



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

FLAYANNA GOUVEIA BRAGA DIAS

DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E PROSPECÇÃO
FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Physalis angulata* L.,
SILVESTRE E CULTIVADA

FORTALEZA

2020

FLAYANNA GOUVEIA BRAGA DIAS

DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E PROSPECÇÃO
FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Physalis angulata* L., SILVESTRE E
CULTIVADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

Coorientadora: Profa. Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D532d Dias, Flayanna Gouveia Braga.
Determinação de propriedades biológicas e prospecção fitoquímica dos extratos das folhas de *Physalis angulata* L., silvestre e cultivada / Flayanna Gouveia Braga Dias. – 2019.
89 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.
Coorientação: Prof. Dr. Larissa Morais Ribeiro da Silva.
1. Potencial antimicrobiano. 2. Potencial antioxidante. 3. Compostos bioativos. 4. Compostos fenólicos.
I. Título.

CDD 664

FLAYANNA GOUVEIA BRAGA DIAS

DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E PROSPECÇÃO
FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Physalis angulata* L., SILVESTRE E
CULTIVADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a D. Sc. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a D. Sc. Larissa Morais Ribeiro da Silva (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a D. Sc. Otília Deusdênia Loiola Pessoa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

D. Sc. Celli Rodrigues Muniz
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Prof. D. Sc. Paulo Henrique Machado de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo amor e por ter me dado força e discernimento durante toda a minha vida, sempre me conduzindo pelos caminhos corretos, porém nem sempre fáceis.

À minha tia Elizabeth Gouveia (Beta) (*in memorian*), cujo amor e carinho dedicados a mim e a minha filha foram essenciais em muitos momentos da minha vida e que continuo a sentir, pois sei que sempre estará na torcida por mim.

À minha mãe que apesar da distância nunca mediu esforços para se fazer presente na minha vida. Obrigada por ser a pessoa com quem eu sempre posso contar e por todo amor dedicado a mim e aos meus filhos Vitória e Miguel.

Ao meu esposo Tiago por todo amor, carinho, paciência e apoio desde a época do cursinho pré-vestibular até os dias atuais. Amo-te!

À minha filha Vitória por todo amor e compreensão quando precisei ficar ausente. Saiba que tudo foi e sempre será por você e agora também por seu irmão Miguel que está a caminho.

À professora Evânia pelo acolhimento no Laboratório de Microbiologia de Alimentos – UFC, oportunidades, ensinamentos passados desde o segundo semestre da graduação, orientação, convivência, compreensão, carinho e amizade. Obrigada por me ajudar a realizar esse sonho!

À professora Larissa pela sua orientação, convivência, amizade, carinho, dedicação ao repassar seus ensinamentos e valiosos conselhos.

À professora Otília pelo acolhimento e aprendizado no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais II da UFC, o qual foi essencial para o enriquecimento do trabalho desenvolvido.

À pesquisadora Celli pelo acolhimento e aprendizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da EMBRAPA contribuindo de maneira significativa para o enriquecimento do trabalho desenvolvido.

Ao professor Marcos Esmerado do Departamento de Fitotecnia por suas sugestões no desenvolvimento do projeto de dissertação.

À minha amiga Jaiana por todo carinho e amizade desde a graduação. Obrigada também por toda ajuda, pois foi essencial para a realização deste trabalho!

Aos bolsistas Rayane, Eurilany, Fernando Eugênio, Denise e Davi por toda ajuda e dedicação no desenvolvimento deste trabalho. Vocês foram essenciais! Muito obrigada!!!

Aos técnicos dos laboratórios que estavam sempre disponíveis para ajudar, em

especial ao Fernando e a Liana do Laboratório de Frutos e Hortaliças da UFC, ao Tobias do Laboratório de Química do IFCE Fortaleza, ao Chaguinha do Laboratório de de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais II da UFC, aos técnicos do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN).

Aos professores do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará que tanto contribuíram com seus ensinamentos todos esses anos.

Aos secretários, funcionários da limpeza e outros que contribuíram de forma direta ou indiretamente para minha formação.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

RESUMO

A diversidade de plantas em todo o mundo, bem como a variação química implica em uma grande quantidade de substâncias bioativas. O uso de extratos de plantas com propriedades biológicas surge como uma alternativa viável, saudável e menos onerosa quando comparada a substâncias sintéticas. Neste contexto, objetivou-se com esta pesquisa realizar um *screening* fitoquímico e avaliar os extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* L., silvestres e cultivadas, quanto a influência do método de extração e material vegetal na bioacessibilidade de compostos bioativos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, bem como a toxicidade destes sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. Os extratos foram obtidos a partir das folhas silvestres e cultivadas de *Physalis angulata* e três diferentes métodos extrativos (decoção, maceração e assistidos por ultrassom). Estes foram avaliados através de espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), unidimensionais, antes e após a extração de fase sólida, quantificação de compostos bioativos antes e após digestão gastrointestinal *in vitro*, atividade antioxidante através de métodos espectrofotométricos (ABTS $^{*+}$ e DPPH), atividade antimicrobiana pelos métodos de difusão em ágar, microdiluição em caldo, danos morfológicos às células bacterianas (Microscopia Eletrônica de Transmissão, além de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*. A análise de variância mostrou diferenças significativas na interação entre os métodos extrativos e o tipo de material vegetal estudados. Os extratos das folhas silvestres e cultivadas obtidos por decoção apresentaram, respectivamente, os maiores teores de compostos fenólicos (15310,79 e 8115,95 mg EAG/100 g de extrato seco) e consequentemente, maior potencial antioxidante para ambos os métodos analíticos (ABTS $^{*+}$ e DPPH), diferindo significativamente dos demais métodos extrativos. Os índices de bioacessibilidade de compostos fenólicos dos extratos foram reduzidos (45,2% a 87,8%) após a digestão gastrointestinal simulada, apresentando baixo potencial antioxidante quando comparado aos dados obtidos antes da digestão. O potencial antimicrobiano dos extratos foi observado apenas frente as bactérias Gram-positivas por ambos os métodos analíticos, apresentando CMI's entre 1,0 e 25 mg/ mL para *Staphylococcus aureus* e de 2,5 a 6,25 mg/ mL para *Listeria monocytogenes*, sendo também observados os danos morfológicos causados às células bacterianas através de imagens de microscopia eletrônica de transmissão. As frações metanólicas dos extratos das folhas cultivadas obtidos por decoção e assistidos por ultrassom também apresentaram potencial antimicrobiano sobre os microrganismos Gram-positivos com CIM's de 1,0 mg/ mL de ambos os extratos sobre *Staphylococcus aureus* e de 2,7 mg/ mL e

1,0 mg/ mL sobre *Listeria monocytogenes*, respectivamente. O potencial antimicrobiano destes extratos pode ser atribuído ao vitanolideo 4β -hidroxivitanolideo E identificado nos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C como composto majoritário. Os extratos aquosos de *Physalis angulata* com potencial antimicrobiano e antioxidante, bem como suas respectivas frações (metanólicas e aquosas) não apresentaram toxicidade ($\text{CL}_{50} > 1000 \mu\text{g/ mL}$) sobre o microcrustáceo *Artemia salina* apresentando potencial para aplicação em alimentos, evitando assim o uso de solventes orgânicos e substâncias sintéticas.

Palavras-chave: Potencial antimicrobiano. Potencial antioxidante. Compostos bioativos. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

The diversity of plants worldwide, as well as chemical variation implies a large amount of bioactive substances. The use of plant extracts with biological properties appears as a viable, healthy and less expensive alternative when compared to synthetic substances. In this context, the objective of this research was to carry out a phytochemical screening and to evaluate the aqueous extracts of the leaves of *Physalis angulata* L., wild and cultivated, regarding the influence of the extraction method and plant material on the bioaccessibility of bioactive compounds, antioxidant activity, activity antimicrobial, as well as their toxicity on the microcrustacean *Artemia salina*. The extracts were obtained from wild and cultivated leaves of *Physalis angulata* and three different extractive methods (decoction, maceration and assisted by ultrasound). These were evaluated using one-dimensional hydrogen-1 (^1H NMR) and carbon-13 (^{13}C NMR) nuclear magnetic resonance spectra, before and after solid phase extraction, quantification of bioactive compounds before and after gastrointestinal digestion *in vitro*, antioxidant activity by spectrophotometric methods (ABTS • + and DPPH), antimicrobial activity by agar diffusion methods, broth microdilution, morphological damage to bacterial cells (Transmission Electron Microscopy, in addition to toxicity using the *Artemia salina* microcrustacean. variance showed significant differences in the interaction between the extractive methods and the type of plant material studied. The extracts of wild and cultivated leaves obtained by decoction showed, respectively, the highest levels of phenolic compounds (15310.79 and 8115.95 mg EAG/100 g of dry extract) and, consequently, greater antioxidant potential for both analytical methods (ABTS • + and DPPH), differing significantly from the other extractive methods. The bioaccessibility indexes of phenolic compounds in the extracts were reduced (45.2% to 87.8%) after simulated gastrointestinal digestion, presenting low antioxidant potential when compared to data obtained before digestion. The antimicrobial potential of the extracts was observed only against Gram-positive bacteria by both analytical methods, presenting CMI's between 1.0 and 25 mg / mL for *Staphylococcus aureus* and 2.5 to 6.25 mg / mL for *Listeria monocytogenes*, also being observed the morphological damage caused to bacterial cells through transmission electron microscopy images. The methanolic fractions of cultivated leaf extracts obtained by decoction and assisted by ultrasound also showed antimicrobial potential on Gram-positive microorganisms with MICs of 1.0 mg / mL of both extracts on *Staphylococcus aureus* and of 2.7 mg / mL and 1.0 mg / mL on *Listeria monocytogenes*, respectively. The antimicrobial potential of these extracts can be attributed to vitanolide 4x-hydroxyvitanolide E identified in the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra as the

major compound. The aqueous extracts of *Physalis angulata* with antimicrobial and antioxidant potential, as well as their respective fractions (methanolic and aqueous) did not present toxicity ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g} / \text{mL}$) on the microcrustacean *Artemia salina* presenting potential for application in food, thus avoiding the use of organic solvents and synthetic substances.

Keywords: Antimicrobial potential. Antioxidant potential. Bioactive compounds. Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagens de <i>Physalis angulata</i> L.....	22
Figura 2 – Principais constituintes químicos encontrados na família <i>Solanaceae</i>	23
Figura 3 – Placas de Petri apresentando ausência e presença do halo de inibição bacteriana.....	29
Figura 4 – Esquema de distribuição da microplaca utilizada na microdiluição em caldo.....	29
Figura 5 – Distribuição granulométrica das folhas pulverizadas de <i>Physalis angulata</i> ..	43
Figura 6 – Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos aquosos das folhas de <i>Physalis angulata</i> obtidos por diferentes métodos de extração frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	55
Figura 7 – Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos aquosos das folhas de <i>Physalis angulata</i> obtidos por diferentes métodos de extração frente a <i>L. monocytogenes</i>	56
Figura 8 – Micrografia eletrônica de transmissão de <i>S. aureus</i> sob o efeito antimicrobiano do extrato aquoso das folhas de <i>Physalis angulata</i>	59
Figura 9 – Micrografia eletrônica de transmissão de <i>S. aureus</i> sem o efeito antimicrobiano do extrato aquoso das folhas de <i>Physalis angulata</i>	59
Figura 10 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FCDEC.....	63
Figura 11 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FSDE.....	64
Figura 12 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FCMAC.....	65
Figura 13 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FSMAC.....	66
Figura 14 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FCUS.....	67
Figura 15 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FSUS.....	68
Figura 16 – Representação estrutural do composto 4 β -hydroxywithanolide E.....	69
Figura 17 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FCDEC.....	70

Figura 18 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FCUS.....	71
Figura 19 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em MeOD) de FCDEC.....	72
Figura 20 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em MeOD) de FCUS-2.....	73
Figura 21 – Espectro de RMN 13C (125 MHz em D2O) de FCDEC-2.....	74
Figura 22 – Espectro de RMN 13C (125 MHz em D2O) de FCUS.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades biológicas dos extratos de diferentes partes de <i>Physalis angulata</i> L.	24
Tabela 2 – Extratos vegetais com atividade antimicrobiana.....	28
Tabela 3 – Rendimentos dos extratos aquosos das folhas de <i>Physalis angulata</i>	45
Tabela 4 – Resumo da análise de variância dos compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante (ABTS e DPPH) e bioacessibilidade dos extratos aquosos das folhas de <i>Physalis angulata</i> antes e após digestão simulada.....	47
Tabela 5 – Comparações entre médias dos compostos fenólicos, atividade antioxidante (ABTS e DPPH) e bioacessibilidade dos extratos aquosos de <i>Physalis angulata</i>	48
Tabela 6 – Índices de soma de postos para o ordenamento dos métodos extrativos e materiais vegetais para as variáveis teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante (ABTS e DPPH) antes e após digestão simulada.....	52
Tabela 7 – Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos de <i>Physalis angulata</i> representada por zonas de inibição através do método de difusão em ágar.....	53
Tabela 8 – Atividade biológica das frações aquosas e metanólicas obtidas a partir dos extratos aquosos das folhas de <i>Physalis angulata</i>	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	<i>Physalis angulata</i> L.	21
3.2	Compostos bioativos	24
3.3	Potencial antioxidante	25
3.4	Bioacessibilidade de compostos bioativos	26
3.5	Potencial antimicrobiano	27
3.6	Métodos de extração	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Obtenção do material vegetal	32
4.2	Pré-tratamento das folhas de <i>Physalis angulata</i> L.	32
4.3	Determinação do diâmetro médio de partícula	32
4.4	Elaboração dos extratos	33
4.4.1	<i>Decocção</i>	33
4.4.2	<i>Maceração</i>	33
4.4.3	<i>Extração assistida por ultrassom</i>	33
4.5	Rendimento dos extratos	34
4.6	Compostos bioativos e potencial antioxidante dos extratos	34
4.6.1	<i>Compostos fenólicos totais</i>	34
4.6.2	<i>Potencial antioxidante</i>	35
4.6.2.1	<i>Ensaio do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)</i>	35
4.6.2.2	<i>Ensaio do radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS•+)</i>	35
4.7	Bioacessibilidade de compostos fenólicos in vitro	36
4.7.1	<i>Digestão gastrointestinal simulada</i>	36
4.7.2	<i>Quantificação de compostos fenólicos e potencial antioxidante após digestão</i>	36
4.7.3	<i>Índices de Bioacessibilidade</i>	36

4.8	Potencial antimicrobiano	37
4.8.1	<i>Preparo de inóculo</i>	37
4.8.2	<i>Método de difusão em ágar</i>	38
4.8.3	<i>Concentração mínima inibitória (CMI)</i>	38
4.8.4	<i>Concentração mínima bactericida (CMB)</i>	39
4.8.5	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i>	39
4.9	Toxicidade dos extratos aquosos de <i>Physalis angulata</i> sobre <i>Artemia salina</i>	39
4.10	Perfil fitoquímico dos extratos aquosos de <i>Physalis angulata</i> L.	40
4.10.1	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹ H) e de Carbono-13 (RMN ¹³ C)</i>	40
4.10.2	<i>Extração em fase sólida</i>	41
4.10.3	<i>Atividade biológica e quantificação de compostos bioativos</i>	41
4.11	Análises estatísticas	41
4.11.1	<i>Índice de soma de postos ou “ranking”</i>	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Caracterização morfológica e rendimento dos extratos aquosos das folhas de <i>Physalis angulata</i>	43
5.1.1	<i>Diâmetro médio de partícula</i>	43
5.1.2	<i>Rendimento dos extratos (%)</i>	45
5.2	Quantificação de compostos fenólicos e potencial antioxidante antes e após digestão <i>in vitro</i>	47
5.3	Potencial antimicrobiano	53
5.3.1	<i>Difusão em ágar</i>	53
5.3.2	<i>Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração mínima bactericida (CMB)</i>	55
5.3.3	<i>Danos morfológicos causados às células bacterianas</i>	58
5.4	Avaliação da toxicidade dos extratos de <i>Physalis angulata</i> sobre <i>Artemia salina</i>	60
5.5	Screening fitoquímico dos extratos aquosos de <i>Physalis angulata</i>	61
5.5.1	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	61
5.5.2	<i>Atividade biológica das frações aquosas e metanólicas dos extratos de <i>Physalis angulata</i></i>	76

6	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

Physalis angulata L. (*Solanaceae*) é uma herbácea de ciclo anual abundantemente distribuída nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde é conhecida popularmente como “camapu”. Nessas regiões, os frutos são consumidos *in natura* e na forma de sucos como sedativo, diurético, depurativo e anti-reumático. As folhas são empregadas no tratamento de inflamações na bexiga, malária, hepatite e dermatite (REGINFO-SALGADO; VARGAS-ARANA, 2013).

