução, e por sua vez quanto mais intensa for essa cor, maior a concentração de compostos bioativos, os testes realizados para determinação de ácidos fenólicos totais (TPC) indicaram a presença de grupos fenólicos no extrato da pimenta rosa.

Para avaliação do teor dos compostos fenólicos presentes, buscou-se realizar a análise das amostras que foram adquiridas em diferentes condições. As amostras de Mangabeira foram coletadas no quintal de uma residência, sendo a mesmas localizada em região distante a rodovias e estradas. Já as amostras das regiões de Arembepe, Cabula e Nazaré foram coletadas em regiões as quais a aroeira estava em beira de estrada. Por fim, as amostras de Itapuã foram adquiridas em uma feira de produtos naturais.

Sabe-se que os metabólitos secundários são frutos de uma ligação entre a planta e o ambiente que a mesma está inserida, de modo que a síntese desses compostos pode ser afetada pelas condições ambientais. Por esse motivo, já era esperado que as concentrações desses compostos não fossem semelhantes, no que diz respeito as amostras coletadas diretamente da aroeira e as coletadas na feira de produtos naturais, justamente por não se saber se as coletadas na feira passaram por algum processo antes de serem colocadas à venda. As concentrações que variaram entre 274,37 mg 100g^{-1} e 571,08 mg 100g^{-1}, sendo a primeira da região de Itapuã e a segunda de Mangabeira (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Como já citado, a exposição a estradas e rodovias, que constantemente contém um fluxo intenso de carros, liberando poluentes gasosos e particulados como dióxido de carbono (CO_2), monóxido de carbono (CO), e óxidos de nitrogênio (NO_x), podem provocar alterações bioquímicas e estruturais nas plantas. Desta forma, a elevada concentração de compostos fenólicos na amostra de Mangabeira, bem como a baixa concentração nas demais amostras podem ser um reflexo desta exposição (ALVES, E. S., TRESMONDI, F., LONGUI, E. L, 2008).

Melo e Araújo (2011), em estudo realizado com a manga (*Mangifera indica* L.), fruta pertencente à família *Anacardiacea* (semelhante a pimenta rosa), determinaram, através do método de Folin-Ciocalteau, o teor de fenólicos totais na mesma. As concentrações encontradas variaram entre 126,08 mg $100g^{-1}$ e 279,54 mg $100g^{-1}$, concentrações essas inferiores as encontradas na presente pesquisa. Desta forma, tomando como base o teor de fenólicos totais, a pimenta rosa é uma boa fonte de substâncias bioativas se comparada com a manga, que é uma fruta tropical de grande importância econômica.

Ainda em relação ao teor de fenólicos totais, a concentração do caju (*Anacardium occidentale*), também pertencente à família *Anacardiacea,* determinada através do estudo realizado por Vieira e colaboradores (2010), apresentou concentração de 201,61 mg $100g^{-1}$, sendo este resultado mais próximo ao encontrado na pimenta rosa, indicando assim que as concentrações do conteúdo de compostos bioativos podem ser alterados a partir da mudança da espécie, apesar de pertencerem a mesma família. Em estudo realizado por Freire e colaboradores (2013), para análise do teor de fenólicos totais, através do extrato metanólico, utilizando o método de Folin-Denis também com o caju, o resultado foi encontrado no valor de 248 mg $100g^{-1}$, podendo-se inferir então que a pimenta rosa é uma fonte de bioativos fenólicos mais significativa que o fruto citado.

No que se refere ao teor de flavonoides totais (TFC), que se baseia na técnica na qual o alumínio do reagente e o flavonoide contido no extrato formam um complexo de coloração amarelada, sendo possível então a análise, o resultado obtido indicou o oposto do mencionado na análise do teor de fenólicos totais, sendo os resultados encontrados na faixa de 100,97 mg 100^{-1} a 283,35 mg $100g^{-1}$. Isso se deu devido as concentrações desses compostos serem

menores na amostra advinda de Mangabeira que nas demais regiões. Desta forma, pode-se inferir que a alteração bioquímica dos compostos pode ocorrer de forma positiva (aumento da concentração) ou negativa (diminuição da concentração). Importante ressaltar que, embora tenha ocorrido de a amostra de Mangabeira obter o menor resultado de TFC, a amostra advinda da região de Itapuã ainda obteve um resultado inferior as demais, o que reforça o fato de a forma de cultivo ser um fator influenciador (SÁ et. al., 2012).

A partir do estudo realizado por Sauthier e colaboradores (2017), a manga, como citado anteriormente, fruto de elevada importância econômica, foi avaliada quanto ao seu teor de flavonoides totais, sendo os resultados encontrados apresentados na faixa de 194,97 mg 100^{-1} a 370,87 mg 100^{-1}. Esses resultados, se comparados ao da pimenta rosa, e considerando que ambos foram realizados em condições semelhantes, incluindo o processo de extração, indicam uma semelhança, no que diz respeito ao teor desses compostos.

Entendendo que, para que os compostos presentes na matriz sejam considerados antioxidantes, podendo assim exercer sua função biológica, é fundamental que os mesmos sejam capazes de, em baixas concentrações, agirem de forma a retardar, impedir e até prevenir o processo de oxidação mediada pelos radicais livres. Desta forma, analisando os resultados apresentados na tabela 5, pode-se verificar que as amostras que possuem maior teor de fenóis são as que apresentam maior atividade antioxidante. Este fato ocorre devido à presença dos grupos hidroxila reativos, que favorecem a reação antioxidante (DUARTE-ALMEIDA et. al., 2006).

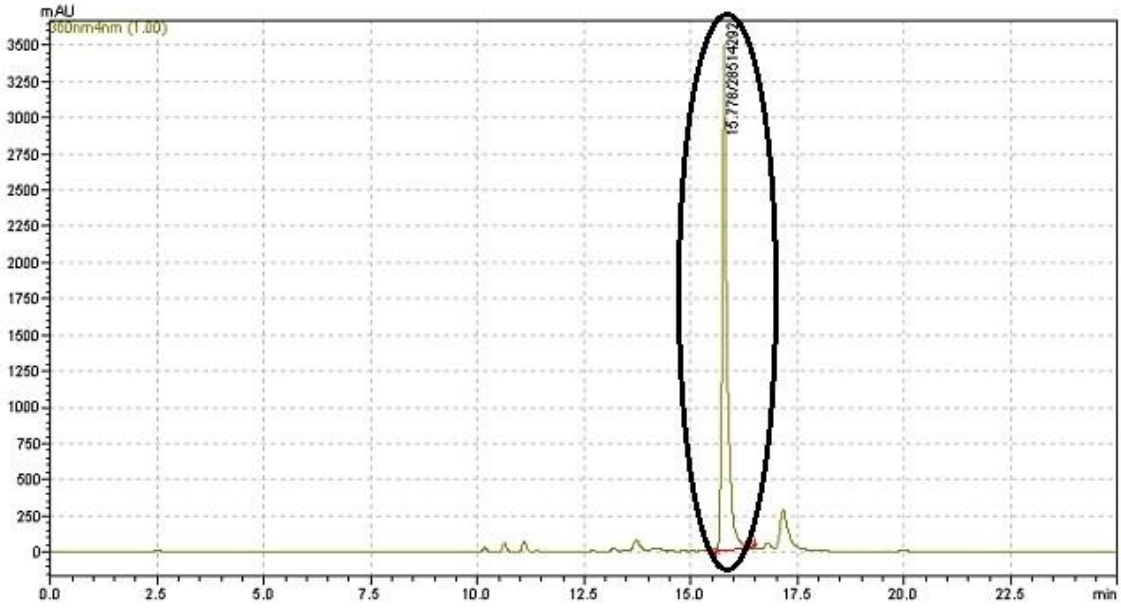
Compreendendo que as amostras de pimenta rosa das regiões do Cabula, Nazaré e Arembepe estavam localizadas próximas a estradas, sendo o oposto com a amostra de Mangabeira, esta última apresentou menor capacidade antioxidante. Apesar de possuir maior teor de TPC que as demais, nota-se que a influência do ambiente no teor de compostos bioativos é fundamental. Nesse sentido, necessita de uma concentração maior de substâncias bioativas para captura dos radicais livres.

