

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS FENÓLICOS E
CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTAS DE
Mimosa verrucosa BENTH.**

GILVANDA LEÃO DOS ANJOS

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MARÇO - 2024**

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS FENÓLICOS E
CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTAS DE
Mimosa verrucosa BENTH.**

GILVANDA LEÃO DOS ANJOS

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2017

Tese submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Souza Dias

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Franceli da Silva

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MARÇO - 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

A599e

Anjos, Gilvanda Leão dos.

Extração de compostos bioativos fenólicos e caracterização do óleo essencial de plantas de *Mimosa verrucosa* Benth / Gilvanda Leão dos Anjos._ Cruz das Almas, Bahia, 2024.

91f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Doutorado em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Souza Dias.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Franceli da Silva.

1.Plantas – Leguminosa. 2.Extratos vegetais – Essências e óleos essenciais. 3.Compostos bioativos – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 633.15

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS FENÓLICOS E
CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTAS DE
***Mimosa verrucosa* BENTH.**

COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DA TESE
DE GILVANDA LEÃO DOS ANJOS

Realizada em 08 março de 2024

Prof. Dr. Fabio de Souza Dias
Universidade Federal da Bahia-UFBA
Examinador interno (Orientador)

Profa. Dr. Floricéa Magalhães Araújo
Universidade Federal da Bahia-UFBA
Examinador externo

Profa. Dra. Debora de Andrade Santana
Universidade do Estado da Bahia -UNEB
Examinador externo

Dra. Roberta Menezes Santos
Universidade Federal do Piauí -CPCE/UFPI
Examinador externo

Profa. Dra. Leilane Silveira D´Avila
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia -UFRB
Examinador interno

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada a Deus, à minha querida família e aos meus fiéis amigos, cujo apoio constante tornou esta jornada acadêmica possível e significativa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, cuja sabedoria e orientação foram fundamentais em cada passo desta jornada acadêmica. À minha amada família, principalmente meus pais o Sr. Gilvando e a Sra. Rosimeire e a minha irmã Taniele, expresso minha gratidão pelo apoio incondicional, compreensão e encorajamento ao longo do doutorado.

Ao meu orientador “professor Fabio de Souza Dias”, expresso profundo reconhecimento pela orientação e conhecimento compartilhado. À coorientadora “professora Franceli da Silva”, agradeço pela colaboração valiosa, contribuindo significativamente para o desenvolvimento desta tese.

Aos amigos do grupo de pesquisa GPLAM, Sinara, Luiz, Bruna, Carol e Magnison, cuja troca de conhecimentos e experiências enriqueceu este trabalho, meu sincero agradecimento. A todos os meus amigos, principalmente Railda, Candice, Fabrício e Gisele que estiveram ao meu lado durante os desafios e sucessos, agradeço por seu apoio e amizade.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e ao programa de pós-graduação de Ciências Agrárias pelo apoio e infraestrutura.

Um agradecimento especial aos técnicos de laboratório, Rayza, Lene, Verônica e Moacir, a pós-doutora Roberta, cuja dedicação e expertise foram essenciais para a realização dos experimentos. Ao CLQM (Centro de Laboratórios de Química Multiusuários) da Universidade Federal de Sergipe pelo suporte nas análises. Aos funcionários da UFRB, expresso minha gratidão pela assistência e recursos fornecidos ao longo do meu doutorado.

Este trabalho é fruto de esforços coletivos, e agradeço a cada pessoa que contribuiu para a realização desta tese. Seu apoio foi fundamental.

Por último, mas não menos importante, agradeço à CAPES pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA1

Artigo 1

OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE
COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS DE *Mimosa verrucosa*
BENTH.....28

Artigo 2

TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mimosa verrucosa*
BENTH.....50

Artigo 3

POTENCIAL DO ÓLEO ESSENCIAL E HIDROLATO DE *Mimosa verrucosa* BENTH.
NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Aspergillus*
welwitschiae.....65

CONSIDERAÇÕES FINAIS82

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS FENÓLICOS E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTAS DE *Mimosa verrucosa* BENTH.

Autora: Gilvanda Leão dos Anjos
Orientador: Fabio de Souza Dias
Coorientadora: Franceli da Silva

Resumo: A *Mimosa verrucosa* é uma arbórea da família Fabaceae, que pode ser encontrada no bioma Caatinga, destaca-se promissora em bioativos (compostos fenólicos) e óleo essencial (O.E.). A presença desses metabólitos especiais (secundários), confere diversas aplicações biológicas, como propriedades antioxidantes e antibacterianas. Diante do exposto, objetivou-se a otimização da extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos em *M. verrucosa* e analisar o O.E. e os hidrolatos desta espécie. No primeiro capítulo, foram otimizadas as melhores condições de extração em banho ultrassônico por meio de um planejamento Doehlert em conjunto com a função de desejabilidade. A temperatura e o tempo de sonicação influenciaram positivamente na extração, sendo 25 minutos de sonicação e 60 °C a temperatura do solvente, as melhores condições experimentais. Foi possível identificar 10 compostos fenólicos (rutina, ácido vanílico, gálico, *trans*-cinâmico, *d*-hidroxibenzoico, *p*-cumárico, cafeico, clorogênico, ferúlico e sináptico) no extrato otimizado. No segundo capítulo foram analisados o teor e a composição química do O.E. da folha, caule e fruto da *M. verrucosa*. Os teores do O.E. das folhas e frutos da *M. verrucosa* foram 1,17% e 0,25%, respectivamente. O O.E. do caule ficou abaixo do limite de quantificação, só foi possível obter o hidrolato. A composição e concentração dos compostos apresentam diferenças entre o O.E. do fruto e da folha. No terceiro capítulo foi avaliado o potencial antifúngico do O.E. e dos hidrolatos da planta no controle do *Aspergillus welwitschiae*. O O.E. das folhas e todos os hidrolatos de *M. verrucosa* demonstraram ação fungistática contra o *A. welwitschiae*, e reduziram significativamente a produção de esporos do fungo. Esses resultados indicam que a *M. verrucosa* pode ser promissora como recurso bioativo, dado aos ativos fitoquímicos, e compostos com potencial a serem utilizados no controle do *A. welwitschiae*.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, Bioativos, Jurema, Ultrassom.

EXTRACTION OF BIOACTIVE PHENOLIC COMPOUNDS AND CHARACTERIZATION OF ESSENTIAL OIL FROM *Mimosa verrucosa* BENTH. PLANTS

Author: Gilvanda Leão dos Anjos

Advisor: Fabio de Souza Dias

Co-advisor: Franceli da Silva

Abstract: *Mimosa verrucosa* is a tree from the Fabaceae family, which can be found in the Caatinga biome, and is promising in terms of bioactives (phenolic compounds) and essential oil (E.O.). The presence of these special (secondary) metabolites provides several biological applications, such as antioxidant and antibacterial properties. In light of the above, the objective was to optimize the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds in *M. verrucosa* and to analyze the E.O. and hydrolates of this species. In the first chapter, the best extraction conditions in an ultrasonic bath were optimized using Doehlert planning in conjunction with the desirability function. Temperature and sonication time positively influenced the extraction, with 25 minutes of sonication and 60°C solvent temperature being the best experimental conditions. It was possible to identify 10 phenolic compounds (rutin, vanillic acid, gallic acid, *trans*-cinnamic acid, *d*-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, and sinapic acid) in the optimized extract. In the second chapter, the content and chemical composition of the E.O. from the leaf, stem, and fruit of *M. verrucosa* were analyzed. The O.E. contents of the leaves and fruits of *M. verrucosa* were 1.17% and 0.25%, respectively. The E.O. of the stem was below the quantification limit, it was only possible to obtain the hydrolate. The composition and concentration of compounds present differences between the E.O. of the fruit and leaf. In the third chapter, the antifungal potential of the E.O. and hydrolates of the plant in controlling *Aspergillus welwitschiae* was evaluated. The E.O. from the leaves and all hydrolates of *M. verrucosa* demonstrated fungistatic action against *A. welwitschiae*, and significantly reduced the fungus's spore production. These results indicate that *M. verrucosa* may be promising as a bioactive resource, given its phytochemical compounds and potential to be used to control *A. welwitschiae*.

Keywords: Antimicrobial activity, Bioactive, Jurema, Ultrasound.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Diversidade vegetal do bioma Caatinga

A variedade de plantas encontradas no Brasil corresponde a cerca de 20% da biodiversidade mundial, inclui mais de 40 mil espécies que são ricas em compostos químicos naturais. Essa diversidade de plantas está presente em diferentes biomas (Macêdo *et al.*, 2018), Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal. Tal abundância destaca um potencial considerável para produção de conhecimento e a elaboração de novos produtos com valor agregado (Carvalho; Conte-Junior, 2021), despertando a atenção das indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e agrícola, que pesquisam o potencial uso de moléculas e substâncias naturais provenientes de plantas, com a garantia de segurança e eficácia no desenvolvimento dos produtos (Silva *et al.*, 2022).

No semiárido do Nordeste, o bioma predominante é a Caatinga, que cobre cerca de 10% do território nacional e aproximadamente 60% do Nordeste brasileiro (Barros *et al.*, 2023). Este bioma estende-se pelos estados do Ceará, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Alagoas e Sergipe, além de uma pequena parte de Minas Gerais e Maranhão (Medeiros *et al.*, 2018). A maior dificuldade nessa região árida brasileira é a escassez de água, a estação chuvosa ocorre apenas durante três ou quatro meses consecutivos (Pagano; Zandavalli; Araujo, 2013), enquanto a estação seca pode durar até 70% do ano. Em quase todos os dias durante o ano essa região é intensamente exposta ao sol, com temperaturas médias variando entre 23 °C e 27 °C. As condições ambientais da Caatinga são bastante diferentes das encontradas em outros biomas brasileiros, as chuvas são irregulares de um ano para outro, resultando em secas severas (Horta *et al.*, 2018).

A Caatinga se destaca por ser o único bioma exclusivamente brasileiro, sua flora é constituída principalmente de plantas herbáceas e arbustivas lenhosas anuais, sendo ao mesmo tempo diversificada e endêmica. Foram identificadas 932 espécies de plantas, das quais 380 são encontradas apenas nesse bioma (Barros *et al.*, 2023). A vegetação representada por formações xerofíticas distribuídas em diferentes camadas (herbáceas, arbustivas e arbóreas), e durante os períodos mais secos,

abriga várias espécies que têm características caducifólias (Cunha; Almeida; Ferreira, 2021).

É um ecossistema onde os estudos científicos ainda não atendem completamente às necessidades, pois abriga uma grande quantidade de plantas com potencial aromático e medicinal em seu ambiente, devido à sua vegetação resistente à seca prolongada e irregular, altas temperaturas e intensa radiação ultravioleta (Souza *et al.*, 2022). Essas plantas exibem uma ampla variedade de metabólitos especiais (secundários), o que as torna altamente valorizadas pelas indústrias (Barros *et al.*, 2023).

As espécies desse bioma, destacam-se pela ampla diversidade de atividades biológicas, tais como, a atividade antimicrobiana do óleo essencial e extrato metanólico de folhas de *Croton argyrophyllus* e *Croton heliotropiifolius* contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* (Brito *et al.*, 2018). Os extratos de 9 espécies de plantas (*Eugenia uniflora*, *Libidibia ferrea*, *Mimosa tenuiflora*, *Psidium guajava*, *Schinus terebinthifolius*, *Anadenanthera colubrina*, *Palicourea rigida*, *Mimosa ophthalmocentra* e *Persea americana*) da Caatinga apresentaram atividade antifúngica contra complexo de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* (Biasi-Garbin *et al.*, 2016). Barros *et al.* (2019) observaram que o extrato etanólico de *Lippia origanoides* teve maior eficácia, inibindo 100% dos fungos avaliados, *Pythium* sp., *Phytophthora palmivora*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum truncatum*, *Cercosporidium* sp., *Curvularia* sp., *Sclerotium rolfii* e *Moniliophthora perniciosa*. O extrato aquoso de folhas de *Homalolepis ferrugínea* foi o único, dentre os extratos de doze plantas, que apresentou atividade antibiofilme e antibacteriana contra quatro cepas *Xanthomonas citri* pv. *vitícola* (Silva *et al.*, 2020).

A Caatinga conta com diversas plantas que, quando exploradas de maneira adequada e sustentável, possibilitam estudos voltados para o planejamento e desenvolvimento de processos e produtos. Dentre as variedades de plantas existentes na Caatinga, destaca-se a *Mimosa verrucosa* Benth. pertencente à família Fabaceae.

1.1 Aspectos gerais da *Mimosa verrucosa* Benth.

A família Fabaceae engloba uma grande variedade de espécies que são extremamente importantes para os seres humanos pelo seu valor nutricional e medicinal (Jacob *et al.*, 2022), além de servir como fonte de diversos produtos, como fibras, óleos, madeiras e taninos (Monção; Araújo; Citó, 2019). Essa família inclui tanto subarbustos quanto árvores de grande porte, com aproximadamente 795 gêneros e quase 20.000 espécies, sendo que metade dessas espécies são endêmicas do Brasil e estão distribuídas por diferentes biomas (Flora do Brasil, 2023).

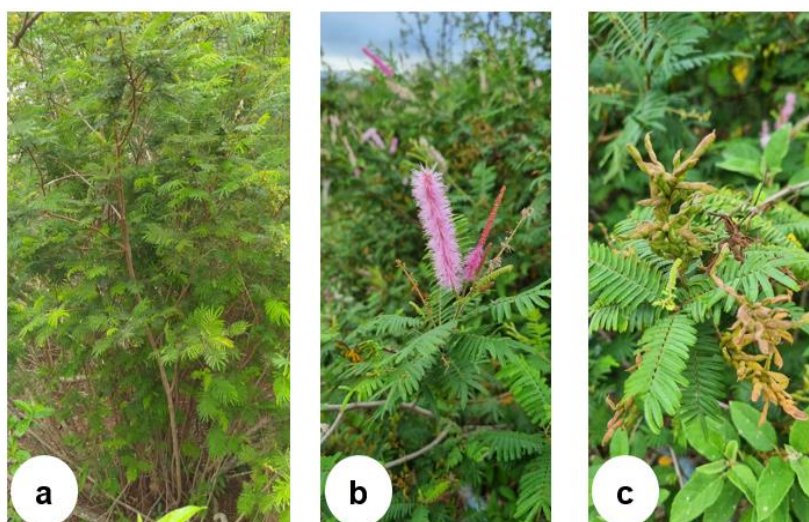
Dentre os gêneros da família Fabaceae, a *Mimosa* é particularmente notável, com cerca de 540 espécies amplamente distribuídas na região Neotropical. Seus principais centros de diversidade estão localizados no Brasil, sul da Amazônia e áreas adjacentes no Paraguai, Argentina, Uruguai e centro-sul do México. É o segundo gênero com maior número de espécies na flora brasileira, contando aproximadamente com 379 delas, das quais 279 são exclusivas do território nacional. Na região Nordeste foram registradas 91 espécies desse gênero (Flora do Brasil, 2023). Destaca-se como o gênero da família Fabaceae mais representativo na Caatinga (Sousa; Queiroz; Pereira, 2021).

As plantas pertencentes ao gênero *Mimosa*, conhecidas popularmente como Jurema, têm sido utilizadas há muito tempo pelos povos indígenas e ainda são muito empregadas na medicina popular. A presença de diversos metabólitos especiais (secundários), como compostos bioativos fenólicos, incluindo flavonoides e taninos, confere aos extratos dessas plantas diversas aplicações biológicas, como propriedades antioxidantes e antibacterianas, justificando seu uso em medicamentos (Silva *et al.*, 2020). Estudos químicos indicam que as espécies desse gênero são ricas em flavonoides, além de terem isolado alcaloides, esteroides, terpenoides, terpenos, saponinas, aminoácidos, glicosídeos, lignoides, polissacarídeos, ligninas, sais e ésteres graxos (Monção; Araújo; Citó, 2019; Rizwan *et al.*, 2022). Apenas 25 espécies desse gênero foram estudadas quanto à composição fitoquímica (Rizwan *et al.*, 2022), as mais estudadas incluem *M. pudica* e *M. tenuiflora* (Monção; Araújo; Citó, 2019). Algumas outras espécies apresentam poucos ou nenhum relato científico sobre sua composição fitoquímica e potencial biológico, apesar de serem muito usadas pela população nordestina, como é o caso da *Mimosa verrucosa* Benth (Silva *et al.*, 2020).

A *Mimosa verrucosa* Benth. (Figura 1) é uma arbórea endêmica do Brasil, encontrada nos biomas Caatinga e Cerrado, conhecida popularmente como jurema,

jureminha, jurema lisa, jurema vermelha e jurema da flor rosa. Destaca-se pela aparência verrucosa de suas estruturas vegetativas e reprodutivas, resultante da presença de tricomas verruciformes (Lopes *et al.*, 2021; Flora do Brasil, 2023). São arbustos com altura entre 1,5 a 4 m, as folhas são bipinadas, as flores são rosadas em forma de espigas e os frutos são em forma de lança reunidos em pencas (Lopes *et al.*, 2021). Essa planta é muito utilizada pela população local como anti-inflamatório, cercas para animais, na alimentação de pequenos ruminantes durante a estação seca e como fonte de néctar e pólen para as abelhas (Silva *et al.*, 2020; Romanoski; Santos, 2017).

Figura 1. Planta (a), flores (b) e frutos (c) de *M. verrucosa*.



Autor: Fabricio M. Miranda, 2022.

Em geral, as plantas contêm uma ampla gama de compostos bioquímicos valiosos, que lhe conferem atividade biológica, na *M. verrucosa*, o extrato aquoso e metanólico do caule apresentou atividade antioxidante (Desmarchelier *et al.*, 1999). Romanoski e Santos (2017) encontraram no extrato etanólico da *M. verrucosa* (folha, caule e raiz) esteroides e saponinas no caule e raízes, bem como flavonoides nas folhas, observaram também que a maior atividade antioxidante dos extratos da *M. verrucosa* está na folha ($IC_{50} = 372,7 \pm 0,3 \mu g mL^{-1}$) em relação ao caule e raiz. Os autores ainda fizeram o perfil cromatográfico no HPLC-DAD, e os resultados indicaram que a espécie é rica em compostos fenólicos, apresentando muitos picos em comprimentos de onda típicos de compostos fenólicos (330nm), especialmente

flavonoides. No estudo realizado por Silva *et al.* (2020), com o extrato etanólico do caule da *M. verrucosa*, foram encontrados taninos (flobabênicos e pirogálicos), além de flavonas, flavonois e xantonas, e o extrato apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (CIM: 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e atividade antifúngica contra *Candida albicans* (CIM: 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Trichophyton interdigitale* (CIM: 78,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Na literatura há poucas pesquisas sobre fitoquímicos em extratos de *M. verrucosa*, e nenhuma, até o momento, sobre a composição química e potencial biológico do óleo essencial, havendo a necessidade de estudos dessa natureza.

2. Metabolismo especial (secundário) das plantas

Ao longo do processo evolutivo, as plantas estabeleceram relações complexas com o ambiente ao seu redor. Por serem limitadas em termos de mobilidade, as plantas frequentemente enfrentam diversos fatores de estresse, tanto abióticos quanto bióticos. Esses fatores incluem toxicidade oxidativa, presença de metais tóxicos, variações de temperatura, inundações, salinidade, seca e a presença de microrganismos e herbívoros. Para lidar com esses estresses, as plantas utilizam várias estratégias e uma delas envolve a produção de metabólitos especiais, que são uma variedade de compostos químicos de baixa massa molecular (Cao *et al.*, 2020; Ogbe; Finnie; Van Staden, 2020).

As plantas produzem uma grande variedade de compostos químicos, que incluem tanto metabólitos primários quanto especiais. Os metabólitos primários são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, enquanto os metabólitos especiais, embora não sejam essenciais, têm um papel importante na proteção das plantas e em sua capacidade de se adaptar a ambientes em constante mudança (Roaa, 2020). Os metabólitos especiais são sintetizados a partir dos metabólitos primários e representam uma ampla gama de compostos ativos. Sua distribuição no reino vegetal é restrita e varia em termos da quantidade entre diferentes espécies e também depende do ambiente onde as plantas crescem. Geralmente são encontrados em quantidades menores e são sintetizados por células específicas em estágios específicos do desenvolvimento das plantas. Muitos desses metabólitos presentes nas plantas, são constitutivos. No entanto, alguns funcionam

como precursores inativos que são ativados quando ocorre danos nos tecidos ou ataques por patógenos (Jain; Khatana; Vijayvergia, 2019).

Para a produção de metabólitos especiais, as plantas utilizam diversas vias metabólicas que se originam das rotas metabólicas primárias. Os precursores desses metabólitos são sintetizados principalmente no ciclo de Krebs e na via do chiquimato. A via do chiquimato, ativada durante o estresse, gera triptofano, tirosina e fenilalanina, que são componentes cruciais para a produção metabólitos especiais. Os principais metabólitos secundários (fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados) são derivados das vias metabólicas do acetato-malonato, ácido chiquímico, acetato-mevalonato (MVA) e metileritritolfosfato (MEP) (Figura 2) (Costa, 2021). Enzimas específicas, como terpeno sintase (terpenos), fenilalanina amônia liase e chalcona sintase (compostos fenólicos), triptofano descarboxilase, WRKY6 e hiosciamina 6 β -hidroxilase (alcaloides), regulam a produção desses metabólitos especiais em várias condições de estresse (Khare *et al.*, 2020).

Figura 2. Rotas metabólicas dos compostos bioativos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados.



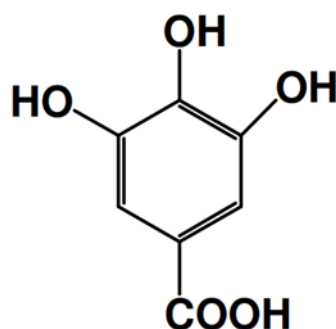
Fonte: Costa, 2021.

2.1 Compostos fenólicos bioativos

Os radicais livres têm a capacidade de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, além de causar danos às membranas biológicas. Para combater essa ameaça, as plantas desenvolveram sistemas antioxidantes distintos, que incluem enzimas responsáveis pela catálise das Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e componentes não enzimáticos, como compostos fenólicos, carotenoides e as vitaminas C e E (Kubalt, 2016).

Os compostos fenólicos (Figura 3) constituem uma categoria ampla e variada, sendo caracterizados pela presença de pelo menos um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas (Ambriz-Pérez *et al.*, 2016). Podem ser encontrados no citosol, na parede celular ou associados a ceras presentes na superfície da planta, na forma conjugada com amidas e ésteres, e menos frequentemente com glicosídeos, ou ainda na forma livre, sendo esta última mais rara (Karakaya, 2004).

Figura 3. Estrutura do ácido gálico.



Fonte: Kabera *et al.*, 2014.