Estudos com extratos de *Physalis angulata* têm demonstrado importantes propriedades biológicas, tais como anti-cancerígena e antiinflamatória (HSEU *et al.*, 2011), antibacteriana (DONKOR *et al.*, 2016), analgésica (UKWUBILE *et al.*, 2016) e antioxidante (KUSUMANINGTYAS *et al.*, 2015). Estas têm sido relacionadas com a diversidade de fitoquímicos presentes nesta espécie como flavonoides simples ou glicosados, ácidos graxos de cadeia linear (C6 a C24), hidroxilados, epoxilados, ácido ascórbico, carotenoides, alcaloides e vitaesteróides (REGINFO-SALGADO; VARGAS-ARANA, 2013).

O potencial antioxidante de extratos vegetais depende da concentração de compostos fenólicos e do perfil de acumulação destes nos tecidos vegetais (BARRIADA-BERNAL *et al.*, 2014). A concentração é influenciada por condições ambientais, idade e estágio fenológico, enquanto o perfil fenólico é mais estável e varia entre os diferentes grupos de vegetais, seguindo uma tendência específica para cada espécie (MEDINA-MEDRANO *et al.*, 2015).

O potencial antimicrobiano de extratos vegetais tem sido atribuído a uma rica variedade de substâncias presentes nas plantas tais como saponinas, taninos, alcalóides, alcenilfenóis, glicocalcóides, flavonóides, sesquiterpenos, lactonas, terpenóides e ésteres (TAJKARIMI *et al.*, 2010). Alguns estudos reportados na literatura, também, têm demonstrado que o efeito sinérgico entre estas substâncias tem intensificado as propriedades bioativas de extratos vegetais e conseqüentemente a ação sobre patógenos (CABRAL; PINTO; PATRIARCA, 2013).

A busca por compostos de origem natural com alta atividade biológica aumentou consideravelmente nas últimas décadas, principalmente, devido ao seu potencial preventivo de doenças (GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013). No entanto, encontrar métodos extrativos eficientes bem como a caracterização de compostos bioativos a partir de fontes naturais tem sido um grande desafio para pesquisadores (OLIVEIRA *et al.*, 2016)

Os métodos extrativos mais citados na literatura incluem maceração, decocção,

infusão, turbólise percolação, extração contínua a quente (Soxhlet), extração em contracorrente, extração assistida por micro-ondas, ultrassom e fluido supercrítico (KOÇAK; PAZIR, 2018). Além dos métodos extrativos, outros fatores também podem influenciar na obtenção de compostos a partir de extratos vegetais, tais como a região desse material, o grau de processamento, o tamanho de partícula, o tempo e a temperatura de extração, o tipo, a polaridade e a concentração do solvente extrator (TIWARI *et al.*, 2011; XYNOS *et al.*, 2012).

Inúmeras pesquisas com compostos bioativos têm demonstrado efeitos benéficos à saúde, fato que tem motivado consumidores na busca por produtos alimentícios com estas alegações. No entanto, são necessários estudos em relação à biodisponibilidade destes após a digestão gastrointestinal.

A investigação sobre a biodisponibilidade de compostos fenólicos e outros antioxidantes de matrizes sólidas, por exemplo, é importante uma vez que apenas os compostos libertados da matriz do alimento e/ou absorvidos no intestino delgado ficam biodisponíveis e em condição de serem utilizados para as funções do corpo, podendo, assim, exercer os seus efeitos benéficos (PALAFOX-CARLOS *et al.*, 2011).

Diante do exposto, pesquisas com extratos aquosos de *Physalis angulata* L. como fonte de compostos bioativos com propriedades antioxidante e antimicrobiana podem ser uma alternativa promissora para aplicação em alimentos agregando-lhes propriedades funcionais e desejáveis à saúde.

2 OBJETIVOS

Abaixo estão descritos o objetivo geral, bem como os objetivos específicos que delinearão o estudo.

2.1 Objetivo geral

Determinar o perfil fitoquímico dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* L., silvestres e cultivadas, e avaliá-los quanto à influência do método de extração e material vegetal de origem na bioacessibilidade de compostos bioativos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, bem como, testar os extratos com melhores resultados quanto a toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos aquosos a partir das folhas de *Physalis angulata* L. (silvestre e cultivada) utilizando diferentes métodos de extração (decoção, maceração e assistido por ultrassom);
- Quantificar os compostos fenólicos totais dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* L., silvestres e cultivadas, antes e após a digestão simulada;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* L., silvestres e cultivadas, através dos métodos espectrofotométricos utilizando os radicais livres ABTS⁺ e DPPH antes e após digestão simulada;
- Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* dos extratos sobre *Escherichia coli* e as bactérias patogênicas *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Enteritidis* através dos métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo;
- Avaliar os danos morfológicos causados às células bacterianas através de microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliar a toxicidade dos extratos com maior potencial antimicrobiano sobre o microcrustáceo *Artemia salina*;

- Realizar o estudo fitoquímico dos extratos aquosos com maior potencial antimicrobiano através de espectros de RMN e avaliar as frações obtidas por extração de fase sólida quanto ao potencial antimicrobiano, antioxidante e toxicidade.

3 REVISÃO DE LITERATURA

No texto que segue abaixo, serão expostas informações acerca da *Physalis angulata* L, bem como o potencial antioxidante, acessibilidade e métodos de extração dos compostos ativos presentes no vegetal.

3.1 *Physalis angulata* L.

São frutíferas de cultivo simples, anuais e sua propagação se dá por sementes. Encontram-se abundantemente distribuídas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, crescendo principalmente de forma espontânea, por esse motivo é tida como erva daninha. Nessas regiões, é conhecida popularmente como “camapú”, “bucha de rã”, “Juá de capote” ou “Mata fome” (LORENZI; MATOS, 2002).

Pertencente ao gênero *Physalis* da família Solanaceae, são herbáceas, eretas, de 40 a 70 cm de altura e apresentam ramificação densa. As folhas são aveludadas e triangulares, enquanto o talo principal, herbáceo e piloso, apresenta 8 a 12 nós. O fruto é climatérico do tipo baga, carnoso, de formato redondo, que contém inúmeras sementes e exibe uma coloração amarelo-alaranjado quando maduro. O cálice é formado por cinco sépalas e envolve o fruto durante o desenvolvimento e amadurecimento conferindo-lhe proteção contra insetos, patógenos e condições climáticas adversas (Figura 1) (ALVARADO *et al.*, 2004; LORENZI; MATOS, 2002). Além de prolongar a vida pós-colheita dos frutos, o cálice é considerado um indicador para determinação do ponto de colheita (ÁVILA *et al.*, 2006).

As espécies de *Physalis* são as mais evoluídas da família *Solanaceae* em níveis de oxidação biogenética. Isso se deve à presença de metabólitos polioxigenados, os vitaesteróides, que constituem uma classe de compostos químicos bioativos denominados lactonas esteróidais (C-28) naturais, que reproduzem o esqueleto intacto ou modificado do ergostano. As plantas desse gênero possuem a habilidade de oxidar o átomo de carbono do núcleo esteroidal e da cadeia lateral, com exceção aos carbonos C-8, C-9 e C-11 originando uma ampla variedade de estruturas químicas. Como resultado dessa diversidade estrutural, os vitaesteróides foram subdivididos em oito grupos (Figura 2): vitanolídeos e vitanolídeos modificados (anéis A ou D aromatizados 2,3), vitafisalinas, fisalinas, acnistinas, ixocarpalactonas e perulactonas (TOMASSINI *et al.*, 2000).

Figura 1 – Imagens de *Physalis angulata* L.

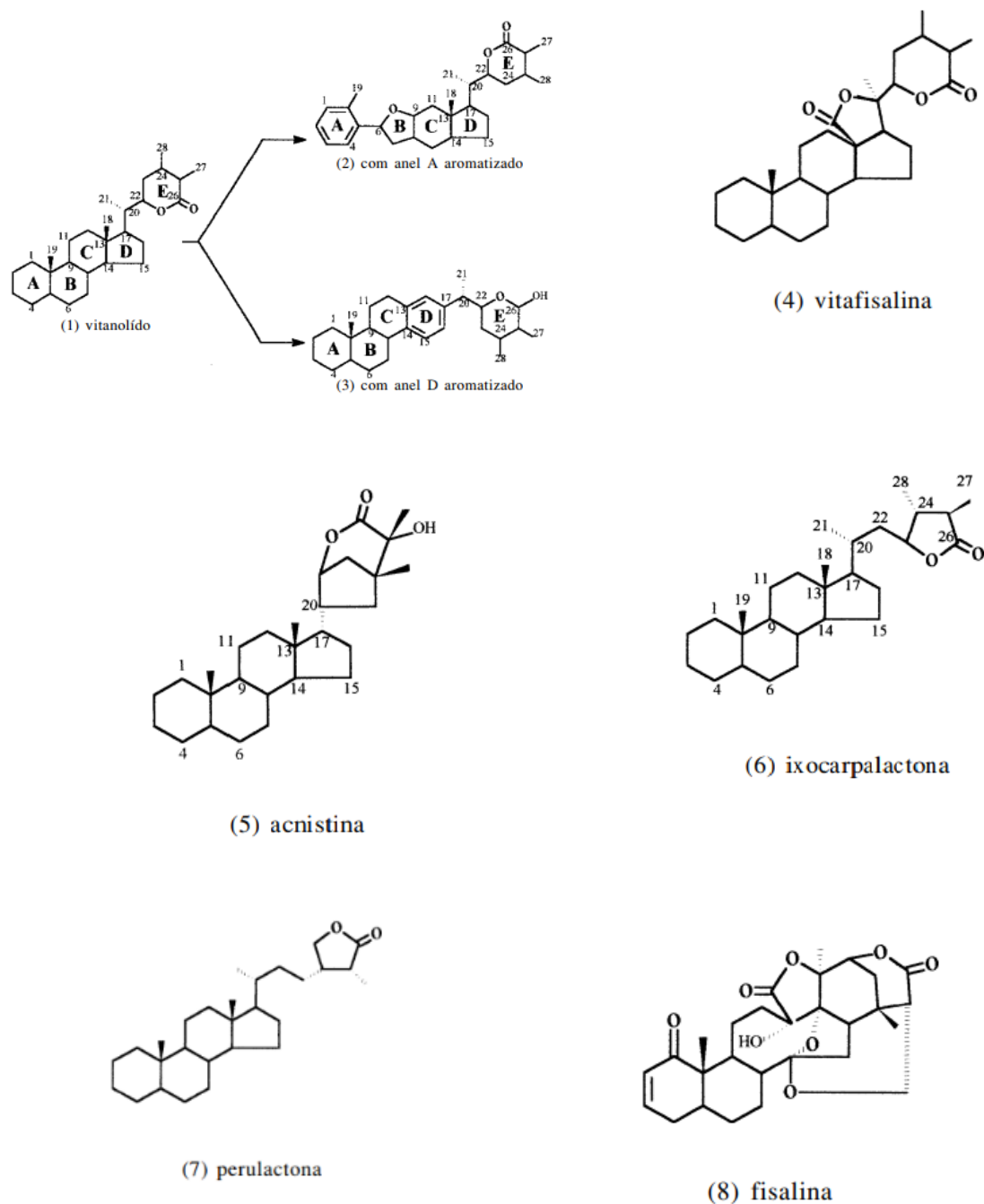


A: lâminas foliares com comprimento médio de 3 a 10 cm e largura de 2 a 8 cm apresentando margens ligeiramente denteadas; B: flor; C: cálice envolvendo o fruto; D: fruto sem o cálice. Fonte: elaborada pela autora.

Além dos vitaesteróides, uma variável presença de constituintes tem sido relatada em estudos químicos desta espécie, tais como flavonóides simples ou glicosilados (Campferol, Quercetina e Rutina), esteróides (β -sitosterol, Estigmasterol, Campesterol e 2,4-metileno-colesterol), ácidos graxos de cadeia linear (C6 a C24), carotenoides, ácido ascórbico e alcaloides (TOMASSINI *et al.*, 2000).

O gênero *Physalis* é constituído por diversas espécies de incontestável valor etnofarmacológico. A espécie *Physalis angulata* L. é uma das mais representativas, sendo-lhe atribuída várias propriedades na medicina tradicional (HAWKES *et al.*, 1991). No Nordeste do Brasil e Amazônia, por exemplo, há muito tempo os índios já utilizavam a infusão das folhas para fins diuréticos, inflamações da bexiga, do baço e contra icterícia (SOARES *et al.*, 2003). São também empregadas no tratamento da malária, hepatite e dermatite. O suco do fruto é considerado calmante e depurativo, sendo empregado contra reumatismos e dores no ouvido. Na Colômbia, algumas tribos indígenas utilizam o decocto de folhas e frutos como anti-inflamatório e antisséptico para doenças de pele. No Peru, as raízes maceradas em rum são empregadas no tratamento da diabetes (LORENZI; MATOS, 2002).

Figura 2 – Principais constituintes químicos encontrados na família *Solanaceae*



Fonte: Tomassini *et al.*, (2000).

Como consequência da importância etnofarmacológica, muitos estudos têm sido realizados a fim de justificar a vasta utilização dessa espécie na medicina popular sob a forma de infusões, decocções e macerações (REGINFO-SALGADO; VARGAS-ARANA, 2013). Na Tabela 1, encontram-se descritas algumas atividades biológicas reportadas na literatura.

Tabela 1 – Atividades biológicas dos extratos de diferentes partes de *Physalis angulata* L

Material vegetal	Solvente	Atividade biológica	Referência bibliográfica
Cálice e frutos	Metanol	Antineoplásica	Ribeiro <i>et al.</i> (2002)
Raízes	Água	Antinociceptiva	Bastos <i>et al.</i> (2006)
Frutos	Água	Antimicrobiana	Donkor <i>et al.</i> (2012)
Frutos e folhas	Água e etanol	Antioxidante e imunomoduladora	Kusumaningtyasa <i>et al.</i> , (2015)
Folhas, cálices e frutos	Metanol	Antioxidante	Medina-Medrano <i>et al.</i> , (2015)
Folhas	Metanol	Analgésica e antiinflamatória	Ukwubile e Oise, (2016)
Partes aéreas (folha, flor e caule)	Água e metanol	Antibacteriana	Donkor <i>et al.</i> , (2016)
Raízes, folhas, cálices, flores e frutos	Etanol	Antioxidante	Cobadela-Velasco <i>et al.</i> , (2017)

Fonte: elaborada pela autora.

3.2 Compostos bioativos

A possibilidade de reduzir o risco de doenças através da dieta tem atraído não só a atenção da comunidade científica, mas também das indústrias alimentícias com o objetivo comum de desenvolver os atualmente conhecidos “alimentos funcionais” ou alimentos ricos em um ou mais compostos/substâncias bioativas que promovam efeitos positivos à saúde.

Segundo a ANVISA (RDC n. 02/2002), substâncias bioativas são os nutrientes e não nutrientes que possuem função metabólica ou fisiológica específica. Essas substâncias compreendem, entre outras, os carotenoides, os fitoesteróis, os flavonoides, os fosfolipídeos, os organossulfurados e os polifenóis.

Os compostos fenólicos representam a maior categoria de agentes fitoquímicos e encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo classificados em ácidos fenólicos, flavonoides, taninos diterpenos, estilbenos, curcuminóides, cumarinas, lignanas e outros (FRESCO *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2009). Esses compostos são responsáveis por diversas funções nas plantas, tais como a absorção de nutrientes, síntese proteica, atividade enzimática, fotossíntese, formação de compostos estruturais, alelopatia e fatores ambientais adversos (PALADINO; ZURITZ, 2011).

Os fitoquímicos podem ser encontrados em várias partes da planta, tais como folhas, caule, flor e frutos (AZMIR *et al.*, 2013). Estudos com extratos vegetais de diferentes partes das plantas têm mostrado ser uma opção viável uma vez que, são facilmente obtidos de

fontes naturais e têm demonstrado bons resultados quando aplicado em alimentos e produtos farmacológicos (WARNER *et al.*, 2003).