Após a aplicação do teste de similaridade de Tukey, foi possível observar que, no nível de significância de 5%, as amostras de P_C e P_N (TPC), P_C e P_I (TFC) e P_C, P_I, P_A e P_N (DPPH) não apresentaram diferenças significantes. Aplicando o teste de correlação de Pearson, os valores encontrados: r = 0,87

(CPT x DPPH); r = - 0,66 (TPC x TFC) e r = - 0,92 (DPPH x TFC), demonstram uma correlação positiva entre o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante da DPPH, e uma correlação negativa muito forte entre a TPC e a TFC, bem como a TFC e DPPH, valores maiores que 0,561 para este teste indicam correlação significativa entre as variáveis de acordo com a tabela de valores críticos do coeficiente de Pearson.

6.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Figura 12. Cromatograma da amostra de pimenta rosa da região de Arembepe no comprimento de onda de 360nm.



Fonte: Acervo pessoal

Entendendo que o reagente de Folin-Ciocalteau não é específico para grupos fenólicos, ou seja, as demais substancias presentes no extrato podem agir como interferentes no processo de redução, se fez necessária uma análise mais detalhada para identificação dos compostos presentes no extrato da pimenta rosa, para que assim fosse possível não só identificar, como também quantificar as suas concentrações. Para tal, foi necessário utilizar o cromatógrafo líquido de alta eficiência com arranjo de diodo (HPLC-DAD) (PIRES et. al., 2017).

Para tal determinação, foi utilizada a fase móvel por gradiente. A utilização desta fase móvel se deu devido ao fato de, apesar de trabalhar com substâncias fenólicas, as quais todas possuem grupos fenóis presente em suas estruturas,

conferindo as mesmas um caráter polar, umas são mais polares que as outras. Utilizar de uma fase móvel isocrática, a qual a polaridade não é alterada no percurso da análise, significaria não contemplar a todas as substancias, ou na pior das hipóteses, aumentar as chances de uma co-eluição, gerando, por sua vez, baixas resoluções.

A partir da análise dos flavonoides presentes do extrato, quatro flavonoides foram quantificados, sendo eles: catequina, rutina quercetina e kaempferol, como indicado na tabela 6.

Tabela 6. Resultados para concentrações de flavonoides (mg $100g^{-1}$ DW) em pimenta rosa, por HPLC-DAD

	Catequina	Rutina	Quercetina	Kaempferol
P_M	$61,56^{b}$±0,37	$14,56^{d}$±0,67	$0,68^{d}$±0,02	$753,16^{d}$±15,53
P_C	$14,29^{c}$±0,01	$9,31^{b}$±0,04	$1,13^{b}$±0,03	$237,64^{d}$±1,01
P_I	$56,62^{e}$±0,41	$3,30^{c}$±0,05	$0,58^{c}$±0,01	$154,36^{c}$±0,05
P_A	$36,29^{a}$±0,13	$12,72^{a}$±0,05	$5,42^{d}$±0,11	$702,18^{a}$±13,49
P_N	$40,55^{d}$±0,85	$11,80^{b}$±0,22	$3,37^{a}$±0,02	$154,02^{b}$±0,73

P_M: Pimenta Mangabeira; P_C: Pimenta Cabula; P_I: Pimenta Itapuã; P_A: Pimenta Arembepe; P_N: Pimenta Nazaré.
A média de cada composto seguido por pelo menos uma letra da coluna não difere em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As concentrações dos flavonoides em questão se apresentaram, em mg $100g^{-1}$, na faixa de 14,29 a 61,56 para catequina, 3,3 a 14,56 para rutina, 0,58 a 5,42 para quercetina e por fim, 154,02 a 753,16 para o kaempferol. Se tratando do flavonoide que se apresenta em maior concentração em todos os extratos, o Kaempferol, como observado na figura 12, se destaca. O mesmo é geralmente encontrado em frutas e legumes, além de chás e cereais. Possui, entre os efeitos benéficos dos compostos bioativos, a capacidade de reduzir o risco de doenças crônicas, como o câncer. Dessa forma, através do estudo realizado por Chen e Chen (2013), foi possível afirmar que existe uma relação inversa entre a ingestão de kaempferol e o câncer. Essa relação é possível pois esse composto aumenta a defesa do organismo contra os radicais livres, que por sua vez podem promover o desenvolvimento desta patologia. Além disso, através do mesmo estudo, verificou-se que o kaempferol inibe o crescimento e a angiogênese das células cancerígenas.

Ainda em relação aos flavonoides, a catequina, substância que apresenta eficácia na diminuição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, em estudo realizado por Tomaino e colaboradores (2010), demonstrou que o pistache (*Pistacia vera* L.) também pertencente à família *Anacardiaceae*, possuía em sua composição a concentração de catequina equivalente a 377,5 µg/g, sendo essa concentração significativame nte menor que a obtida na pimenta rosa, indicando assim que, se comparada a essa matriz, o fruto discutido nesse trabalho é uma boa fonte de catequina. Analisando os dados da tabela 6, a concentração da substância citada foi a segunda maior em relação aos flavonoides.

Tabela 7. Resultados para concentrações de ácido fenólicos (mg $100g^{-1}$ DW) em pimenta rosa, por HPLC-DAD

	AG	ACL	AC	ApC	AS	AE	AV
P_M	$197,20^{d}$±2,93	$27,58^{e}$±0,55	$46,29^{c}$±0,41	$7,78^{d}$±0,002	$11,47^{d}$±0,08	$54,43^{d}$±0,22	$9,57^{d}$±0,57
Pc	$355,67^{a}$±7,20	$17,6^{a}$±0,59	$1,81^{c}$±0,002	$2,54^{c}$±0,01	$30,41^{a}$±0,19	$142,44^{a}$±1,88	$9,68^{d}$±0,77
P_I	$137,78^{b}$±0,43	$5,19^{c}$±0,12	$1,70^{c}$±0,02	$3,63^{e}$±0,03	$1,07^{b}$±0,02	$100,72^{b}$±0,70	$34,56^{c}$±0,86
P_A	$36,23^{c}$±4,47	$11,71^{b}$±0,12	$48,09^{b}$±0,82	$6,66^{a}$±0,01	$11,71^{c}$±0,02	$93,93^{c}$±0,47	$40,34^{b}$±0,54
P_N	$441,36^{e}$±3,27	$33,61^{d}$±0,46	$3,11^{a}$±0,02	$4,34^{b}$±0,008	$51,62^{c}$±0,03	$100,31^{b}$±0,95	$87,52^{a}$±1,23