Com base no número de anéis fenólicos e nos elementos estruturais que conectam esses anéis, esses compostos são agrupados e categorizados como fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonoides, xantonas, estilbenos e lignanas (Vuolo; Lima; Maróstica, 2019). Os flavonoides, um dos grupos fenólicos mais comuns, desempenham um papel significativo na coloração de tecidos vegetais. Outra classe reconhecida de compostos fenólicos são os ácidos fenólicos, como os ácidos ferúlico, cafeico e sináptico, que geralmente ocorrem em formas conjugadas, como ésteres, glicosídeos ou amidas, raramente na forma livre (Khoddami; Wilkes; Roberts, 2013).

Adicionar compostos fenólicos aos alimentos não só traz benefícios para a saúde, mas também ajuda a prolongar sua vida útil devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Em sistemas alimentares, esses compostos ajudam a prevenir a formação de substâncias cancerígenas, como a acrilamida, atuando como agentes anticarcinogênicos. Os extratos vegetais podem ser usados para introduzir esses compostos, além de servirem como corantes (Xu; Wang; Li, 2019) e influenciarem as características sensoriais dos alimentos. As várias propriedades biológicas dos compostos fenólicos são fundamentais para seu uso nas indústrias farmacêutica e alimentícia (Esfanjani; Assadpour; Jafari, 2018).

Além de suas propriedades antioxidantes, esses compostos podem exercer uma função antimicrobiana, como evidenciado pelos resultados obtidos por Grzegorz-Karolak *et al.* (2019), onde o extrato da *Salvia viridis* demonstrou atividade bacteriostática e propriedades bactericidas, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos como ácido cafeico e ácido rosmarínico. O extrato também exibiu atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Aspergillus brasiliensis*, cuja atividade foi extremamente alta.

Os flavonoides, pertencentes a um extenso grupo de metabólitos especiais das plantas derivado dos fenóis simples, são predominantemente antimicrobianos e desempenham um papel na proteção da planta contra a radiação ultravioleta. Geralmente representam a maioria das fitoalexinas, que são substâncias produzidas como resposta à infecção por microrganismos ou estresse biótico. Além disso, têm a capacidade de inibir a esporulação, germinação de esporos e crescimento micelial de fungos patogênicos. Outros compostos fenólicos, como cumarinas e taninos, são tóxicos para herbívoros e os taninos em particular, são eficazes como repelentes devido ao seu sabor amargo e desagradável. Eles também podem se ligar a proteínas e alterá-las estruturalmente (Kubalt, 2016).

Os flavonoides presentes em frutas, vegetais e bebidas derivadas de plantas, são utilizados como fitoterápicos, sendo a inclusão desses compostos nas dietas associada à redução do risco de doenças como asma, câncer, diabetes e doenças cardíacas (Khan *et al.*, 2019). Portanto, frutas e vegetais desempenham um papel essencial na alimentação humana e na promoção da saúde pública, sendo frequentemente recomendados por nutricionistas (Roaa, 2020).

2.1.1 Extração de compostos fenólicos em plantas

A extração de compostos fenólicos é influenciada por suas propriedades químicas, tais como polaridade, concentração, estrutura molecular, número de grupos hidroxila e presença de anel aromático. Alguns desses compostos podem formar complexos com proteínas, carboidratos ou outras moléculas, o que pode dificultar o processo de extração (Khoddami; Wilkes; Roberts, 2013).

As propriedades de solubilidade dos polifenóis são influenciadas pelas suas diferenças estruturais (Alara; Abdurahman; Ukaegbu, 2021). Tanto a água quanto os compostos fenólicos contêm grupos hidroxila, o que facilita sua solubilidade mútua. Geralmente, quanto mais grupos hidroxila um composto possui, maior é sua solubilidade em água. Isso significa que os glicosídeos fenólicos são mais solúveis em água do que as agliconas correspondentes. Além da água, esses compostos também podem se dissolver em álcoois de baixa massa molecular, como metanol e etanol, e outros solventes orgânicos como acetona e acetato de etila, que têm a capacidade de formar ligações de hidrogênio (Bodoira; Maestri, 2020).

Técnicas convencionais, como maceração, decocção, percolação, infusão e extração por soxhlet, são amplamente utilizadas para recuperar compostos bioativos de biomassa vegetal (Arumugham *et al.*, 2021). A maceração envolve a imersão de amostras pulverizadas em um solvente em um sistema fechado, seguido por agitação constante. A percolação, semelhante à maceração, deixa o solvente cair gradualmente de cima para baixo, dispensando a necessidade de filtração. A decocção consiste em ferver amostras de plantas por um curto período. A infusão é empregada para extrair compostos voláteis, macerando-as em água fervente ou fria por um curto período e deixando-as em infusão no solvente. No método de extração Soxhlet, a amostra é inserida em um cartucho, enquanto o solvente é colocado em um balão de fundo redondo, conectado ao cartucho. A circulação constante do solvente aquecido extrai os compostos desejados, obtendo-se um extrato concentrado após a evaporação do solvente (Alara; Abdurahman; Ukaegbu, 2021).

Os métodos convencionais de extração usados para obter extratos bioativos têm algumas desvantagens, como altas temperaturas, alto consumo de energia e tempo prolongado de processo, além de baixa seletividade, e também ao provável uso de grandes quantidades de solventes tóxicos (Lasta *et al.*, 2019). O uso de

solventes orgânicos como hexano, tolueno, clorofórmio, metanol e acetona nessas técnicas podem alterar a natureza do extrato, tornando-os potencialmente tóxicos para o consumo humano (Arumugham *et al.*, 2021).

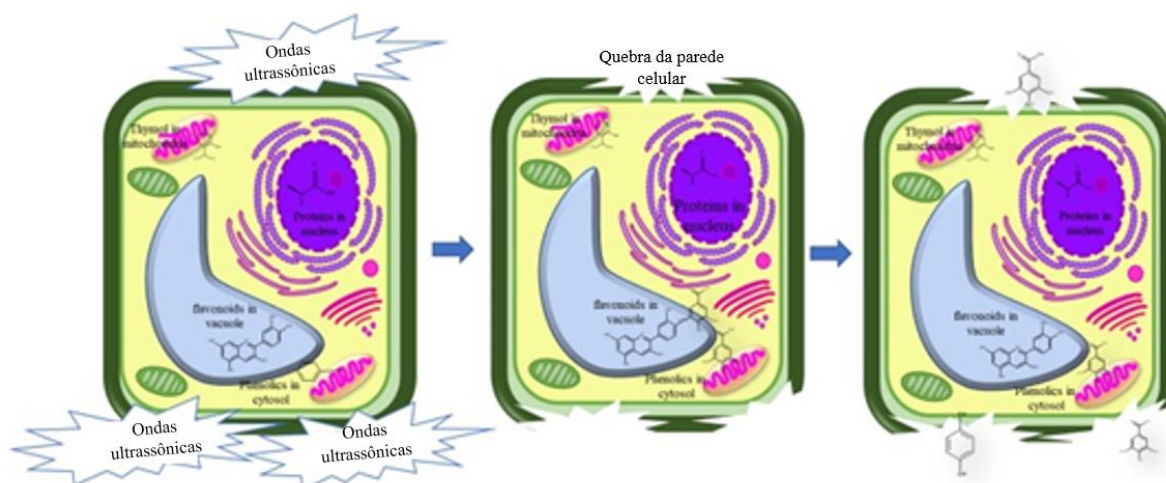
É importante ressaltar que apenas o etanol é considerado seguro para o consumo humano entre os solventes orgânicos adequados para a extração de compostos fenólicos. Devido a preocupações ambientais e de segurança crescentes, há uma preferência por água ou misturas de água e etanol na extração desses fenólicos (Bodoira; Maestri, 2020). Os pesquisadores estão buscando desenvolver novas técnicas eficientes, econômicas e ecologicamente corretas que preservem a qualidade e as propriedades dos compostos bioativos (Arumugham *et al.*, 2021). Dentre os processos de extração alternativos, a extração assistida por micro-ondas (EAM), a extração com líquido pressurizado (ELP), a extração com fluido supercrítico (EFS) e a extração assistida por ultrassom (EAU) são os mais estudados. Esses processos são considerados ambientalmente sustentáveis, caracterizados por tempos de extração reduzidos e baixos índices de utilização de solventes (Uwineza; Waśkiewicz, 2020).

A EAM se fundamenta no princípio do aquecimento dielétrico, sendo capaz de aquecer uma matriz tanto interna quanto externamente, sem criar gradientes térmicos. Por meio do superaquecimento interno das moléculas de água na amostra, as micro-ondas induzem o rompimento da matriz celular, liberando compostos intracelulares (Osorio-Tobón, 2020; Panzella *et al.*, 2020). A ELP utiliza solventes líquidos em alta pressão e temperatura, abaixo de seus pontos críticos, para mantê-los em estado líquido, favorecendo a solubilidade e as propriedades de transferência de massa, permitindo sua rápida penetração na matriz da amostra (Lasta *et al.*, 2019; Uwineza; Waśkiewicz, 2020). A EFS, por sua vez, aproveita altas pressões para extrair compostos bioativos usando fluidos supercríticos, sendo o dióxido de carbono o solvente mais comumente empregado devido à sua não toxicidade, não inflamabilidade e disponibilidade a custos razoáveis. Esta técnica tem ganhado destaque em comparação aos métodos tradicionais devido a benefícios como maior seletividade, difusividade e sustentabilidade ambiental (Uwineza; Waśkiewicz, 2020).

O ultrassom refere-se a ondas sonoras mecânicas em frequências acima de 20 kHz, ultrapassando o limite de audição humana. São gerados pelo ultrassom, ondas de compressão e expansão que leva ao processo de cavitação, resultando na

formação de bolhas que liberam alta energia, gerando pressão e temperaturas extremamente elevadas localizadas (Gouda *et al.*, 2021). A implosão das bolhas de cavitação induz colisões entre partículas, rompendo as paredes celulares da matriz. Esse processo permite que o solvente de extração penetre profundamente, resultando em rendimentos de extração mais elevados e tempos de extração mais curtos (Figura 4) (Panzella *et al.*, 2020). No processo de EAU, o material é inicialmente colocado em um recipiente junto com um solvente em uma temperatura específica, dando início ao processo ultrassônico. Após o tempo de extração, o extrato é recuperado através de filtração (Osorio-Tobón, 2020).

Figura 4. Efeito das ondas ultrassônicas na parede celular vegetal.



Fonte: Adaptado de Yusoff *et al.* (2022).

Assim como a EAM, a EAU reduz consideravelmente tanto o tempo quanto a quantidade de solvente necessários para extrair compostos fenólicos presentes em resíduos agroalimentares. Essa abordagem é considerada simples e requer instrumentação laboratorial simples, como um banho ultrassônico (Panzella *et al.*, 2020).

Muitas pesquisas vêm demonstrando o aumento do rendimento de fenólicos extraídos com banho ultrassônico, como Ling *et al.* (2019), que obtiveram maiores teores de fenólicos totais, flavonóides totais e kaempferol de *Cassia alata* com a EAU ($26,91 \pm 0,43$ mg EAG g⁻¹, $86,69 \pm 1,67$ mg EQ g⁻¹, $14,19 \pm 0,43$ mg KA g⁻¹) em relação a extração por maceração (EM) ($20,68 \pm 1,63$ mg EAG g⁻¹, $70,13 \pm 4,43$ mg EQ g⁻¹, $12,01 \pm 0,25$ mg KA g⁻¹). O extrato de folhas da *Moringa oleífera* L. extraído por EAU

(potência ultrassônica: 188 W, relação solvente-massa: 40:1 e porcentagem de etanol: 52%) exibiu maiores rendimentos de flavonoides ($43,96 \pm 1,90$ mg ER g⁻¹) do que aqueles extraídos por extração assistida por agitação ($33,25 \pm 1,81$ mg ER g⁻¹), extração assistida por soxhlet ($23,22 \pm 1,12$ mg ER g⁻¹) ou EAM ($36,13 \pm 0,94$ mg ER g⁻¹) (Lin *et al.*, 2021). Yilmaz *et al.* (2021) conseguiram reduzir o tempo de extração de teores de glicosídeos de esteviol, fenólicos e flavonoides utilizando a EAU (43 min) e EAM (16 min) em relação EM (112 min), bem como maiores rendimentos foram obtidos com a EAU, seguidos por EAM e EM.

A utilização de protocolos de extração com tecnologias ecologicamente sustentáveis, combinados com técnicas de separação, como cromatografia líquida (LC) acoplada à espectrometria de massa (MS), possibilita a identificação de compostos fenólicos associados às respostas metabólicas complexas induzidas por mudanças ou alterações em diversas espécies de plantas (Herrera-Pool *et al.*, 2021).

2.1.2 Otimização de métodos de extração

A otimização dos fatores que afetam o processo de extração de compostos fenólicos é importante para minimizar o tempo e a quantidade de solvente utilizada, ao mesmo tempo em que maximiza as recuperações dos analitos. Tradicionalmente, esse procedimento é conduzido ao ajustar os níveis dos fatores, também conhecidos como variáveis independentes, e observar as variações na resposta, também denominada variável dependente (Bezerra *et al.*, 2016; Novaes *et al.*, 2016).

Normalmente, a otimização univariada é usada, analisando cada variável de forma independente, no entanto, essa abordagem tem suas desvantagens, como a necessidade de realizar um grande número de experimentos, consumo considerável de tempo e reagentes, além da incapacidade de avaliar as interações entre as variáveis, podendo levar a conclusões específicas que podem não representar as condições ideais para todos os fatores (Novaes *et al.*, 2016). Por outro lado, técnicas multivariadas têm sido adotadas para otimizar métodos analíticos. Nesses projetos, os níveis de todos os fatores são ajustados simultaneamente. Essas técnicas oferecem vantagens como análise rápida, praticidade, eficiência econômica e a necessidade de realizar menos experimentos (Friedrich *et al.*, 2016).

O primeiro passo da otimização multivariada envolve a seleção das variáveis mais relevantes no procedimento de extração, ou seja, aquelas que têm uma influência significativa na magnitude da resposta (planejamento fatorial completo ou fatorial fracionário). Essa etapa de seleção é crucial para eliminar variáveis que não contribuem de maneira significativa para a resposta, permitindo avançar para a otimização apenas com as variáveis relevantes. O segundo passo se concentra na modelagem dos dados obtidos por meio de uma matriz experimental específica, derivada da metodologia de superfície de resposta. Isso é realizado por meio de designs experimentais mais complexos, como matriz Doehlert, planejamento compostos centrais e Box-Behnken. Nesse método, funções polinomiais são ajustadas aos dados para descrever o comportamento da resposta em relação às variações nos níveis dos fatores. Após a identificação dos fatores significativos, as condições operacionais ótimas são determinadas (Ferreira *et al.*, 2007; Novaes *et al.*, 2016)

2.1.2.1 Planejamento fatorial

O planejamento experimental fatorial é uma ferramenta estatística muito importante para otimização de múltiplas variáveis, sendo amplamente utilizado no desenvolvimento de métodos analíticos. Sua utilidade está na capacidade de identificar as variáveis significativas e determinar as melhores condições experimentais (Friedrich *et al.*, 2016). O planejamento fatorial completo em dois níveis é o mais simples, onde o número de experimentos é determinado pela matriz e expressa como (2^k) , sendo (k) o número de fatores em estudo (Ferreira *et al.*, 2019). Nesses projetos, cada variável tem dois níveis, codificados como -1 e +1, podendo ser quantitativas ou qualitativas (Leardi, 2009).

O planejamento fatorial completo é adequado quando há um pequeno número de fatores. No entanto, em situações com um grande número de fatores, torna-se impraticável utilizá-lo. Nessas circunstâncias, é possível reduzir o número de experimentos por meio do uso dos planejamentos fatoriais fracionários, onde os experimentos são reduzidos por um número x, conforme a fórmula 2^{k-x} . Embora esses planejamentos possam diminuir a quantidade de experimentos necessários,

eles têm a desvantagem associada à confusão dos efeitos dos principais fatores com as interações entre outros fatores (Ferreira *et al.*, 2019; Novaes *et al.*, 2016).

2.1.2.2 Metodologia de superfície de resposta (Box-Behnken, Doehlert e Composto central)

A metodologia de superfície de resposta é uma abordagem que consiste de técnicas matemáticas e estatísticas para encontrar um polinômio adequado que descreva o comportamento da resposta em relação aos níveis dos fatores estudado. Essa metodologia possibilita realizar previsões dentro da região experimental definida pelo projeto (Novaes *et al.*, 2016). Para atingir esse objetivo, são empregadas funções polinomiais lineares ou quadráticas para modelar o sistema em estudo e otimizar as condições experimentais (Bezerra *et al.*, 2008). Matrizes experimentais específicas são utilizadas para estabelecer as combinações entre os níveis das variáveis modeladas na metodologia de superfície de resposta (Novaes *et al.*, 2016).

A matriz Box-Behnken elege pontos de um arranjo fatorial de três níveis para estimar eficientemente os coeficientes de primeira e segunda ordem em um modelo matemático. O número de experimentos (N) necessários para o desenvolvimento do Box-Behnken é determinado pela fórmula $N = 2k(k - 1) + C_p$, onde k é o número de fatores e C_p é o número de pontos centrais. Os diferentes níveis dos fatores devem ser ajustados exclusivamente em três níveis (-1, 0, +1), mantendo intervalos igualmente espaçados entre esses valores (Bezerra *et al.*, 2008).

O desenho composto central integra um planejamento fatorial completo ou fracionário de dois níveis com pontos adicionais (pontos estrela), incluindo pelo menos um ponto no centro da área experimental. Requerem um número de experimentos determinado por $N = k^2 + 2k + c_p$, onde k é o número de fatores e c_p é o número replicado do ponto central, todos os fatores são examinados em cinco níveis ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$) (Ferreira *et al.*, 2004).

A matriz de Doehlert é uma opção prática e econômica em comparação com outras matrizes experimentais de segunda ordem. Ao contrário dos projetos composto central e Box-Behnken, esses projetos não são rotativos devido ao número variável de estimativas para diferentes fatores. No entanto, os projetos Doehlert apresentam números distintos de níveis para cada variável (Riswanto *et al.*, 2019), uma

característica especialmente útil quando algumas variáveis estão sujeitas a restrições como custos e restrições de insumos, ou quando é desejável estudar uma variável em um número maior ou menor de níveis. A matriz requer um número de experimentos determinado por $N = k^2 + k + c_p$, onde k é o número do fator e (c_p) é o número replicado do ponto central (Bezerra *et al.*, 2008).

2.1.2.3 Otimização de múltiplas respostas

A maioria das pesquisas divulgadas em Química Analítica concentra-se na otimização multivariada de uma única resposta de cada vez. No entanto, é frequente a demanda por otimização simultânea de várias respostas. Existem diversas abordagens para realizar a otimização de múltiplas respostas. As superfícies de resposta podem ser determinadas individualmente para cada resposta, e essas superfícies podem ser analisadas simultaneamente. Quando as diferentes respostas apresentam comportamento semelhante ao alterar os níveis dos fatores, o processo é facilitado. Contudo, à medida que as diferenças entre as respostas se ampliam, encontrar uma área em que elas convergem de forma satisfatória torna-se mais difícil. Isso significa que alterar um fator pode ser benéfico para uma resposta específica, mas prejudicial para as demais respostas ao mesmo tempo (Bezerra *et al.*, 2019). Um modelo para uma única função composta, que leva em consideração todas as respostas, pode ser estabelecido para gerar uma única superfície de resposta (Ferreira *et al.*, 2007).

É possível combinar várias respostas em uma única usando uma função matemática. Um método proposto por Derringer e Suich nos anos 80, conhecido como função de desejabilidade, envolve transformar cada conjunto de respostas obtidas através de um planejamento experimental em valores adimensionais chamados desejabilidades individuais (d_i). Essas desejabilidades individuais são então combinadas para formar uma única resposta chamada de desejabilidade global (D) (Bezerra *et al.*, 2019). A escala da função de desejabilidade varia de $d = 0$ (indicando uma resposta inaceitável) a $d = 1$ (representando uma resposta totalmente desejável). O cálculo de D é realizado combinando os valores individuais de desejabilidade através da média geométrica (Ferreira *et al.*, 2007; Novaes *et al.*, 2016).

2.2 Óleo essencial

Os óleos essenciais (O.E.) são misturas complexas com baixa massa molecular, constituídos por vários componentes em diferentes concentrações. Normalmente, dois ou três componentes são majoritários, representando de 20% a 70% do óleo, enquanto outros estão presentes em quantidades menores. Os terpenos, especialmente os monoterpenos, que são formados pela combinação de duas unidades de isopreno (C10), geralmente predominam e constituem cerca de 90% do óleo essencial. Além disso, também existem sesquiterpenos (C15), hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). Também contêm terpenoides e compostos fenólicos que conferem propriedades antioxidantes. Além desses elementos, há hidrocarbonetos e compostos oxigenados como aldeídos, cetonas, ésteres, óxidos e alcoóis (Bakkali *et al.*, 2008; Maurya *et al.*, 2021). A composição química e o teor dos O.E são influenciados por diversos fatores intrínsecos, associados à planta, incluindo sua interação com o ambiente, como tipo de solo, clima e maturidade durante a colheita, e extrínsecos, fatores como o método de extração e o ambiente circundante (Dhifi *et al.*, 2016; Jugreet *et al.*, 2020).

Esses óleos têm uma ampla gama de cores, que vão desde incolor até tons que variam de amarelo claro a marrom. Normalmente, eles são líquidos quando estão em temperatura ambiente. No entanto, suas densidades podem variar consideravelmente e alguns óleos podem se tornar resinosos ou até mesmo solidificar. Embora não se dissolvam facilmente na água, eles são altamente solúveis em solventes orgânicos e são classificados como solúveis em gordura (Raveau; Fontaine; Lounès-Hadj Sahraoui, 2020). Esses componentes podem ser localizados em todos os órgãos da planta e são armazenados no citoplasma de células secretoras, cavidades, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Bakkali *et al.*, 2008). Sua extração é realizada por meio de diversas técnicas, tais como destilação a vapor, hidrodestilação, extração por fluido supercrítico e extração sob pressão (Edris, 2007).

A destilação a vapor é amplamente usada, especialmente na indústria, e representa uma grande parte, cerca de 93%, da extração total. Nesse método, o calor gerado pelo vapor de um gerador específico é utilizado para aquecer o material vegetal. O vapor passa pela planta enquanto a água fervente fica separada do material vegetal. A eficácia em quebrar a estrutura do material e liberar o O.E. depende do

calor fornecido pelo vapor. Além disso, esse processo ajuda a reduzir a quantidade de resíduos (hidrolato) gerados durante a extração. A hidrodestilação é amplamente utilizada em laboratórios de pesquisa e envolve um processo no qual materiais vegetais são mergulhados em água dentro do recipiente e a mistura é posteriormente fervida (Sharma *et al.*, 2021).