A estas substâncias são atribuídas inúmeras atividades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividade antioxidante, antiinflamatória e antibacteriana. Zhang *et al.* (2016) aplicaram extratos de alecrim e cravo em carnes de frango cruas armazenadas a 4°C. Ambos os extratos aumentaram a estabilidade da carne de frango quanto à oxidação lipídica e qualidade microbiológica. Reddy *et al.* (2005) avaliaram a vida de prateleira de biscoitos elaborados com extratos dos frutos de *Emblica officianalis*, folhas de *Moringa oleifera* e frutos de *Vitis vinífera* e observaram o efeito antioxidante semelhante ao antioxidante sintético (controle).

Donkor *et al.* (2016) avaliando a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólicos das partes aéreas de *Physalis angulata* L. e *Euphobia hirta* Linn *in vitro* e aplicados em formulações de pomadas para infecções cutâneas, observaram a efetividade de ambos os extratos sobre os microrganismos patogênicos, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Donkor *et al.* (2012) em outros estudos também relataram a atividade antimicrobiana dos extratos dos frutos de *Physalis angulata in vitro* e quando aplicado na formulação de pomadas contendo óxido de zinco, sugerindo a eficácia do tratamento para infecções estafilocócicas.

Oliveira *et al.* (2011) avaliando o potencial tecnológico dos extratos aquosos e etanólicos dos frutos de *Physalis angulata* observaram potencial antioxidante satisfatório quando comparado a outros frutos tropicais. A atividade antioxidante de *Physalis angulata* também foi evidenciada a partir de extratos dos frutos e folhas obtidos utilizando solventes polares (água e etanol), sendo relatado elevados teores de compostos fenólicos e sugerido pelos autores a aplicação destes extratos em alimentos (KUSUMANINGTYAS *et al.*, 2015).

3.3 Potencial antioxidante

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade de oxidação, através de um ou mais mecanismos químicos, como a inibição de radicais livres e a complexação de metais. Essas substâncias atuam evitando danos oxidativos estando presentes em pequenas concentrações (MAISUTHISAKUL *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2010).

A diversidade de plantas em todo o mundo, assim como a variação química implica em uma grande quantidade de substâncias bioativas. Assim, o uso de plantas como fonte de antioxidantes naturais, surge como uma alternativa viável, saudável e menos onerosa

quando comparada aos antioxidantes sintéticos (KRISHNAIAH *et al.*, 2011; MEDINA-MEDRANO *et al.*, 2015).

Os antioxidantes naturais incluem os tocoferóis, vitaminas C e E, carotenoides (carotenos e xantofilas) e os polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos). Esses últimos são sintetizados a partir do metabolismo secundário das plantas e acumulados em praticamente todos os tecidos (AZMIR *et al.*, 2013; OROIAN; ESRICHE, 2015). Muitos desses compostos possuem similaridades quanto à estrutura molecular básica, como por exemplo, a presença de um anel aromático ligado a um grupo hidroxila como é observado nos ácidos fenólicos e flavonoides, substâncias com alto potencial antioxidante (SHAHIDI *et al.*, 1992).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é quimicamente atribuída à capacidade de sequestro dos radicais livres através da doação de elétron (s) com ou sem átomo de hidrogênio, pela ação de quelar íons metálicos, ou pela inibição de enzimas oxidativas (SILVA; ROGEZ, 2013; PIETTA, 2000). Dessa forma, danos oxidativos às moléculas como os ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, dentre outras macromoléculas, podem ser evitados e conseqüentemente, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (MEDINA-MEDRANO *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2009).

Visto que os radicais livres podem causar danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, podem levar também a muitas patologias. Presume-se que a ingestão de antioxidantes capazes de neutralizar os radicais livres possa ter um papel importante na redução do risco de doenças, dessa forma, a identificação de fontes vegetais com alta capacidade antioxidante, seja esta derivada de compostos fenólicos e/ou vitaminas, é de extrema importância.

3.4 Bioacessibilidade de compostos bioativos

O efeito *in vivo* de todos os compostos fenólicos depende de vários fatores, a exemplo da sua absorção e das alterações promovidas ao longo do trato gastrointestinal. Ou seja, a quantidade total dessas moléculas presentes no material vegetal não reflete necessariamente a quantidade absorvida e metabolizada pelo organismo. Estima-se que 90-95% dos polifenóis resistem à digestão e se acumulam no lúmen do intestino grosso, onde a microbiota origina uma série de metabólitos de baixo peso molecular que, podem ser os verdadeiros responsáveis pelos efeitos benéficos à saúde (TUOHY *et al.*, 2012; GUERGOLETTI *et al.*, 2016).

A biodisponibilidade vem sendo definida como a proporção do composto ingerido que é absorvido e metabolizado por vias normais de absorção (SENGUL *et al.*, 2014). Entre os fatores que determinam a biodisponibilidade de compostos bioativos está a bioacessibilidade, que é definida como a fração de um composto que é liberado da matriz alimentar e se encontra potencialmente disponível para absorção e metabolização. Somente polifenóis liberados da matriz sólida pela ação de enzimas digestivas (intestino delgado) e microbiota bacteriana (intestino grosso) são bioacessíveis no intestino e, portanto, potencialmente biodisponíveis (SAURA - CALIXTO *et al.*, 2007; SCHULZ *et al.*, 2017).

Nesse contexto, os modelos de mimetização da digestão humana *in vitro* que simulam a digestão na cavidade oral, estômago, intestino delgado e no intestino grosso têm sido desenvolvidos e empregados para prever a liberação de compostos bioativos da matriz sólida (bioacessibilidade), e para avaliar as mudanças em seus perfis antes da absorção (biodisponibilidade) (HELAL *et al.*, 2014). Esses métodos têm sido amplamente utilizados uma vez que são rápidos, seguros e fiáveis, além de não envolverem as questões éticas dos estudos *in vivo* (BRIONES-LABARCA *et al.*, 2011).

3.5 Potencial antimicrobiano

As doenças transmitidas por alimentos, a resistência microbiana promovida pelo o uso indiscriminado de antibióticos e o uso excessivo de conservantes sintéticos têm impulsionado pesquisadores a buscarem substâncias que sejam mais seguras e ao mesmo tempo efetivas no controle microbiológico dos alimentos. Nesse sentido, surge uma demanda crescente do uso alternativo de substâncias provenientes de plantas, animais, bactérias, algas e fungos como agentes antimicrobianos naturais (TAJKARIMI *et al.*, 2010; GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Os compostos bioativos derivados das plantas, em sua maioria, são metabólitos secundários. Essas substâncias há muito são reconhecidas como agentes antimicrobianos, mas somente nos últimos trinta anos, essa atividade tem sido comprovada cientificamente. Dentre os fitoquímicos mais citados na literatura, destacam-se os ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonóides, taninos, cumarinas, terpenoides e alcalóides, como responsáveis pela ação antimicrobiana sobre microrganismos patogênicos e deteriorantes (HAYEC *et al.*, 2013).

Assim, pesquisas relacionadas à estrutura e função destes compostos, são necessárias para a elucidação e compreensão do mecanismo de ação sobre os microrganismos (SRINIVASAN *et al.*, 2001). Muitos desses estudos têm sido realizados a partir de extratos

vegetais e envolvem a recuperação de compostos bioativos, com propriedades antimicrobianas, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Extratos vegetais com atividade antimicrobiana

Extratos vegetais/Parte da planta	Microrganismos	Referência bibliográfica
Folhas e frutos de <i>Physalis alkekengi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Estakhr e Javdan (2011)
Folhas e caule de <i>Coscinium fenestratum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Goveas e Abraham (2013)
Folhas de <i>Passiflora caerulea</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Serratia</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp.	Santhoshkumar <i>et al.</i> , (2017)
Folhas de <i>Azadirachta indica</i> Juss	<i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Fusarium</i> sp.	Freitas <i>et al.</i> , (2018)
Folhas de <i>Spodias mombi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> e <i>Listeria innocua</i>	Cristofoli <i>et al.</i> , (2018)

Fonte: elaborada pela autora.

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica de extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem o método de difusão em ágar (CLSI, 2017), macrodiluição e microdiluição (OSTROSKY *et al.*, 2008). Para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) de extratos de plantas, tem-se utilizado o método da microdiluição em caldo (ELOFF, 1998).

O método disco-difusão fornece resultados qualitativos classificando as bactérias como suscetíveis, intermediárias ou resistentes, através da medição do halo de inibição (Figura 3). Entretanto, este método não permitiu distinguir os efeitos bactericida e bacteriostático, assim, não se pode determinar a CMI, uma vez que é impossível quantificar o agente antimicrobiano difundido no ágar (NIJS *et al.*, 2003).

Figura 3 – Placas de Petri apresentando ausência e presença do halo de inibição bacteriana



Fonte: Cristofoli (2017).

Os métodos de diluição são os mais apropriados para a determinação dos valores de CMI, uma vez que oferecem a possibilidade de estimar a concentração do agente antimicrobiano no ágar ou no caldo nutritivo (microdiluição) (Figura 4). Assim, é possível avaliar quantitativamente o potencial antimicrobiano de extratos vegetais *in vitro* contra bactérias e fungos.

Figura 4 – Esquema de distribuição da microplaca utilizada na microdiluição em caldo.



Fonte: Ferreira (2018).

Assim, recomenda-se que a partir dos testes de difusão em ágar sejam selecionados os extratos que serão submetidos ao teste quantitativo de microdiluição em caldo, no qual se determina o parâmetro de atividade antimicrobiana, a CMI, que é definida como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível do microrganismo e geralmente é expresso em $\mu\text{g} / \text{mL}$ ou mg / L (PFALLER *et al.*, 2004).

3.6 Métodos de extração

A extração de compostos com propriedades biológicas é uma das etapas mais críticas das pesquisas com produtos naturais, pois sua eficiência depende de vários parâmetros, tais como a natureza da amostra, tipo de substâncias a serem extraídas, localização em que essas substâncias se encontram na amostra, tipo de solvente extrator, método e temperatura de extração (TIWARI *et al.*, 2011; XYNOS *et al.*, 2012).

Devido à alta solubilidade dos compostos fenólicos em soluções aquosas, a água tem sido bastante utilizada como solvente extrator na obtenção de compostos bioativos. Além disso, outros fatores como o baixo custo, fácil manuseio e atoxicidade tem influenciado sua utilização, sobretudo, em estudos que visam à aplicação dessas substâncias (DOMÍGUEZ-RODRÍGUEZ; MARINA; PLAZA, 2017).

Os métodos de extração convencionais mais utilizados são a maceração, percolação, decocção, infusão, extração contínua a vapor (Soxhlet) e arraste com vapor (THOMA *et al.*, 2001). Entretanto, o desenvolvimento de procedimentos de extração que possibilitem a utilização de solventes menos agressivos ao meio ambiente e que sejam usados em menor quantidade tem sido proposto como uma alternativa para o desenvolvimento da chamada “química verde” (HERRERO *et al.*, 2010; RODRÍGUEZ- ROJO *et al.*, 2012).

Dentre as tecnologias mais recentes, podemos citar a extração assistida por ultrassom que é uma técnica amplamente explorada em escala industrial e laboratorial devido à sua eficiência em extrair componentes, fácil operação e baixo consumo de solventes (GONZÁLEZ-CENTENO *et al.*, 2015). Embora esse método apresente vantagens, alguns fatores devem ser considerados para garantir a eficiência da extração, tais como intensidade da onda sonora, tempo de exposição à frequência, temperatura do processo, granulometria da amostra, entre outros (TAO *et al.*, 2014).

A extração assistida por ultrassom é um método que utiliza a energia acústica e solvente para promover o processo de extração (MINJARES-FUENTES *et al.*, 2014). A propagação de ondas no solvente promove o fenômeno de cavitação, que ocasiona a formação de cavidades para onde os gases dissolvidos no sistema migram, formando microbolhas, que aumentam e diminuem de tamanho, gerando ciclos de expansão e compressão até que as bolhas implodem, liberando uma grande quantidade de calor e exercendo elevadas pressões próximas a região de implosão (CARCEL *et al.*, 2012, CASTRO; CAPOTE, 2007, VEILLET *et al.*, 2010). A presença de materiais sólidos no sistema provoca uma implosão assimétrica das microbolhas, gerando jatos que colidem com as superfícies sólidas e ocasionam a

circulação de líquidos, devido à turbulência gerada. Essas colisões fazem com que as células vegetais sejam rompidas, facilitando a difusão do solvente extrator para o interior da matriz (CASTRO; CAPOTE, 2007). Somando-se a isso, o calor liberado pelas implosões aumenta a solubilidade dos analitos, favorecendo o aumento da eficiência da extração (VEILLET *et al.*, 2010).

A extração de compostos por esse método demanda um tempo menor quando comparado aos métodos tradicionais, utilizando quantidades menores de solventes. Devido a tais vantagens, esse método tem sido muito utilizado no processo de extração de vários compostos alimentares, tais como pigmentos, aromas, antioxidantes, outros compostos orgânicos e minerais oriundos de diversas matrizes vegetais (VEILLET *et al.*, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção estão descritos os principais materiais e metodologias adotadas na presente pesquisa.

4.1 Obtenção do material vegetal

O cultivo de *Physalis angulata* foi realizado na Fazenda Sagitários, localizada no município de Maranguape, Ceará (Lat.: -4.095439; Lon.: -38.854927). A semeadura foi realizada em outubro de 2017 em solo de textura franco argilosa com pH 6,8 e CE (Condutividade Elétrica) 0,47 dS/m (deciSiemens por metro). As plantas foram cultivadas com o auxílio de irrigação localizada do tipo gotejamento e a necessidade hídrica da cultura foi atendida de modo a deixar o solo sempre na capacidade de campo. As partes aéreas das plantas silvestres e cultivadas foram coletadas na mesma localidade no período de abril a julho de 2018 e as exsiccatas identificadas e depositadas sob os números 61268 (planta cultivada) e 61269 (planta silvestre) no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará.

4.2 Pré-tratamento das folhas de *Physalis angulata* L.

As folhas foram selecionadas quanto à integridade física e uniformidade de cor e tamanho. Após a separação manual dos talos, foram lavadas em água corrente, drenadas e secas a temperatura ambiente. Em seguida, foram acondicionadas em bandejas de alumínio e submetidas a secagem a 40°C por 24 horas em estufa com circulação de ar Modelo 315 SE (FANEM). Após esse período, as folhas secas foram pulverizadas durante 5 minutos em multiprocessador seguindo com a elaboração dos extratos.

4.3 Determinação do diâmetro médio de partícula

O diâmetro médio de partícula das folhas de *Physalis angulata* pulverizadas foi determinado segundo metodologia descrita por Gomide *et al.*, (1980). Foram aferidos em balança analítica aproximadamente 100 g do material vegetal, em seguida foi realizada a separação das partículas em peneiras da série de Tyler de mesh 10 a 500 µm (Granutest – TELASTEM) com agitação durante 10 minutos.

4.4 Elaboração dos extratos

Os extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* L. foram obtidos através dos métodos extrativos de decocção, maceração e assistido por ultrassom, descritos a seguir. Ao final de cada processo de extração, as soluções aquosas resultantes foram desidratadas em liofilizador (Beta 1-8 LD plus, CHRIST) a -40 °C sob pressão de 0,025 mbar. Em seguida, os extratos obtidos foram acondicionados em frascos de polietileno opacos e armazenados a -18°C.

4.4.1 Decocção

O material vegetal foi acondicionado em filtro de algodão, embebido em água destilada na proporção de 1:40 m/v, respectivamente. Em seguida, foi submetido ao aquecimento até a temperatura de 100 °C, permanecendo nessas condições durante cinco minutos. Após esse período, a solução aquosa foi filtrada, acondicionada em frascos de polietileno e armazenada a -18°C (SUSANTI *et al.*, 2015).

4.4.2 Maceração

O material vegetal foi imerso em Becker contendo água destilada na proporção de 1:20 m/v, respectivamente. Após 18 horas ao abrigo da luz, o material foi filtrado em papel de filtro e a solução aquosa resultante acondicionada em frascos de polietileno opacos e armazenada a -18°C (SUSANTI *et al.*, 2015).