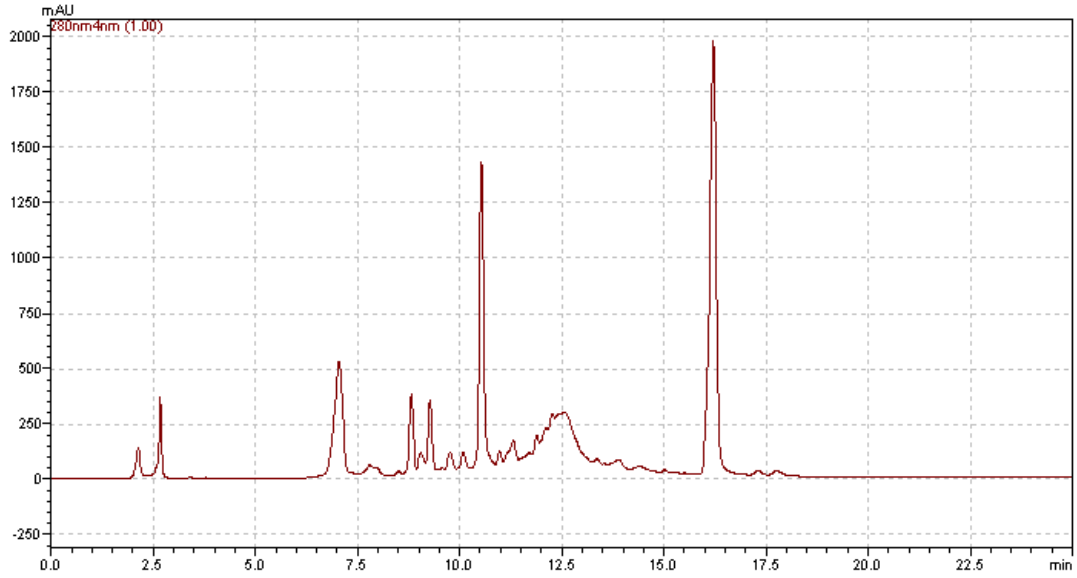
P_M: Pimenta Mangabeira; Pc: Pimenta Cabula; P_I: Pimenta Itapuã; P_A: Pimenta Arembepe; P_N: Pimenta Nazaré. AG: ácido gálico; ACL: ácido clorogênico; AC: ácido cafeico; ApC: ácido comarico; AS: ácido siríngico; EA: ácido elágico; AV: ácido vanílico. A média de cada composto seguido por pelo menos uma letra da coluna não difere em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O ácido gálico, que possui entre suas propriedades já estudadas as ações antioxidantes, anti-inflamatórias e antibióticas, auxiliando assim na proteção contra doenças cardiovasculares, câncer, entre outros, é um importante composto presente na matriz em questão, devido a sua utilização como antioxidante em óleos e gorduras, sendo assim explorado pela indústria alimentícia para evitar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que por sua vez carregariam o colesterol para o sangue, desencadeando doenças como arteriosclerose. Analisando o teor desse composto na pimenta rosa, pode-se destacar que as pimentas advindas das regiões do Cabula e de Nazaré apresentaram-se com maior concentração do mesmo, consequentemente apresentando também maior potencial antioxidante, como indicado pela captura do radical livre DPPH, indicado na tabela 5 (SALAS, 2013).

No que diz respeito a identificação e quantificação das substancias de interesse, através da técnica cromatográfica foi possível obter a concentração

de todos os analitos em um tempo inferior a 20 minutos, podendo assim inferir que a técnica utilizada possui boa frequência analítica. O cromatograma indicado na figura 13 revela que a coluna utilizada, bem como o gradiente escolhido se mostraram eficientes para a boa resolução dos picos, sendo que, no comprimento de onda selecionado (280 nm), o ácido gálico foi um dos que apresentou maior concentração.

Figura 13. Cromatograma da amostra de pimenta rosa da região do Cabula no comprimento de onda de 280nm.



Fonte: Acervo pessoal

Conforme estudo realizado por Borges e colaboradores (2015), os estresses aos quais as plantas são submetidas podem influenciar diretamente na concentração dos metabólitos secundários, no caso em questão, dos compostos bioativos, presentes nas mesmas. Como indicado na tabela 7, a maior concentração, em sua totalidade, de bioativos fenólicos se deu na pimenta rosa da região de Mangabeira (P_M). Como esta foi a única amostra adquirida em um espaço longe de estradas, pode-se inferir que as condições as quais a árvore Aroeira estava submetida facilitou a rota metabólica para maior efetividade desses compostos.

6.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A partir da análise em questão, foi observado que algumas fileiras apresentavam turbidez em todos ou alguns poços, sendo possível inferir que os compostos presentes no extrato possuíam atividade frente a determinadas bactérias e fungos (sem turbidez), podendo assim inibir (bacteriostático) ou mata-los (bactericida), porém outras, na concentração trabalhada, não (turvas). Como os microrganismos possuem um pH ótimo, ou seja, possuem uma faixa de pH na qual eles crescem com maior facilidade, sendo ele próximo a neutralidade (pH 7), e entendendo que a maioria desses microrganismos não crescem com uma faixa de pH unidade maior ou menos a essa faixa, foi necessário utilizar o extrato sem adição do ácido clorídrico antes utilizado no extrato para análise por HPLC.

Todas as bactérias Gram-positivas testadas foram sensíveis aos extratos metanólicos dos frutos de *Schinus terebinthifolius*, principalmente *S*. *epidermidis* e *B*. *cereus*, como indicado na tabela 8. O extrato de P_M apresentou efeito bacteriostático e bactericida para *S*. *epidermidis*, com valores de MIC e MBC de 58,59 e 937,5 μg mL^{-1}, respectivamente. Este extrato também apresentou maior efeito bacteriostático para *B*. *cereus* com MIC de 58,59 μg mL^{-1}. Embora P_N e P_C tenham menor atividade bacteriostática para *B*. *cereus* que P_M, estes também foram bactericidas para esta cepa. A atividade antibacteriana dos extratos contra a bactéria Gram-negativa foi seletiva para *Salmonella choleraesius*, obtendo valores de MIC's na faixa de 937,5 a 58,59 μg mL^{-1}.