Os O.E despertam um grande interesse do ponto de vista econômico devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Essas características os tornam muito úteis para realçar o sabor e conservar alimentos, justificando a sua adição em produtos alimentícios (Hmaied *et al.*, 2019). Além disso, eles são amplamente utilizados na indústria de perfumaria, cosméticos e agricultura, sendo especialmente importantes na fabricação de medicamentos. Também são utilizados na aromaterapia, seja por meio de massagem, aplicação tópica ou inalação. Vale ressaltar que são substâncias químicas e seu uso inadequado pode representar riscos para a saúde (Pandey *et al.*, 2020). A atividade biológica geralmente é atribuída aos componentes majoritários, mas não devemos ignorar a importância dos componentes presentes em concentrações mínimas. Isso ocorre porque o efeito antimicrobiano pode ser resultado das interações entre essas substâncias. As interações entre os constituintes podem ser tanto antagônicas quanto sinérgicas (Čabarkapa *et al.*, 2020).

O O.E. desempenha um papel significativo na regulação do ambiente em que a planta está inserida, atuando como sinalizadores químicos que têm diversas funções ecológicas. Essas funções incluem atrair polinizadores e dispersores de sementes, agir na defesa contra herbívoros, inibir a germinação de sementes, conferir às plantas a capacidade de tolerar temperaturas extremas. Além disso, tem a capacidade de facilitar a comunicação entre plantas. Destaca-se ainda que esses óleos apresentam propriedades antimicrobianas notáveis, estando presentes em várias partes das plantas aromáticas, servindo como antivirais, antimicrobianos e inseticidas (Taheri; Soweizy; Tarighi, 2023; Aqeel *et al.*, 2023).

2.2.1 Atividade antifúngica dos óleos essenciais

Os O.E. têm a capacidade de eliminar patógenos fúngicos relevantes. Além de apresentarem efeitos fungicidas e fungistáticos, o mecanismo de ação varia em diferentes situações, conforme explicado na maioria das pesquisas científicas. A

citotoxicidade dos O.E. em seus ambientes é causada pela sua capacidade em afetar a parede celular, a formação celular, a estabilidade citoplasmática e causar danos celulares, juntamente com a liberação de macromoléculas (Sil *et al.*, 2020). A hidrofobicidade é uma propriedade crucial dos O.E., o que facilita a interação deles com os lipídios presentes na membrana celular dos microrganismos. Esse fenômeno torna as células microbianas mais permeáveis, pois perturba a estrutura celular. Consequentemente, ocorre a perda de íons e produtos químicos essenciais das células bacterianas e fúngicas, o que eventualmente leva à morte desses microrganismos (Taheri; Soweizy; Tarighi, 2023).

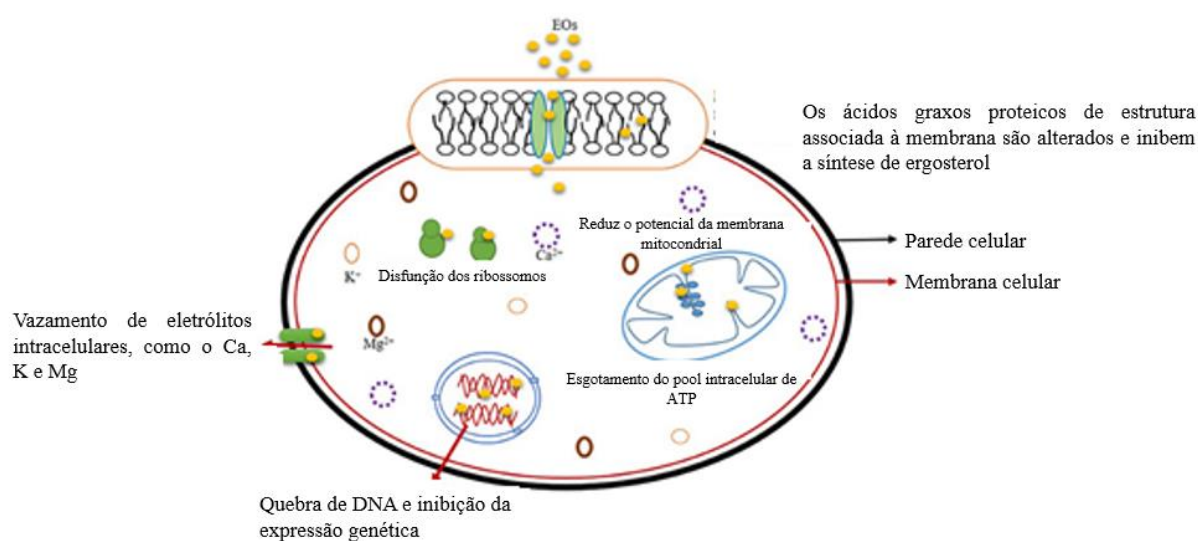
A atividade antimicrobiana dos O.E. pode ser explicada por diferentes mecanismos devido à presença de diversos compostos (Čabarkapa *et al.*, 2020) (Figura 5). Apesar de inúmeros estudos ao longo dos anos terem investigado o efeito antibacteriano dos óleos essenciais, o número de pesquisas relacionadas aos efeitos antifúngicos ainda não alcançou níveis adequados (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020).

No que diz respeito ao mecanismo de ação, os O.E. podem afetar a membrana celular de culturas fúngicas, impedindo a formação da parede celular. Isso acontece porque as células dos fungos são danificadas e perdem sua integridade devido à inibição da produção de quitina e glucano. Como resultado, o equilíbrio interno é perturbado, o que eventualmente leva à morte das células (Taheri; Soweizy; Tarighi, 2023). O O.E. também induz a ruptura da membrana celular ao inibir a síntese de ergosterol na membrana plasmática dos fungos. O ergosterol é exclusivo da membrana plasmática fúngica, desempenhando um papel fundamental na preservação da fluidez, viabilidade e integridade dessa membrana. Além disso, é essencial para a biogênese de diversas enzimas associadas à membrana. A desestruturação da membrana plasmática, em última análise, na liberação de íons celulares importantes, como K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} . Esse desequilíbrio de íons vitais no citoplasma por meio da membrana plasmática resulta em mudanças metabólicas e consequentemente, na morte das células (Maurya *et al.*, 2021).

Alguns O.E. têm um efeito negativo sobre as desidrogenases mitocondriais e a cadeia de transporte de elétrons, o que por sua vez afeta a atividade mitocondrial nas células dos fungos. Além disso, podem impedir a divisão celular, bem como a síntese de RNA e DNA, resultando em uma redução na produção de proteínas (Taheri; Soweizy; Tarighi, 2023). Também possuem a capacidade de interromper os processos

de transporte de íons e interagir com proteínas presentes na membrana, bem como com outros compostos dentro das células. Resumindo, é bem relatado que os efeitos antifúngicos estão vinculados à interação entre o O.E. e o sistema celular, especialmente em relação à membrana plasmática e ao comprometimento das funções mitocondriais (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020).

Figura 5. Possíveis mecanismos de ação do óleo essencial em células fúngicas.



Fonte: Adaptado de Maurya *et al.* (2021).

O uso de O.E. é muito estudado para controle de fungos fitopatogênicos. Dantas *et al.* (2018) estudando o controle alternativo de fungos pós colheita de mamão Tainung, relataram a eficiência do óleo essencial de cravo na inibição do crescimento micelial da *Alternaria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizopus* sp. *in vitro* e em frutos de mamão. Sarkhosh *et al.* (2018) conseguiram reduzir em 58,40% o diâmetro da lesão de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamão com O.E. de tomilho.

A aplicação de O.E. de *Salvia officinalis* reduziu significativamente (31,71%) a taxa de crescimento de *Aspergillus carbonarius*, sendo que a dose 0,5% de O.E. promoveu a inibição completa de esporos do *A. carbonarius*. Os autores associam que as atividades antifúngicas poderiam ser relacionadas em parte à presença da cânfora (Dammak *et al.*, 2019). O O.E. de *Salvia officinalis* também foi eficaz para

controlar *Botrytis cinérea* e *Fusarium sambucinum* em testes *in vitro*, cuja inibição foi proporcional à dose de óleo utilizada, a concentração de 10 microlitros foi considerada ideal para controlar *B. cinérea* e *F. sambucinum* (Rguez *et al.*, 2019). Carvalho *et al.* (2023) relataram que o O.E. extraído de diferentes acessos de *Lippia alba* L. com diferentes idade (30, 60 e 90 dias após o transplântio), inibe o crescimento micelial, reduz a velocidade de crescimento e o número de esporos de *Aspergillus welwitschiae* em testes *in vitro*.

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e otimização de procedimento de extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos em *Mimosa verrucosa* e determinar o teor, composição química, e atividade antifúngica do óleo essencial desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200-214, 2021.
- AMBRIZ-PÉREZ, D. L. *et al.* Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1131412, 2016.
- ARUMUGHAM, T. *et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of plant phytochemicals for biological and environmental applications—A review. **Chemosphere**, v. 271, p. 129525, 2021.
- AQEEL, U. *et al.* Regulation of essential oil in aromatic plants under changing environment. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 32, p. 100441, 2023.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARROS, D. B. *et al.* Antifungal activity of terpenes isolated from the Brazilian Caatinga: a review. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e270966, 2023.
- BARROS, P. N. *et al.* Fractions of the *Lippia origanoides* extract induce the polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase enzymes in *Solanum lycopersicum*. **European journal of plant pathology**, v. 153, p. 79-88, 2019.
- BEZERRA, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.
- BEZERRA, M. A. *et al.* Simplex optimization: A tutorial approach and recent applications in analytical chemistry. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 45-54, 2016.
- BEZERRA, M. A. *et al.* Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry—A review. **Talanta**, v. 194, p. 941-959, 2019.
- BIASI-GARBIN, R. P. *et al.* Antifungal potential of plant species from Brazilian Caatinga against dermatophytes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, p. 18, 2016.
- BODOIRA, R.; MAESTRI, D. Phenolic compounds from nuts: extraction, chemical profiles, and bioactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 927-942, 2020.
- BRITO, S. S. S. *et al.* *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial crops and products**, v. 113, p. 308-315, 2018.

ČABARKAPA, I. *et al.* Aromatic plants and their extracts pharmacokinetics and in vitro/in vivo mechanisms of action. *In: Feed additives*. Academic Press, 2020. p. 75-88.

CAO, Y. *et al.* MYB transcription factors as regulators of secondary metabolism in plants. **Biology**, v. 9, n. 3, p. 61, 2020.

CARVALHO, A. P. A.; CONTE-JUNIOR, C. A. Health benefits of phytochemicals from Brazilian native foods and plants: Antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, and risk factors of metabolic/endocrine disorders control. **Trends in Food Science & Technology**, v. 111, p. 534-548, 2021.

CARVALHO, Z. S. *et al.* Atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia alba* em *Aspergillus welwitschiae*. **MAGISTRA**, v. 33, n. 2023.

COSTA, S. N. O. Prospecção de metabólitos secundários relacionados com a resistência de *Psidium* spp. ao nematoide *Meloidogyne enterolobii*. 2021. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2021.

CUNHA, M. do C. L.; ALMEIDA, E. P.; FERREIRA, T. C. Seed bank induced with species native to the Caatinga (Fabaceae) in São Mamede, PB. **Revista Ciência Agrícola**, v. 19, n. 1, p. 9-16, 2021.

DAMMAK, I. *et al.* Evaluation of antifungal and anti-ochratoxigenic activities of *Salvia officinalis*, *Lavandula dentata* and *Laurus nobilis* essential oils and a major monoterpene constituent 1, 8-cineole against *Aspergillus carbonarius*. **Industrial Crops and Products**, v. 128, p. 85-93, 2019.

DANTAS, A. M. M. *et al.* Alternative control of post-harvest diseases in Tainung 1 papaya. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, p. 29-35, 2018.

DESMARCHELIER, C. *et al.* Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 67, n. 1, p. 69-77, 1999.

DHIFI, W. *et al.* Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

ESFANJANI, A. F.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Improving the bioavailability of phenolic compounds by loading them within lipid-based nanocarriers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 76, p. 56-66, 2018.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061-1067, 2004.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica chimica acta**, v. 597, n. 2, p. 179-186, 2007.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Multivariate optimization techniques in food analysis—A review. **Food chemistry**, v. 273, p. 3-8, 2019.

Flora do Brasil. **Fabaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB115>>. Acesso em: 18 nov. 2023.

FRIEDRICH, M. T. *et al.* Use of factorial design in the development of multiresidue method for determination of pesticide residues in wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 2541-2551, 2016.

GOUDA, M. *et al.* Recent innovations of ultrasound green technology in herbal phytochemistry: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 73, p. 105538, 2021.

GRZEGORCZYK-KAROLAK, I. *et al.* Accumulation of phenolic compounds in different in vitro cultures of *Salvia viridis* L. and their antioxidant and antimicrobial potential. **Phytochemistry Letters**, v. 30, p. 324-332, 2019.

HERRERA-POOL, E. *et al.* Effect of solvent polarity on the Ultrasound Assisted extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 76, p. 105658, 2021.

HMAIED, M. *et al.* Effect of Forest Biomass Pretreatment on Essential Oil Yield and Properties. **Forests**, v. 10, n. 11, p. 1042, 2019.

HORTA, M. C. *et al.* Detection of anti-Toxoplasma gondii antibodies in small wild mammals from preserved and non-preserved areas in the Caatinga biome, a semi-arid region of Northeast Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 14, p. 75-78, 2018.

JACOB, M. C. M. *et al.* Culture matters: A systematic review of antioxidant potential of tree legumes in the semiarid region of Brazil and local processing techniques as a driver of bioaccessibility. **Plos one**, v. 17, n. 3, p. e0264950, 2022.

JAIN, C.; KHATANA, S.; VIJAYVERGIA, R. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. **Int. J. Pharm. Sci. Res**, v. 10, n. 2, p. 494-504, 2019.

JUGREET, B. S. *et al.* Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. **Trends in Food Science & Technology**, v. 101, p. 89-105, 2020.

KABERA, J. N. *et al.* Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 2, n. 7, p. 377-392, 2014.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004.

KHARE, S. *et al.* Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. **Journal of Plant Biology**, v. 63, p. 203-216, 2020.

KHAN, M. *et al.* Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. **Food Research International**, v. 130, p. 108933, 2020.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328-2375, 2013.

KULBAT, K. The role of phenolic compounds in plant resistance. **Biotechnology and Food Science**, v. 80, n. 2, p. 97-108, 2016.

LASTA, H. F. B. *et al.* Pressurized liquid extraction applied for the recovery of phenolic compounds from beetroot waste. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101353, 2019.

LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica chimica acta**, v. 652, n. 1-2, p. 161-172, 2009.

LING, Y. Y. *et al.* Assessment of maceration, ultrasonic and microwave assisted extraction for total phenolic content, total flavonoid content and kaempferol yield from *Cassia alata* via microstructures analysis. **Materials Today: Proceedings**, v. 19, p. 1273-1279, 2019.

LIN, X. *et al.* Ultrasonic-assisted extraction for flavonoid compounds content and antioxidant activities of India *Moringa oleifera* L. leaves: Simultaneous optimization, HPLC characterization and comparison with other methods. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 20, p. 100284, 2021.

LOPES, M.T. R. *et al.* **Plantas que os polinizadores gostam**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. 1016 p.

MACÊDO, M. J. F. *et al.* Fabaceae medicinal flora with therapeutic potential in Savanna areas in the Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 738-750, 2018.

MAURYA, A. *et al.* Essential oils and their application in food safety. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 653420, 2021.

MEDEIROS, F. S. *et al.* Florística, fitossociologia e modelagem da distribuição diâ métrica em um fragmento de Caatinga em São Mamede-PB. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.14, n.2, p.85-95, 2018.

MONÇÃO, N. B. N.; ARAÚJO, B. Q.; CITÓ, A. M. G. L. Explorando a Química de Produtos Naturais e Propriedades Biológicas do Gênero *Mimosa Linnaeus* (FABACEAE-MIMOSOIDEAE). **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 3, p. 970-1010, 2019.

MUTLU-INGOK, A. *et al.* Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4711, 2020.

NOVAES, C. G. *et al.* A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical journal**, v. 128, p. 331-346, 2016.

OGBE, A. A.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. The role of endophytes in secondary metabolites accumulation in medicinal plants under abiotic stress. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 126-134, 2020.

OSORIO-TOBÓN, J. F. Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, p. 4299-4315, 2020.

PAGANO, M. C.; ZANDAVALLI, R. B.; ARAUJO, F. S. Biodiversity of arbuscular mycorrhizas in three vegetational types from the semiarid of Ceará State, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 67, p. 37-46, 2013.

PANDEY, A. K. *et al.* Distribution of aromatic plants in the world and their properties. *In: Feed additives*. Academic Press, 2020. p. 89-114.

PANZELLA, L. *et al.* Bioactive phenolic compounds from agri-food wastes: An update on green and sustainable extraction methodologies. **Frontiers in nutrition**, v. 7, p. 60, 2020.

RGUEZ, S. *et al.* Chemical composition and biological activities of essential oils of *Salvia officinalis* aerial parts as affected by diurnal variations. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 153, n. 2, p. 264-272, 2019.

RISWANTO, F. D. O. *et al.* Application of response surface methodology as mathematical and statistical tools in natural product research. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 9, n. 10, p. 125-133, 2019.

RIZWAN, K. *et al.* Phytochemistry and diverse pharmacology of Genus *Mimosa*: A review. **Biomolecules**, v. 12, n. 1, p. 83, 2022.

ROAA, M. H. A review article: The importance of the major groups of plants secondary metabolism phenols, alkaloids, and terpenes. **International Journal for**

Research in Applied Sciences and Biotechnology (IJRASB), v. 7, n. 5, p. 354-358, 2020.

ROMANOSKI, V. S.; SANTOS, R. A. F. Cytotoxic and Antioxidant Activity of *Mimosa verrucosa* Benth. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, p. 100-104, 2017.

RAVEAU, R.; FONTAINE, J.; LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, A. Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A review. **Foods**, v. 9, n. 3, p. 365, 2020.

SARKHOSH, A. *et al.* Antifungal activity of five plant-extracted essential oils Against anthracnose in papaya fruit. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 34, n. 1, p. 18-26, 2018.

SHARMA, S. *et al.* Essential oils as additives in active food packaging. **Food Chemistry**, v. 343, p. 128403, 2021.

SIL, A. *et al.* Essential oils: A boon towards eco-friendly management of phytopathogenic fungi. **J. Entomol. Zool. Stud**, v. 8, p. 1884-1891, 2020.

SILVA, S. A. N. M. *et al.* Phytochemical and biological prospection of *Mimosa* genus plants extracts from Brazilian northeast. **Phytochemistry letters**, v. 39, p. 173-181, 2020.

SILVA, P. H. R. *et al.* Caatinga biome plant extracts affect the planktonic growth and biofilm formation of *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. **Journal of Plant Pathology**, v. 102, p. 1245-1250, 2020.

SILVA, P. M. *et al.* Natural products from the Brazilian Caatinga as a sustainable source of phytocosmetics: a review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 17, p. e167111736940-e167111736940, 2022.

SOUZA, A. V. V. *et al.* Bioprospecção de plantas da Caatinga com potencial para produção de fitomedicamentos. **Revista Fitos**, v. 16, Supl. 2, p. 212-226, 2022.

SOUSA, E. E.; QUEIROZ, R. T.; PEREIRA, M. S. *Mimosa* L. (Fabaceae) em Cachoeira dos Índios, Paraíba, Brasil. **Acta Brasiliensis**, v. 5, n. 1, p. 35-43, 2021.

TAHERI, P.; SOWEIZY, M.; TARIGHI, S. Application of essential oils to control some important fungi and bacteria pathogenic on cereals. **Journal of Natural Pesticide Research**, v. 6, p. 100052, 2023.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre:Artmed, 2013. 879 p.

UWINEZA, P. A.; WAŚKIEWICZ, A. Recent advances in supercritical fluid extraction of natural bioactive compounds from natural plant materials. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3847, 2020.

VUOLO, M. M.; LIMA, V. S.; MARÓSTICA, M. R. Chapter 2-Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power, Editor (s): Maira Rubi Segura Campos. **Bioactive Compounds, Woodhead Publishing**, p. 33-50, 2019.

XU, J.; WANG, W.; LI, Y. Dough properties, bread quality, and associated interactions with added phenolic compounds: A review. **Journal of functional foods**, v. 52, p. 629-639, 2019.

YILMAZ, F. M. *et al.* Steviol glycosides and polyphenols extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves using maceration, microwave-, and ultrasound-assisted techniques. **Separation Science and Technology**, v. 56, n. 5, p. 936-948, 2021.

YUSOFF, I. M. *et al.* A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. **Food research international**, v. 157, p. 111268, 2022.

ARTIGO 1

OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS DE *Mimosa verrucosa*¹

¹ Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Microchemical Journal

OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS DE *Mimosa verrucosa*

Resumo: Os compostos fenólicos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sendo relevantes para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e agrícolas. Devido à complexidade das amostras, a escolha do método de extração de compostos fenólicos é crucial para obter resultados precisos. Na indústria de extração, os "processos verdes", como as extrações assistidas por ultrassom, ganham destaque devido à redução do tempo e consumo de água e solventes orgânicos. No entanto, a eficiência da extração por ultrassom é influenciada por diversos fatores, exigindo otimização para maximizar seus benefícios. Assim, objetivou-se otimizar um procedimento de extração assistido por ultrassom para identificar e quantificar compostos fenólicos em plantas de *Mimosa verrucosa*. O material vegetal foi coletado em Jequié – BA e seco em estufa com circulação forçada de ar a 45°C. O método de extração foi otimizado usando planejamento fatorial de dois níveis e superfície de resposta (planejamento Doehlert), para identificar as variáveis (volume do solvente, porcentagem de etanol, tempo e temperatura de extração) que influenciaram de maneira significativa nas respostas analíticas (fenólicos e flavonoides totais) e otimiza-las. A temperatura e o tempo de sonicação influenciaram positivamente na extração, sendo 25 minutos de sonicação e 60 °C a temperatura do solvente, as melhores condições experimentais. Além disso, a análise fitoquímica qualitativa detectou flavonoides, xantonas, galotaninos e triterpenoides nos extratos otimizados. Também foram identificados por HPLC-DAD 10 compostos fenólicos, rutina, ácido vanílico, gálico, *trans*-cinâmico, *d*-hidroxibenzoico, *p*-cumárico, cafeico, clorogênico, ferúlico e sináptico. A extração assistida por ultrassom demonstra eficácia na obtenção de compostos fenólicos nos extratos de folha de *M. verrucosa*.

Palavras-chave: Fitoquímicos, Banho ultrassônico, Planejamento Doehlert.