4.4.3 Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom foi realizada através de sonicação direta do material vegetal e água destilada (1:30 m/v) em equipamento de Ultrassom (DES500, Unique) com ponteira 1,3 cm de diâmetro, durante 8 minutos sob a potência de 154 W conforme descrito por Shineider *et al.*, (2015). Posteriormente, a mistura foi submetida a centrifugação em centrífuga (ROTINA 380R, Hettich) a 25°C, 10000 rpm por 15 minutos e a solução aquosa resultante filtrada em papel de filtro, acondicionada em frascos de polietileno opacos e armazenada a -18°C.

4.5 Rendimento dos extratos

Para calcular o rendimento dos extratos foram utilizados os pesos das folhas de *Physalis angulata* L. após a secagem e dos extratos após liofilização. Em seguida, esses valores foram aplicados na Equação 1, conforme descrito por Rodrigues *et al.* (2011).

$$R (\%) = ES/FS \quad (1)$$

Onde,

R = Rendimento total do extrato (%);

ES = Peso do extrato seco (g);

FS = Peso das folhas secas (g).

4.6 Compostos bioativos e potencial antioxidante dos extratos

4.6.1 Compostos fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com Larrauri *et al.* (1997), através do método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, o ácido gálico como padrão e concentrações de 7000 a 10000 ppm dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata*. Inicialmente, foram adicionadas a tubos de ensaio alíquotas de 40 μ L dos extratos e água destilada até completar o volume de 0,5 mL. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:3), 1 mL de carbonato de sódio à 20% e 1 mL de água destilada. Após a homogeneização dos tubos, as soluções permaneceram em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz, sendo realizadas posteriormente as leituras em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo UV- 1800) à 700 nm. Para a quantificação dos compostos fenólicos totais foi utilizada uma curva padrão do ácido gálico (10-120 μ g/mL; Chem Service, Inc., USA), e o resultado expresso como microgramas equivalentes de ácido gálico por 100 mg de extrato seco de *Physalis angulata* (mg EAG/ 100 g de extrato seco).

4.6.2 Potencial antioxidante

4.6.2.1 Ensaio do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

O potencial antioxidante dos extratos foi determinado pela capacidade de captura do radical livre DPPH utilizando a metodologia descrita por Rufino et al., (2007). O método consiste em monitorar o consumo do radical livre DPPH (0,06mM) através do decréscimo da absorbância quando submetido a diferentes concentrações dos extratos. Foram adicionadas a tubos de ensaio alíquotas de 0,1 mL dos extratos nas concentrações de 7000 – 10000 ppm obtidas pela diluição em água destilada e 3,9 mL da solução etanólica de DPPH. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo UV- 1800) a 515 nm, após a estabilização da absorbância. Os ensaios foram realizados em triplicata, com três repetições e os resultados expressos em CE₅₀ (Concentração Efetiva 50 %) que corresponde a concentração necessária do extrato (mg/ mL) capaz de reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH.

4.6.2.2 Ensaio do radical 2,2- azino-bis- (3-etilbenzotiazolina) - 6-ácido sulfônico (ABTS •+)

O potencial antioxidante dos extratos das folhas de *Physalis angulata* também foi determinado através do método de captura do radical livre ABTS^{•+}, sendo este obtido através da mistura de ABTS e persulfato de potássio conforme descrito por Rufino *et al.*, (2007). Alíquotas de 30 µL de diferentes concentrações dos extratos (7000 – 10000 ppm) e 3,0 mL do radical ABTS diluído em álcool etílico (absorbância de 0,695 – 0,705) foram adicionadas a tubos de ensaio, seguindo de homogeneização e repouso de 6 minutos ao abrigo da luz. Após esse período, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo UV-1800) a 734 nm e o potencial antioxidante determinado através da curva padrão do antioxidante Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico). Os ensaios foram realizados em triplicata, com três repetições e os resultados expressos em micromolar equivalente de trolox por g de extrato seco de *Physalis angulata* (µM trolox / g de extrato seco).

4.7 Bioacessibilidade de compostos fenólicos in vitro

4.7.1 Digestão gastrointestinal simulada

A digestão foi realizada utilizando os fluidos gástrico e intestinal simulados, ambos preparados conforme descritos por Helal *et al.* (2014). A digestão gastrointestinal simulada foi realizada utilizando pepsina solubilizada em HCl 0,1 M (simulando a fase gástrica), e sais de bile e pancreatina solubilizados em NaHCO₃ 0,1 M (simulando a fase intestinal).

As amostras (2 g de cada extrato) foram adicionadas a 100 mL de HCl 0,01 M e ajustadas para pH 2 utilizando solução de HCl 0,1 M. Após o ajuste do pH, foram adicionadas alíquotas de 3,2 mL de pepsina e as amostras agitadas em banho-maria a 37 ° C por 2 horas, simulando a digestão gástrica. Após esse período, realizou-se a titulação com NaOH 0,5 M até pH 7,5 (pH do intestino) e as amostras foram adicionadas às membranas de diálise (33 × 21 mm, peso molecular: 12.000-16.000, porosidade: 25 angstroms - INLAB, Brasil) contendo alíquotas de NaHCO₃ 0,1 M equivalentes a acidez titulável.

Em seguida, as amostras foram incubadas sob agitação em banho-maria a 37°C por 30 minutos, e então, foram adicionadas alíquotas de 5,0 mL da solução de bile e pancreatina permanecendo sob as mesmas condições por 2 horas, simulando a digestão intestinal. Ao término desse período, o conteúdo da membrana (dialisado) foi coletado e armazenado a -18 ° C até o momento das análises.

4.7.2 Quantificação de compostos fenólicos e potencial antioxidante após digestão

Os compostos fenólicos totais e o potencial antioxidante dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* foram quantificados após a digestão gastrointestinal simulada através dos ensaios utilizando os reagentes Folin-Ciocalteu e os radicais livres DPPH (item 4.6.2.1) e ABTS (item 4.6.2.2), respectivamente.

4.7.3 Índice de Bioacessibilidade

Além da quantificação dos compostos fenólicos e do potencial antioxidante após a digestão, os resultados também foram expressos através dos índices de bioacessibilidade de compostos fenólicos (BCF) e atividade antioxidante bioacessível (AAB) obtidos a partir das

Equações 2 e 3 a seguir (NETO, 2017).

$$\text{BCF (\%)} = (\text{CFa}/\text{CFb}) \times 100 \quad (2)$$

Onde,

BCF: Fração bioacessível de compostos fenólicos das amostras;

CFa: Concentração de compostos fenólicos após a digestão gastrointestinal *in vitro*;

CFb: Concentração de compostos fenólicos antes da digestão gastrointestinal *in vitro*.

$$\text{AAB (\%)} = (\text{AAa}/\text{AAb}) \times 100 \quad (3)$$

Onde,

AAB: Atividade antioxidante bioacessível das amostras;

AAa: Atividade antioxidante após a digestão gastrointestinal *in vitro*;

AAb: Atividade antioxidante antes da digestão gastrointestinal *in vitro*.

4.8 Potencial antimicrobiano

O potencial antimicrobiano *in vitro* dos extratos aquosos de *Physalis angulata* L. foi determinado sobre as cepas bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Enteritidis* IAL 1132, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 e *Staphylococcus aureus* ATCC 27664. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará (LMA/DETAL/UFC).

4.8.1 Preparo do inóculo

As cepas bacterianas foram cultivadas em ágar tripton de soja (TSA/Difco) a 35°C por 24 horas. Após esse período, colônias isoladas entre 1 e 2 mm de diâmetro foram transferidas para tubos contendo 5mL do caldo tripton de soja (TSB/Difco) e incubadas a

35°C por 24 horas. Em seguida, as concentrações dos inóculos foram ajustadas fazendo-se diluições seriadas em água peptonada 0,1% (Difco) até a obtenção da suspensão bacteriana de 10^6 UFC/mL (UGART, 2012).

4.8.2 Método de difusão em ágar

A susceptibilidade bacteriana foi avaliada através do método qualitativo de difusão em ágar de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). Placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton foram inoculadas com suspensões bacterianas de 10^8 UFC/mL dos microrganismos de estudo. Após 10 minutos, foram produzidos orifícios de 6 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade, onde foram adicionadas alíquotas de 50 µL das soluções dos extratos (50 mg/ mL). Os halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos após a incubação a 35 °C/ 24 horas. Os extratos que apresentaram halos de inibição foram analisados quantitativamente através do método de microdiluição em caldo.

4.8.3 Concentração mínima inibitória (CMI)

A CMI foi determinada através do método de microdiluição em caldo utilizando microplacas de 96 poços (Microtest™-Becton Dickinson and Co.) conforme descrito por Branen e Davidson (2004). As concentrações dos extratos foram obtidas através de diluições em água destilada estéril e caldo TSB contendo o inóculo (10^6 UFC/mL) previamente preparado (item 4.9.1), considerando o volume final de 200 µL em cada poço. Foram realizados controles para verificar a viabilidade dos microrganismos em estudo (controle positivo) e a inocuidade das soluções testadas (controle negativo).

Após a distribuição da placa, foram realizadas as leituras da densidade óptica a 630 nm no tempo inicial (T_0) e após 24 horas de incubação (T_{24}) a 35°C, utilizando o leitor de absorvância (ELx 808, BioTek instruments). Os resultados foram obtidos pela diferença das leituras de absorvância ($T_{24}-T_0$) $\leq 0,05$, sendo consideradas as CMI's, as menores concentrações dos extratos aquosos de *Physalis angulata* L. que inibiram o crescimento dos microrganismos.

4.8.4 Concentração mínima bactericida (CMB)

A partir dos poços testes que indicaram atividade antimicrobiana, CMI's $\leq 0,05$, foram inoculadas alíquotas de 100 μL em TSA utilizando o método de plaqueamento *spread plate*. Após a incubação a 35 °C por 24 horas, as CMB's foram identificadas como as menores concentrações dos extratos que reduziram $3\log_{10}$ UFC/ml e/ou aquelas que apresentaram a ausência de crescimento microbiano (BRANDT *et al.*, 2010).

4.8.5 Microscopia eletrônica de Trasmisão (MET)

Os danos estruturais causados pela exposição dos extratos aquosos de *Physalis angulata* às bactérias em estudo foram observados através dos ensaios de MET conforme descrito por Hooton, Atterbury e Connerton (2011), com algumas adaptações. As culturas bacterianas que apresentaram susceptibilidade aos extratos foram submetidas às respectivas CMB's, a fim de verificar os possíveis danos celulares. Também foram realizados os controles positivos que consistiram nos ensaios com as cepas bacterianas na ausência dos extratos, oferecendo as condições ótimas de crescimento para os microrganismos.

As suspensões bacterianas de 10^6 UFC/mL foram previamente preparadas conforme descrito no item 4.8.1 Em seguida, foram adicionadas alíquotas das CMB's dos extratos, obedecendo as mesmas condições dos ensaios microbiológicos descritos no item 4.8.3 Posteriormente, foram adicionadas ao inóculo resultante alíquota de 100 μL da solução fixadora Karnovsky em cacodilato (1:1 v/v), o qual foi incubado a 35 °C por *overnight*. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (10.000 xg /10 minutos a 25°C), e os *pellets* resultantes suspensos em solução tampão de cacodilato e centrifugados sob as mesmas condições repetindo o processo de lavagem por três vezes. Após as lavagens, as suspensões bacterianas foram dispostas em grades de cobre adicionando-se em seguida uma gota da solução corante de ácido fosfotúngstico (pH 7,4). Após três minutos, foi retirado o excesso do ácido e as amostras permaneceram em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente para secagem do material. As imagens foram observadas em microscópio eletrônico (TESCAN VEGA 3 - Tescan, República Tcheca) com tensão de 30 Kv.

4.9 Toxicidade dos extratos aquosos de *Physalis angulata* sobre *Artemia salina*

A toxicidade dos extratos aquosos de *Physalis angulata* sobre *Artemia salina* foi

determinada de acordo com a metodologia descrita por Meyer (1982). Inicialmente, foi preparada uma solução salina com concentração de 33g/L e pH 8,0-9,0. Em seguida, foram inoculados os cistos de *Artemia salina* a 27 °C sob iluminação de 100 W por 24 horas. Após a eclosão dos cistos, 10 náuplios foram coletados, transferidos para os frascos contendo os extratos nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 µg/mL obtidas através de diluições em solução salina, sendo então novamente incubados a 27 °C sob iluminação de 100 W por 24 horas. Após esse período, foi verificada a taxa de sobrevivência dos náuplios e calculada a CL₅₀ (concentração letal de 50%) de acordo com o método PROBIT, através de software estatístico com 95% de confiança. Os extratos foram classificados como tóxicos quando foram observados valores de CL₅₀ menores que 1000 µg/mL.

4.10 Perfil fitoquímico dos extratos aquosos de *Physalis angulata* L.

O perfil fitoquímico dos extratos das folhas de *Physalis angulata* foi avaliado através dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). E aqueles que apresentaram maior potencial antioxidante e antimicrobiano foram submetidos a extrações de fase sólida realizadas no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais II (LAFIPLAM II) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

As frações obtidas também foram avaliadas quanto ao perfil fitoquímico através de espectros de RMN, conforme descrito no item 4.11.1. Ambas as análises de RMN foram realizadas no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN).

4.10.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 (RMN ¹H) e carbono-13 (RMN ¹³C), unidimensionais, foram obtidos em espectrômetros da Bruker modelo Avance DPX-500, operando na frequência de 499,60 MHz para ¹H e 125,40 MHz para ¹³C. As análises foram realizadas a 298 K utilizando de 25,5 a 50,0 mg de cada fração em um volume aproximado de 0,5 mL por amostra. Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foram metanol (CD₃OD) e água deuterada (D₂O). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ¹H pelo sinal do hidrogênio pertencente a fração não-deuterada dos

solventes; metanol (δ_H , 3,31) e água deuterada (δ_H , 4,80) e para os espectros de RMN ^{13}C pelo pico de carbono-13 do metanol (δ_C , 49,15).

4.10.2 Extração da fase sólida

As extrações em fase sólida foram realizadas em cartuchos de fase reversa (Strata C₁₈-E, 20g/60,0 mL, 55 μ m, 70 Å) da Phenomenex[®]. O uso dos cartuchos foi precedido por ativação do adsorvente com MeOH grau CLAE da Tedia[®], seguida de água Milli-Q utilizando alíquotas equivalentes a três vezes o volume do cartucho.

Os extratos foram individualmente submetidos a extração em fase sólida utilizando como sistema de eluição H₂O, e posteriormente, MeOH. Após a obtenção das frações (aquosas e metanólicas), estas foram submetidas a secagem por evaporação a pressão reduzida em evaporador rotativo (modelo B-480 waterbath, BUCHI) e liofilizadas, respectivamente.

4.10.3 Atividade biológica e quantificação de compostos bioativos

Após a obtenção dos extratos (frações aquosas e metanólicas), estes foram avaliados quanto ao perfil fitoquímico através de espectros de RMN 1H e RMN ^{13}C (item 4.11.1), quantificação de compostos fenólicos totais (item 4.7.1), atividade antioxidante (item 4.7.2.2), atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes* (item 4.9) e toxicidade sobre *Artemia salina* (item 4.10).

4.11 Análises estatísticas

Os ensaios para determinação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram conduzidos utilizando o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os resultados foram avaliados estatisticamente pela ANOVA e as comparações de médias foram realizadas utilizando o teste de Tukey $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional GENES (CRUZ, 2006).

4.11.1 Índice de soma de postos ou “ranking”

Os extratos foram avaliados segundo o índice de soma de postos ou “ranking”

proposto por Mulamba e Mock (1978). Esse índice consiste no ordenamento de forma geral dos métodos de extração (decoção, maceração e ultrassom) e material vegetal (folhas silvestres e cultivadas) em relação às variáveis estudadas e foi calculado pelo somatório dos postos dos extratos quanto ao teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidantes antes e após digestão simulada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir estão descritos os resultados de caracterização e extração dos compostos bioativos.