Tabela 8. Atividade antimicrobiana da pimenta rosa (*Shinus terebinthifolius* Raddi)

Ei q	**MIC (MBC) - µg mL^{-1}**								
Microrganismo	**Bactéria Gram +**				**Bactéria Gram -**			**Fungo**	
Amostra	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*B. subtilis*	*B. cereus*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. choleraesius*	*C. glabrata*	*C. albicans*
P_A	937,5 (>7500)	58,59375 (>7500)	1875 (>7500)	468,75 (>7500)	>7500	>7500	937,5 -937,5	>7500	234,375 (>7500)
P_N	468,75 (>7500)	58,59375 (>7500)	468,75 468,75	234,375 1875	>7500	>7500	468,75 468,75	>7500	234,375 (>7500)
P_I	937,5 (>7500)	117,1875 (>7500)	937,5 1875	468,75 (>7500)	>7500	>7500	58,59375 58,5938	>7500	234,375 (>7500)
P_C	937,5 1875	58,59375 (>7500)	937,5 937,5	234,375 1875	>7500	>7500	468,75 (>7500)	>7500	234,375 (>7500)
P_M	234,375 (>7500)	58,59375 937,5	234,375 (>7500)	58,59375 (>7500)	>7500	>7500	234,375 937,5	>7500	117,1875 (>7500)
Cloranfenicol	3,125 (>25)	3,125 (>25)	1,5625 1,5625	3,125 6,25	-	-	-	-	-
Benzilpenicilina	0,039063 (>2,5)	2,5 (>2,5)	0,078125 0,07813	**-**	-	-	-	-	-
Garamicina	-	-	-	-	0,625 (>5)	1,25 (>5)	0,039063 0,07813	-	-
Ciclopirox Olamina	-	-	-	-	-	-	-	12,5 (>25)	12,5 (>50)

O extrato de P_I apresentou maior efeito bacteriostático e bactericida para *S. choleraesius*, com valores de MIC e MBC de 58,59 µg mL^{-1}. Todos os extratos foram seletivos para *C. albicans* e apresentaram apenas efeito microbiostático com valores de MIC na faixa de 234,37 - 117,18 µg mL^{-1}. Estudos realizados por Salem (2018), indicaram que os extratos metanólicos de *Schinus Terebinthifolius* apresentam maior atividade contra *Candida albicans* (MIC 1,25 mg/mL), isso porque se trata de uma espécie que contém monoterpenos, que por sua vez defendem a planta em questão contra agentes patogênicos (SALEM et. al., 2018).

O extrato de P_M apresentou maior efeito bacteriostático com valor de MIC de 117,2 µg mL^{-1}. De maneira geral, o extrato de P_M apresentou maior atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, exceto *S. choleraesius*, que apresentou a maior atividade observada para o extrato de P_I.

Dentre os ácidos fenólicos analisados, cabe citar o ácido clorogênico, por se tratar de um composto abundante em diversas espécies, como maças, cenouras, kiwis e batata, conhecido na literatura por possuir propriedades antioxidantes, anti-inflamatória e principalmente antidiabética, sendo já relatados estudos sobre a sua ação contra a diabetes mellitus tipo 2, mesmo possui também as propriedades antibacterianas e antifúngicas, possuindo, dessa forma, ampla atividade contra microrganismos. Como indicado na tabela 7, as concentrações desse composto nos extratos da pimenta rosa não foram as maiores obtidas, porém, podem ter auxiliado no resultado do teste realizado. (SANTANA-GÁLVEZ, J., CISNEROS-ZEVALLOS, L., JACOBO-VELÁZQUEZ, D, A., 2017)

O ácido gálico é amplamente utilizado na indústria farmacêutica devido ao fato de ser precursor na fabricação de antibióticos de amplo espectro. Sendo assim, estudos já realizados comprovaram que o mesmo possui atividade antibacteriana, promovendo assim a inibição enzimática de alguns microrganismos, intervindo no desenvolvimento microbiano. Como indicado na tabela 7, as concentrações apresentadas para este composto foram as maiores na maioria das amostras adquiridas, bem como as maiores em relação a maioria dos analitos determinados (SALAS, 2013).

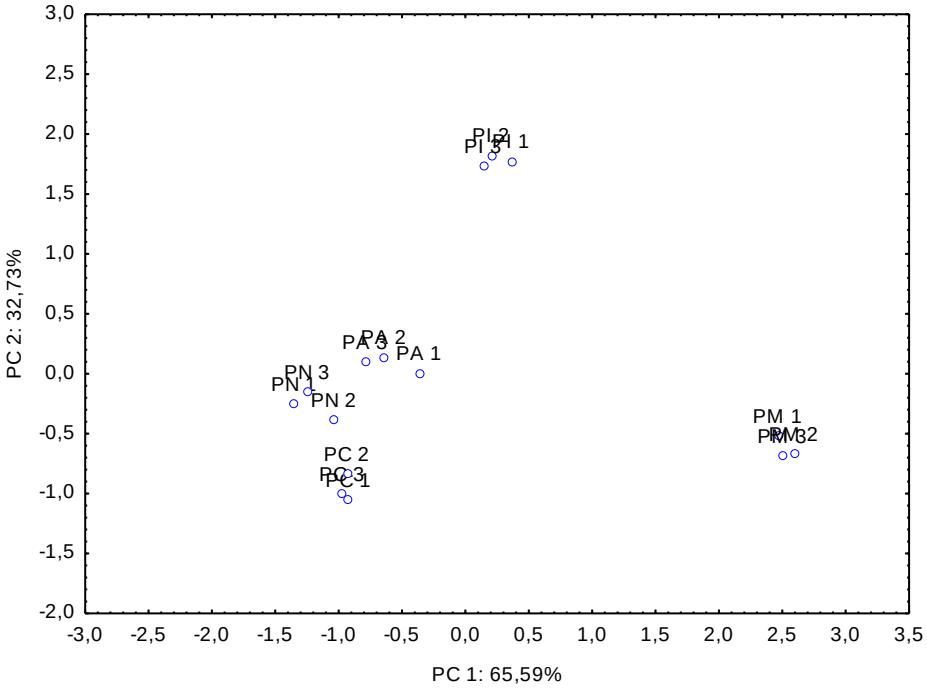
Devido a sua propriedade já mencionada, o ácido gálico possui uma forte influência no processo antibacteriano, sendo indicado as suas maiores

concentrações nas amostras advindas da região de Nazaré (P_N) e Cabula (P_C), as quais foram as que apresentaram ação bactericida na maioria dos microrganismos estudados. A P_N, por ter sido um dos extratos que apresentou maiores concentrações de compostos bioativos, foi também a que atingiu as menores concentrações inibitórias, indicando assim que os compostos bioativos são uma boa alternativa para o tratamento de microrganismos.

6.4 QUIMIOMETRIA

A partir da análise espectrofotométrica envolvendo 5 amostras (em triplicata) de pimenta rosa, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA), compreendendo 3 variáveis: teor de fenólicos totais (mg 100 g^{-1}), teor de flavonoides totais (mg 100 g^{-1}) e concentração de DPPH (µM TE 100g^{-1} de amostra seca). As análises de PCA foram aplicadas, utilizando o Software Statistica 7.0.

Figura 14. Gráfico de scores PC1 vs PC2 da pimenta rosa (*Shinus terebinthifolius* Raddi) em relação ao teor de fenólicos totais.