MULTIVARIATE OPTIMIZATION OF ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN *Mimosa verrucosa* PLANTS

Abstract: Phenolic compounds are known for their antioxidant and antimicrobial properties, being relevant for the food, pharmaceutical, and agricultural industries. Due to the complexity of samples, the choice of the method for extracting phenolic compounds is crucial to obtain accurate results. In the extraction industry, "green processes" such as ultrasound-assisted extractions are gaining prominence due to the reduction in time and consumption of water and organic solvents. However, the efficiency of ultrasound extraction is influenced by several factors, requiring optimization to maximize its benefits. Thus, the objective was to optimize an ultrasound-assisted extraction procedure to identify and quantify phenolic compounds in *Mimosa verrucosa* plants. Plant material was collected in Jequié – BA dried in an oven with forced air circulation at 45°C. The extraction method was optimized using two-level factorial design and response surface methodology (Doehlert design) to identify the variables (solvent volume, percentage of ethanol, extraction time and temperature) that significantly influenced analytical responses (total phenolics and flavonoids) and optimizes them. Sonication time and temperature positively influenced the extraction, with 25 minutes of sonication and 60°C solvent temperature being the best experimental conditions. Additionally, qualitative phytochemical analysis detected flavonoids, xanthones, gallotannins and triterpenoids in the optimized extracts. Ten phenolic compounds, including rutin, vanillic acid, gallic acid, *trans*-cinnamic acid, *o*-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, and sinapic acid, were also identified by HPLC-DAD. Ultrasound-assisted extraction demonstrated efficacy in obtaining phenolic compounds in *M. verrucosa* leaf extracts.

Keywords: Phytochemicals, Ultrasonic bath, Doehlert design.

1. Introdução

Os compostos fenólicos são metabólitos especiais que estão presentes em uma variedade de plantas. Essas substâncias têm propriedades antialérgicas, antimicrobianas e anti-inflamatórias, o que as torna muito interessantes para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e agrícolas. Devido à essa ampla presença nas plantas, pesquisas estão focadas na busca por novas variedades vegetais que possam ser fontes desses compostos (Osorio-Tobón, 2020). A *Mimosa verrucosa* Benth., uma arbórea da família Fabaceae, destaca-se como um possível recurso de compostos fenólicos, especialmente flavonoides, conforme indicado por estudos recentes (Romanoski; Santos, 2017; Silva *et al.*, 2020).

Devido à complexidade das amostras, o método de extração tem um impacto significativo nos resultados obtidos (Alara; Abdurahman; Ukaegbu, 2021). Métodos tradicionais, como aquecimento, fervura ou refluxo, têm desvantagens como o uso excessivo de solventes, tempos longos e rendimentos mais baixos. O crescente interesse em produtos provenientes de constituintes químicos presentes em plantas está impulsionando a busca por métodos eficientes, rápidos e econômicos de extração. Além da produtividade e economia, a sustentabilidade também se torna crucial na engenharia de processos, dadas as mudanças climáticas e a necessidade de reduzir os impactos ambientais. Na indústria da extração, os “processos verdes”, como as extrações assistidas por ultrassom (EAU), se destacam por reduzir o tempo necessário, o consumo energético, a quantidade de água utilizada e o uso de solventes orgânicos (Touami; Marir; Merouane, 2023).

O método em questão utiliza a cavitação acústica, que envolve a formação, crescimento e colapso de pequenas bolhas geradas pela compressão e expansão próximas à superfície do líquido e à interface entre líquido e sólido, resultando na quebra da parede celular, facilitando a entrada do solvente e a liberação dos compostos fenólicos. Além da cavitação, os efeitos sonocapilar e de sonoporação também podem ter um papel importante. O primeiro acelera a penetração do solvente nos poros celulares após o colapso das bolhas, enquanto o segundo está relacionado à permeabilidade celular em relação ao solvente para liberar o extrato (Patra; Abdullah; Pradhan, 2021). Estudos mostram que a eficiência da EAU de compostos fenólicos de materiais vegetais pode ser afetada pelo tempo de extração, volume de

solvente, relação massa-solvente e tipo do solvente (Moreira; Dias, 2018; Sousa *et al.*, 2020; Anjos *et al.*, 2021), havendo a necessidade de fazer uma otimização das condições de extração.

Em razão da geração abundante de dados analíticos e da complexidade dos resultados experimentais, a abordagem quimiométrica, especialmente o planejamento experimental, destaca-se como a escolha ideal para otimizar dados. O planejamento experimental, frequentemente utilizado para identificação, planejamento e avaliação estatística de fatores experimentais, é aprimorado pela metodologia de superfície de resposta (RSM). O RSM, uma forma especial de projeto experimental, emprega técnicas matemáticas e estatísticas para projetar, desenvolver, melhorar e otimizar processos, considerando as interações entre variáveis (Riswanto *et al.*, 2019).

A aplicação da técnica de EAU com misturas de água e etanol como solvente oferece a oportunidade de diminuir ou eliminar o uso de solventes tóxicos, além de melhorar o rendimento da amostra ou reduzir o tempo necessário para a extração. Assim, o objetivo do presente trabalho foi otimizar um procedimento de extração assistido por ultrassom para identificar e quantificar compostos fenólicos em plantas de *Mimosa verrucosa*.

2. Materiais e Métodos

Material vegetal

As folhas das plantas de *Mimosa verrucosa* (voucher HUESB12727) foram coletadas no bioma Caatinga, na cidade de Jequié (Latitude: 13° 51' 4" Sul, Longitude: 40° 4' 52" Oeste), Bahia, durante os meses de junho a agosto de 2022. O material vegetal foi submetido à secagem em uma estufa (Tecnal®, São Paulo, Brasil) com circulação forçada de ar a 45°C até atingir massa constante. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em recipientes de vidro e armazenadas no congelador até serem utilizadas.

Instrumentação e reagentes

Todos os reagentes utilizados na pesquisa foram de grau analítico. O reagente de Folin-Ciocalteu e os padrões de quercetina, rutina, ácido vanílico, gálico, trans-

cinâmico, d-hidroxibenzoico, p-cumárico, cafeico, clorogênico, ferúlico e sináptico foram provenientes da Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, EUA). O etanol, ácidos sulfúrico e clorídrico, hidróxido de sódio, anidrido acético e o clorofórmio utilizados nos experimentos foram adquiridos pela J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Méx., México, a água ultrapura (18, 2 MΩ cm) foi obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). Os tubos de ensaio contendo o material vegetal e solvente foram submetidos a sonicação em um banho ultrassônico (Elma Ultrasonic S10H®, F.: 50/60 Hz, P.: 90 W, Alemanha) e, posteriormente, centrifugados em uma centrífuga por 3 minutos a 1125 G. A análise das amostras por cromatografia foi conduzida utilizando um sistema HPLC modelo 1260 Infinity (Agilent, Califórnia, EUA). Este sistema inclui um injetor automático G4226A, sistema de bomba Quaternária GA4202A 1290 Quart Pump e um detector de arranjo de diodos (modelo G4212B). Na execução dessa análise, foi utilizada uma coluna Zorbax ODS C18, com dimensões 25cm x 4.6 mm x 5 µm.

Otimização das variáveis experimentais da extração assistida por ultrassom

Foi empregado um planejamento fatorial de dois níveis (2⁴) para a avaliação preliminar de quatro fatores, abrangendo as variáveis: concentração de etanol (Ce), volume do solvente (Vol), tempo de sonicação (Tm) e temperatura do solvente (Ts), cujos valores foram determinados com base em literatura. Após avaliação da significância das variáveis e suas interações, as variáveis que impactaram de maneira significativa na resposta analítica foram otimizadas utilizando o planejamento Doehlert como metodologia de superfície de resposta. A quantidade de folha utilizada em cada amostra foi de 0,1 g. Para otimizar simultaneamente as respostas (fenólicos e flavonoides totais), foi adotada a função de desejabilidade em todos os experimentos conduzidos.

Determinação dos compostos fenólicos totais

O teor de fenólicos totais nos extratos de folhas de *M. verrucosa* foi determinado utilizando a metodologia de Slinkard e Singleton (1977) com adaptações. Em um balão volumétrico de 10 mL, foram combinados 300 µL do extrato da amostra, 1 mL de uma

solução saturada de carbonato de sódio e 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, sendo o volume completado com água destilada. Após uma reação de 60 minutos à temperatura ambiente e em ambiente escuro, as leituras foram realizadas em um espectrofotômetro Biochrom a 750 nm (Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Os testes foram conduzidos em triplicata, e o teor total de compostos fenólicos foi calculado utilizando a curva de calibração do ácido gálico (0 – 25 mg L⁻¹), expresso em equivalente de ácido gálico.

Determinação dos flavonoides totais

Foi utilizada a metodologia proposta por Marques *et al.* (2012) com modificações para determinação dos flavonoides nos extratos de *M. verrucosa*. Foram adicionados em um balão volumétrico de 10 mL, 1 mL do extrato da folha e 2,0 mL de uma solução etanólica de AlCl₃ (5%, m v⁻¹), em seguida o volume foi completado com uma solução hidroalcoólica (40%, v v⁻¹). Após as etapas, aguardou-se um período de 30 minutos antes de efetuar as medições utilizando um espectrofotômetro Biochrom a 408 nm (Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Os testes foram conduzidos em triplicata. O teor total de flavonoides foi determinado utilizando a curva de calibração com padrão de quercetina (0 – 35 mg L⁻¹), e os resultados foram expressos em equivalente de quercetina.

Análise qualitativa do perfil fitoquímico

Os extratos foram analisados quanto à presença de flavonoides, taninos, esteroides/triterpenoides, saponinas e alcaloides. Foram aplicadas as metodologias ajustadas de Matos (2009), Joshi, Bhobe e Sattarkar (2013), Azevedo *et al.* (2014) e Iqbal, Salim e Lim (2015).

Flavonoides (Shinoda)

Num tubo de ensaio foram adicionados 0,5 mL do extrato, 10 gotas de ácido clorídrico e por último um pedaço de fita de magnésio (0,5 cm). A observação de uma coloração rosa, avermelhada ou marrom indicou a presença de flavonoides.

Antocianinas, antocianidinas e flavonoides

Foram preparados três tubos de ensaio, nos quais cada um recebeu 1 mL do extrato hidroalcoólico. Um deles foi acidulado para atingir um pH de 3 (1), o segundo foi alcalinizado para um pH de 8 (2), e o terceiro para um pH de 11 (3), utilizando HCl 0,5 mol L⁻¹ e NaOH 0,5 mol L⁻¹. A observação das mudanças na coloração do material vermelho, lilás e azul púrpura nos tubos 1, 2 e 3, respectivamente, indica a presença de antocianidinas. A coloração amarela no tubo 3, a presença de flavonas, flavonóis e xantonas. A coloração vermelha nos tubos 1 e 3 indica a presença de chalconas e auronas. A coloração vermelho-laranja no tubo 3 indica a presença de flavanonois.

Leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

Foram preparados dois tubos de ensaio, nos quais cada um recebeu 1 mL do extrato hidroalcoólico. Um deles foi acidulado pela adição de HCl 0,5 mol L⁻¹ até atingir pH 3, enquanto o outro foi alcalinizado com NaOH 0,5 mol L⁻¹ até atingir pH 11. Ambos foram aquecidos cuidadosamente com o auxílio de uma lamparina. Qualquer alteração na cor foi observada em comparação com os tubos correspondentes utilizados no teste anterior. O surgimento ou intensificação da cor indicou a presença de constituintes específicos, como a coloração vermelha no tubo 1, indicando a presença de leucoantocianidinas, amarela no tubo 1, indicando a presença de catequinas, e vermelho-laranja no tubo 2, indicando a presença de flavanonas.

Taninos

Adicionaram-se 3 gotas de solução alcoólica de FeCl₃ (5% p v⁻¹) a 1 mL do extrato, uma coloração verde indicou a presença de galotaninos, enquanto uma coloração marrom indica a presença de pseudotaninos, e a coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

Saponina

Em um tubo de ensaio foram adicionados 2 mL do extrato e acrescentados 2 mL de clorofórmio e 5 mL de água destilada. Posteriormente, a solução foi agitada vigorosamente, e observou-se a formação de espuma. A persistência da espuma ao ser aquecida em banho-maria por 5 minutos evidenciou a presença de saponinas.

Esteróide/triterpenóides

- **Teste de Lieberman-Burchard:**

Em 2 mL do extrato foram adicionados 2 mL de clorofórmio, seguido pela adição de 1 mL de anidrido acético. Após agitar suavemente, foram adicionadas três gotas de ácido sulfúrico concentrado pelas paredes do tubo. Um anel de cor marrom se formou na junção das duas camadas, se a camada superior adquirir coloração verde, indica a presença de esteróides. Por outro lado, a formação de uma cor vermelha profunda indica a presença de triterpenóides.

- **Teste de Salkowshi:**

Foi adicionado em um tubo de ensaio 1 mL do extrato e 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, a formação da coloração vermelha indica a presença de esteróides, enquanto a coloração amarela indicou a presença de triterpenóides.

Alcaloide

Adicionaram-se 2 mL do extrato em um tubo de ensaio, em seguida foi alcalinizado com 15 gotas de hidróxido de sódio a 1% e acrescentados de 2 mL de água e 2 mL de clorofórmio. A porção aquosa foi descartada, e a fração clorofórmica foi tratada com quinze gotas de ácido clorídrico a 1%. Posteriormente, ocorreu a extração com 2 mL de água. A fase clorofórmica foi descartada, e os testes foram realizados com a fração aquosa ácida, à qual foram adicionadas três gotas do reagente de Drangendorff para verificar a presença de alcalóides. A formação de um precipitado laranja ou laranja avermelhado indica a presença de alcalóide.

Análise cromatográfica das amostras

Os compostos fenólicos (rutina, ácido vanílico, gálico, *trans*-cinâmico, *d*-hidroxibenzoico, *p*-cumárico, cafeico, clorogênico, ferúlico e sináptico) foram identificados por meio da comparação com espectros padrão em cada tempo de retenção. Os extratos filtrados (membrana de 0,45 µm) foram injetados no CLAE (Agilent, California, USA). A fase estacionária foi uma coluna Zorbax ODS-C18 (25cm x 4.6 mm x 5 µm). A fase móvel foi constituída por solvente A, metanol + ácido acético + água (5% + 2% + 93%) enquanto o solvente B uma mistura de metanol + ácido acético + água (88% + 2% + 10%). O gradiente utilizado foi 0-10 min, 100% A; 10-15 min, 85% A; 15-30 min, 70% A e 30-60 min, 50% A, a um fluxo de 1 mL min⁻¹. Os compostos foram testados em diferentes comprimentos de onda (nm): 260 ácido vanílico e rutina; 272 ácido gálico e *trans*-cinâmico; 310 ácido *p*-cumárico e *d*-hidroxibenzoico; 330 ácido clorogênico, cafeico, ferúlico e sináptico.

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas no programa Statistica 7.0 para Windows (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

3.Resultados e Discussão

Planejamento fatorial completo de dois níveis

Foi utilizado um planejamento fatorial de dois níveis para identificar as variáveis que influenciaram de maneira significativa nas respostas analíticas. Os resultados dos teores de fenólicos e flavonoides totais nos extratos de folhas de *M. verrucosa*, obtidos por meio desse planejamento, são apresentados na Tabela 1. As concentrações de fenólicos totais nos extratos variaram de 4,730 a 27,483 mg EAG g⁻¹, enquanto os teores de flavonoides totais variaram de 1,566 a 11,914 mg EQ g⁻¹.

Tabela 1 – Planejamento fatorial completo de dois níveis ²⁴ na extração de compostos fenólicos em *M. verrucosa*.

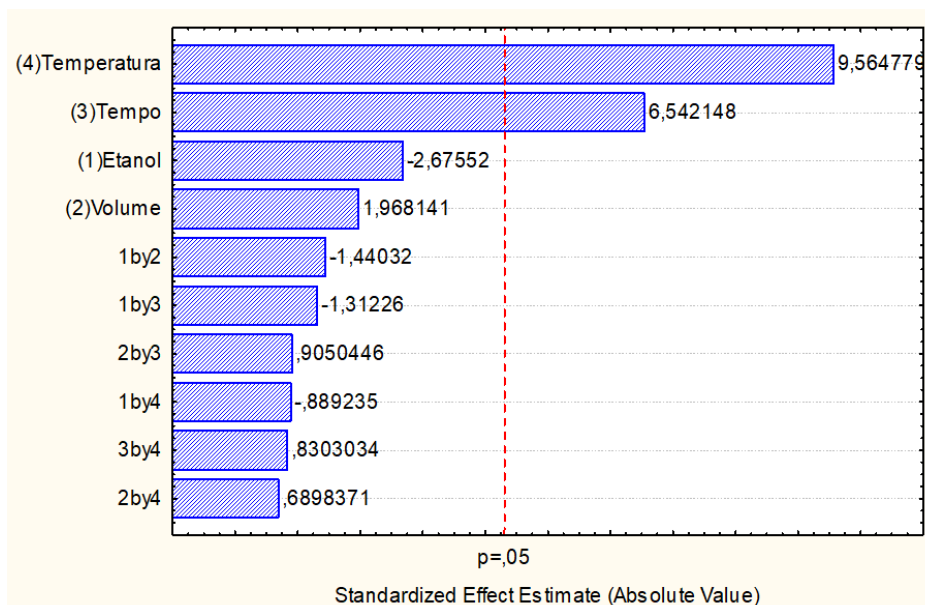
Experimentos	Ce (v/v %)	Vol (mL)	Tm (min)	Ts (°C)	Fenólicos Totais ¹	Flavonoides Totais ²
--------------	---------------	-------------	-------------	------------	----------------------------------	------------------------------------

1	40 (-) ³	6 (-)	5(-)	40 (-)	4,899	1,566
2	70 (+)	6 (-)	5(-)	40 (-)	4,730	1,881
3	40 (-)	16 (+)	5(-)	40 (-)	8,710	1,959
4	70 (+)	16 (+)	5(-)	40 (-)	7,481	1,696
5	40 (-)	6 (-)	25(+)	40 (-)	11,820	4,474
6	70 (+)	6 (-)	25(+)	40 (-)	8,569	4,204
7	40 (-)	16 (+)	25(+)	40 (-)	15,021	5,053
8	70 (+)	16 (+)	25(+)	40 (-)	10,482	3,425
9	40 (-)	6 (-)	5(-)	60 (+)	12,466	6,691
10	70 (+)	6 (-)	5(-)	60 (+)	10,213	7,524
11	40 (-)	16 (+)	5(-)	60 (+)	16,735	6,477
12	70 (+)	16 (+)	5(-)	60 (+)	12,464	5,199
13	40 (-)	6 (-)	25(+)	60 (+)	15,684	11,211
14	70 (+)	6 (-)	25(+)	60 (+)	12,463	11,914
15	40 (-)	16 (+)	25(+)	60 (+)	27,483	11,755
16	70 (+)	16 (+)	25(+)	60 (+)	17,887	9,278
17	55 (0)	11 (0)	15(0)	50 (0)	12,539	4,802
18	55 (0)	11 (0)	15(0)	50 (0)	13,428	5,892
19	55 (0)	11 (0)	15(0)	50 (0)	15,309	7,120

¹ Concentração expressa em mg de equivalente a ácido gálico g⁻¹; ² Concentração expressa em mg de equivalente de quercetina g⁻¹; ³ Limite inferior (-), limite superior (+) e ponto central (0).

A partir do planejamento fatorial completo (conforme apresentado na Tabela 1), foi gerado o gráfico de Pareto (Figura 1). Observou-se que os diferentes valores de volume do solvente e concentração de etanol não tiveram uma influência significativa na resposta analítica. Em contraste, tanto o tempo de sonicação quanto a temperatura do solvente apresentaram influência significativa, e tiveram efeito positivo. Em outras palavras, um aumento tanto no tempo de extração quanto na temperatura do solvente resultou em um aumento na resposta de desejabilidade.

Figura 1 – Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo de dois níveis.



A temperatura demonstrou ser o fator de maior influência no rendimento dos compostos fenólicos extraídos, sendo este um fator crucial para controlar a extração visando a recuperação eficiente de fenólicos. A extração em temperaturas mais elevadas favorece o rendimento ao promover uma melhor difusão dos compostos, pois proporciona o aumento do coeficiente de difusão do soluto, bem como da solubilidade, ao mesmo tempo em que reduz a tensão superficial e viscosidade do solvente (Zardo *et al.*, 2019). A segunda variável que teve um impacto positivo no rendimento da extração foi o tempo. Para alcançar uma maior difusão dos compostos fenólicos durante a extração assistida por ultrassom, pode ser necessário longos tempos de extração. A transferência de massa do material vegetal para o solvente se intensifica ao longo do tempo. Entretanto, é importante salientar que períodos de extração mais longos podem favorecer a degradação dos compostos fenólicos, comprometendo a qualidade dos extratos vegetais (Cavuldak *et al.*, 2019).

Planejamento Doehlert

As variáveis que tiveram uma influência significativa nas respostas analíticas foram otimizadas utilizando o planejamento Doehlert, enquanto aquelas que não influenciaram foram fixadas em valores específicos (6 mL) e concentração de etanol (55%). A superfície de resposta e o perfil de desejabilidade (Figuras 2 e 3) destacam o efeito da temperatura (TS) e do tempo de sonicação (T) na extração de compostos

fenólicos das folhas de *M. verrucosa*. O planejamento Doehlert foi conduzido seguindo os experimentos descritos na Tabela 2, que inclui os valores codificados, os valores reais e as respostas referentes aos rendimentos totais de fenólicos e flavonoides.

Tabela 2- Planejamento Doehlert para as variáveis temperatura (TS) e do tempo de sonicação (T) na extração de compostos fenólicos de folhas de *M. verrucosa*.

Experimentos	Ts (°C)	Tm (min)	Fenólicos Totais ¹	Flavonoides Totais ²
1.1	0 ³ (50) ⁴	0 (15)	7,195	2,585
1.2	0 (50)	0 (15)	9,094	3,806
1.3	0 (50)	0 (15)	10,161	3,993
2	1 (60)	0 (15)	19,991	9,133
3	0,5 (55)	0,866 (25)	17,905	7,037
4	-1 (40)	0 (15)	6,231	2,899
5	-0,5 (45)	-0,866 (5)	3,616	1,413
6	0,5 (55)	-0,866 (5)	4,517	2,031
7	-0,5 (45)	0,866 (25)	12,226	4,701

¹Concentração expressa em mg de Ac. Gálico g⁻¹; ² Concentração expressa em mg de Quercetina g⁻¹;

³ valores codificados; ⁴ () Valores reais.