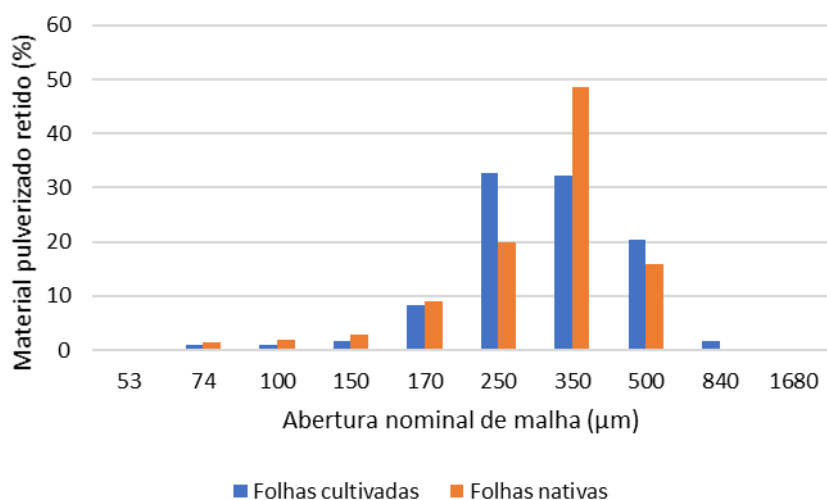
5.1 Caracterização morfológica e rendimento dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata*

5.1.1 Diâmetro médio da partícula

O diâmetro médio da partícula das folhas pulverizadas de *Physalis angulata* foi de 0,25 mm para a folha cultivada e de 0,35 mm para a folha silvestre, concordando com a classificação granulométrica de pó moderadamente grosso e pó grosso, respectivamente, para materiais vegetais (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Segundo esta classificação, o pó moderadamente grosso é aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 710 μm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 μm e o pó grosso é aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1700 μm e, no máximo, 40% pelo tamis de abertura nominal de malha de 355 μm (Figura 5).

Figura 5 – Distribuição granulométrica das folhas pulverizadas de *Physalis angulata*.



Fonte: elaborada pelo autor.

A diferença entre o diâmetro de partícula e granulometria dos materiais vegetais, cultivado e nativo, pode estar relacionado com o fator abiótico luminosidade uma vez que, plantas silvestres não apresentam uniformidade quanto as condições de desenvolvimento. Este fator, entre outros, pode influenciar na morfologia foliar (área foliar) e na produção de biomassa (matéria seca). Segundo Lambers *et al.* (1998), as plantas em ambiente com baixa luminosidade geralmente possuem folhas delgadas, menor densidade de massa e maior área foliar específica.

Guimarães *et al.* (2018). avaliando a influência de três níveis de luminosidade (25 %, 50% e 100%) no desenvolvimento vegetativo de *Physalis angulata* observaram maiores valores para a altura, área foliar e massa seca (biomassa) a 25 % de luminosidade.

Vários fatores ambientais podem influenciar no desenvolvimento vegetal, incluindo as condições abióticas. A altura da planta e a área foliar estão relacionadas com a resposta morfológica da planta na tentativa de captação dos raios solares quando há baixa luminosidade. Trata-se de uma estratégia adotada pela espécie para compensar a restrição de luminosidade no ambiente ao qual está exposto, ajustando dessa forma o aparelho fotossintético a essa condição, ampliando a superfície de interceptação luminosa das folhas, e consequentemente, a biomassa (LACERDA *et al.*, 2010; MORAIS *et al.*, 2003).

A granulometria é o parâmetro que determina a superfície de contato do material vegetal disponível para a interação com o solvente. Logo, a análise granulométrica é uma etapa imprescindível na padronização do processo extrativo, influenciando diretamente no rendimento e na obtenção de compostos bioativos (ALVES *et al.*, 2010).

Vasconcelos *et al.* (2005) em seus estudos com extratos aquosos e hidroalcoólicos da casca do caule de Aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*) comprovaram a importância de três fatores no processo de extração, o método, o solvente e a granulometria do material vegetal, sendo este último o fator mais importante na eficiência do processo independentemente do método.

Cardoso *et al.* (2017) avaliaram a influência do método de extração (percolação, maceração e ultrassom) e o tamanho de partícula (16 a 32; 32 a 60 e 60 a 100 *mesh*) na extração de compostos bioativos das folhas *Alpinia zerumbet* e observaram que o tamanho de partícula não influenciou significativamente na extração de compostos fenólicos, considerando cada técnica extrativa isoladamente. Entretanto, a combinação do método extrativo de percolação e a faixa entre 60 a 100 *mesh*, demonstraram maior eficiência no estudo.

O grau de divisão das partículas pode ser um fator limitante no processo extrativo, pois partículas muito pequenas tendem a formar uma camada compacta de pó dificultando a penetração do solvente e conseqüentemente, diminuindo a eficiência do processo. Entretanto, é preciso considerar que quanto mais rígido o tecido vegetal, menor deve ser sua granulometria facilitando assim a penetração do solvente extrator (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

5.1.2 Rendimento dos extratos

Os rendimentos dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* foram maiores para os obtidos pelo método maceração (FCM e FSM), seguido pelos métodos de decocção e assistidos por ultrassom para ambos os materiais vegetais, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Rendimentos dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata*

*Extratos	Rendimento (%)
FCD	12,8
FSD	11,7
FCM	19,9
FSM	18,9
FCUS	9,9
FSUS	8,9

*Extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* obtidos por diferentes métodos de extração. FCD: Folhas cultivadas/decocção; FSD: Folhas silvestres/decocção; FCM: Folhas cultivadas/maceração; FSM: Folhas silvestres/ maceração; FCUS: Folhas cultivadas/ultrassom; FSUS: Folhas silvestres/ultrassom. Fonte: elaborada pela autora.

A influência do método de extração, solvente utilizado e granulometria no rendimento dos extratos de aroeira pimenteira silvestre foram relatados por Vasconcelos *et al.* (2005). Os autores verificaram que o maior rendimento foi o obtido através do método de maceração utilizando solventes polares (água e etanol) e granulometria classificada como pó moderadamente grosso.

Esses resultados corroboram com os encontrados no presente estudo uma vez que, segundo as especificações da Farmacopeia Brasileira os materiais vegetais, folhas cultivadas e silvestres pulverizadas, foram classificados como pó moderadamente grosso e pó grosso, respectivamente. Segundo Marques *et al.* (2012) essas classificações favorecem o processo de extração, pois partículas muito finas podem aderir às partículas maiores, aumentando a

viscosidade do meio, dificultando a penetração de solventes, e conseqüentemente, diminuindo a eficiência da extração.

Cristofoli *et al.* (2018) avaliando o rendimento dos extratos das folhas de Cajazeira silvestre obtidos por métodos extrativos distintos e solventes de diferentes polaridades observaram os maiores rendimentos com o aumento da polaridade, obtendo-se valores de 21,6 % e 27,5 % para os extratos aquosos e de 23,5 % e 30,5% para os extratos hidroalcoólicos através do método a quente (Soxhlet) e do método a frio (Ultrassom), respectivamente.

No presente estudo foram encontrados rendimentos que variaram de 8,9% e 19,9% para os extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata*, sendo o maior rendimento obtido através do método de maceração (Tabela 3). Rendimento inferior (10,43%) foi encontrado por Ukwubile e Oise (2017) em seus estudos com o extrato metanólico das folhas *Physalis angulata* utilizando o mesmo método extrativo.

O uso da água como solvente otimiza o processo de extração uma vez que, possui maior poder de dissolução de compostos polares, em sua maioria metabólitos secundários presentes em diferentes partes das plantas (BENELLI *et al.*, 2010). Além disso, apresenta uma série de vantagens em relação aos solventes orgânicos tais como ser atóxica, não requerer etapa de evaporação/concentração e longos períodos para recuperação, baixo custo, evita a degradação de compostos bioativos pelo uso de altas temperaturas, além de não agredir o meio ambiente (GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013).

O efeito do método extrativo e dos solventes utilizados também foram avaliados por Oliveira *et al.* (2016) para os extratos das folhas de *Dicksonia sellowiana*. Estes autores observaram rendimentos que variaram entre 0,6 % a 15,4% para os extratos etanólicos e de 10,4 % a 14,8% para os extratos hidroalcoólicos. obtidos pelos métodos extrativos de Soxhlet, decocção, infusão, maceração, turbolização e assistidos por ultrassom.

Além dos métodos extrativos, outros fatores podem influenciar diretamente no rendimento dos extratos vegetais tais como o tecido vegetal, o solvente utilizado, o tempo de exposição e a temperatura. Sendo este último um dos fatores mais importantes, pois a exposição a altas temperaturas pode aumentar a taxa de difusão e solubilidade de compostos bioativos com propriedades antioxidantes (AYBASTIER *et al.*, 2013) e/ou acarretar a degradação destas substâncias (TIWARI *et al.*, 2011).

Em resumo, pode-se afirmar que o rendimento de extração é reflexo do método e das condições de extração, das características fenológicas das espécies e de suas variações fisiológicas sazonais no acúmulo e síntese de compostos orgânicos, das peculiaridades do

ambiente de cultivo e da variação genética intraespecífica. Assim, o rendimento de extração configura-se em uma variável de difícil comparação entre os diferentes estudos disponíveis na literatura (RIBEIRO, 2010).

5.2 Quantificação de compostos fenólicos e potencial antioxidante antes e após digestão *in vitro*

Os resultados da análise de variância dos extratos aquosos das folhas (silvestres e cultivadas) de *Physalis angulata* obtidos por três diferentes métodos de extração para as cinco variáveis estudadas (compostos fenólicos antes e após digestão simulada, atividade antioxidante por ABTS e DPPH) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resumo da análise de variância dos compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante (ABTS e DPPH) e bioacessibilidade dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* antes e após digestão simulada

Fontes de variação	GL	Quadrados medios				
		CFT Antes da digestão	CFT Após digestão	ABTS Antes da digestão	ABTS Após digestão	DPPH*** Antes da digestão
MV	1	220609996,64 ^{ns}	995,16*	57357,32*	184,91 ^{ns}	1085822,92 ^{ns}
ME	2	3247836,44 ^{ns}	65,98 ^{ns}	4504,46 ^{ns}	105,94 ^{ns}	295744,58 ^{ns}
MV x ME	2	49083053,55**	17,56**	1294,26*	17,04 ^{ns}	64470,39**
Resíduo	12	2028351,91	1,71	198,76	53,95	6424,92
Total	17	-	-	-	-	-
Média		8181,64	22,15	184,69	45,37	476,62
CV (%)		17,40	5,21	7,63	16,18	16,81

CFT: Compostos fenólicos totais; ABTS: 2,2- azino - bis - (3-etilbenzotiazolina) - 6-ácido sulfônico; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ND: Não determinado; MV: Material vegetal (extratos das plantas silvestres e cultivadas); ME: Métodos de extração (Decocção, maceração e assistido por ultrassom); MV x ME: Interação do material vegetal com o método de extração; GL: grau de liberdade; CV: coeficiente de variação (razão do desvio padrão e a média dos dados). *Significativo a 5% de probabilidade. ** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. *** DPPH após digestão não foi determinado. Fonte: elaborada pela autora.

Observa-se que não há diferenças significativas entre as variáveis para os fatores de variação isoladamente, exceto para as variáveis atividade antioxidante (ABTS) e compostos fenólicos após digestão simulada correspondente ao fator material vegetal (MV). Estatisticamente, resultados significativos foram observados para interação entre o material vegetal e os métodos de extração (MV x ME) em todas as variáveis analisadas, exceto pela variável atividade antioxidante (ABTS) após digestão. Essa interação significativa indica que um fator interfere no comportamento do outro para obtenção da resposta, o que pode ser

justificado pelo comportamento diferencial das variedades de *Physalis* (silvestre e cultivada) frente aos métodos de extração estudados.

Os resultados das comparações entre as médias da interação dos materiais vegetais (folhas silvestres e cultivadas) e os métodos de extração (decoção, maceração e ultrassom) frente as variáveis estudadas estão apresentadas na Tabela 5 a seguir:

Tabela 5 – Comparações entre médias dos compostos fenólicos, atividade antioxidante (ABTS e DPPH) e bioacessibilidade dos extratos aquosos de *Physalis angulata*

CFT (mg EAG/100 g ES)						
Métodos de extração	Silvestre			Cultivada		
	Antes da digestão	Após a digestão	BCF (%)	Antes da digestão	Após a digestão	BCF (%)
Decocção	15310,79Aa	36,43Aa	0,23	8115,95Bb	43,34Aa	0,56
Maceração	9695,50Bb	17,28Ab	0,17	13607,62Aa	21,71Ab	0,16
Ultrassom	812,95Bc	15,99Ab	1,96	1547,01Ac	16,14Ac	1,04
ABTS (μ M trolox /g ES)						
Métodos de extração	Silvestre			Cultivada		
	Antes da digestão	Após a digestão	AAB (%)	Antes da digestão	Após a digestão	AAB (%)
Decocção	317,06Aa	38,74Aa	12,2	254,74Ba	47,19Aa	18,5
Maceração	191,80Ab	39,25Aa	20,4	163,00Bb	43,61Aa	26,7
Ultrassom	92,66Ac	50,84Aa	54,8	88,88Ac	52,60Aa	59,1
DPPH CE ₅₀ (mg/ mL)						
Métodos de extração	Silvestre			Cultivada		
	Antes da digestão	Após a digestão	AAB (%)	Antes da digestão	Após a digestão	AAB (%)
Decocção	1,65Bb	ND	-	2,11Ac	ND	-
Maceração	2,63Bb	ND	-	6,95Ab	ND	-
Ultrassom	13,63Ba	ND	-	20,94Aa	ND	-

CFT: Compostos fenólicos totais; ABTS: 2,2- azino – bis - (3-etilbenzotiazolina) – 6 -ácido sulfônico; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; CE₅₀: Concentração Efetiva do extrato capaz de reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH; BCF: Bioacessibilidade de compostos fenólicos; AAB: Atividade antioxidante bioacessível; ES: Extrato seco; ND: Não determinado. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si e as médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tuckey. Fonte: elaborada pela autora.

Avaliando o teor de compostos fenólicos dos extratos aquosos das folhas silvestres e cultivadas de *Physalis angulata*, observou-se que estes apresentaram diferenças significativas entre si destacando-se o extrato da folha silvestre obtido pelo método de decoção com 15310,79 mg EAG/100 g de extrato seco, seguido pelo extrato da folha cultivada obtido através do método extrativo de maceração com 13607,62 mg EAG/100 g de extrato seco.

Ramirez *et al.* (2018) avaliando os teores de compostos fenólicos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Physalis chenopodifolia*, plantas silvestres e cultivadas, observaram as maiores concentrações para os extratos das folhas silvestres (196,46 mg EAG/100 g de extrato seco).

O comportamento dos extratos aquosos de *Physalis angulata* diferem estatisticamente em todas as variáveis analisadas. Entretanto, sabe-se que os teores de compostos fenólicos, metabólitos secundários, estão diretamente relacionados com fatores ambientais tais como tempo de exposição à radiação solar, idade da planta, período de chuva durante o cultivo, tipo de solo, espécie, práticas agrícolas, entre outros (MEDINA-MEDRANO *et al.*, 2015).

Abreu *et al.* (2017) avaliando a concentração de compostos fenólicos em períodos distintos (abril – junho e dezembro – fevereiro) verificaram diferenças significativas entre estes, observando a influência do período mais seco sobre o conteúdo de compostos fenólicos dos extratos hidroalcoólicos de *Physalis angulata* cultivada no Recôncavo Bahiano. Estas diferenças também foram observadas sobre os diferentes tecidos obtendo-se nesta ordem as maiores concentrações de compostos fenólicos nos extratos das folhas, caules e raízes. Estes autores atribuíram essa diferença às condições adversas durante o período de cultivo resultando no aumento da síntese de metabólitos secundários.

Fatores relacionados com os métodos de extração também podem influenciar no teor de compostos fenólicos. No presente estudo observa-se que para ambos os materiais vegetais ocorreram diferenças significativas entre os métodos extrativos aplicados, destacando-se nesta ordem o método de decocção, maceração e ultrassom para o extrato da folha silvestre e o método de maceração, decocção e ultrassom para o extrato da folha cultivada (Tabela 5).