P_M: Pimenta Mangabeira; Pc: Pimenta Cabula; P_I: Pimenta Itapuã; P_A: Pimenta Arembepe; P_N: Pimenta Nazaré

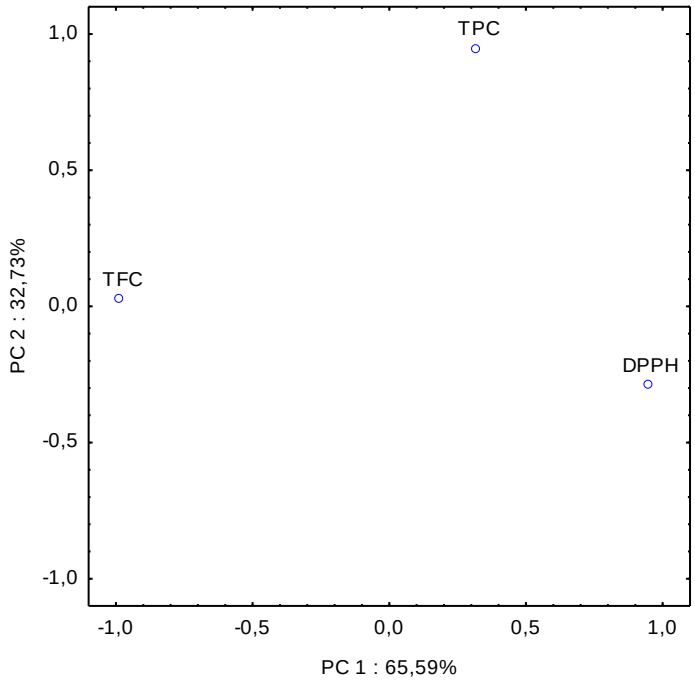
Os componentes (PC1 × PC2) descrevem 98,29% da variância total dos dados e fornecem informações discriminatórias relacionadas às amostras, sendo

a Componente Principal (PC1) representante de 65,59% da variância total, e a segunda Componente Principal (PC2) representante de 32,7% da variância. A partir da análise do gráfico de scores é possível verificar que existe uma relação entre os dados das amostras P_A, P_N e P_C. Como mencionado anteriormente, as pimentas advindas das regiões de Arembepe, Nazaré e Cabula foram adquiridas próximas a estradas. Segundo Borges e colaboradores (2015), a concentração de metabólitos secundários em cultivares pode ocorrer em resposta a estresses ambientais, tais como a incidência da luz, temperatura, umidade, água, entre outros. Desta forma, pode-se inferir que clima, solo, bem como o contato com diferentes tipos de poluentes, podem interferir de maneira significativa das concentrações de metabólitos secundários presentes nas plantas.

Ainda em relação a figura 14, a pimenta rosa advinda da região de mangabeira, a única que possuía relativa distância do terreno em relação as rodovias, se apresentou em diferente posição de quadrante, bem como a pimenta adquirida do supermercado, corroborando com a premissa de que as condições as quais as plantas estão submetidas podem interferir diretamente na sua composição química.

Analisando o gráfico de loading, indicado na figura 15, comparando com o gráfico de scores (figura 14), é possível confirmar a forte relação entre o teor de flavonoides totais e as amostras P_A, P_N e P_C, reafirmada tal análise pela tabela 5. Da mesma forma, a amostra P_M apresentou maior correlação com a quantidade de fenólicos totais avaliada. Como ambas as concentrações (TPC e TFC) foram significativamente elevadas, possibilitando assim a redução do radical livre DPPH, a posição na qual o mesmo se encontra indica que existe um padrão estabelecido, confirmado também pela tabela 6, que indica que o maior teor desses compostos induz a menor concentração de DPPH.

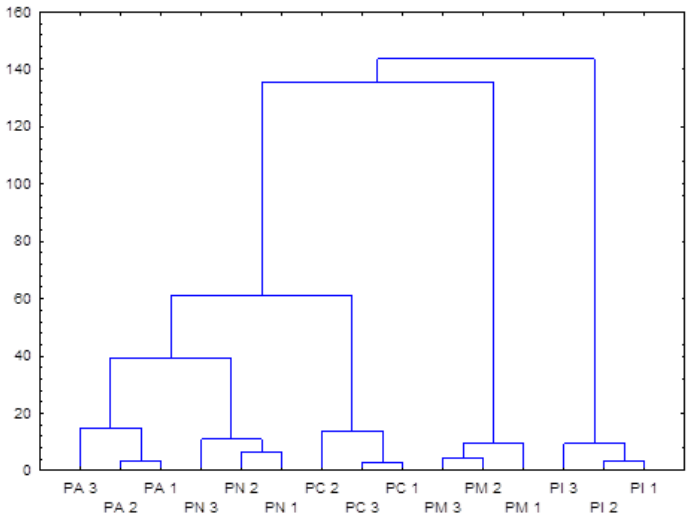
Figura 15. Gráfico de loading PC1 vs PC2 das amostras de pimenta rosa (*Shinus terebinthifolius* Raddi).



TPC: teor de fenólicos totais; TFC: teor de flavonóides totais; DPPH: captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

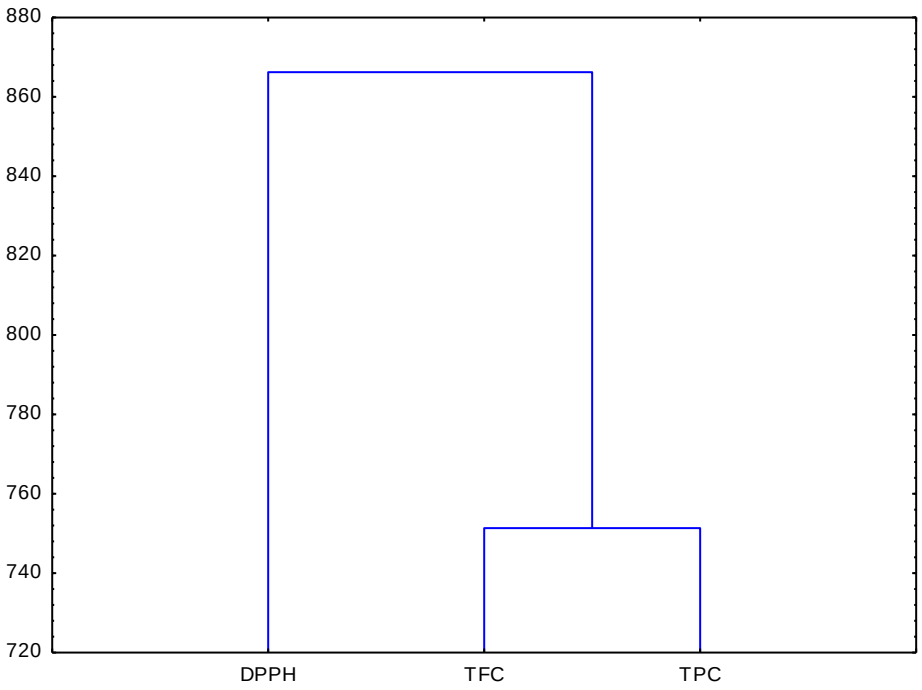
A partir da Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), a conclusão supracitada é evidenciada de maneira mais efetiva, sendo estabelecidos os padrões entre as amostras e as variáveis analisadas, indicadas pelas figuras 16 e 17.

Figura 16. Dendrograma das amostras de P_A, P_C, P_I, P_M e P_N por HCA.



P_M: Pimenta Mangabeira; Pc: Pimenta Cabula; P_I: Pimenta Itapuã; P_A: Pimenta Arembepe; P_N: Pimenta Nazaré; HCA: Análise de Agrupamento Hierárquico.