A extração realizada a 45°C por 5 minutos (Tabela 2) resultou em uma redução na recuperação de fenólicos e flavonoides totais das folhas de *M. verrucosa*. A obtenção dos maiores teores de compostos fenólicos ocorreu quando foi combinado um tempo de extração mais longo com uma temperatura mais elevada. O perfil de desejabilidade revelou que as melhores condições foram um tempo de sonicação de 25 minutos e uma temperatura de extração de 60°C. Essa combinação proporcionou a diminuição da tensão superficial do solvente, enquanto simultaneamente aumentava a pressão de vapor, resultando na formação de bolhas de cavitação e aumento do rendimento da extração (Cavuldak *et al.*, 2019).

Figura 2 – Superfície de Resposta e Superfície de Contorno para otimização das variáveis.

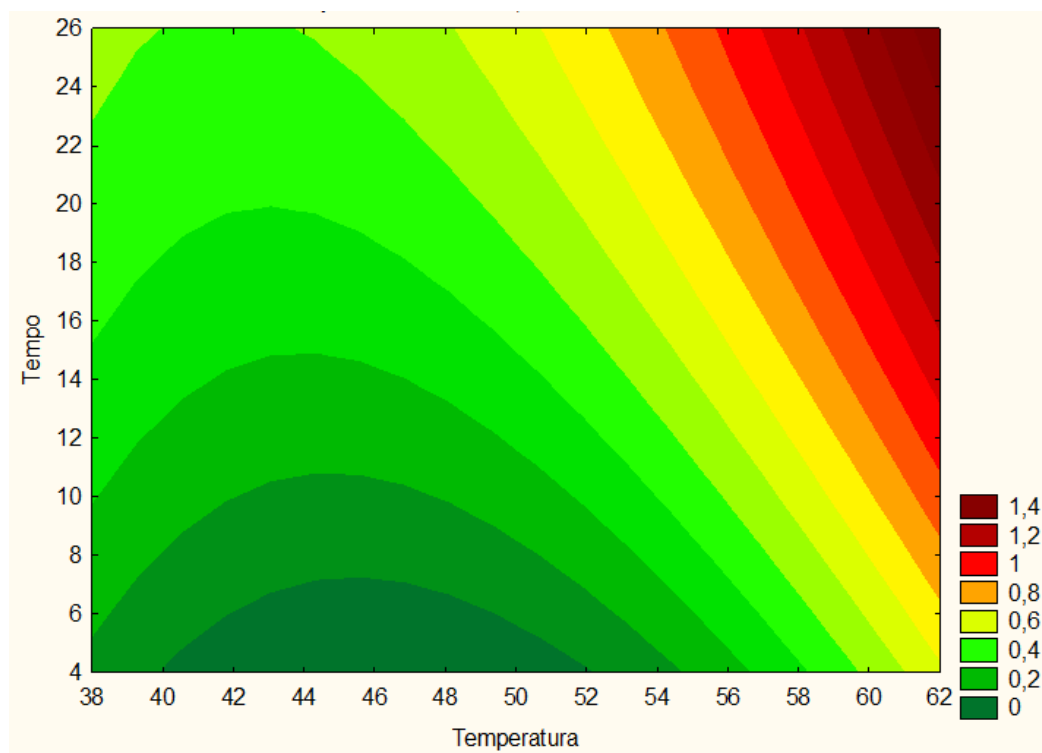
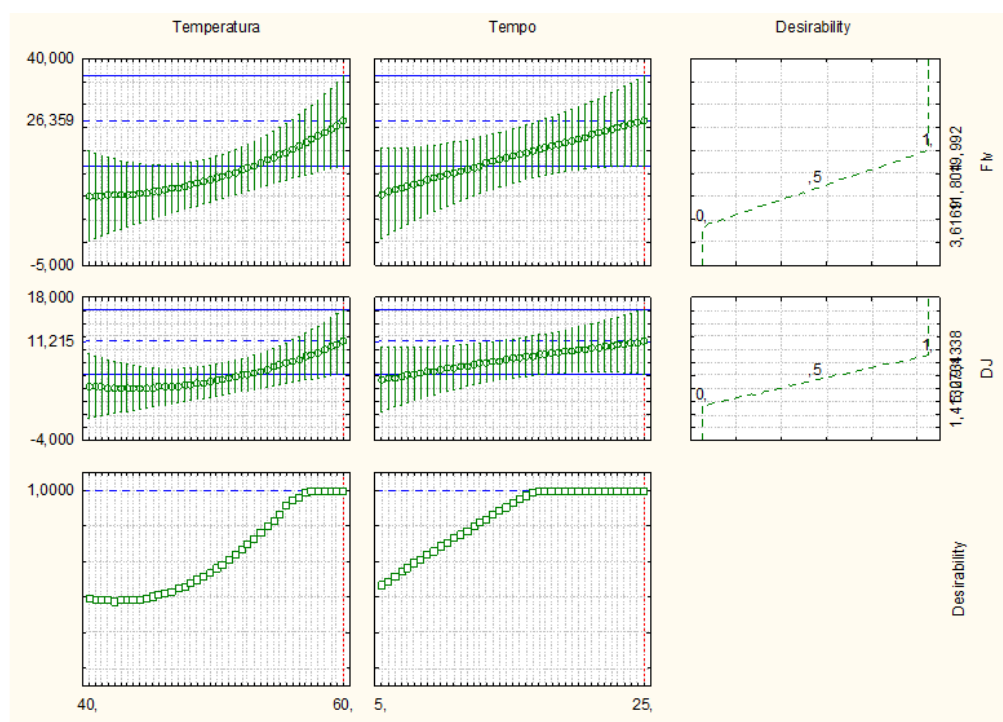


Figura 3 – Perfil dos valores preditos das desejabilidades individuais e global usando planejamento Doehlert na otimização.



As temperaturas mais elevadas proporcionaram um aumento no rendimento dos compostos fenólicos extraídos das folhas de *M. verrucosa*. Em um estudo anterior

mentionado na literatura, Anjos e colaboradores notaram que o rendimento de compostos fenólicos e flavonoides totais aumentava quando o solvente extrator era aquecido a uma temperatura de 55 °C (Anjos *et al.*, 2021). De maneira semelhante, Sousa *et al.* (2020) observaram que a temperatura de 54,8 °C era ideal para aumentar a extração de flavonoides totais das folhas de *C. heliotropiifolus* utilizando um solvente hidroetanólico.

Validação do método

Adição e recuperação

Foi realizado o teste de adição e recuperação para verificar a precisão do método analítico. As recuperações foram realizadas com adição de ácido gálico e quercetina no extrato das folhas de *M. verrucosa*.

As porcentagens de recuperação foram calculadas usando a seguinte equação: $R(\%) = (C_s - C_o) / (C_{add}) \times 100$, onde C_s representa a concentração do analito na amostra após adição, C_o é a concentração inicial do analito na amostra e C_{add} é a quantidade de analito adicionada à amostra. Os resultados obtidos variaram de 83% a 116% (Tabela 3), indicando que a matriz da amostra não influencia nos resultados obtidos por meio deste método analítico.

Tabela 3 – Teste de recuperação no extrato das folhas *M. verrucosa*.

Analito	Add (mg L ⁻¹)	Encontrado (mg g ⁻¹)	Recuperação (%)
Ácido gálico	0,0	18,5	
	5,0	20,5	116
	10,0	21,5	83
Quercetina	0,0	2,6	
	5,0	3,4	114
	10,0	4,3	113

Aplicação

Os metabólitos especiais identificados nos extratos vegetais exercem uma variedade de funções dentro da planta e podem proporcionar benefícios à saúde humana. Realizou-se uma avaliação fitoquímica qualitativa para identificar as classes químicas presentes no extrato otimizado das folhas de *M. verrucosa*. A Tabela 4 exibe a detecção de flavonoides (flavonas, flavonóis, catequinas), xantonas, galotaninos e triterpenoides no extrato. Resultados similares foram reportados no estudo de Romanoski e Santos (2017), onde foi identificado flavonoides no extrato etanólico das folhas de *M. verrucosa*. De maneira semelhante a este trabalho, Romanoski e Santos não observaram a presença de alcaloides no extrato de *M. verrucosa*, embora algumas espécies do gênero *Mimosa* sejam conhecidas por possuírem alcaloides alucinógenos, como a N,N-dimetiltriptamina (DMT).

Tabela 4 - Caracterização fitoquímica qualitativa dos extratos de *Mimosa verrucosa* obtidos após a otimização.

Metabólitos secundários	Extrato da folha
Fenóis totais	+
Flavonoides (Shinoda)	+
Flavonas, Flavonois, Xantonas	+
Chalconas, Auronas	-
Flavanonois	-
Flavanonas	-
Catequinas	+
Antocianidinas	-
leucoantocianidinas	-
Galotaninos	+
Pseudotaninos	-
Taninos hidrolisáveis	-
Saponinas	-
Esteróide	-
Triterpenoides	+
Alcaloide	-

(+) Presente; (-) Não detectado.

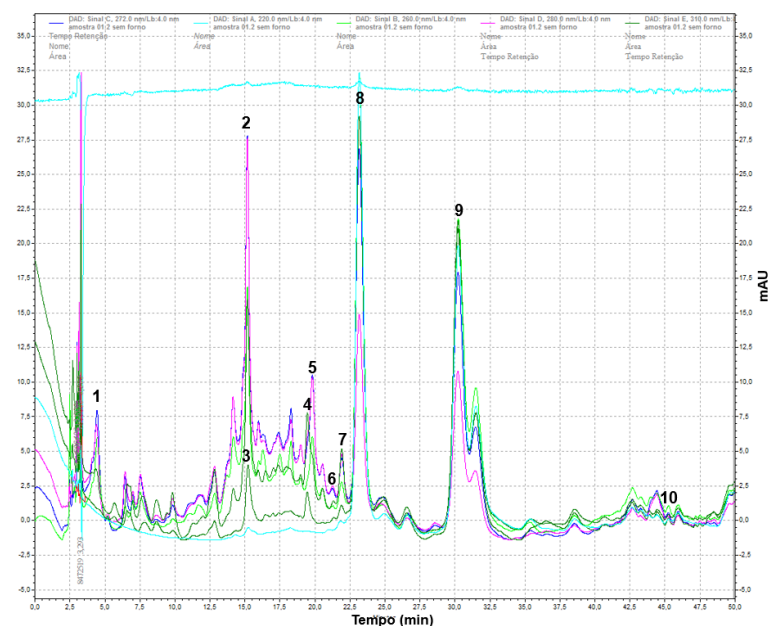
A detecção de taninos e flavonoides pode estar associada ao fato de serem correspondentes a extratos hidroetanólicos (55%), indicando que a escolha do solvente para a extração foi adequada. Geralmente, acredita-se que solventes com maior polaridade apresentem melhor desempenho na extração de polifenóis, devido à alta solubilidade desses compostos nesses solventes (Alara; Abdurahman; Ukaegbu, 2021). Compostos como taninos e flavonoides, devido à sua maior

solubilidade em solventes polares, são extraídos de maneira mais eficiente em comparação com outros compostos que não apresentam a mesma afinidade por etanol e água (Silva *et al.*, 2020).

Os flavonoides, presentes em folhas, flores, raízes e frutos, representam um dos grupos de grande importância e diversificado de metabólitos secundários. Pertencendo à classe dos compostos fenólicos, desempenham papel crucial na pigmentação e atração de polinizadores nas plantas. Além de suas propriedades antioxidantes ao inibir espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido e radicais peroxil, os flavonoides também exibem atividade antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral. Por outro lado, os taninos vegetais, polifenólicos com diversos pesos moleculares, demonstram propriedades antidiabéticas, antioxidantes, anti-inflamatórias e cicatrizantes (Silva *et al.*, 2020).

Compostos fenólicos nos extratos otimizados de folhas das *M. verrucosa* foram identificados e quantificados por HPLC-DAD. Os cromatogramas dos extratos obtidos em 220, 260, 272, 280, 310 nm, é ilustrado na Figura 4. Foram identificados 10 compostos fenólicos, rutina, ácido vanílico, gálico, *trans*-cinâmico, *d*-hidroxibenzoico, *p*-cumárico, cafeico, clorogênico, ferúlico e sináptico, no extrato otimizado das folhas de *M. verrucosa*.

Figura 4 - Cromatograma dos compostos fenólicos encontrados no extrato otimizado das folhas de *M. verrucosa*. 1: ácido gálico; 2: ácido vanílico; 3: ácido cafeico; 4: ácido *d*-hidroxibenzoico; 5: ácido *p*-cumárico; 6: ácido clorogênico; 7: ácido ferúlico; 8: ácido sináptico; 9: rutina; 10: ácido *trans*-cinâmico.



A quantidade de compostos fenólicos, calculada a partir das curvas de calibração, é mostrada na Tabela 5.

Tabela 5 – Concentração dos compostos fenólicos identificados no extrato otimizado de *M. verrucosa*.

Compostos fenólicos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Rutina	3628,5 \pm 350,9
Ácido vanílico	282,8 \pm 20,2
Ácido gálico	267,5 \pm 31,2
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	<LQ
Ácido d-hidroxibenzoico	2,5 \pm 1,0
Ácido <i>p</i> -cumárico	<LQ
Ácido cafeico	70,5 \pm 24,8
Ácido clorogênico	<LQ
Ácido ferúlico	<LQ
Ácido sináptico	2,7 \pm 0,3

<LQ: abaixo do limite de quantificação.

Esse é o primeiro trabalho relatando o perfil fenólico dos extratos de folhas de *M. verrucosa*. Na literatura encontram-se trabalhos sobre o perfil fenólico de outras espécies do gênero *Mimosa*, como o de Oliveira *et al.* (2024), que identificaram

flavonoides e outros compostos fenólicos por ESI-MS/MS e HPLC-DAD no extrato seco e na fração acetato de etila de *Mimosa caesalpiniiifolia*, e encontraram ácido gálico, galato de metila, galato de etila, catequina, quercetina, apigenina, rutina, cassiaocidentalina A, 5-hidroxi- 4',7-dimetoxi-flavona, entre outros. Gandhi *et al.* (2023) encontraram ácido clorogênico, catequina e epicatequina nos extratos metanólicos de folhas de *Mimosa pudica* avaliados pelo HPLC-DAD.

No extrato otimizado, a rutina foi o composto fenólico majoritário encontrado, seguido de ácido vanílico e gálico. A rutina é um flavonol glicosídeo que tem sido amplamente estudado devido às suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, anticancerígenas e antidiabéticas. Além disso, nas plantas, a rutina desempenha o papel de proteger os órgãos contra a radiação solar ultravioleta (Luthar *et al.*, 2020).

A extração assistida por ultrassom revela-se eficaz na identificação e quantificação de compostos fenólicos, principalmente a rutina, no extrato de *M. verrucosa*. Chew *et al.* (2023) também concluíram que a extração assistida por ultrassom (tempo de extração: 20 min; solução extratora: 20% de etanol; tamanho de partícula: 710 µm e razão sólido-líquido: 1:650) mais eficiente em termos de utilização de recursos, pois exigiu a menor quantidade de energia para cada mg/g de rutina extraída das folhas de mamão fêmea.

O extrato de *M. verrucosa* tem potencial para ser utilizado em processos e produtos, sendo necessários testes adicionais para avaliar seu potencial antioxidante e antimicrobiano.

4. Conclusões

A extração assistida por ultrassom demonstra eficácia na obtenção de compostos fenólicos nos extratos de folha de *M. verrucosa*.

O método de otimização de resposta múltipla revelou-se apropriado, promovendo aumento simultâneo em todas as variáveis respostas.

Os fatores de extração, temperatura do solvente e o tempo de extração, proporcionaram efeitos significativos nas variáveis resposta. As melhores condições de extração foram determinadas como 25 minutos para o tempo de sonicação e 60 °C para a temperatura de extração.

No que se refere ao perfil fitoquímico dos extratos obtidos, observou-se a presença de flavonoides, taninos, triterpenoides e, principalmente os compostos fenólicos: rutina, ácido vanílico, gálico, *trans*-cinâmico, *d*-hidroxibenzoico, *p*-cumárico, cafeico, clorogênico, ferúlico e sináptico por HPLC-DAD.

5. Referências Bibliográficas

ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200-214, 2021.

ANJOS, G. L. *et al.* Multivariate optimization of an ultrasound-assisted extraction method of bioactive phenolic compounds in malagueta peppers (*Capsicum frutescens*). **Food Analytical Methods**, v. 14, p. 2607-2616, 2021.

AZEVEDO, L. F. P. *et al.* Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, p. 209-215, 2014.

CAVULDAK, Ö. A. *et al.* Optimization of ultrasound-assisted water extraction conditions for the extraction of phenolic compounds from black mulberry leaves (*Morus nigra* L.). **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 5, p. e13132, 2019.

CHEW, S. K. *et al.* Rutin extraction from female *Carica papaya* Linn. using ultrasound and microwave-assisted extractive methods: Optimization and extraction efficiencies. **Heliyon**, v. 9, n. 10, 2023.

GANDHI, M. Y. *et al.* Quantification of Phytochemicals and Metal Ions as well as the Determination of Volatile Compounds, Antioxidant, Antimicrobial and Antacid Activities of the *Mimosa pudica* L. Leaf: Exploration of Neglected and Under-Utilized Part. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 10, p. e202301049, 2023.

IQBAL, E.; SALIM, K. A.; LIM, L. B. L. Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. **Journal of King Saud University-Science**, v. 27, n. 3, p. 224-232, 2015.)

JOSHI, A.; BHOBE, M.; SATTARKAR, A. Phytochemical investigation of the roots of *Grewia microcos* Linn. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 7, p. 80-87, 2013.

LUTHAR, Z. *et al.* Breeding buckwheat for increased levels of rutin, quercetin and other bioactive compounds with potential antiviral effects. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1638, 2020.

MARQUES, G. S. *et al.* Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* LINK. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 2009. 125p.

MOREIRA, G. C.; DIAS, F. S. Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin and trans-cinnamic acid in *Physalis angulata* L. and determination by HPLC DAD. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 247-252, 2018.

OLIVEIRA, V. C. *et al.* Chemical profile and evaluation of the pharmacological activity of the dry extract and fraction of ethyl acetate obtained from the leaves of *Mimosa caesalpiniiifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 323, p. 117716, 2024.

OSORIO-TOBÓN, J. F. Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, p. 4299-4315, 2020.

PATRA, A.; ABDULLAH, S.; PRADHAN, R. C. Application of artificial neural network-genetic algorithm and response surface methodology for optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from cashew apple bagasse. **Journal of Food Process Engineering**, v. 44, n. 10, p. e13828, 2021.

RISWANTO, F. D. O. *et al.* Application of response surface methodology as mathematical and statistical tools in natural product research. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 9, n. 10, p. 125-133, 2019.

ROMANOSKI, V. S.; SANTOS, R. A. F. Cytotoxic and Antioxidant Activity of *Mimosa verrucosa* Benth. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, p. 100-104, 2017.

SILVA, S. A. N. M. *et al.* Phytochemical and biological prospection of *Mimosa* genus plants extracts from Brazilian northeast. **Phytochemistry letters**, v. 39, p. 173-181, 2020.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, n. 1, p. 49-55, 197.

SOUSA, C. B. C. *et al.* Greener ultrasound-assisted extraction of bioactive phenolic compounds in *Croton heliotropiifolius* Kunth leaves. **Microchemical Journal**, v. 159, p. 105525, 2020.

TOUAMI, Y.; MARIR, R.; MEROUANE, F. Improvement of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic content of the plant *Cytisus triflorus* L'Her as a natural resource using artificial neural network modeling and multi-objective optimization. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 32, p. 101032, 2023.

ZARDO, I. *et al.* Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from sunflower seed cake using response surface methodology. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, p. 33-44, 2019.

ARTIGO 2

TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mimosa verrucosa* BENTH.²

² Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico da Industrial Crops and Products

TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mimosa verrucosa* BENTH.

Resumo: A Caatinga possui uma biodiversidade única, destacando-se por apresentar espécies ricas em fitoquímicos, como a *M. verrucosa*. Esta arbórea é estudada por apresentar bioativos, como compostos fenólicos e óleo essencial (O.E.). Os O.E. são complexas misturas de compostos voláteis com várias atividades biológicas, que são dependentes de sua composição química, e esta última é influenciada por diversos fatores. Assim, objetivou-se determinar o teor e a composição química do O.E. em diferentes órgãos da planta *M. verrucosa*. As plantas de *Mimosa* foram coletadas em Jequié, Bahia, em outubro de 2022. A extração do O.E. foi por hidrodestilação utilizando aparelho Clevenger. O teor do óleo essencial foi calculado por meio do método da base livre da umidade (BLU) utilizando a fórmula: $To = ((Vo / Bm - ((Bm \times U) / 100)) \times 100$. O O.E. foi analisado por CG/EM e os compostos foram identificados por meio de seus índices de retenção. Os teores da extração dos O.E. das folhas e frutos da *M. verrucosa* foram 1,17% e 0,25%, respectivamente. O do caule ficou abaixo do limite de quantificação, só foi possível obter o hidrolato. Os dados obtidos neste trabalho indicam uma variação significativa na composição e concentração dos compostos entre o fruto e a folha. O O.E. do fruto apresentou 35 constituintes, e uma maior percentagem de monoterpenos, o da folha, 43 compostos e maiores quantidades de sesquiterpenos hidrocarbonetos. Os componentes majoritários encontrados nos O.E. foram Cariofileno e β -Pineno. Conclui-se que mesmo sendo provenientes da mesma planta, há diferença no teor e perfil químico do O.E. entre órgãos/partes da *M. verrucosa*.

Palavras-chave: Caatinga, Cromatografia gasosa, Terpenos.

CONTENT AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS FROM *Mimosa verrucosa* BENTH.

Abstract: The Caatinga has a unique biodiversity, standing out for having species rich in phytochemicals, such as *M. verrucosa*. This tree is studied for presenting bioactives, including phenolic compounds and essential oil (E.O.). E.O. are complex mixtures of volatile compounds with several biological activities, which are dependent on their chemical composition, and the latter is influenced by several factors. Thus, the objective was to determine the content and chemical composition of the essential oil in different organs of *M. verrucosa* plant. *Mimosa* plants were collected in Jequié, Bahia, in October 2022. Essential oil extraction was performed by hydrodistillation using a Clevenger apparatus. The essential oil content was calculated using the moisture-free basis (BLU) method with the formula: $To = ((Vo / Bm - ((Bm \times U) / 100)) \times 100$. The essential oil was analyzed by GC/MS, and compounds were identified based on their retention rates. The extraction levels of essential oils from *M. verrucosa* leaves and fruits were 1.17% and 0.25%, respectively. Stem's level was below the limit of quantification, and it was only possible to obtain the hydrolate. The data obtained in this study indicate a significant variation in the composition and concentration of compounds between the fruit and the leaf. The fruit's essential oil presented 35 constituents, with a higher percentage of monoterpenes, while the leaf had 43 compounds and higher amounts of hydrocarbons sesquiterpene. The majority components found in the essential oils were Caryophyllene and β -Pinene. It is concluded that, even though they originate from the same plant, there is a difference in the content and chemical profile of the essential oil between organs/parts of *M. verrucosa*.