Teores de compostos fenólicos inferiores aos encontrados no presente estudo foram relatados Fawole, Sahu e Lakra (2013) avaliando os extratos aquosos e etanólicos das folhas de *Physalis angulata* obtidos por decocção e maceração, respectivamente, observaram concentrações de compostos fenólicos de 57,71 mg EAG/100 g de extrato seco (extrato aquoso) e de 48,53 mg EAG/100 g de extrato seco (extrato etanólico). Kusumaningtyasa *et al.* (2015) avaliando o potencial tecnológico dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* obtidos por decocção relataram teores de compostos fenólicos de 49,00 mg EAG/100 g de extrato seco. Susanti *et al.* (2015) em seus estudos com extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* obtidos pelos métodos de decocção e maceração relataram teores de 58,94 mg EAG/100 g de extrato seco e 63,32 mg EAG/100 g de extrato seco,

respectivamente.

Esses autores observaram que a temperatura de extração apresentou efeito significativo sobre o teor de compostos fenólicos, corroborando com os encontrados no presente estudo uma vez que, o maior teor de compostos fenólicos foi obtido pelo método extrativo de decocção.

O uso de altas temperaturas pode facilitar a extração promovendo a permeabilidade das células vegetais, aumentando a solubilidade e conseqüentemente facilitando a difusão das substâncias a serem extraídas (LIU *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016).

Os menores teores de compostos fenólicos foram observados para os extratos das folhas silvestres e cultivadas obtidos pelo método assistido por ultrassom (Tabela 5). Carniel *et al.* (2018) em seus estudos com extratos hidroalcolólicos de *Physalis angulata* obtidos através do método assistido por ultrassom observaram uma relação entre o teor de compostos fenólicos e elevadas temperaturas, apresentando teores de polifenóis que variaram de 11,7 a 103,9 mg de GAE/ g de extrato obtidos a 40 °C.

Inúmeros estudos com o objetivo de avaliar as condições ótimas dos parâmetros da extração assistida por ultrassom têm sido realizados em prol de otimizar o rendimento de substâncias bioativas e conseqüentemente, a atividade biológica destas substâncias. Entretanto, a complexidade estrutural e a rigidez da parede de células vegetais têm se mostrado obstáculos, sendo desejável mais discussões sobre as variáveis envolvidas neste processo (GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013).

O potencial antioxidante dos extratos aquosos de *Physalis angulata* foi avaliado por dois métodos que se baseiam na capacidade dos extratos em capturar os radicais livres, ABTS e DPPH. Os resultados mostraram diferenças estatísticas significativas entre os métodos extrativos aplicados e os materiais vegetais estudados, exceto para os extratos das folhas silvestres obtidos pelos métodos de decocção e maceração (DPPH) e assistidos por ultrassom (ABTS) (Tabela 5).

Os extratos obtidos por decocção apresentaram maior potencial antioxidante pelo método de captura do radical ABTS com valores de 317,06 μM trolox /g ES (silvestre) e 254,74 μM trolox / g ES (cultivada), diferindo significativamente entre os materiais vegetais. Para os ensaios com o radical livre DPPH, observou-se que quanto maior o consumo do radical, maior o potencial antioxidante da amostra e menor a concentração efetiva dos extratos capaz de neutralizar em 50% a ação do radical (CE_{50}), destacando-se nesta ordem os extratos obtidos pelos métodos de decocção, maceração e assistidos por ultrassom.

Cobaleda-Velasco *et al.* (2017) avaliando extratos de várias partes de *Physalis*

angulata cultivada e em diferentes estádios de desenvolvimento observaram valores de CE₅₀ que variaram de 0,15 a 0,25 mg/ mL para os extratos obtidos por maceração. Estes autores também observaram uma correlação significativa entre os compostos fenólicos e propriedades antioxidantes para todos os extratos em estudo.

Outros estudos realizados com os extratos das folhas e frutos de *Physalis angulata* mostraram maior potencial de inibição do radical DPPH para os extratos das folhas, etanólico obtido por maceração e aquoso obtido por decocção. Esses autores também relataram maiores concentrações de compostos fenólicos para estes extratos e atribuíram a atividade antioxidante a tais substâncias (KUSUMANINGTYASA *et al.*, 2015).

Estes resultados são semelhantes aos encontrados no presente estudo, onde os dados obtidos nos permitem relacionar a composição fenólica com o potencial antioxidante dos extratos obtidos por diferentes métodos extrativos. A extração de compostos com propriedades biológicas é uma etapa crítica das pesquisas com produtos naturais, pois sua eficiência depende de vários fatores, tais como as substâncias a serem extraídas, parte do material vegetal utilizado, método e temperatura de extração, bem como a polaridade do solvente extrator (TIWARI *et al.*, 2011; XYNOS *et al.*, 2012). Justificando dessa forma, as diferenças estatísticas significativas entre os materiais vegetais na quantificação de compostos bioativos, bem com atividade antioxidante a qual estão relacionadas.

Após a digestão gastrointestinal (Tabela 5), os índices de bioacessibilidade dos compostos fenólicos, para as folhas silvestres e cultivadas, respectivamente, foram de 0,23 e 0,53% para os extratos obtidos por decocção, de 0,17 % e 0,16 % para os extratos obtidos por maceração e de 1,96 % e 1,04 % para os extratos obtidos pelo método assistido por ultrassom. Estes índices não apresentaram diferenças significativas entre os distintos materiais vegetais, bem como não foram encontrados dados na literatura a respeito da bioacessibilidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante para extratos de *Physalis angulata*.

A atividade antioxidante bioacessível dos extratos foi determinada apenas para o método analítico ABTS, apresentando redução após digestão gastrointestinal que variaram de 45,2% a 87,8% (Tabela 5). Resultados similares foram reportados por Martín-Vertedor *et al.* (2016) avaliando a bioacessibilidade compostos bioativos de extratos aquosos de oliveira observaram redução no teor de compostos fenólicos (90%) e atividade antioxidante (50%) após digestão simulada. Ramírez-Moreno *et al.* (2011) também relataram valores entre 0 e 14% para a bioacessibilidade de compostos fenólicos em extratos de sementes *Opuntia albicarpa* cv. Reyna e *Opuntia ficus-indica*.

A redução da atividade antioxidante dos extratos aquosos de *Physalis angulata*

está relacionado com os baixos teores de compostos fenólicos quantificados após digestão simulada. Ambos os resultados podem ser justificados por possíveis alterações destes compostos durante o processo de digestão gastrointestinal.

Os compostos fenólicos podem sofrer modificações estruturais causadas por variações drásticas de pH (condições alcalinas), ação das enzimas utilizadas na digestão com consequente alteração de moléculas, alteração de grupos bioativos como a perda de hidrogênio que resulta em uma perda significativa da atividade antioxidante, e também a presença de ácidos fenólicos ligados a outras moléculas ou à matriz alimentar que dificulta a absorção através da membrana de diálise (GARBETTA *et al.* 2014; RAMÍREZ-MORENO *et al.*, 2011).

Os índices de soma de postos ou “ranking” segundo Mulamba e Mock (1978) foi realizado com o objetivo de ordenar de forma geral o melhor método extrativo e o material vegetal frente as variáveis teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante antes e após a digestão simulada conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Índices de soma de postos para o ordenamento dos métodos extrativos e materiais vegetais para as variáveis teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante (ABTS e DPPH) antes e após digestão simulada

Ordem de seleção	Métodos Extrativos				
	CFT (mg EAG/100 g)	CFT Após digestão (mg EAG/100 g)	ABTS (µM trolox /g)	ABTS Após digestão (mg EAG/100 g)	DPPH CE ₅₀ (mg/mL)
DEC	11713,37	39,89	285,91	42,97	98,59
MAC	11651,57	19,5	177,41	41,44	394,02
US	1179,99	16,07	90,77	51,73	937,28
Material vegetal					
Nativo	8606,42	23,24	200,52	42,95	348,45
Cultivado	7756,87	27,07	168,88	47,8	604,81

CFT: Compostos fenólicos totais; ABTS: 2,2- azino – bis - (3-etilbenzotiazolína) – 6 -ácido sulfônico; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; CE₅₀: Concentração Efetiva do extrato capaz de reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH; DEC: decocção; MAC: maceração; US: ultrassom. Fonte: elaborada pela autora.

Conforme pode ser observado na Tabela 6 dentre os métodos extrativos e materiais vegetais estudados, o método de decocção e os extratos das folhas de *Physalis angulata* silvestres se sobressaíram aos demais, apresentando a maior resposta biológica frente as variáveis estudadas. Estes resultados corroboram com a interação significativa

apresentada anteriormente (Tabela 5) onde pode ser observado que o maior teor de compostos fenólicos e o maior potencial antioxidante foi verificado para o extrato das folhas silvestres de *Physalis angulata* obtido pelo método extrativo de decocção.

5.3 Potencial antimicrobiano

5.3.1 Difusão em ágar

Os extratos aquosos de *Physalis angulata* obtidos por diferentes métodos de extração apresentaram atividade antimicrobiana sobre a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. A bactéria *Listeria monocytogenes*, também Gram-positiva, demonstrou susceptibilidade ao extrato aquoso obtido pelo método extrativo de decocção (FCDEC). Este e os demais extratos não demonstraram ação inibitória sobre os microrganismos Gram-negativos, *Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis*, conforme pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 – Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos de *Physalis angulata* representada por zonas de inibição através do método de difusão em ágar

Extratos (50mg/ mL)	Zona de inibição (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Esherichia coli</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>
FCD	13	18	ND	ND
FSD	8	14	ND	ND
FCM	11	ND	ND	ND
FSM	10	ND	ND	ND
FCUS	16	ND	ND	ND
FSUS	9	ND	ND	ND
*Gentamicina (10 µg)	19	24	-	-
**Amicacina (30 µg)	-	-	18	15

FCD: Extratos das folhas cultivadas obtidos por decocção; FSD: Extrato das folhas silvestres obtidos por decocção; FCM: Extrato das folhas cultivadas obtidos por maceração; FSM: Extrato das folhas silvestres obtidos por maceração; FCUS: Extrato das folhas cultivadas obtidos por ultrassom; FSUS: Extrato das folhas silvestres obtidos por ultrassom; ND: Não determinado. * Antibiótico comercial utilizado como controle positivo para os microrganismos Gram-positivos; **Antibiótico comercial utilizado como controle positivo para os microrganismos Gram-negativos. Fonte: elaborada pela autora.

A intoxicação alimentar por *S. aureus* é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA's) mais comuns e resulta da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas em alimentos. Estes microrganismos são capazes de sobreviver e se multiplicar em concentrações de até 15% de cloreto de sódio e toleram atividade de água de 0,83, valor

inferior a maioria dos microrganismos. Além disso, são cepas resistentes a antibióticos convencionais, fato que impulsiona as pesquisas por alternsilvestres terapêuticas mais efetivas (HENNEKINNE *et al.*, 2011). Nesse sentido, os resultados do presente estudo mostram que os extratos aquosos de *Physalis angulata* apresentam potencial antimicrobiano relevante sendo uma alternativa viável no controle patógenos.

Donkor *et al.* (2016) ao avaliarem a atividade antimicrobiana de extratos aquosos e etanólicos das partes aéreas de *Physalis angulata* obtidos por maceração relataram maior potencial antimicrobiano dos extratos etanólicos sobre *S. aureus* (Gram-positiva) e *P. aeruginosa* (Gram-negativa) apresentando halos de inibição de 21,00 mm e 23,00 mm, respectivamente. Já o extrato aquoso apresentou halo de inibição de 13 mm sobre *P. aeruginosa* não sendo observada atividade inibitória sobre *S. aureus*.

Osho *et al.* (2010) avaliaram o potencial antimicrobiano do óleo essencial das folhas de *Physalis angulata* e observaram ação inibitória (halo de 10 mm) sobre a bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae*, não sendo observado este resultado para a Gram-positiva *S. aureus*. Estes resultados discordam dos encontrados no presente estudo, uma vez que não foi observada a atividade antimicrobiana dos extratos de *Physalis angulata* sobre os microrganismos Gram-negativos. Entretanto, é importante ressaltar que os microrganismos Gram-positivos são mais susceptíveis a ação antimicrobiana de extratos vegetais (FERREIRA *et al.*, 2010), sobretudo a bactéria *S. aureus*, para a qual se observa o efeito inibitório de todos os extratos em estudo (Tabela 7).

Além disso, a estrutura celular de bactérias Gram-positivas é menos complexa, enquanto que às Gram-negativas possuem uma dupla camada constituída por uma membrana externa constituída por lipopolissacarídeos e proteínas que envolvem a parede celular, e uma camada interna de lipopolissacarídeos que lhes conferem uma barreira de permeabilidade à substâncias, sobretudo substâncias de caráter hidrofílico (SIMONETTI *et al.*, 2016).

Portanto, com base nos resultados obtidos e na literatura apresentada, infere-se que a atividade antimicrobiana de *Physalis angulata* sobre bactérias Gram-negativas pode estar relacionada com a presença de substâncias de caráter apolar uma vez que no presente estudo, os extratos aquosos apresentaram ação inibitória apenas sobre as bactérias Gram-positivas.

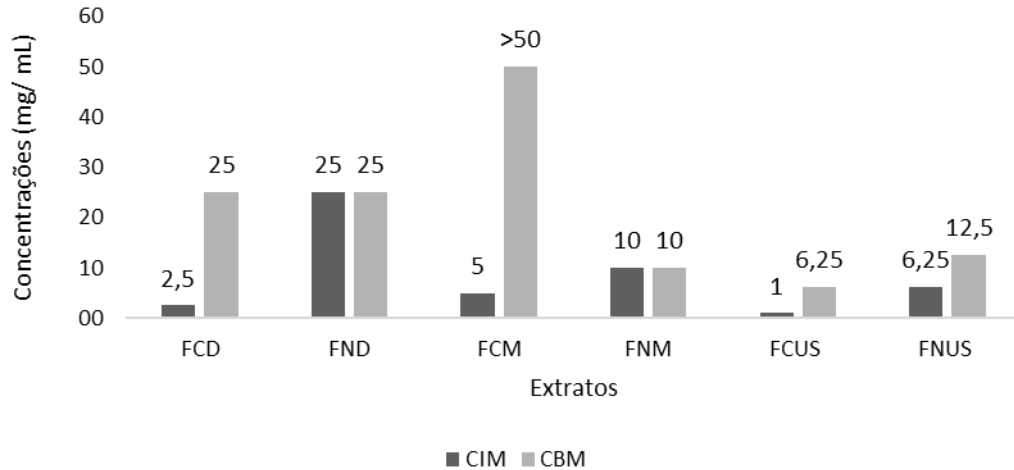
Inúmeros estudos têm atribuído a atividade antimicrobiana sobre microrganismos patogênicos às substâncias presentes em extratos vegetais de várias partes da planta tais como saponinas, taninos, alcaloides, flavonoides, sesquiterpenos, lactonas e terpenóides (TAJKARIMI *et al.*, 2010). Estes estudos têm demonstrado que o perfil de acumulação destas

substâncias é diferente nas diferentes espécies e até mesmo nos diferentes tecidos podendo este ser, também, um fator de influência na resposta da ação antimicrobiana frente aos microrganismos patogênicos.

5.3.2 Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração mínima bactericida (CMB)

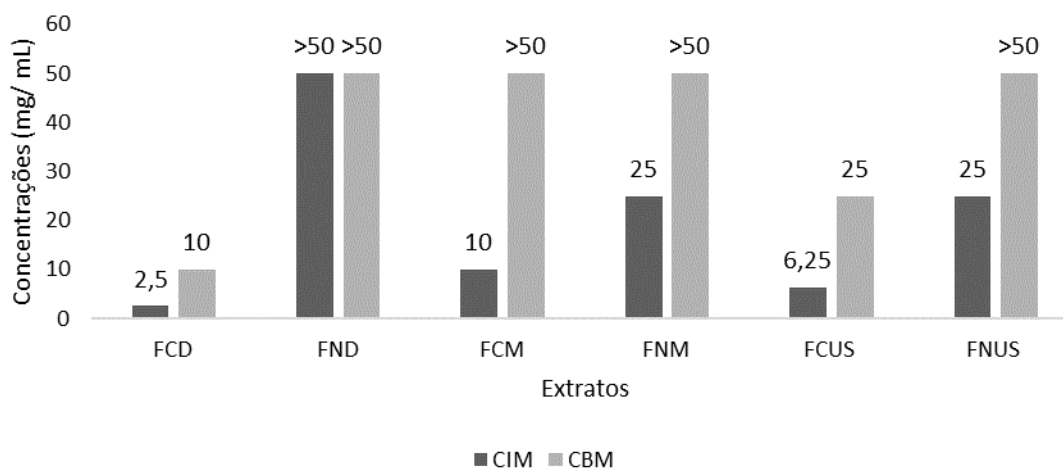
Com base nos resultados obtidos na análise de difusão em ágar, os extratos aquosos de *Physalis angulata* foram avaliados quanto ao potencial antimicrobiano através do método quantitativo de microdiluição em caldo. Nas Figuras 6 e 7, observam-se os resultados dos parâmetros de atividade antimicrobiana, concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) sobre os microrganismos que apresentaram susceptibilidade.