Figura 17. Dendrograma obtido a partir da análise de TPC, TFC e DPPH por HCA.

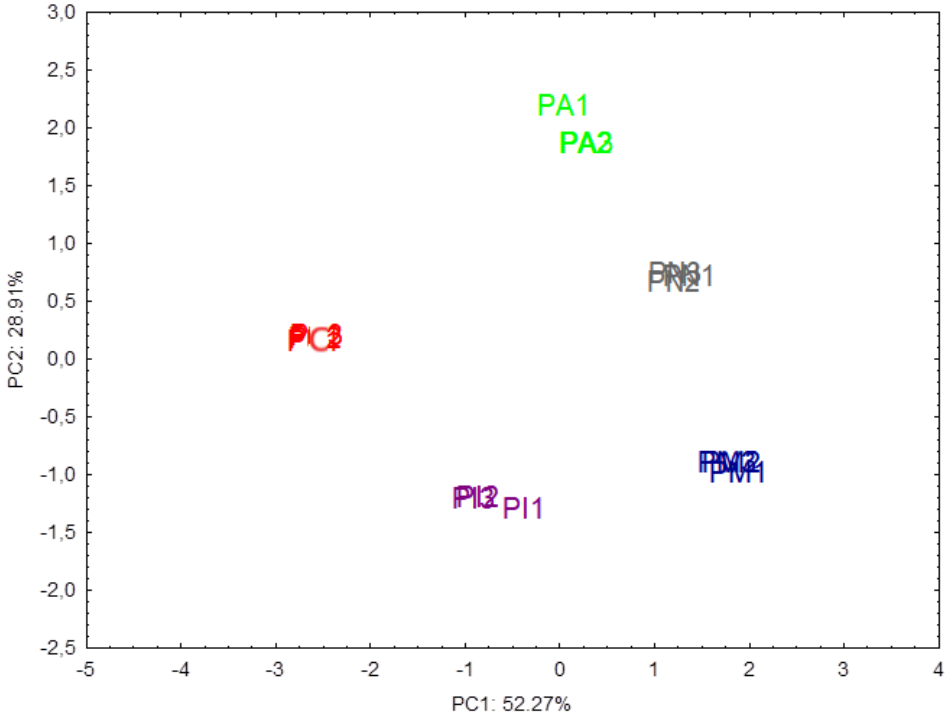


TPC: teor de fenólicos totais; TFC: teor de flavonoides totais; DPPH: captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

Conforme indicado nas figuras acima, foi possível realizar a análise exploratória, buscando assim classificar os grupos, possibilitando a associação dos mesmos a partir do seu comportamento. Em concordância, as amostras de P_A, P_N e P_C apresentaram um comportamento semelhante, reforçado pelas análises das figuras 14 e 15, assim como as amostras P_M e P_I apresentaram comportamentos distintos, comparadas as citadas anteriormente.

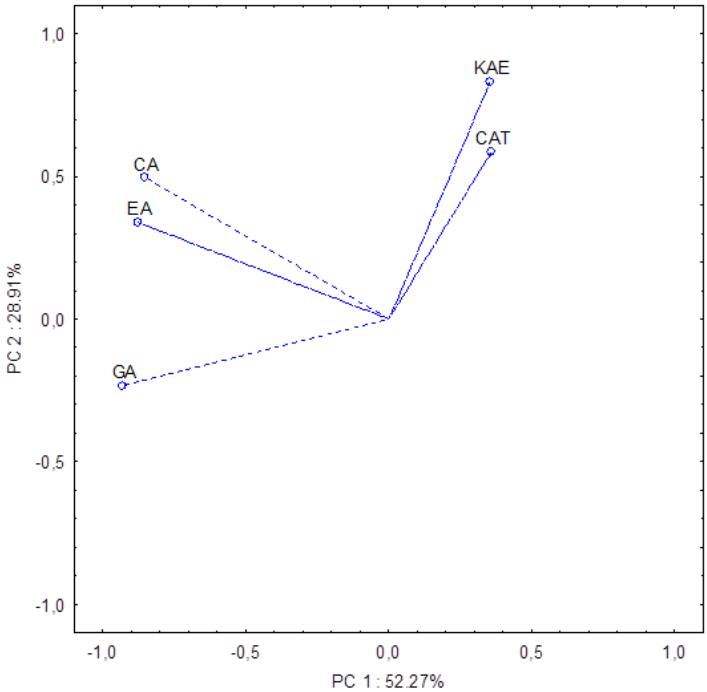
Avaliando os analitos mais eficazes nas amostras, destacam-se os ácidos fenólicos cafeico (AC), elágico (AE) e gálico (AG), e os flavonoides catequina (CAT) e kaempferol (KAE). Desta forma, considerando as regiões nas quais as amostras foram adquiridas, foi realizada a análise da PC desse grupo, a fim de estudar a similaridade entre elas.

Figura 18. Gráfico de scores PC1 vs PC2 em relação aos bioativos fenólicos mais efetivos na pimenta rosa (*Shinus terebinthifolius* Raddi).



P_M: Pimenta Mangabeira; Pc: Pimenta Cabula; P_I: Pimenta Itapuã; P_A: Pimenta Arembepe; P_N: Pimenta Nazaré;

Figura 19. Gráfico de loading scores PC1 vs PC2 em relação aos bioativos fenólicos mais efetivos na pimenta rosa (*Shinus terebinthifolius* Raddi).



GA: ácido gálico; EA: ácido elágico; AC: ácido cafeico; KAE: kaempferol; CAT: catequina.

As amostras obtidas na região do Cabula apresentaram maiores níveis de ácidos cafeico e elágico, como indicado nas figuras 18 e 19, e as amostras de Mangabeira e Itapuã, maior teor de ácido gálico. A partir da análise gráfica, a Componente Principal (PC1) apresentou 52,27% da variação total, e a segunda Componente Principal (PC2) 28,91% da variação total, indicando assim que as análises realizadas foram eficientes para estabelecer a relação entre os analitos com as pimentas advindas das diferentes regiões.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mediante as técnicas e métodos utilizados, foi possível comprovar que a pimenta rosa é uma importante fonte de bioativos fenólicos, possuindo ação antioxidante e antimicrobiana comprovados pelos resultados numéricos e ensaios realizados. As diferentes concentrações encontradas nas amostras deste fruto indicam que o solo e as condições climáticas as quais a planta está sujeita, podem ser cruciais para o teor dos compostos presentes na mesma, podendo ser comprovados com mais estudos.

Através do trabalho supracitado, foi possível identificar e quantificar 11 analitos por cromatografia líquida de alta eficiência em um tempo menor que 20 minutos, sendo eles os ácidos fenólicos: cafeico, clorogênico, cumárico, elágico, gálico, siríngico e vanílico, e os flavonoides: catequina, quercetina, rutina e kaempferol**,** sendo relevante ressaltar que a alta concentração deste último se mostra de importante valia, pois o mesmo é abundante nas plantas, possuindo entre suas propriedades as ações antidiabéticas e anti-inflamatórias.