Keywords: Caatinga, Gas chromatography, Terpenes.

1. Introdução

A *Mimosa verrucosa* Benth., uma arbórea pertencente à família Fabaceae, endêmica do Brasil, encontrada nos biomas Caatinga e Cerrado. A planta é valorizada localmente por suas diversas aplicações, sendo conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, que estão relacionadas a presença de compostos bioativos, como os compostos fenólicos (Romanoski e Santos, 2017; Silva *et al.*, 2020) e o óleo essencial.

Os óleos essenciais (O.E.) são misturas complexas de compostos químicos voláteis de baixa massa molecular, presentes em quantidades variáveis. São sintetizados como metabólitos secundários em vários órgãos das plantas, incluindo flores, folhas, raízes, sementes, frutos e caules. Apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Os O.E. estão despertando o interesse das indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia por serem considerados uma fonte promissora de novos ingredientes naturais com propriedades biológicas (Meenu *et al.*, 2023). Em 2022, o mercado global de O.E. alcançou aproximadamente 10,47 bilhões de dólares, com uma projeção para atingir a marca de 22,41 bilhões de dólares até 2030 (Insights, 2022). Os países líderes na produção incluem Brasil, Índia, China e Indonésia, enquanto os Estados Unidos (40%), União Europeia (30%) e Japão (7%) destacam-se como os principais consumidores (Aqeel *et al.*, 2023).

O rendimento e a composição química dos O.E. são influenciados por uma variedade de fatores que desempenham papéis cruciais no crescimento e desenvolvimento das plantas, como as características climáticas (temperatura, umidade e luz), local de cultivo, a escolha da época de colheita, solo (acidez e disponibilidade de nutrientes), presença de microrganismos simbióticos e o órgão da planta do qual o O.E. é extraído. É importante ressaltar que as diferenças na composição química não se limitam apenas entre diferentes espécies vegetais, mas também ocorrem entre espécie de mesmo gênero e mais precisamente entre variedades da mesma espécie vegetal, principalmente no que diz respeito às concentrações dos compostos majoritários (Raveau; Fontaine; Lounès-Hadj Sahraoui, 2020). Pesquisas relacionadas a esses fatores são importantes para

garantir a consistência na qualidade dos O.E. e para explorar seu potencial em diversas aplicações.

Muitas investigações têm sido feitas sobre o potencial das plantas da Caatinga quanto ao rendimento do óleo essencial. Além disso, a compreensão aprofundada da relação entre fatores genéticos e os órgãos de extração é importante para otimizar a produção desses óleos essenciais, garantindo não apenas sua quantidade, mas também a qualidade. Até momento, nenhum estudo anterior sobre a composição química ou rendimento de O.E. de caule, folhas e frutos de *M. verrucosa* foram apresentados em artigos científicos, assim, esse trabalho tem o objetivo de determinar o teor e a composição química do óleo essencial em diferentes órgãos da planta de *M. verrucosa*, oriunda do bioma Caatinga, localizado em Jequié, BA.

2. Materiais e Métodos

Material vegetal

As plantas de *Mimosa verrucosa* (voucher HUESB12727) (folhas, caules e frutos) foram coletadas no bioma Caatinga, em Jequié (Latitude: 13° 51' 4" Sul, Longitude: 40° 4' 52" Oeste), Bahia, em outubro de 2022. O material vegetal foi seco em estufa (Tecnal®, São Paulo, Brasil) aquecida com circulação forçada de ar a 45°C.

Extração e teor de óleo essencial

A extração do óleo essencial foi conduzida utilizando o método de hidrodestilação no equipamento Clevenger. As folhas, caules e frutos secos foram dispostos em um balão volumétrico de 2L, ao qual foi adicionada a quantidade necessária de água destilada para cobrir completamente o material vegetal. Este balão foi colocado em uma manta térmica (Tecnal®, São Paulo, Brasil), dando início ao processo. O procedimento de extração teve uma duração aproximada de 120 minutos, contados a partir da condensação da primeira gota. Após a conclusão do processo de extração, o óleo essencial foi cuidadosamente retirado utilizando uma pipeta de vidro, submetido a pesagem em uma balança analítica e transferido para

um recipiente de vidro. Este recipiente foi devidamente etiquetado e armazenado sob refrigeração, protegido da luz, até o momento do uso.

O teor de O.E. foi determinado utilizando a equação descrita por Santos et al., (2004): $TO = Vo/Bm - (Bm \times U/100) \times 100$ onde,

TO = teor de óleo (mL de óleo essencial em 100 g de biomassa seca) ou rendimento de extração (%);

Vo = volume de óleo extraído (mL), lido diretamente na escala do tubo separador; Bm = Biomassa aérea vegetal, em gramas;

$Bm \times U/100$ = quantidade de umidade ou água presente na biomassa;

$Bm - Bm \times U/100$ = quantidade de biomassa seca isenta de água ou livre de umidade;

100 = fator de conversão para porcentagem.

Para a determinação da umidade (U) (procedimento realizado em triplicata) separou-se 3 g de massa fresca das folhas, frutos e caule das plantas. Essas amostras foram colocadas em estufa com circulação forçada de ar com temperatura de 65° C.

Cromatografia gasosa

O O.E. foi analisado por cromatografia gasosa (Thermo Scientific, Bremen, Germany, modelo TRACE 1310) acoplada a espectrômetro de massas (modelo TSQ-9000), com o autoamostrador TriPlus RSH. Uma coluna NA-5MS (60 m x 0,25 mm ID, 0,25µm espessura do filme) foi usada para separação dos compostos, utilizando hélio como gás de arraste 99,999% (White Martins S.A) com fluxo de 1 mL min⁻¹ e autoinjeter (split/splitless).

Para a análise, foi preparada uma solução estoque da amostra na concentração de aproximadamente 10 mg mL⁻¹ empregando hexano como solvente, medidos em frasco de vidro de 1,5 mL. Posteriormente, a amostra foi encaminhada para análise cromatográfica. A programação da rampa foi: 60 °C - 3 °C min⁻¹ - 240 °C (15 min). O modo de injeção foi *split* (1:30), modo SCAN e tempo total de análises 75 min. Para o MS as condições foram: temperaturas do injetor 220 °C e do detector 240 °C, tempo de corte do solvente 2 min, modo de ionização por elétrons (EI) 70 eV com relação m/z de 40 a 350 Dalton.

Os compostos do O.E. foram identificados por meio de seus índices de retenção (RI), calculados para cada constituinte por meio da injeção de uma série de padrões de hidrocarbonetos lineares (C8-C20) nas mesmas condições da amostra, e comparados com o valor tabelado, e confirmando comparando-se os espectros dos compostos com a referência apresentada pelas bibliotecas Nist 107, 21 e Wiley 8.

3. Resultados e Discussão

Teor de óleo essencial das folhas, caule e frutos de *M. verrucosa*

Os teores da extração dos O.E. das folhas e frutos da *M. verrucosa* foram 1,17% e 0,25%, respectivamente (Tabela 1). O do caule ficou abaixo do limite de quantificação, só foi possível obter o hidrolato. A quantificação do teor de O.E. em plantas da família Fabaceae foi também realizada por Mendes *et al.* (2012), os quais registraram valores variando de 0,0019% a 0,0076% para as folhas de *Dalbergia frutescens*. Santos *et al.* (2010), ao avaliar o rendimento de óleo essencial nas folhas de *Pterodon emarginatus*, obtiveram valor de 2%. Em um levantamento e identificação das espécies nativas medicinais da Caatinga nos estados da Bahia e Pernambuco conduzido por Souza *et al.* (2022), constatou-se que, das 59 espécies medicinais identificadas, 51 foram submetidas à extração de óleo essencial. Dessas, 15 pertenciam à família Fabaceae, incluindo 2 do gênero *Mimosa*. Os resultados observados pelos autores indicaram que, das 13 plantas que apresentaram rendimento de O.E. superior a 0,4 mL, nenhuma pertencia à família Fabaceae.

A avaliação do teor do O.E. é um importante fator de pesquisa para determinação da viabilidade da planta como fonte de compostos bioativos, além disso, serve para se ter uma estimativa de quanta fitomassa é necessária para obter uma quantidade satisfatória de óleo essencial. Mesmo o teor das folhas sendo quase 5 vezes maior que o dos frutos, o mesmo não pode ser desconsiderado, deixando claro que se pode utilizar a parte aérea da planta para extrair o óleo essencial principalmente na fase de frutificação.

Composição química do óleo essencial das folhas e frutos da *M. verrucosa*

Resultados analíticos qualitativos e quantitativos estão apresentados na Tabela 1, juntamente com os índices de retenção dos compostos identificados e o teor de O.E. da *M. verrucosa*.

Tabela 1- Compostos identificados no óleo essencial da folha e fruto da *M. verrucosa*.

Composto		IR	Área relativa (%)	
			Folha	Fruto
1	α -Pineno	980	5,81	9,3
2	β - Felandreno	1048	0,34	<LD
3	β -Pineno	1057	14	19,56
4	p-Cimeno	1140	0,21	<LD
5	D-Limoneno	1146	0,16	<LD
6	α - Felandreno	1150	0,15	<LD
7	Eucaliptol	1153	7,57	8,6
8	Acifileno	1411	0,09	<LD
9	4-terpineol	1425	0,58	0,3
10	α -Terpineol	1454	0,55	<LD
11	Ciclosativeno	1780	0,07	0,25
12	Copaeno	1793	1,86	2,15
13	Elemeno	1820	2,09	0,43
14	Patchouleno	1857	0,08	<LD
15	Cariofileno	1886	15,96	22
16	β -Calareno	1906	0,16	1,91
17	(-)- α -Panasinseno	1913	0,14	1,01
18	Humuleno	1958	5,36	2,92
19	Aromadendreno	1966	1,31	0,58
20	2-isopropenil-4a,8-dimetil-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahidronaftaleno	1990	1	0,07
21	-Muuroleno	1994	0,45	0,2
22	β -Longipineno	2008	<LD	0,16
23	β -Selineno	2021	<LD	1,72
24	β -helmiscapene	2026	6,55	<LD
25	(1R,5S)-1,8-Dimetil-4-(propan-2-ilideno)espiro[4.5]dec-7-eno	2031	0	1,18
26	α -selineno	2038	9,14	1,54
27	δ -Guajeno	2061	0,19	<LD
28	γ -Muuroleno	2069	0	0,31
29	Cubeneno	2077	2,74	2,18
30	cis-Calameneno	2087	0,16	0,17
31	Espatuleno	2202	4,88	6,09
32	Óxido de Cariofileno	2214	3,15	10,9
33	Isovalencenol	2220	0,43	0,34
34	Ledol	2266	0,04	0,2

35	Epóxido de humuleno I	2280	0,56	1,09
36	Cubenol	2316	0,06	0,34
37	(-)-Espatuleno	2332	0,46	0,21
38	10,10-Dimethyl-2,6-dimethylenebicyclo[7.2.0]undecan-5 β -ol	2348	0,35	0,64
39	Acetato de Tau-Cadinol	2357	0,31	0,21
40	tau-Cadinol	2363	0,31	0,19
41	τ -Muurolool	2370	0,19	0,54
42	α -Cadinol	2396	1,36	1,19
43	Neointermedeol	2407	1,96	0,22
44	(1R,7S,E)-7-Isopropyl-4,10-dimethylenecyclodec-5-enol	2437	0,72	0,68
45	6-epi-Shyobunol	2514	0,45	<LD
Total identificado			91,95	99,38
Teor (%)			1,17	0,25
Monoterpenos oxigenados			8,70	8,90
Hidrocarbonetos monoterpenos			20,67	28,86
Sesquiterpenos oxigenados			14,57	21,99
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			47,70	39,42
Ésteres			0,31	0,21

IR: Índice de retenção experimental; <LD: abaixo do limite de detecção.

Foram identificados 43 e 35 compostos que representam 91,95% e 99,38% do O. E. obtido das folhas e frutos, respectivamente (Tabela 1). As maiores quantidades de hidrocarbonetos monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados foram encontradas no O.E. dos frutos (28,86% e 21,99%, respectivamente) em relação as folhas (20,67% e 14,57%, respectivamente). O percentual de sesquiterpenos hidrocarbonetos foi maior nas folhas (47,70%) comparado aos frutos (39,42%). Para os monoterpenos oxigenados e ésteres os maiores percentuais foram detectados em quantidades semelhantes nos frutos (8,9% e 0,21%, respectivamente) e nas folhas (8,7% e 0,31%, respectivamente). Do total de compostos presentes no O.E. da folha, dez (β -Felandreno, p-Cimeno, D-Limoneno, α -Felandreno, Acifileno, α -Terpineol, Patchouleno, β -hilmiscapene, δ -Guajeno e 6-epi-Shyobunol) não foram identificados no fruto, e dos identificados no fruto, dois (β -Longipineno e β -Selineno) não foram encontrados na folha.

Os componentes majoritários encontrados no O.E. da folha foram Cariofileno (15,96%) e β -Pineno (14%), seguidos de α -selineno (9,14%), Eucaliptol (7,57%) e β -hilmiscapene (6,55%). No fruto foram Cariofileno (22%), β -Pineno (19,56%) e Óxido

de Cariofileno (10,9%), seguidos de α -Pineno (9,3%), Eucaliptol (8,6%) e Espatulenol (6,09%) (Figura 1 e 2).

Figura 1 - Cromatograma com a estrutura química dos compostos majoritários (área relativa superior a 10%) do O.E. da folha.

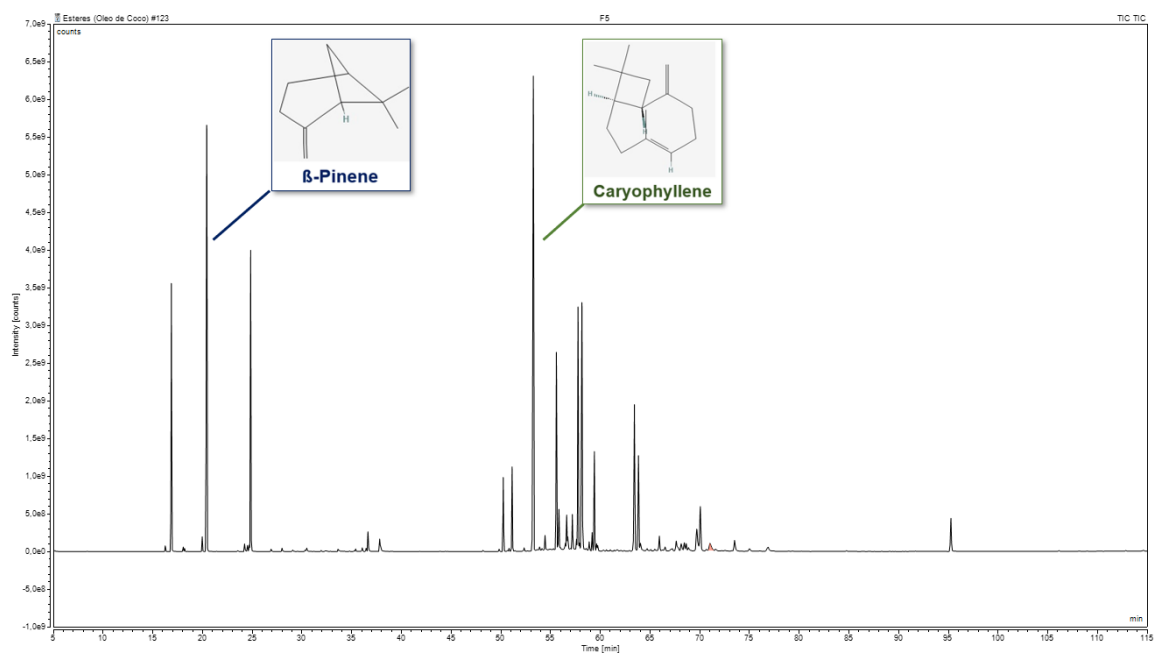
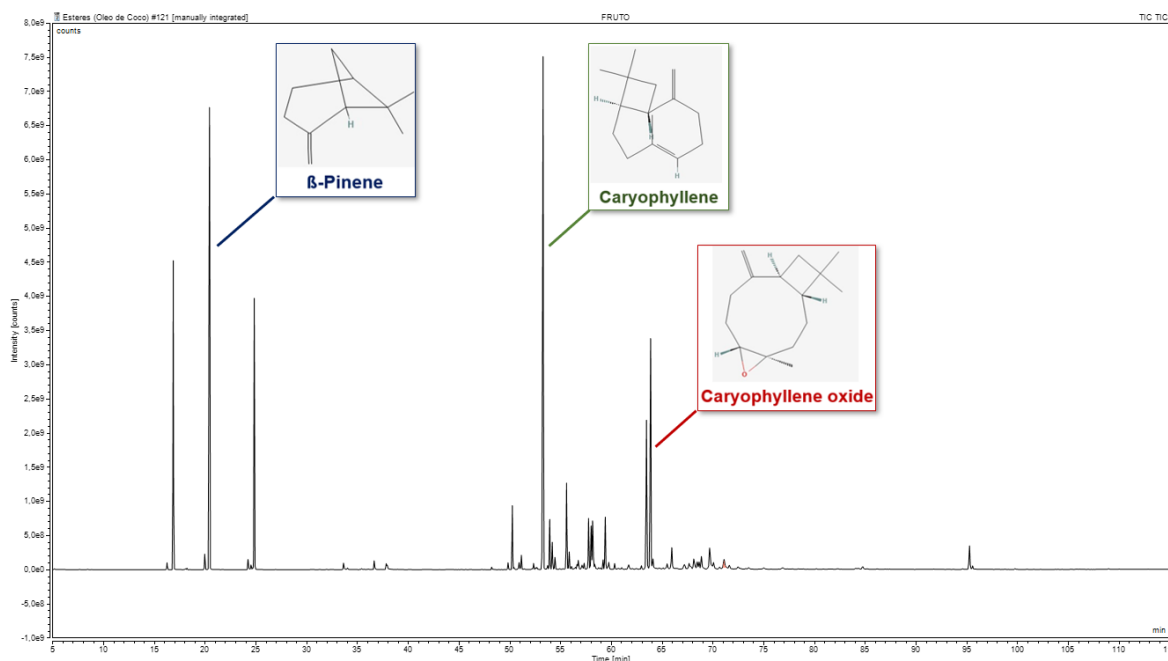
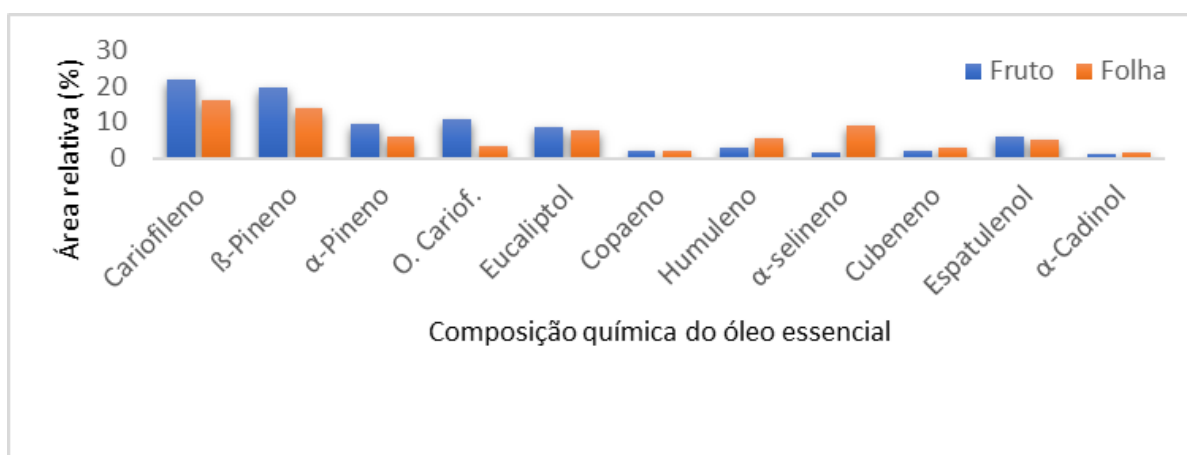


Figura 2 - Cromatograma com a estrutura química dos compostos majoritários (área relativa superior a 10%) do O.E. do fruto.



O GC-EM identificou 11 compostos comuns em ambos os O.E. com área superior a 1% (Figura 3). Comparando esses compostos, o Cariófileno, β -Pineno, Óxido de cariofileno, α -Pineno e Espatuleno são mais abundantes no fruto, enquanto Humuleno e α -selineno são mais proeminentes na folha. O Eucaliptol tem concentrações relativamente equilibradas.

Figura 3 – Compostos com área superior a 1% identificados nos O.E. da *M. verrucosa*.



Não há relatos sobre a composição química de O.E. obtidos da *M. verrucosa*, mas os dados obtidos neste trabalho indicam uma variação significativa na composição e concentração dos compostos entre o fruto e a folha, sugerindo que

mesmo sendo provenientes da mesma planta, há diferença nos perfis químicos dos órgãos da *M. verrucosa*.

Diferenças na composição química do O.E. entre folhas e frutas também foram encontradas por Gyesi, Opoku e Borquaye (2019) trabalhando com *Annona muricata*, os autores encontraram no O.E. das folhas 31 compostos, e na polpa das frutas 32 compostos, mas a diferença marcante foi na composição química, enquanto os O.E. das folhas consistiam em grande parte de terpenos e terpenóides, os O.E. da polpa das frutas eram constituídos por compostos alifáticos (ácidos, ésteres e álcoois). A análise dos O.E. das folhas e cascas de frutas de *Citrus aurantifolia* por GC-FID e GC-EM revelaram que os hidrocarbonetos monoterpênicos (84,6%) foram os principais constituintes da casca da fruta e os monoterpênicos oxigenados (57,6%) foram os principais constituintes das folhas (Lemes *et al.*, 2018). O O.E. de frutas e folhas de *Eucalyptus gomphocephala* apresentaram diferenças na composição e concentração dos compostos, os principais constituintes no óleo essencial de frutas (acima de 3%) foram: 1,8-cineol (46,69%), p-cimeno (8,99%), baeckeol (8,57%), α -pineno (5,21%) e globulol (4,25%). No óleo essencial de folhas, foram: 1,8-cineol (24,25%), p-cimeno (20,70%), α -pineno (14,15%), β -pineno (8,17%), γ -terpineno (6,90%), metileugenol (6,78%), α -terpineol (4,75%) e limoneno (3,80%) (Stankov *et al.*, 2020).