Figura 6 – Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* obtidos por diferentes métodos de extração frente a *Staphylococcus aureus*.



FCD: Extratos das folhas cultivadas obtidos por decocção; FSD: Extrato das folhas silvestres obtidos por decocção; FCM: Extrato das folhas cultivadas obtidos por maceração; FSM: Extrato das folhas silvestres obtidos por maceração; FCUS: Extrato das folhas cultivadas obtidos por ultrassom; FSUS: Extrato das folhas silvestres obtidos por ultrassom. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 7 – Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* obtidos por diferentes métodos de extração frente a *Listeria monocytogenes*.



FCD: Extratos das folhas cultivadas obtidos por decocção; FSD: Extrato das folhas silvestres obtidos por decocção; FCM: Extrato das folhas cultivadas obtidos por maceração; FSM: Extrato das folhas silvestres obtidos por maceração; FCUS: Extrato das folhas cultivadas obtidos por ultrassom; FSUS: Extrato das folhas silvestres obtidos por ultrassom. Fonte: elaborada pela autora.

Os extratos de *Physalis angulata* apresentaram atividade antimicrobiana sobre os microrganismos Gram-positivos, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, com CMI's entre 1,0 e 50 mg/ mL. As menores CMI's encontradas foram de 1,0 mg/ mL do extrato da folha cultivada obtido por ultrassom (FCUS) sobre *S. aureus* e de 2,5 mg/ mL do extrato da folha cultivada obtido por decocção (FCD) para ambos os microrganismos. O efeito bactericida dos extratos sobre *S. aureus* foi observado entre as concentrações de 6,25 e 25 mg/ mL, sendo a menor CMB encontrada para o extrato FCUS e de 10 mg/ mL para extrato FCD sobre *L. monocytogenes*, conforme pode ser observado nas Figuras 6 e 7.

Conforme mencionado anteriormente na análise qualitativa, estes resultados podem estar relacionados com a ação de compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais que atuam na parede celular das bactérias rompendo estruturas da membrana com conseqüente extravasamento celular. Além disso, os íons hidroxilas destes compostos se complexam com íons metálicos diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Entretanto, é importante ressaltar que outras substâncias fitoquímicas ou a interação destas substâncias podem estar relacionadas com a atividade antimicrobiana dos

extratos aquosos de *Physalis angulata* com maior potencial antimicrobiano (FCDEC e FCUS). Estudos fitoquímicos tem identificado a presença de vários compostos com propriedades biológicas nas espécies do gênero *Physalis* (*Solanaceae*) tais como os vitaesteroides (fisalinas) metabólito secundário próprio deste gênero (Ramírez et al., 2018), flavonoides e diversos ácidos fenólicos presentes em várias partes da planta (MEDINA-MEDRANO et al., 2015).

Gonçalves et al. (2016) observaram a ação antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Solanum subinerme* (*Solanaceae*) obtidos por soxhlet (frutos) e maceração (talos) sobre *S. aureus* e constataram em análises fitoquímicas que os extratos de ambos os tecidos vegetais apresentavam alcaloides, taninos, saponinas e triterpenos.

Silva et al. (2005) avaliando a atividade antimicrobiana do pool de fisalinas (B, D, F e G), metabólitos obtidos do extrato etanólico de *Physalis angulata*, sobre microrganismos Gram-positivos e Gram- negativos observaram CMI de 200 µg sobre as cepas *S. aureus* ATCC 29213, ATCC 36923 e ATCC 6538P, não sendo identificado valores de CMI para os demais microrganismos (Gram-negativos).

Januário et al. (2002) identificaram CMI's de 128 µg/ mL e 32 µg/ mL de fisalinas B e D, respectivamente, sobre *Mycobacterium tuberculosis*. Extratos das partes aéreas de *Physalis angulata* e frações contendo fisalinas apresentaram atividade antimicrobiana (CMI de 32 – 1000 µg / mL) sobre *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense* e *Mycobacterium intracellulare* (PIETRO et al., 2000). Estas espécies são dificilmente identificadas pelo método de Gram devido a constituição da parede celular, mas assemelham-se às bactérias Gram-positivas (COELHO; MARQUES, 2006).

Embora não exista um consenso na literatura sobre valores de referência de concentração mínima inibitória para extratos vegetais, alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial aqueles com níveis de inibições superiores (DUARTE, 2006).

No presente estudo os resultados qualitativos dos extratos aquosos de *Physalis angulata* apresentaram ação bacteriostática que variaram de 42 % a 84% sobre *S. aureus* e 58% a 75% sobre *L. monocytogenes* quando comparado ao antibiótico padrão gentamicina (controle). Estes resultados demonstram o potencial antimicrobiano uma vez que nas análises quantitativas o efeito bacteriostático foi observado em concentrações menores dos extratos (Figuras 6 e 7). Resultados inferiores foram relatados por Lopes et al. (2006) que ao avaliarem o potencial inibitório do extrato etanólico dos frutos de *Physalis angulata*

verificaram atividade bacteriostática de 25 % frente a ampicilina se enquadrando na faixa de linearidade da curva do antibiótico padrão.

Os resultados obtidos no presente estudo bem como os encontrados na literatura reforçam a importância de estudos com extratos vegetais obtidos por diferentes métodos extrativos para a obtenção de extratos aquosos com potencial antimicrobiano para o uso em alimentos e fármacos, evitando assim o uso de solventes orgânicos e corroborando com a medicina popular na busca de plantas silvestres para a obtenção de produtos de alto valor agregado.

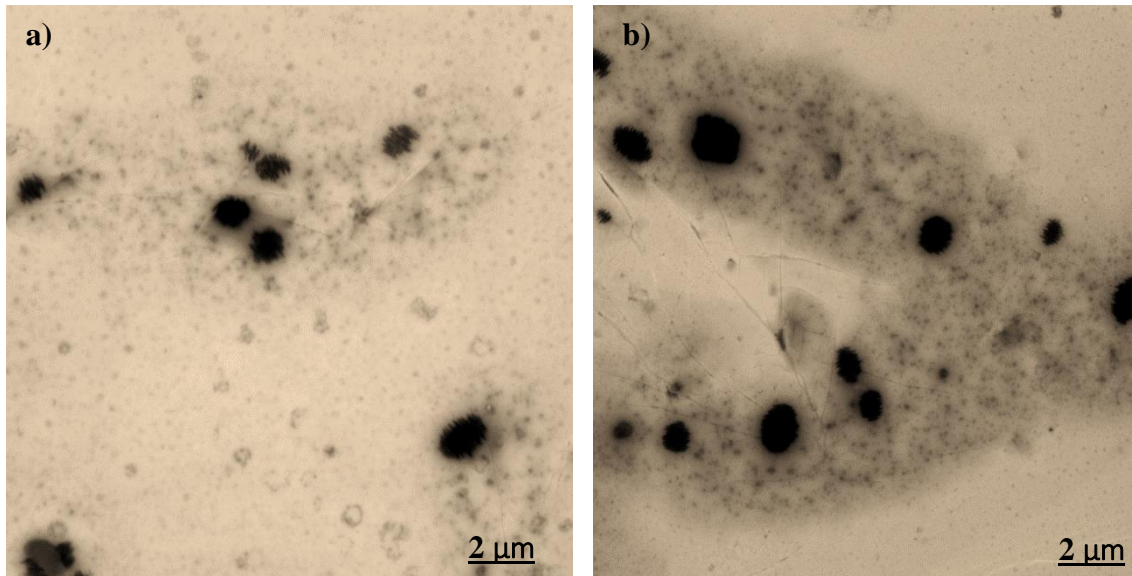
5.3.3 Danos morfológicos causados às células bacterianas

Com base nos resultados da atividade antimicrobiana, qualitativos e quantitativos, obtidos a partir dos extratos aquosos de *Physalis angulata* foram selecionados o extrato com maior potencial antimicrobiano e o microrganismo com maior susceptibilidade para análise morfológica através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.

O efeito antimicrobiano do extrato de *Physalis angulata* assistido por ultrassom (FCUS) sobre o microrganismo Gram-positivo *S. aureus* é observado na Figura 8. É possível visualizar células bacterianas com formas e tamanhos irregulares, apresentando danos na parede celular tais como distorções, rugosidades e rupturas, com consequente extravasamento do conteúdo celular. Estes danos estruturais podem ser mais bem identificados em comparação com as imagens do controle, microrganismo sem a ação do extrato (Figura 9). É possível visualizar nas imagens células de *S. aureus* de forma esférica, tamanho regular e uniforme, apresentando parede celular íntegra, ou seja, sem a presença de danos morfológicos.

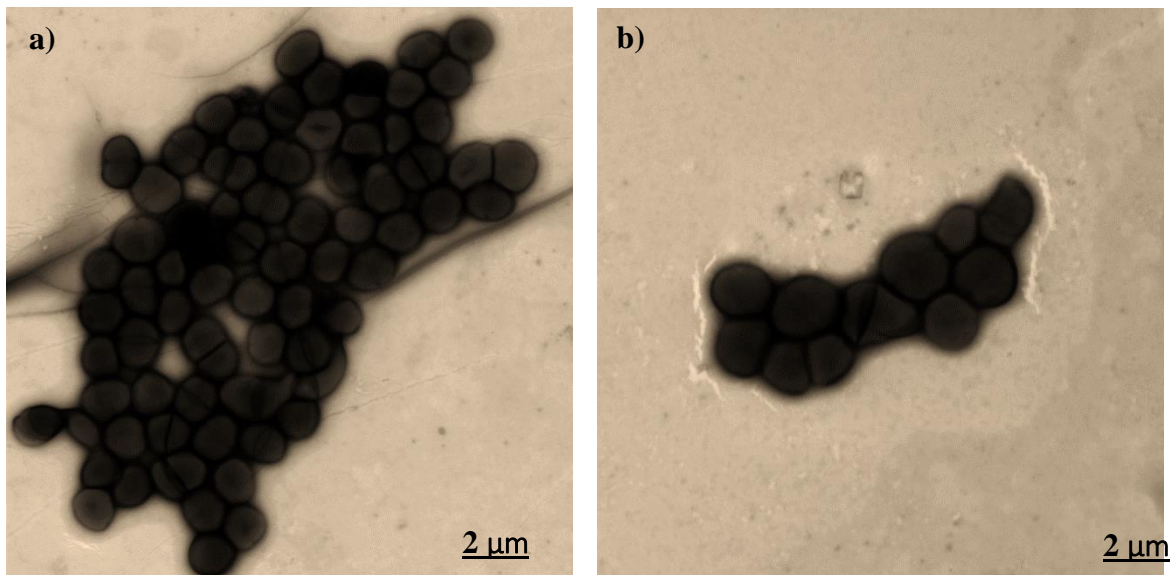
Observações similares foram reportadas por Kamonwannasit *et al.* (2013) em seus estudos avaliando a atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de *Aquilaria crassna* sobre *Staphylococcus epidermidis*. O comprometimento da divisão celular e o espessamento da parede celular também foram relatados por Jiamboonsri *et al.* (2011) avaliando a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Mangifera indica* L. sobre *S. aureus*.

Figura 8 – Micrografia eletrônica de transmissão de *S. aureus* sob o efeito antimicrobiano do extrato aquoso das folhas de *Physalis angulata*.



Imagens de células de *S. aureus* sob o efeito antimicrobiano do extrato FCUS na concentração de 10 mg/mL com magnificação de 26.700 X (a) e 26.100 X (b). Fonte: elaborada pela autora.

Figura 9 – Micrografia eletrônica de transmissão de células de *S. aureus* sem o efeito antimicrobiano do extrato aquoso das folhas de *Physalis angulata*.



Imagens de células de *S. aureus* sem o efeito antimicrobiano do extrato FCUS na concentração de 1 mg/mL com magnificação de 25.800 X (a) e 36.500 X (b). Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados do presente estudo corroboram com os encontrados na literatura. Os danos às células bacterianas podem ser atribuídos aos compostos fenólicos e/ou outros fitoquímicos presentes nos extratos vegetais. Estas substâncias possuem a capacidade de

aderirem à parede celular bacteriana por meio de complexos proteicos e de polissacarídeos, levando a permeabilidade das membranas com conseqüente ruptura e extravasamento do conteúdo celular (YI *et al.*, 2010)

Apesar da susceptibilidade do microrganismo de estudo à ação de várias drogas ativas contra bactérias Gram-positivas tais como penicilinas, tetraciclina, clorafenicol, entre outros, é também conhecido por sua capacidade de desenvolver resistência a diversas delas (LENCASTRE *et al.*, 2007).

Neste contexto, os resultados obtidos são de grande relevância, uma vez que o extrato aquoso das folhas de *Physalis angulata* apresentou potencial antimicrobiano sobre *S. aureus* contribuindo, assim, para novas pesquisas visando substituir antimicrobianos sintéticos por naturais.

5.4 Avaliação da toxicidade dos extratos de *Physalis angulata* sobre *Artemia salina*

O teste de toxicidade sobre a *Artemia salina* é um ensaio biológico considerado como uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de toxicidade. Sua ampla utilização está relacionada com a rapidez, acessibilidade e fiabilidade dos ensaios. Logo, a *Artemia salina* tem sido muito utilizada como organismo alvo para detectar compostos bioativos em extratos de plantas (AMARANTE *et al.*, 2011).

A análise de toxicidade dos extratos de *Physalis angulata* sobre *Artemia salina* foi realizada através da relação de organismos não sobreviventes com as concentrações dos extratos. Os extratos FSDEC e FCUS, de maior potencial antimicrobiano, apresentaram valores de $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/ mL}$, não sendo constatada a mortalidade dos náuplios em nenhuma das concentrações testadas. O controle positivo, solução salina sintética foram associados a 100% de sobrevivência.

Estes resultados indicam que os extratos das folhas de *Physalis angulata* não apresentaram toxicidade. Segundo Meyer (1982) são considerados atóxicas ou isilvestres, amostras que apresentarem CL_{50} superior a $1000 \mu\text{g/ mL}$. Abreu *et al.* (2016) em seus estudos com extratos etanólicos das folhas, galhos e cascas de *Piptadenia stipulacea* obtiveram valores de $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/ mL}$, $707,11 \mu\text{g/ mL}$ e $> 1000 \mu\text{g/ mL}$, respectivamente, comprovando a ação tóxica do extrato etanólico dos galhos.

Seyfried (2010) avaliando a toxicidade da fração etanólica do extrato aquoso dos frutos de *Physalis peruviana* sobre *A. salina* observou valores de CL_{50} entre 4000 e 5000 $\mu\text{g/ mL}$. Hyacienth e Almeida (2015) avaliando a toxicidade do extrato etanólico da casca do

caule de *Pseudoxandra cuspidata* sobre *A. salina* observaram CL_{50} de 605,92 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ashan *et al.* (2009) relataram valores de CL_{50} de 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para os extratos metanólicos das folhas de *Physalis mínima*. Estes extratos foram classificados segundo Meyer (1982) como atóxico, moderadamente tóxico e tóxico, respectivamente.

Quignard *et al.* (2003) avaliaram a toxicidade de extratos aquosos e metanólicos das raízes de *Physalis angulata* e relataram taxa de sobrevivência de 100% das larvas de *A. salina* na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Schneider *et al.* (2015) avaliaram os extratos aquosos das folhas de *Brunfelsia cuneifolia* (Solanaceae) obtidos por decocção, maceração e assistidos por ultrassom sobre *A. salina* e constataram taxa de mortalidade de 10,3% no extrato obtido pelo método a quente, porém não houve diferença estatística quando comparado ao controle.