Considerando as propriedades dos analitos determinados, foi notória a ação do extrato da pimenta rosa frente aos microrganismos utilizados, apresentando, entre outros, efeito bactericida, bacteriostático e fungistático, com destaque para a C. albicans, que teve efeito fungistático, a bactéria Gram-positiva *S. epidermidis*, que teve ação bactericida e a bactéria Gram-negativa *S. choleraesius*. Pode-se inferir desta forma, que a pimenta rosa possui potencial para agir como aliado na busca por novas alternativas na ação contra patógenos.

REFERÊNCIAS

Alves, E. S.; Tresmondi, F.; Longui, E. L. Análise estrutural de folhas de Eugenia uniflora L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. **Acta bot. bras**. v. 22, n. 1, p. 241-248. 2008.

Alves, I. A. B. S.; Miranda, M. M.; Barbosa, A. P.; Randau, K. P.; Soares, L. A. L. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria no visível para quantificação de taninos totais na casca do caule de *Simarouba amara* Aubl. **Árvore**. v. 39, p. 37- 47. Novembro, 2015.

Andrade, K. S.; Poncelet, D.; Ferreira, S. R. S. Sustainable extraction and encapsulation of pink pepper oil. **Journal of Food Engineering**. v. 204, p. 38-45. Julho, 2017.

Barbieri, D. S. V.; Tonial, F.; Lopez, P. V. A.; Maia, B. H. L. N. S.; Santos, G. D.; Ribas, M. O.; Glienke, C.; Vicente, V. A. Antiadherent activity of Schinus terebinthifolius and Croton urucurana extracts on in vitro biofilm formation of Candida albicans and Streptococcus mutans. **Archives of oral biology**. v. 59, p. 887-896. Setembro, 2014.

Biesalski, H-K.; Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Weber, P. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**. v. 25, p. 1202-1205. Novembro–Dezembro, 2009.

Borges, C. V.; Minatel, I. O.; Gomez-Gomez, H. A.; Lima, G. P. P. **Medicinal Plants and Environmental Challenges**. Medicinal Plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. p. 259-277. Springer, Cham, 2017.

Bottone, E. J. Bacillus cereus, a Volatile Human Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 23, n. 2, p. 382–398. Abril, 2010.

Campa, M.; Bendinelli, M.; Friedman, H. **Pseudomonas aeruginosas as an opportunistic Pathogen**. p. 1-8. New York: Springer Science+Business Media, 1993.

Chernoff, R. Nutrition in the Second Half of Life. **Reference Module in Biomedical Sciences**. Dezembro, 2014.

Chiu, C-H.; Tang, P.; Chu, C.; Hu, S.; Bao, Q.; Yu, J.; Chou, Y-Y.; Wang, H-S; Lee, Y-S. The genome sequence of Salmonella enterica serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. **Nucleic Acids Research**. v. 33, n. 5, p. 1690–1698. 2005.

Chen, A. Y.; Chen, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. **Food Chemistry**. v. 138, n. 4, p. 2099–2107. 2013.

Dannenberg, G. S.; Funck, G. D; Mattei, F. J.; Silva, W. P.; Fiorentini, A. M. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (Schinus terebinthifolius Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with Listeria monocytogenes. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 36, p. 120-127. Agosto, 2016.

Dannenberg, G. S.; Funck, G. D; Silva, W. P.; Fiorentini, A. M. Essential oil from pink pepper (Schinus terebinthifolius Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**. v. 95, p. 115-120. Janeiro, 2019.

Duarte-Almeida, J. M.; Santos, R. J.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-Caroteno/Ácido Linoléico e método se seqüestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 26, n. 2, p. 446-452, Campinas, abr/jun, 2006.

Earl, A. M.; Losick, R.; Kolter, R. Ecology and genomics of Bacillus subtilis. **Trends in Microbiology**. v.16, n.6., p. 269-275. Junho, 2008.

Earl, A. M.; Losick, R.; Kolter, R. **Bacillus subtilis Genome Diversity.** Journal of Bacteriology. v. 189, n. 3, p. 1163–1170. Fevereiro, 2007.

Farr, B. M.; Salgado, C. D.; Karchmer, T. B.; Sherertz, R. J. Can antibiotic-resistant nosocomial infections be controlled?. **The Lancet infectious diseases**. v. 1, n. 1, p. 38-45. Agosto, 2001.

Ferreira, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. 494 p. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.

Freire, J. M.; Abreu, C. M. P.; Rocha, D. A.; Corrêa, A. D.; Marques, N. R. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas

congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. **Ciência Rural**. v. 43, n.12, p. 2291-2296. Santa Maria, 2013.

Filho, R. L.; Ferro, H. M.; Pinho, R. S. C. Controle biológico mediado por Bacillus subtilis. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 4, n. 2, p. 12. 2010.

Fonseca, K. Z.; Prazeres, A. G. M.; Lima, C. L. B.; Santos, I. P.; Pamponet, J. S. S. **Perguntas mais frequentes sobre flavonoides**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Superintendência de Educação Aberta e a Distância - SEAD/UFRB. Cruz das Almas, 2016.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**. v. 30, n. 2, p. 374-381. 2007.

Horváth, B.; Peles, F.; Bereczki, L.; Széll, A.; Sipos, R.; Erős, A.; Lovász, C.; Micsinai, A. Comparison of sample preparation methods for the identification of Staphylococcus Aureusby MALDI-FOFMS. **Acta Agraria Debreceniensis 2019**. p. 9-14. 2019.

Kim, S-J., Kim, M-C., Um, J-Y., Hong, S-H. The Beneficial Effect of Vanillic Acid on Ulcerative Colitis. **Molecules**. v. 15, n. 10, p. 7208–7217. Outubro, 2010.

Kumar, K.; Askari, F.; Sahu, M. S.; Kaur, R. Candida glabrata: A Lot More Than Meets the Eye**. Microorganisms**. v. 7, n. 2, 49 p. Fevereiro, 2019.

Lanças, F. M. Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). **Scientia Chromatographica**. v. 4, n. 1, p. 13-19. 2012.

Lima Neto, G.A.; Kaffashi, S.; Luiz, W.T.; Ferreira, W.R.; Silva, Y.S.A.D.; Pazin, G.V.; Violante, I.M.P. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Pl. Med**. v.17, n.4, supl. III, p.1069-1077. Campinas, 2015.

Melo, E. A.; Araújo, C. R. Mangas das variedades espada, rosa e tommy atkins: compostos bioativos e potencial antioxidante. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 32, n. 4, p. 1451-1460. Londrina, out./dez, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Document M07-A10; 2015. [Wayne, PA, USA].

Nataro, J, P.; Kaper, J, B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clin Microbiol Rev**. v. 11, n. 1, p. 142-201. Abril, 1998.

Neto, B. R.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4 ed. 414 p. Porto Alegre: Bookman, 2010.

Nobile, C. J.; Johnson, A. D. Candida albicans Biofilmsand Human Disease. **Annual Review of Microbiology**. n. 69, p. 71–92. 2015.

Oliveira, R. A. G.; Lima, E. O.; Vieira, W. L.; Freire, K. R. L.; Trajano, V. N.; Lima, I. O.; Souza, E. L.; Toledo, M. S.; Silva-Filho, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 1, p. 77-82. Jan/Mar, 2006.