Os componentes predominantes nos O.E. da *M. verrucosa* incluem monoterpênicos e sesquiterpenos. Os monoterpênicos, elementos característicos de óleos essenciais, desempenham um papel crucial ao conferir aroma e sabor às plantas, sendo fundamentais em diversos ingredientes ativos utilizados em setores agrícolas, farmacêuticos, cosméticos e alimentícios (Ninkuu *et al.*, 2021). Os sesquiterpenóides são geralmente considerados marcadores mais estáveis, uma vez que os monoterpênicos possuem maior volatilidade (Jin *et al.*, 2021). O O.E. dos frutos teve uma maior concentração de monoterpênicos em relação às folhas de *M. verrucosa*. As razões para o maior acúmulo desses compostos na parte reprodutiva da planta ainda não são claras. Por um lado, levantou-se a hipótese de que esses monoterpênicos podem ter função na atração de dispersores de sementes, defesa contra herbívoros e sinalização planta-planta.

Estudos na literatura reforçam essa hipótese, como evidenciado no trabalho de (Eisner *et al.*, 2000), que destaca os monoterpênicos metilciclopentanóides produzidos

pela *Teucrium marum* como repelentes eficazes contra formigas e baratas. Outro exemplo é observado na *Peperomia macrostachya*, que produz sementes atrativas para formigas (*Camponotus femoratus*), estabelecendo uma relação simbiótica específica da espécie conhecida como formigueiros neotropicais (AGs). As sementes da *P. macrostachya* liberam uma variedade de compostos voláteis fenólicos e terpenoides, sendo o geranil linalol um componente compartilhado por pelo menos oito espécies de sementes AG. Esse terpeno é percebido pela espécie de formiga parceira AG na dispersão de sementes (Youngsteadt et al., 2009). Esse fenômeno ilustra a complexidade e a particularidade das interações entre plantas e formigas, destacando a relevância dos compostos voláteis na comunicação e na coevolução de estratégias de sobrevivência entre essas espécies.

4. Conclusões

A *M. verrucosa* apresentou um teor de O.E. significativo, principalmente nas folhas, podendo ser considerada com potencial para desenvolvimento de ativos.

A composição e concentração dos compostos são diferentes entre o fruto e a folha da planta. Os compostos majoritários do O.E. de *M. verrucosa* das folhas e dos frutos são Cariofileno e β -Pineno.

Esses resultados podem ter implicações práticas para a indústria de O.E., uma vez que a seleção e extração seletiva de compostos específicos podem desempenhar um papel importante para atender às diversas demandas do mercado.

5. Referências Bibliográficas

AQEEL, U. et al. Regulation of essential oil in aromatic plants under changing environment. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 32, p. 100441, 2023.

EISNER, T. et al. Chemical defense of the mint plant, *Teucrium marum* (Labiatae). **Chemoecology**, v. 10, p. 211-216, 2000.

GYESI, J. N.; OPOKU, R.; BORQUAYE, L. S. Chemical composition, total phenolic content, and antioxidant activities of the essential oils of the leaves and fruit pulp of *Annona muricata* L.(Soursop) from Ghana. **Biochemistry research international**, v. 2019, 2019.

INSIGHTS, F. B. **Essential Oils Market Size, Share & COVID-19 Impact Analysis, by Type (Citrus (Orange, Lemon, Grapefruit, Lima, and Others), Eucalyptus, Lavender, Rosemary, Tea Tree, Peppermint, and Others), By Application (Food & Beverages, Personal Care & Cosmetics, Spa & Relaxation, Pharmaceuticals & Medicinal Formulations, and Others), By Distribution Channel (Direct Distribution, MLM Distribution, and Retail Distribution), and Regional Forecast 2023-2030**. 2022. Disponível em: <<https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/essential-oils-market-101063>>. Acesso em: jan. 2024.

JIN, D. *et al.* Identification of chemotypic markers in three chemotype categories of cannabis using secondary metabolites profiled in inflorescences, leaves, stem bark, and roots. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 699530, 2021.

LEMES, R. S. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 1285-1292, 2018.

MEENU, M. *et al.* Antibacterial activity of essential oils from different parts of plants against *Salmonella* and *Listeria* spp. **Food Chemistry**, v. 404, p. 134723, 2023.

MENDES, C. E. *et al.* Efeitos das condições ambientais sobre o teor e variabilidade dos óleos voláteis de *Dalbergia frutescens* (Vell.) Britton (Fabaceae). **Química Nova**, v. 35, p. 1787-1793, 2012.

NINKUU, V. *et al.* Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5710, 2021.

RAVEAU, R.; FONTAINE, J.; LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, A. Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A review. **Foods**, v. 9, n. 3, p. 365, 2020.

ROMANOSKI, V. S.; SANTOS, R. A. F. Cytotoxic and Antioxidant Activity of *Mimosa verrucosa* Benth. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, p. 100-104, 2017.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. de M.; BAKER, D.; ROCHA NETO, O. **Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 6p. 2004

SANTOS, A. P. *et al.* Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 891-896, 2010.

SILVA, S. A. N. M. *et al.* Phytochemical and biological prospection of Mimosa genus plants extracts from Brazilian northeast. **Phytochemistry letters**, v. 39, p. 173-181, 2020.

SOUZA, A. V. V. *et al.* Bioprospecção de plantas da Caatinga com potencial para produção de fitomedicamentos. **Revista Fitos**, v. 16, Supl. 2, p. 212-226, 2022.

STANKOV, S. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from aerial part (leaves and fruit) of *Eucalyptus gomphocephala* DC. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 23, n. 2, p. 204-212, 2020.

YOUNGSTEADT, E. *et al.* Species-specific seed dispersal in an obligate ant-plant mutualism. **PloS one**, v. 4, n. 2, p. e4335, 2009.

ARTIGO 3

POTENCIAL DO ÓLEO ESSENCIAL E HIDROLATO DE *Mimosa verrucosa* BENTH. NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Aspergillus welwitschiae*³

³ Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico da Industrial Crops and Products

POTENCIAL DO ÓLEO ESSENCIAL E HIDROLATO DE *Mimosa verrucosa* BENTH. NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Aspergillus welwitschiae*

Resumo: A podridão vermelha do sisal representa um dos grandes desafios no cultivo dessa cultura no semiárido, resultando em perdas consideráveis na produção de fibras naturais. Dada a falta de métodos de controle eficazes e o aumento da resistência de fitopatógenos, é necessário desenvolver novos agentes antifúngicos mais seguros, baseados em compostos naturais, como O.E. e hidrolatos. Diante do exposto o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antifúngico do O.E. e do hidrolato (folha, caule e fruto) da *M. verrucosa* no controle de *Aspergillus welwitschiae*. A extração do O.E. foi conduzida utilizando o método de hidrodestilação no equipamento Clevenger. Após a conclusão do processo, o O.E. e hidrolato foram retirados e armazenados até o uso. O teste da CIM foi realizado em placas de Elisa de 96 poços, em triplicata, utilizando as seguintes concentrações: 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22 e 30 $\mu\text{L mL}^{-1}$, para o O.E. e 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80 e 90% para os hidrolatos. No ensaio de diluição em meio, as concentrações de O.E. (5, 15, 25 e 35 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e hidrolatos (45, 60, 75 e 90%) foram homogeneizadas no meio B.D.A. e distribuídas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro. Ao final do experimento foi avaliado o número de esporos. A estatística foi realizada com o auxílio do programa R. O O.E. das folhas e todos os hidrolatos de *M. verrucosa* demonstraram uma ação fungistática contra o *A. welwitschiae*, com um valor de CIM de 14 $\mu\text{L mL}^{-1}$, para o O.E. e de 70% para o hidrolato de folha e fruto, e 60% para o caule. A produção de esporos de *A. welwitschiae* foi significativamente inibida ($p < 0,05$) pelos hidrolatos e o O.E. O hidrolato de caule apresentou as maiores reduções no número de esporos em relação ao de folha e fruto. Esses resultados indicam que o O.E. e os hidrolatos da *M. verrucosa* possuem potencial promissor para serem utilizados no controle da podridão vermelha do sisal.

Palavras-chave: Antifúngico, Podridão vermelha do sisal, Subprodutos.

POTENTIAL OF ESSENTIAL OIL AND HYDROLATE OF *Mimosa verrucosa* BENTH. IN VITRO CONTROL OF *Aspergillus welwitschiae*

Abstract: Red rot in sisal represents one of the greatest challenges in cultivating this crop in the semi-arid region, resulting in considerable losses in natural fiber production. Given the lack of effective control methods and the increasing resistance of phytopathogens, it is necessary to develop new safer antifungal agents based on natural compounds, such as essential oils and hydrolates. In light of this, the objective of the study was to evaluate the antifungal potential of E.O. and the hydrolate (leaf, stem, and fruit) of *M. verrucosa* in the control of *Aspergillus welwitschiae*. The E.O. extraction was conducted using the hydrodistillation method on Clevenger equipment. After the process is completed, the E.O. and hydrolate were collected and stored until use. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test was performed in triplicate in 96-well Elisa plates using the following concentrations: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, and 30 $\mu\text{L mL}^{-1}$ for the E.O. and 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90% for the hydrolates. In the agar dilution test, E.O. concentrations (5, 15, 25, and 35 $\mu\text{L mL}^{-1}$) and hydrolate concentrations (45, 60, 75, and 90%) were homogenized in B.D.A. medium and distributed on 5 cm diameter Petri dishes. The number of spores was evaluated at the end of the experiment. Statistical analysis was performed using the R program. The E.O. from the leaves and all hydrolates of *M. verrucosa* demonstrated fungistatic action against *A. welwitschiae*, with a MIC value of 14 $\mu\text{L mL}^{-1}$ for E.O. and 70% for leaf and fruit hydrolate, and 60% for stem hydrolate. Spores production of *A. welwitschiae* was significantly inhibited ($p < 0.05$) by hydrolates and E.O. Stem hydrolate showed the greatest reductions in spores numbers compared to leaf and fruit hydrolates. These results indicate that the EO and hydrolates of *M. verrucosa* have promising potential to be used to control red rot in sisal.

Keywords: Antifungal, Sisal red rot, By-products.

1. Introdução

O Brasil lidera a produção global de fibras de sisal (*Agave sisalana* Perrine), concentrando suas plantações principalmente na região semiárida, com destaque para o estado da Bahia, responsável por 94% da produção nacional. Essa cultura desempenha um papel vital na geração de renda para a população local, sendo uma das principais fontes econômicas na região (Quintanilha-Peixoto *et al.*, 2022; Raya *et al.*, 2023).

O fungo *Aspergillus welwitschiae* (Bres.) Henn é o agente causal da podridão vermelha do sisal, um dos grandes desafios no cultivo dessa planta no semiárido, pois resulta em perdas consideráveis na produção de fibras naturais. Esse fungo penetra na planta através de ferimentos causados tanto pelas altas temperaturas ambientais quanto pelos cortes feitos nas folhas durante o processo de extração das fibras (Quintanilha-Peixoto *et al.*, 2019). Conforme a doença avança, surge uma cor vermelha intensa nos caules afetados, seguida por clorose (amarelecimento das folhas) e, por fim, a morte da planta (Quintanilha-Peixoto *et al.*, 2022).

Ainda não existem métodos de controle eficientes para essa doença. Além disso, o aumento dos fitopatógenos resistentes devido ao uso indiscriminado de produtos químicos na agricultura, tem gerado uma demanda constante e crescente por técnicas inovadoras e sustentáveis. Isso impulsiona o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, mais seguros, baseados em compostos naturais, como óleos essenciais (O.E.) e hidrolatos (Angelini *et al.*, 2022).

Os O.E. são misturas complexas de compostos voláteis, extraídos de diversas partes de plantas aromáticas. Compostos como terpenos, fenilpropanoides e aldeídos são alguns dos constituintes voláteis presentes nos O.E., muitos dos quais têm propriedades bioativas contra vários microrganismos (Achimón *et al.*, 2021). Durante o processo de extração (hidrodestilação e destilação) dos O.E., é gerado um subproduto conhecido como hidrolato, também mencionado como hidrossol, água floral ou destilada, e água aromática. Nesse processo, a água é evaporada simultaneamente com o óleo essencial. Após a condensação dos vapores, os componentes liquefeitos se separam em duas fases: óleo essencial e hidrolato. Apesar de conterem uma pequena quantidade de constituintes do óleo essencial, os hidrolatos são valiosos por seus compostos oxigenados, que oferecem propriedades

organolépticas distintas, sabor específico e atividade biológica, sendo úteis para diversas indústrias (Aćimović *et al.*, 2020; Aćimović, 2023).

Existe um interesse crescente em explorar o óleo essencial e o hidrolato como matérias-primas no desenvolvimento de processos e produtos agrícolas, uma vez que estudos comprovam que ambos são fontes significativas de fitoquímicos com potencial antimicrobiano (Bajer *et al.*, 2017; Gaspar-Pintilieșcu *et al.*, 2020; Ciocarlan *et al.*, 2021; Paramalingam *et al.*, 2021). As plantas do gênero *Mimosa* tem grande potencial para serem fontes de compostos bioativos, especialmente *Mimosa verrucosa* Benth., que produz óleo essencial. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial e dos hidrolatos (folha, caule e fruto) da *M. verrucosa* no controle de *Aspergillus welwitschiae*.

2. Materiais e Métodos

Material vegetal

As plantas de *Mimosa verrucosa* (voucher HUESB12727) (folhas, caules e frutos) foram coletadas no bioma Caatinga, em Jequié (Latitude: 13° 51' 4" Sul, Longitude: 40° 4' 52" Oeste), Bahia, em outubro de 2022. O material vegetal foi seco em estufa (Tecnal®, São Paulo, Brasil) aquecida com circulação forçada de ar a 45 °C.

Extração de óleo essencial e hidrolato

A extração do óleo essencial foi conduzida utilizando o método de hidrodestilação no equipamento Clevenger. As folhas, caules e frutos secos foram dispostos em um balão volumétrico de 2 L, ao qual foi adicionada a quantidade necessária de água destilada para cobrir completamente o material vegetal. Este balão foi colocado em uma manta térmica (Tecnal®, São Paulo, Brasil), dando início ao processo. O procedimento de extração teve uma duração aproximada de 120 minutos, contados a partir da condensação da primeira gota. Após a conclusão do processo de extração, o óleo essencial e o hidrolato foram cuidadosamente retirados

e transferidos para recipientes de vidro, que foram devidamente etiquetados e armazenados sob refrigeração.

Obtenção dos Microrganismos

O fungo *Aspergillus welwitschiae* (isolado A1P1) foi adquirido da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, situado no Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Uma cultura pura do fungo crescida em meio Batata Dextrose Ágar (B.D.A.) a uma temperatura de 28 ± 2 °C por 8 dias, foi utilizada para fazer a suspensão dos esporos. Foi adicionado 20 mL de água destilada autoclavada e duas gotas de Tween 20 na placa, em seguida os esporos foram suspensos usando uma alça de Drigalsky. O ajuste da concentração de esporos (1×10^6 esporos mL⁻¹) foi realizado com base na contagem em câmara de Neubauer.

Ensaio antifúngico:

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada mediante o método de microdiluição, com modificações, empregando placas de Elisa de 96 poços. O O.E. das folhas foi testado em concentrações de 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22 e 30 µL mL⁻¹, enquanto quatro controles foram incluídos: 1- Meio de cultura puro (B.D.); 2- Meio de cultura + *A. welwitschiae*; 3- Tween 20 (5%) + *A. welwitschiae*; 4- Antifúngico (Ciclopirox de Olamina 400 µL mL⁻¹) + *A. welwitschiae*. Quanto aos hidrolatos (folha, caule e frutos), foram utilizadas concentrações de 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80 e 90%, com três controles (1- Meio de cultura puro; 2- Meio de cultura + *A. welwitschiae*; 3- Antifúngico + *A. welwitschiae*). Uma suspensão de 50 µL dos esporos do microrganismo foi adicionada a cada poço. O experimento foi realizado em triplicata, e a atividade antifúngica foi avaliada após 72 h de incubação a 28 °C, observando visualmente o crescimento fúngico em comparação com o controle 2 e determinando a CIM como a menor concentração que inibe o crescimento do microrganismo.

Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Após a realização do teste da CIM, nos poços em que não houve crescimento visível do fungo, uma amostra do conteúdo foi retirada e subcultivada em placas de Petri contendo meio B.D.A. Após incubação por 48 horas a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ em uma BOD (New Lab, Piracicaba, São Paulo), a menor concentração na qual o microrganismo não se desenvolveu, foi considerada como a CFM.

Diluição em meio

O O.E. foi diluído em Tween 20 (5%) nas concentrações predefinidas (5, 15, 25 e $35\ \mu\text{L mL}^{-1}$) e adicionado ao meio B.D.A. após esterilização em autoclave. Os hidrolatos foram incorporados ao meio de cultura B.D.A., resultando nas concentrações de 45, 60, 75 e 90%. Após homogeneização, os tratamentos foram distribuídos em placas de Petri de 5 cm de diâmetro. Os controles consistiram em: meio B.D.A., B.D.A. + Tween 20 (5%), e B.D.A. + antifúngico (Ciclopirox de Olamina $400\ \mu\text{L mL}^{-1}$). Em cada placa, $5\ \mu\text{L}$ da suspensão de esporos do *A. welwitschiae* foram adicionados no centro. As placas foram incubadas em câmara BOD a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ (New Lab, Piracicaba, São Paulo). A avaliação foi feita após o crescimento completo do microrganismo na placa de controle, meio B.D.A.

Número de esporos

A contagem do número de esporos do *A. welwitschiae* foi realizada ao término do experimento. Para cada placa de Petri, foram adicionados 7 mL de água destilada e uma gota de Tween 20. Em seguida, efetuou-se a suspensão dos esporos com uma alça de Drigalsky, retirando-se uma alíquota com o auxílio de uma pipeta. A contagem de esporos foi realizada em uma câmara de Neubauer, utilizando um microscópio óptico (Modelo Cx21, Olympus, Tóquio, Japão). Os resultados foram expressos em números de esporos por mL.

Análise Estatística

No teste de diluição em meio, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 7 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, considerando um nível de significância de 5%. As médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Posteriormente, os dados foram submetidos a uma regressão linear utilizando o software R (R Development Core Team, 2023) para determinar os ED50.

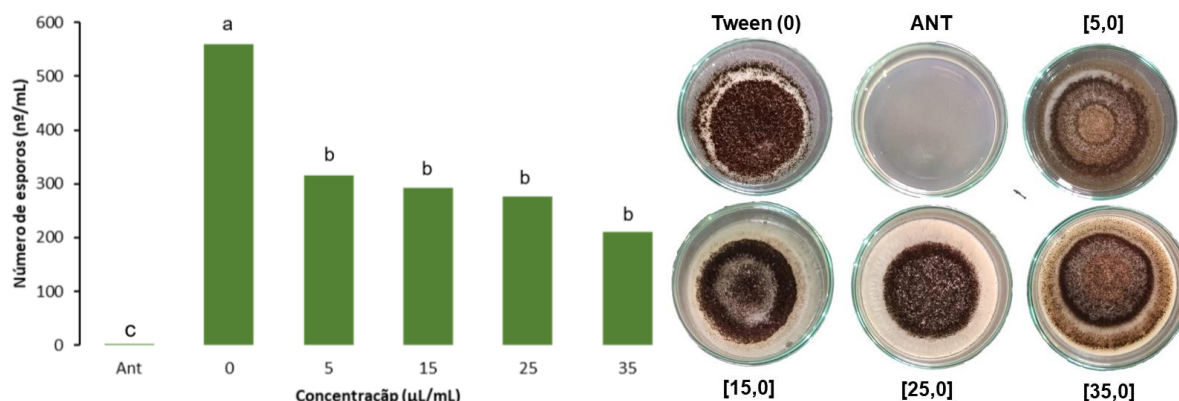
3. Resultados e Discussão

Óleo essencial de folhas de *M. verrucosa* no controle de *Aspergillus welwitschiae*

O O.E. das folhas de *M. verrucosa* demonstrou uma ação fungistática contra o *A. welwitschiae*, com um valor de CIM de $14 \mu\text{L mL}^{-1}$. Esse resultado indica o potencial do O.E., pois requer uma quantidade relativamente baixa para inibir o crescimento do *A. welwitschiae* em comparação com as concentrações testadas. Além disso, esse resultado orientou a escolha das concentrações a serem utilizadas no teste de diluição em meio.

O O.E. das folhas de *M. verrucosa* teve um efeito significativo ($p < 0,05$) na esporulação do *A. welwitschiae*. A produção de esporos foi reduzida em cerca de 44-62,5% em comparação com o controle 0 (Tween + B.D.A.), sem diferenças significativas entre as concentrações testadas (Figura 1). De modo geral, as concentrações mais baixas de óleo essencial foram suficientes para inibir a produção de esporos, sendo que a concentração de $35 \mu\text{L mL}^{-1}$ proporcionou o menor número de esporos, representando aproximadamente 80% da redução observada com o antifúngico (Ciclopirox de Olamina) (ANT).

Figura 1 – Efeito do óleo essencial das folhas de *M. verrucosa* na esporulação de *Aspergillus welwitschiae* e imagens do teste de diluição em meio com diferentes concentrações de óleo essencial. Barras acompanhadas pela mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).



Por meio da análise de regressão linear, observa-se que a dose efetiva do O.E. das folhas de *M. verrucosa* necessária para alcançar uma redução de 50% no número de esporos, é relativamente elevada. No entanto, o O.E. ainda demonstra potencial como uma opção para o controle de *A. welwitschiae* (Tabela 1). Levando em consideração aspectos econômicos, combinar o óleo essencial com outras técnicas de manejo pode ser uma abordagem eficaz para controlar esse fitopatógeno.

Tabela 1- Dose efetiva do óleo essencial de folhas *M. verrucosa* para inibição de 50% do número de esporos de *A. welwitschiae*.

Equação linear	ED50 (µL mL ⁻¹)
$y = 452,59 - 7,60x$; $R^2 = 0,66^{**}$	30,00

Este é o primeiro relato da bioatividade do O.E. de folhas de *M. verrucosa* contra *A. welwitschiae*. Os resultados destacam os principais compostos identificados no óleo essencial (O.E.), sendo Cariofileno (15,96%) e β-Pineno (14%) os mais prevalentes, seguidos por α-selineno (9,14%), Eucaliptol (7,57%) e β-helmiscapene (6,55%) (Capítulo 2). O O.E. demonstrou um notável efeito inibitório no crescimento (CIM) e na esporulação (ensaio de diluição em meio) de *A. welwitschiae*, sugerindo a possibilidade de que esses componentes sejam responsáveis por sua atividade antifúngica. No entanto, são necessários estudos adicionais para confirmar essas descobertas, também é crucial considerar o efeito do fitocomplexo como um todo, pois espera-se uma interação e, muito possivelmente, sinergismo entre os principais compostos químicos e os de menor concentração (Angelini *et al.*, 2022).

De maneira geral, a atividade biológica desses compostos tem sido associada à sua natureza lipofílica, conferindo-lhes a capacidade de penetrar nas membranas das células. Contudo, a eficácia de um determinado O.E. como antifúngico não é determinada apenas pelo seu efeito fungitóxico, mas também pela sua capacidade de reduzir ou inibir a produção de conídios. Os conídios são esporos produzidos assexuadamente, liberados em grandes quantidades, desempenhando um papel crucial na dispersão dos fungos e nos processos de infecção secundária (Achimón *et al.*, 2021). A membrana celular do fungo desempenha um papel importante em sua sobrevivência, a interação do O.E. com essa membrana resulta em alterações na permeabilidade, levando à perda de íons celulares e, conseqüentemente, à perda de função celular, influenciando no crescimento dos fungos, causando mudanças morfológicas e deformações em hifas e esporos (Brandão *et al.*, 2023).

Na literatura é possível encontrar estudos relatando a redução da esporulação de *Aspergillus* spp. com O.E. de diversas espécies. Os O.E. de dois acessos de *L. alba* (L01 e L02), extraídos de plantas com idades diferentes, mostraram eficácia na inibição da produção de esporos de *A. welwitschiae*. Notavelmente, o acesso L02 apresentou inibição significativa na menor concentração testada ($0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$), variando entre 91,77% e 93,52% em todas as épocas de colheita (Carvalho *et al.*, 2023). Em trabalho realizado por Li *et al.* (2020), o O.E. de *Illicium verum* inibiu a produção de esporos de *Aspergillus flavus*, com percentagens de redução variando de 43% a 100%, em concentrações entre 0,4 e $4,0 \mu\text{L mL}^{-1}$. Sarathambal, Rajagopal e Viswanathan (2021) constataram modificações morfológicas no *Aspergillus flavus* quando exposto ao O.E. de *Pimenta dioica*, em comparação com o tratamento controle. Essas alterações englobam a perda visível de pigmentação, ausência de esporulação e maturidade irregular dos conidióforos. Os autores correlacionaram essas mudanças à interferência do óleo essencial na síntese da parede celular, afetando, assim, o crescimento e a morfogênese do fungo.

Hidrolato de folha, caule e frutos de *M. verrucosa* no controle de *Aspergillus welwitschiae*

Os ensaios utilizando o método da microdiluição revelaram que todos os hidrolatos de *M. verrucosa* apresentaram ação fungistática contra o *Aspergillus*

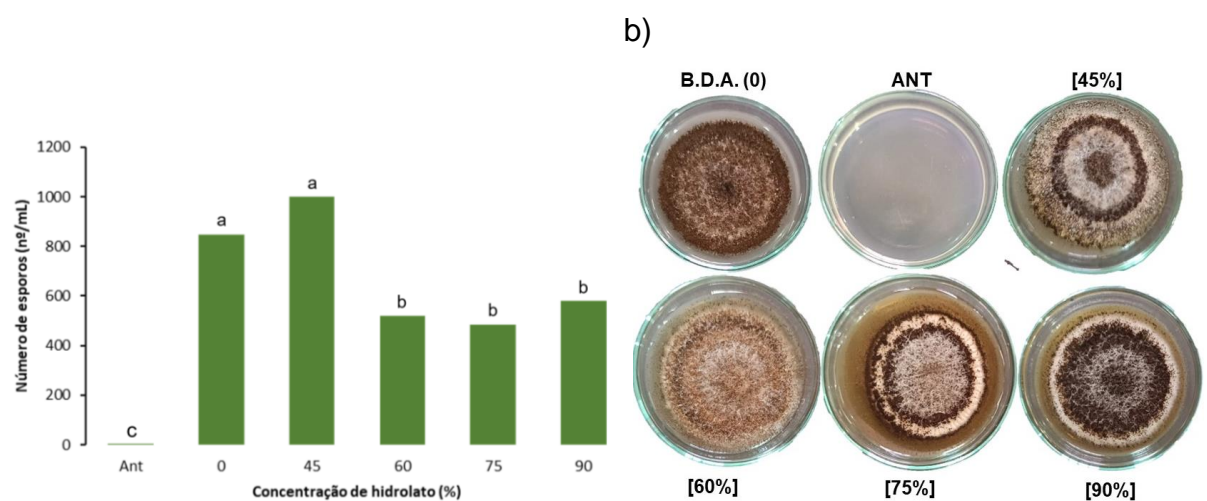
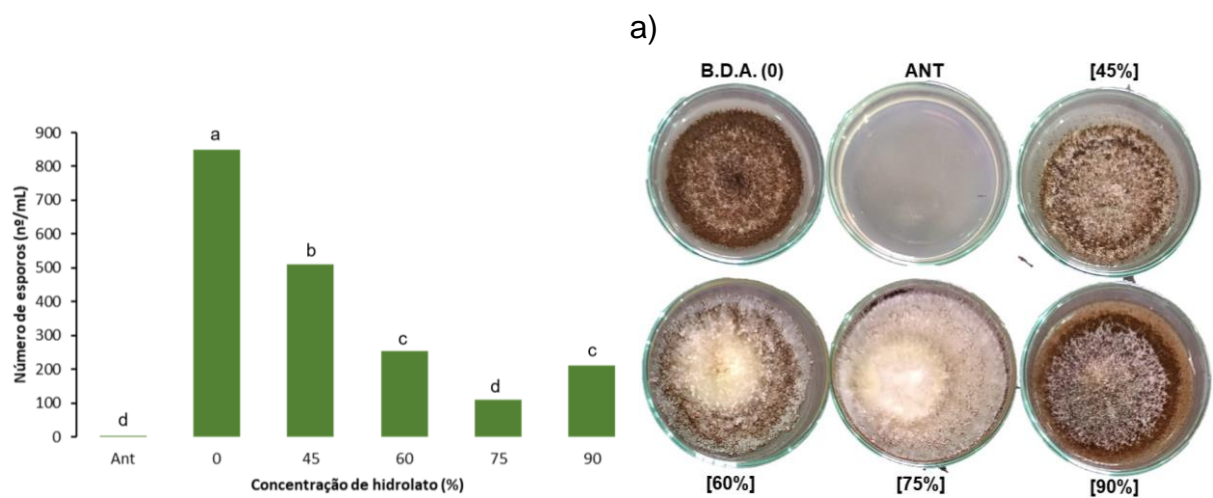
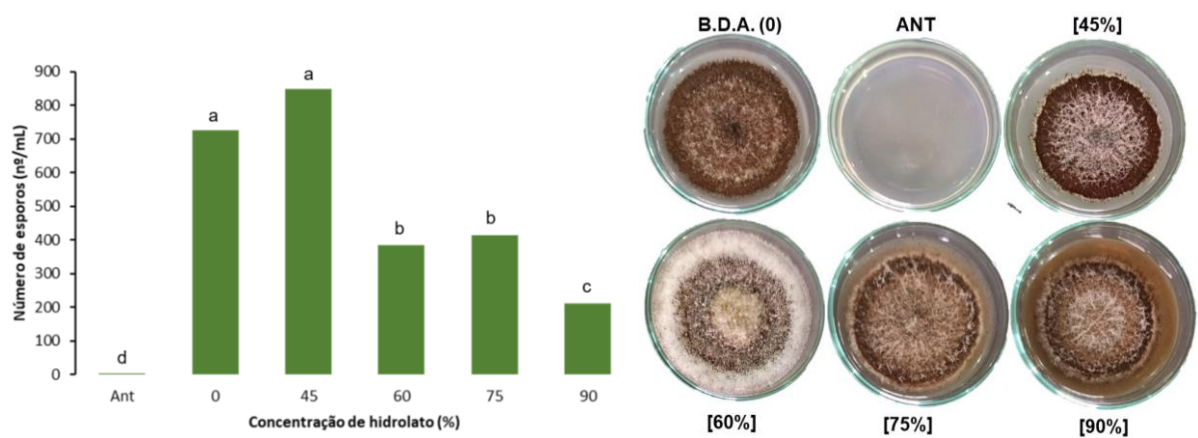
welwitschiae. A CIM foi de 70% para o hidrolato de folha e fruto, enquanto o do caule foi de 60% (Tabela 2). Esses resultados indicam que os hidrolatos da planta possuem propriedades antifúngicas contra o *A. welwitschiae*, semelhantes ao óleo essencial das folhas de *M. verrucosa*, e apresentam potencial para serem empregados no controle do patógeno responsável pela podridão vermelha do sisal.

Tabela 2- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos hidrolatos de *M. verrucosa* contra o *Aspergillus welwitschiae*.

Hidrolato	Concentração (%)	
	CIM	CFM
Folha	70	-
Caule	60	-
Fruto	70	-

A produção de esporos de *A. welwitschiae* foi significativamente inibida ($p < 0,05$) pelos hidrolatos. Na Figura 2, é possível observar que, independentemente do hidrolato utilizado nos testes, o tratamento antifúngico (Ciclopirox de Olamina) apresentou a maior redução na quantidade de esporos do fungo. Os hidrolatos da folha e do fruto mostraram o maior número de esporos na concentração de 45%, mas não diferiu estatisticamente do controle (B.D.A.). As concentrações que proporcionaram a menor esporulação foram 90% na folha e 75% no fruto. O hidrolato de caule, na concentração de 75%, não apresentou diferença estatística em relação ao controle positivo (Ciclopirox de Olamina), confirmando a eficácia dos compostos presentes nesse hidrolato na inibição da esporulação do fungo testado.

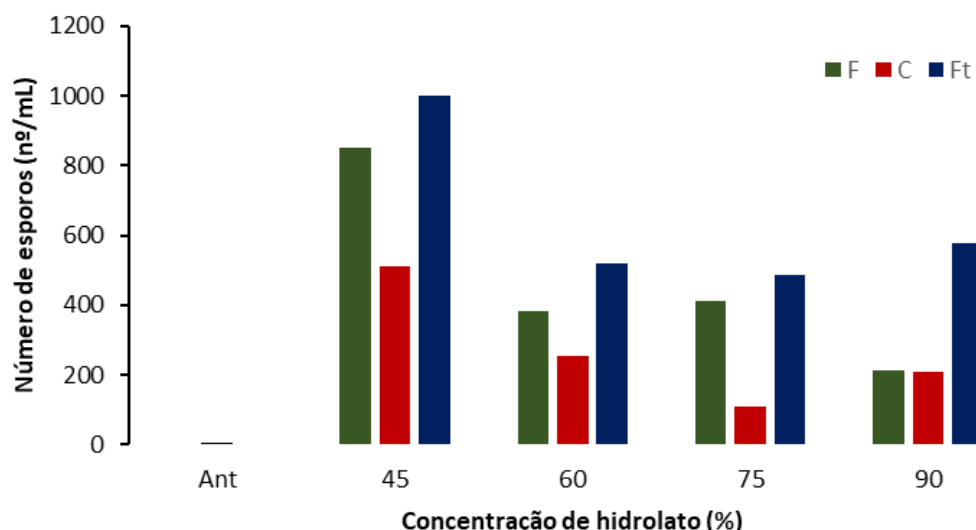
Figura 2 – Efeito do hidrolato das folhas (a), caule (b) e frutos (c) de *M. verrucosa* na esporulação de *Aspergillus welwitschiae* e imagens do teste de diluição em meio com diferentes concentrações de hidrolato. Barras acompanhadas pela mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).



O hidrolato de caule registrou as maiores reduções no número de esporos (40%, 70%, 87%, e 75%, respectivamente) em comparação com o controle B.D.A., em todas as concentrações testadas, superando os demais hidrolatos. Esses resultados indicam que o hidrolato de caule de *M. verrucosa* é o mais bioativo contra

A. welwitschiae. A Figura 3 também revela que o segundo hidrolato mais eficaz contra a esporulação de *A. welwitschiae* foi o derivado da folha.

Figura 3 – Gráfico de barras resumindo o efeito dos hidrolatos de folha (F), caule (C) e fruto (Ft) na esporulação de *Aspergillus welwitschiae*.



Os valores de ED50 (dose efetiva para inibição de 50% do número de esporos) para os hidrolatos de *M. verrucosa* são apresentados na Tabela 3. O menor valor foi observado para o hidrolato de caule, seguido pelo hidrolato de folha. Não foi possível calcular o ED50 para o hidrolato de fruto, pois, nas concentrações e com o fungo utilizado neste experimento, não foi possível alcançar uma redução de 50% no número de esporos. A ED50 do hidrolato de caule é relativamente baixa, indicando seu potencial promissor, uma vez que produtos naturais capazes de controlar a doença em baixas quantidades do princípio ativo são altamente desejados.

Tabela 3 - Dose efetiva do hidrolato da folha, caule e fruto de *M. verrucosa* para inibição de 50% do número de esporos de *A. welwitschiae*.

Hidrolato	Equação linear	ED50 (%)
Folha	$y = 837,14 - 5,93x$; $R^2 = 0,61^{**}$	70,58
Caule	$y = 827,65 - 8,17x$; $R^2 = 0,90^{**}$	50,65
Fruto	$y = 919,77 - 4,32x$; $R^2 = 0,44^{**}$	-

Os hidrolatos geralmente contêm menos de 1 g L⁻¹ (ou seja, 0,10%) de compostos aromáticos solúveis em água, provenientes do O.E. A semelhança entre a

composição do O.E. e do hidrolato depende da proporção entre hidrocarbonetos e compostos oxigenados no O.E. Quando os compostos oxigenados são predominantes, a semelhança é alta, enquanto em O.E. com predominância de hidrocarbonetos, a composição do hidrolato difere significativamente (Aćimović *et al.*, 2020). Foram observadas diferenças quantitativas e qualitativas entre o O.E. e o extrato de hidrossol de *Marrubium vulgare* em relação às classes de compostos e seus principais componentes, como indicado por Zatlá et al. (2020), cujas análises de GC-MS do extrato de hidrossol revelaram exclusivamente compostos oxigenados, sem a presença de hidrocarbonetos.

A análise do O.E. das folhas e dos frutos (Capítulo 2) revela que eles consistem principalmente de hidrocarbonetos monoterpenos (20,67% e 28,86%, respectivamente) e sesquiterpenos hidrocarbonetos (47,70% e 39,42%, respectivamente), indicando que a composição química desses hidrolatos não são tão semelhantes à dos O.E. Provavelmente a atividade antifúngica dos hidrolatos pode ser atribuída aos compostos químicos presentes, os quais podem interferir nas membranas microbianas, na parede celular ou na atividade de enzimas microbianas (D'Amato *et al.*, 2018).

As propriedades antimicrobianas dos hidrolatos dependem da cepa microbiana e da concentração. A pesquisa conduzida por Paramalingam *et al.* (2021) indicou que os hidrossóis de *Melaleuca alternifolia* e limão kaffir exibiram inibição significativa no crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (TR4) em todas as concentrações. Entretanto, o aumento da concentração do hidrossol de limão kaffir até 70% não resultou em aumento da atividade inibitória em comparação com o hidrossol de *Melaleuca alternifolia*, que demonstrou uma tendência ascendente. Todas as concentrações de hidrolato de *Cistus ladanifer* demonstraram inibição no crescimento micelial de quatro cepas microbianas (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, *Cryphonectria parasitica* e *Phytophthora cinamomi*), com o efeito inibitório variando significativamente conforme a concentração. Nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{L mL}^{-1}$, o crescimento micelial de todas as espécies testadas foi completamente inibido, exceto para *F. oxysporum*. *R. solani* foi a espécie mais suscetível ao hidrolato, com um ED50 de 88,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$, enquanto *F. oxysporum* mostrou menor sensibilidade, com um ED50 de 235,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os autores destacaram que os efeitos observados podem estar relacionados ao alto teor de monoterpenos

oxigenados, como trans-pinocarveol, pinocarvona e acetato de bornila presentes no hidrolato (Pérez-Izquierdo; Serrano-Pérez; Rodríguez-Molina, 2022).

A maioria das espécies de *Aspergillus* produz principalmente esporos assexuados, conhecidos como conídios, que atuam como propágulos e unidades infecciosas (Kim *et al.*, 2019). Nas plantações de sisal, é comum encontrar o *A. welwitschiae* no solo próximo às raízes e em diferentes partes da planta. Além disso, esse fungo libera esporos leves, que são prontamente dispersados pelo vento (Duarte *et al.*, 2018). Tanto o óleo essencial quanto os hidrolatos de *M. verrucosa* demonstraram redução significativa no número de esporos de *A. welwitschiae*. Esse resultado é fundamental para o manejo da podridão vermelha do sisal, pois uma quantidade menor de esporos implica em uma fonte menor de inóculo, diminuindo as chances de novas infecções (Lima, 2021).

Os compostos majoritários, sua atividade sinérgica ou mesmo compostos em menores quantidades podem ter contribuído para a inibição eficiente do número de esporos de *A. welwitschiae* no presente estudo. Pesquisas adicionais podem ser conduzidas para elucidar a atividade antifúngica aqui encontrada. Apesar disso, os resultados confirmaram o potencial da espécie estudada, contribuindo assim para pesquisas futuras sobre essa planta e para o desenvolvimento de métodos mais inovadores e sustentáveis no controle da podridão vermelha do sisal.

4. Conclusões

A redução no número de esporos de *A. welwitschiae*, obtida por meio do uso de O.E. e hidrolatos (folhas, caule e frutos) de *M. verrucosa* em testes *in vitro*, evidencia um efeito antifúngico, destacando especialmente o hidrolato do caule.

Novas investigações são necessárias antes que possam ser sugeridos como agentes antifúngicos comerciais e naturais para o manejo da podridão vermelha do sisal.

5. Referências Bibliográficas

ANGELINI, L. G. *et al.* Composition and antifungal activity of the essential oils hydrodistilled from three accessions of pastinocello carrot (*Daucus carota* L. ssp. major). **Industrial Crops and Products**, v. 181, p. 114797, 2022.

ACHIMÓN, F. *et al.* Chemical composition and antifungal properties of commercial essential oils against the maize phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 53, n. 4, p. 292-303, 2021.

AĆIMOVIĆ, M. *et al.* Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses. **Advanced technologies**, v. 9, n. 2, p. 54-70, 2020.

AĆIMOVIĆ, M. G. Production and Use of Hydrolates from the Distillation Process of Aromatic Plants. *In: Agricultural Waste: Environmental Impact, Useful Metabolites and Energy Production*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 453-487.

BAJER, T. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from *Epilobium parviflorum* Schreb. **Industrial Crops and products**, v. 100, p. 95-105, 2017.

BRANDÃO, R. M. *et al.* *In vitro* and in vivo efficacy of poly (lactic acid) nanofiber packaging containing essential oils from *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. against *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* in table grapes. **Food Chemistry**, v. 400, p. 134087, 2023.

CARVALHO, Z. S. *et al.* Atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia alba* em *Aspergillus welwitschiae*. **MAGISTRA**, v. 33, n. 2023.

CIOCARLAN, A. *et al.* Chemical composition and assessment of antimicrobial activity of lavender essential oil and some by-products. **Plants**, v. 10, n. 9, p. 1829, 2021.

D'AMATO, S. *et al.* Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. **Food Control**, v. 86, p. 126-137, 2018.

DUARTE, E. A. A. *et al.* Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschiae* (and not *A. niger*) is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1227, 2018.

GASPAR-PINTILIESCU, A. *et al.* Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of hydrosols from some aromatic Lamiaceae plants. *In: Proceedings*. MDPI, 2020. p. 21.

KIM, M. J. *et al.* The velvet repressed *vidA* gene plays a key role in governing development in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Microbiology**, v. 57, p. 893-899, 2019.

LI, Y. *et al.* *Illicium verum* essential oil, a potential natural fumigant in preservation of lotus seeds from fungal contamination. **Food and chemical toxicology**, v. 141, p. 111347, 2020.

LIMA, RENATA. **Potencial de controle preventivo da Podridão vermelha do Sisal na produção de mudas com aplicação de óleos essenciais e hidrolato de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown**. 2021. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2021.

PARAMALINGAM, P. *et al.* *In vitro* evaluation of antifungal activity of selected Malaysian plants against the wilt pathogen of banana, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4. **Malaysian Journal Of Science**, p. 16-24, 2021.

PÉREZ-IZQUIERDO, C.; SERRANO-PÉREZ, P.; RODRÍGUEZ-MOLINA, M. D. C. Chemical composition, antifungal and phytotoxic activities of *Cistus ladanifer* L. essential oil and hydrolate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 45, p. 102527, 2022.

QUINTANILHA-PEIXOTO, G. *et al.* Phylogenomics and gene selection in *Aspergillus welwitschiae*: Possible implications in the pathogenicity in *Agave sisalana*. **Genomics**, v. 114, n. 6, p. 110517, 2022.

QUINTANILHA-PEIXOTO, G. *et al.* Calm before the storm: A glimpse into the secondary metabolism of *Aspergillus welwitschiae*, the etiologic agent of the sisal bole rot. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 631, 2019.

RAYA, F. T. *et al.* Molecular epidemiology of sisal bole rot disease suggests a potential phytosanitary crisis in Brazilian production areas. **Frontiers in Chemical Engineering**, v. 5, p. 1174689, 2023.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2023. Disponível em: < <https://www.R-project.org/>>. Acesso em: jan. 2024.

SARATHAMBAL, C.; RAJAGOPAL, S.; VISWANATHAN, R. Mechanism of antioxidant and antifungal properties of *Pimenta dioica* (L.) leaf essential oil on *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 2497-2506, 2021.

ZATLA, A. T. *et al.* Efficacy of essential oil and hydrosol extract of *Marrubium vulgare* on fungi responsible for apples rot. **Anti-Infective Agents**, v. 18, n. 3, p. 285-293, 2020.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do método de extração de compostos fenólicos bioativos com banho ultrassônico, viabilizou a identificação e quantificação desses compostos na planta de *Mimosa verrucosa*. A otimização da extração pode contribuir para pesquisas futuras com essa planta.

A avaliação do teor e composição química do O.E. em diferentes órgãos da *Mimosa* mostra o potencial aromático da planta e que existe diferença na composição química do O.E. a depender do órgão ao qual foi extraído. Esse trabalho é um dos primeiros a analisar o O.E. dessa planta em meio acadêmico.

No que diz respeito ao potencial antifúngico, os resultados promissores obtidos na avaliação contra o fungo causador da podridão vermelha do sisal, indicam um grande potencial de utilização do O.E. e hidrolatos para o manejo da doença. Contudo, é importante ressaltar que são necessários mais testes, especialmente *in vivo*, para validar e consolidar esses resultados.

Este estudo também destaca a necessidade de mais pesquisas com plantas da Caatinga, um ecossistema promissor pela sua vasta biodiversidade. Esta região única do Brasil abriga uma riqueza inexplorada de espécies vegetais. A compreensão da riqueza fitoquímica dessas plantas pode abrir portas para o desenvolvimento de novos produtos com potenciais aplicações em diversas áreas, como medicina, agricultura e alimentos.