OPAS. **Folha informativa - Resistência aos antibióticos**. Organização Panamericana da Saúde - Organização Mundial da Saúde. Novembro de 2017. Link disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5664:folha-informativa-resistencia-aos-antibioticos&Itemid=812>. Acesso em 16/10/2019.

Ortega, A. M. M.; Campos, M. R. S. Bioactive Compounds as Therapeutic Alternatives. **Bioactive Compounds**. p. 247-264. 2019

Otto, M. Staphylococcus epidermidis Pathogenesis. Staphylococcus Epidermidis: **Methods and Protocols**. v. 1106, p. 17-31. 2014.

Otto, M. Staphylococcus epidermidis -- The ‘accidental’ pathogen**. Nat Rev Microbiol**. v. 7, n. 8, p. 555–567. 2009.

Pelczar Jr., M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R.; Edwards, D. D.; Pelczar, M. F. **Microbiologia - conceitos e aplicações**. Volume 1, 2ª edição. São Paulo: Pearson Education, 1997.

Pinto, C. M. F.; Pinto, C. L. O.; Donzeles, S. M. L. Pimenta *Capsicum*: Propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**. v. 3, n. 2, p. 108-120. Dezembro, 2013.

Pires, J. S.; Torres, P. B.; Santos, D. Y. A. C.; Chow, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências** - Universidade de São Paulo. p. 1-5. Setembro, 2017.

Rodrigues, I. M.; Lemma, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª ed. 618p. Campinas: Cárita, 2009.

Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Comunicado técnico online n.127- Embrapa. ISSN 1679-6535. Julho, 2007. Link disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/ 1/Cot127.pdf>.

Sá, P. G. S.; Guimarães, A. L.; Oliveira, A. P.; Filho, J. A. S.; Fontana, A. P.; Damasceno, P. K. F.; Branco, C. R. C.; Branco, A.; Almeida, J. R. G. S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de Selaginella convoluta (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. v. 33, n. 4, p. 561-566. 2012.

SAGDIC, O., OZTURKA, I., OZKANB, G. YETIMA, H., EKICIA, L., YILMAZC, M. T. RPHPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1749-1758, 2011.

Salas, M. G.; Cruz, A. Z.; Belmares, S. Y. S.; Urdiales, B. V.; Herrera, R. R.; González, C. N. A.; Chávez, J. M. Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro. **Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila**. v. 5, n. 9. 2013.

Salem, M.Z.M.; El-Hefny, M.; Ali, H.M.; Elansary, H.O. Nasser, R. A.; El-Settawy, A. A. A.;, El Shanhorey, N.; Ashmawy, N.A.; Salem, A.Z.M. Antibacterial activity of extracted bioactive molecules of Schinus terebinthifolius ripened fruits against some pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**. n. 120, p. 119-127. 2018.

Santana-Gálvez, J.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D. A. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome**. Molecules**. v. 22, n. 3, 358. 2017.

Santos, W. N. L.; Sauthier, M. C. S.; Santos, A. M. P.; Santana, D. A.; Azevedo, R. S. A.; Caldas, J. C.; Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (Psidium guajava L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA). **Microchemical Journal**. v.133, 583-592, 2017.

Sartori, C. J.; Castro, A. H. F.; Mori, F. A. Teores de fenóis totais e taninos nas cascas de Angico-Vermelho (*Anadenanthera peregrina*). **Floresta e Ambiente**. v.21, n. 3, 394-400. 2014.

Sauthier, M. C. S.; Silva, E. G. P.; Santosa, B. R. S.; Silva, E. F. R.; Caldas, J. C.; Minho, L. A. C.; Santos, A. M. P.; Santos, W. N. L. Screening of Mangifera indica L. functional content using PCA and neural networks (ANN). **Food Chemistry**. v. 273, p. 115–123. Fevereiro, 2019.

Silva, B. G.; Fileti, A. M. F.; Foglio, M. A.; Ruiz, A. L. T. G.; Rosa, P. T. V. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds from Schinus terebinthifolius Raddi fruits: Effects of operating conditions on global yield, volatile compounds, and antiproliferative activity against human tumor cell lines. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 130, p. 10-16. Dezembro, 2017.

Silva, S.; Negri, M.; Henriques, M.; Oliveira, R.; Williams, D. W.; Azeredo, J. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev**. v. 36, n. 2, p. 288–305. 2012.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. 1104p. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003.

Singleton, V.L. & Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology Viticuture**, 16, 144–158, 1965.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. **Princípios de Análise Instrumental.** 5ª ed., 836 p. Porto Alegre: Bookman, 2002.

Somani, S. J., Modi, K. P., Majumdar, A. S., Sadarani, B. N. Phytochemicals and Their Potential Usefulness in Inflammatory Bowel Disease. Phytotherapy Research. **Phytother Res**. v. 29, n. 3, p.339-50. Janeiro, 2015.

Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr., G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo,D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**. v. 30, n. 2, p. 351-355. 2007.

Souza, G. H. B.; Mello, J. C. P.; Lopes, N. P. **Farmacognosia - Coletânea Científica**. 372 p. Ouro Preto: UFOP, 2011.

Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warrener, P.; Hickey, M. J.; Brinkman, F. S. L.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, D. J.; Lagrou, M.; Garber, R. L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrock-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L. L.; Coulter, S. N.; Folger, K. R.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G. K.-S.; Wu, Z.; Paulsen, I. T.; Reizer, J.; Saier, M. H.; Hancock, R. E. W.; Lory, S.; Olson, M. V. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**. v. 406, n. 6799, p. 959-564. Agosto, 2000.

Tapas, A. R.;Sakarkar, D. M.; Kakde, R. B.Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v. 7, n. 3, p. 1089-1099. Setembro, 2008.

Taylor, T. A.; Unakal, C. G. Staphylococcus Aureus. **StatPearls Publishing**. p. 1-8. 2019.

Tomaino, A.; Martorana, M.; Arcoraci, T.; Monteleone, D.; Giovinazzo C.; Saija, A. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (Pistacia vera L., variety Bronte) seeds and skins. **Biochimie**. v. 92, n. 9, p. 1115-1122. 2010.

Tonhi, E.; Collins, K. E.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H. Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE–FR). **Quim. Nova**. v. 25, n. 4, p. 616-623. 2002.

Uliana, M. P.; Fronza, M.; Silva, A. G.; Vargas, T. S.; Andrade, T. U.; Scherer, R. (2016). Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (Schinus Terebinthifolius Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**. v. 83, p. 235-240. 2016.

Vicentino, A. R. R.; Menezes, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 17, n.3, p. 384-387. Jul./Set. 2007.

Vieira, L. M.; Sousa, M. S. B.; Mancini-Filho, J.; Lima, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Rev. Bras. Frutic.** v. 33, n. 3, p. 888-897. 2011.

Zhang, Y-J.; Gan, R.-Y.; Li, S.; Zhou, Y.; Li, A-N.; Xu, D-P.; Li, H-B. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. **Molecules**. v. 20, n. 12, p. 21138–21156. Dezembro, 2015.

Zhang, Y.; Liu, D. Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. **European Journal of Pharmacology**. v. 670, i. 1, p. 325-332. Novembro, 2011.