A avaliação preliminar de toxicidade dos extratos aquosos de *Physalis angulata* sobre o microcrustáceo *Artemia salina* indicou baixa toxicidade ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$), em função deste resultado outros estudos podem ser realizados visando sua aplicação, como por exemplo, nas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

5.5 Screening fitoquímico dos extratos aquosos de *Physalis angulata*

5.5.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

De acordo com os dados obtidos pelos experimentos de RMN ^1H as amostras FCDEC, FSDEC, FCMAC, FSMAC, FCUS e FSUS apresentam açúcares tais como: α e β -glicose, frutose e sacarose, como constituintes principais, observados na faixa de δ_{H} 3,0-5,4 ppm. Também foram observados sinais de hidrogênios de compostos terpênicos (δ_{H} 0,5-3,4 ppm) e sinais de insaturações ou compostos fenólicos (δ_{H} 6,5-7,5 ppm), conforme apresentado nas Figuras 10 a 15.

Resultados similares aos do presente estudo foram relatados por Ferreira (2018) que através de análises qualitativas com os extratos metanólicos das folhas, frutos e caule de *Physalis angulata* confirmou a presença de esteroides, terpenoides e taninos, principalmente, no extrato das folhas. Este apresentou teores de compostos fenólicos de 27,39 mg EAG / g de extrato seco sendo também observada maior capacidade antioxidante (CE_{50} de 7,24 mg/ mL) quando comparado aos demais extratos.

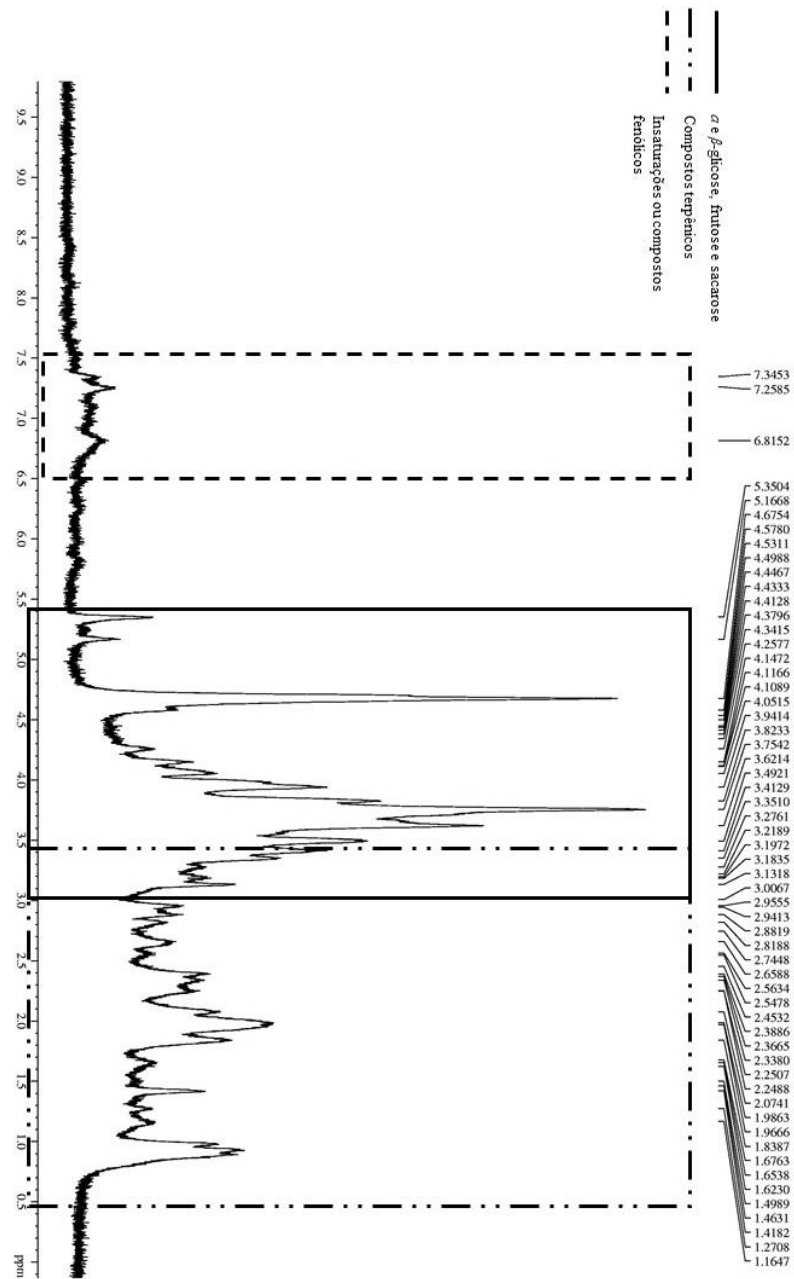
Ogundajo *et al.* (2015) em triagem fitoquímica realizada com o óleo essencial das folhas de *Physalis angulata* observaram as seguintes classes químicas: diterpenos (31,7%), ácidos graxos (22,8%), sesquiterpenos oxigenados (22,3%) e compostos aromáticos (13,6%).

Estes autores relataram diferenças químicas qualitativas e quantitativas quando comparado com outros estudos e atribuíram estas à fatores como o local de cultivo, a idade fenológica, a natureza da planta, as condições climáticas, os procedimentos de manuseio, entre outros.

Estas variações também ocorrem principalmente em decorrência de flutuações nas condições ambientais, o que leva as plantas a sintetizarem metabólitos secundários como estratégia de defesa para completar o seu ciclo de vida. Em outras palavras, estas substâncias são produzidas em resposta ao estresse ambiental (MASTUTI; ROSYIDAH, 2019).

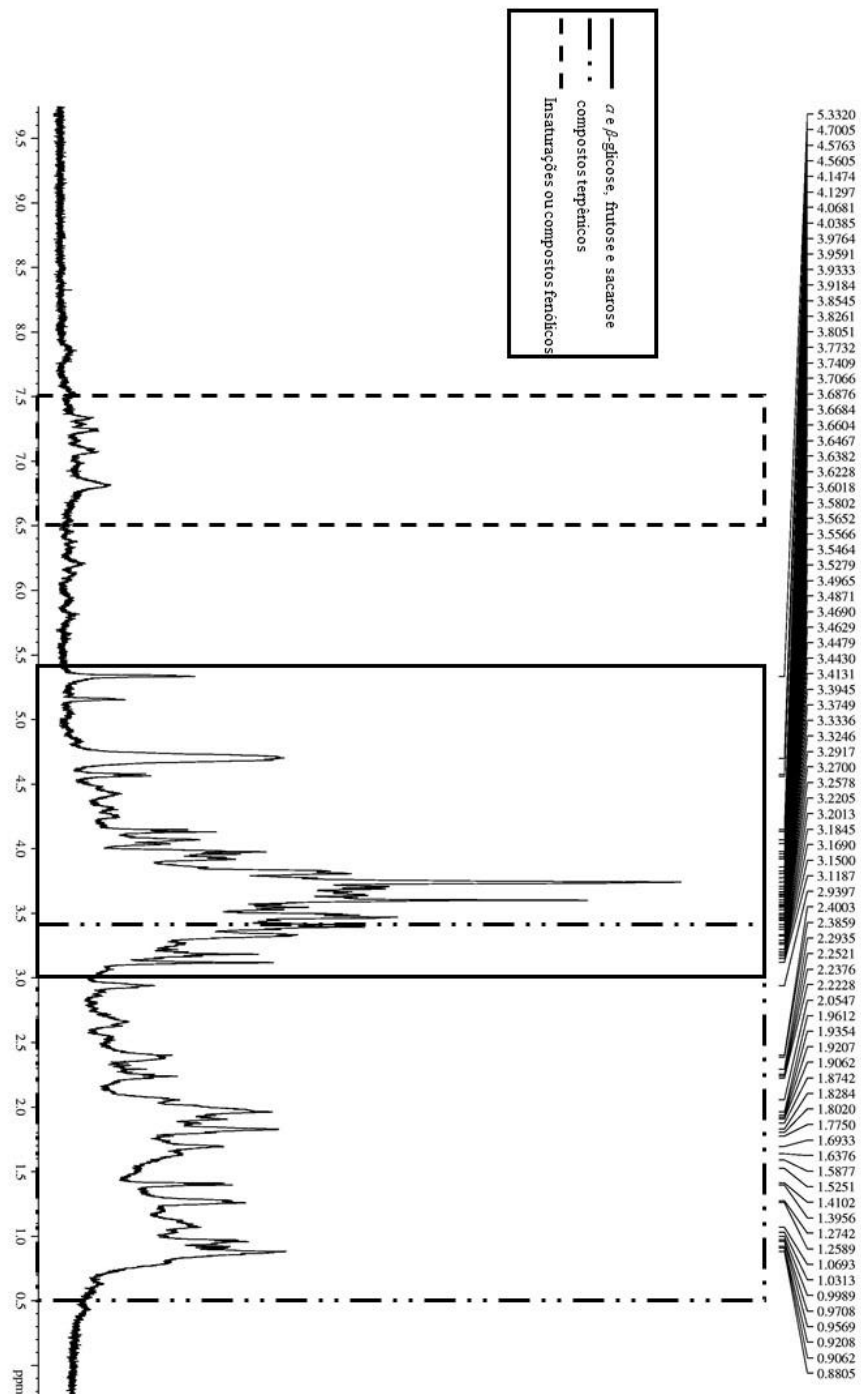
A composição química dos extratos dos gêneros das Solanaceas já é bem conhecida na literatura, sobretudo, na farmacológica (ZHANG; TONG, 2016). Entretanto, devido às variações qualitativas e quantitativas de uma mesma espécie e até de tecidos diferentes, é importante determinar a composição fitoquímica para permitir que procedimentos como o método de extração e isolamento de compostos bioativos ocorram com maior eficiência.

Figura 10 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FCDEC



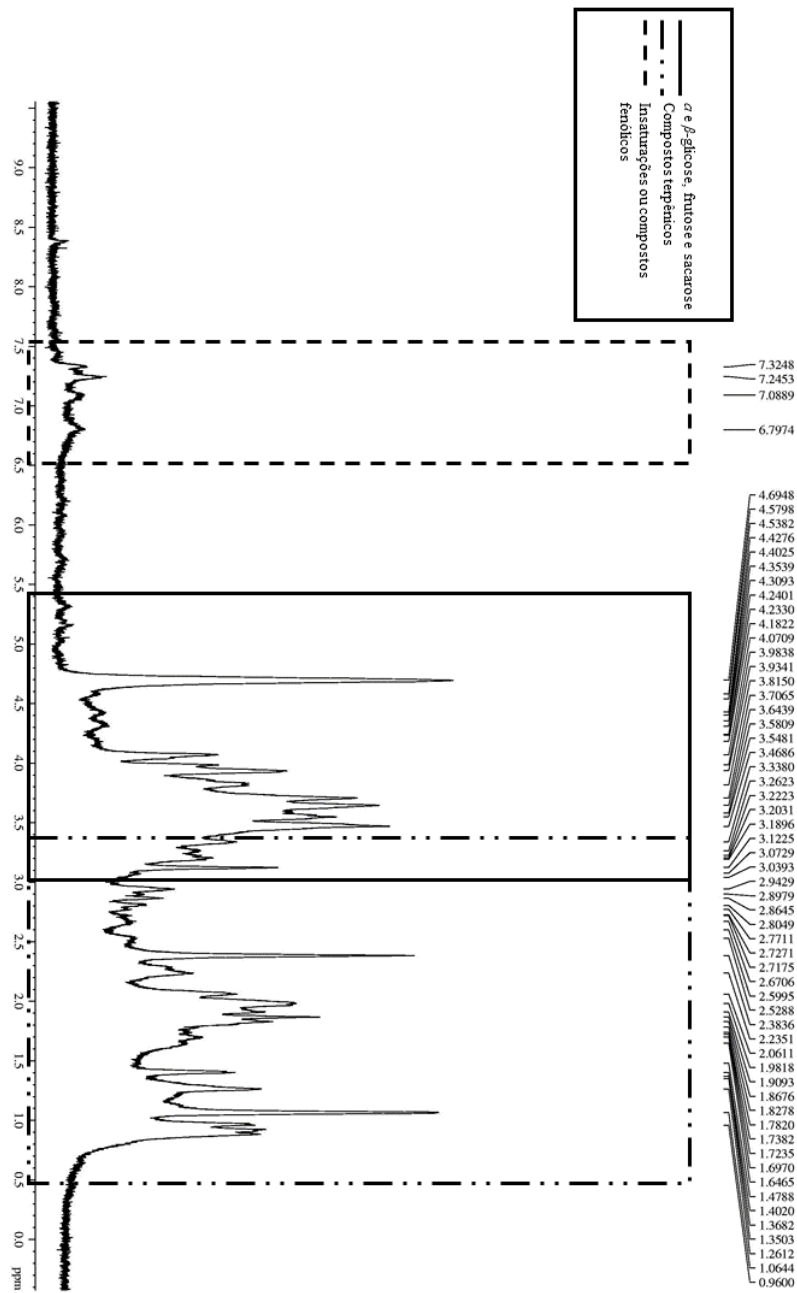
FCD: Extrato das folhas cultivadas de *Physalis angulata* obtido por decocção.
 Fonte: elaborada pela autora.

Figura 11 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FSDE.



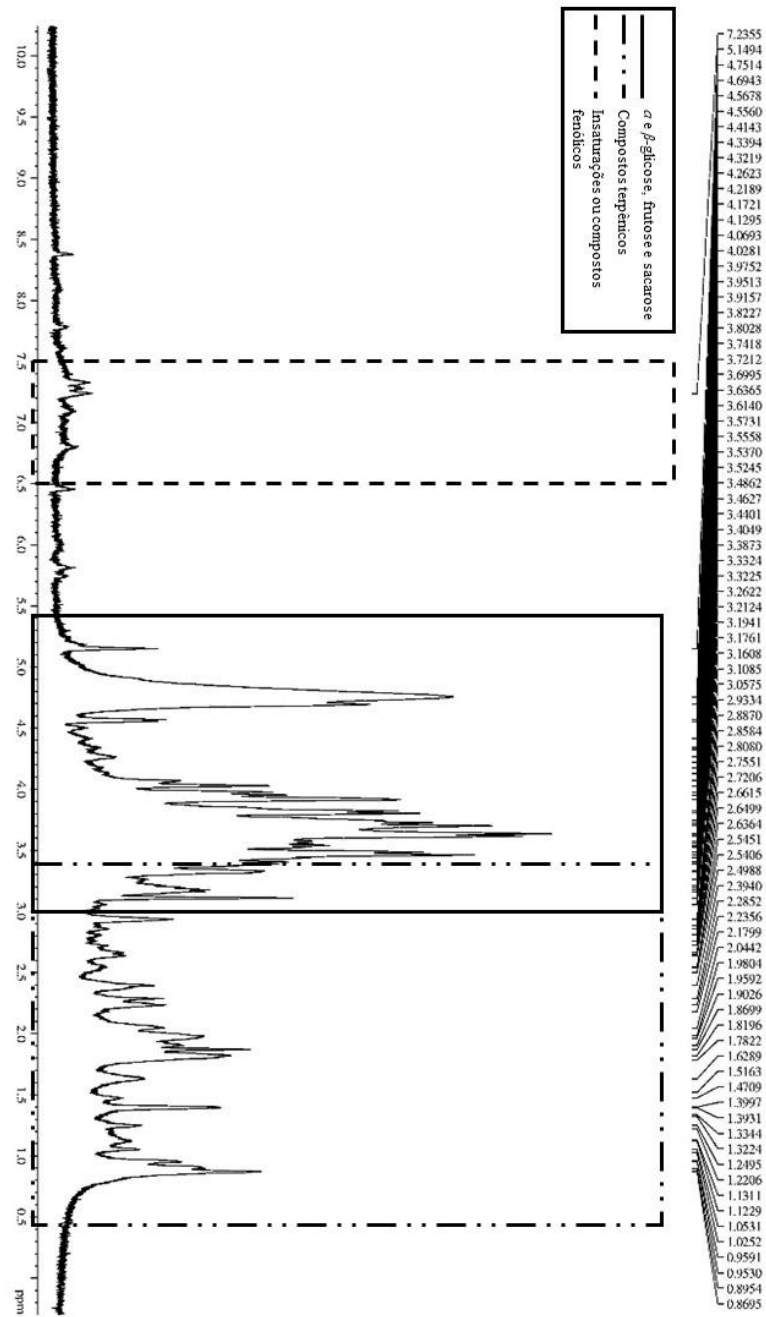
FCD: Extrato das folhas silvestres de *Physalis angulata* obtido por decocção. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 12 - Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FCMAC



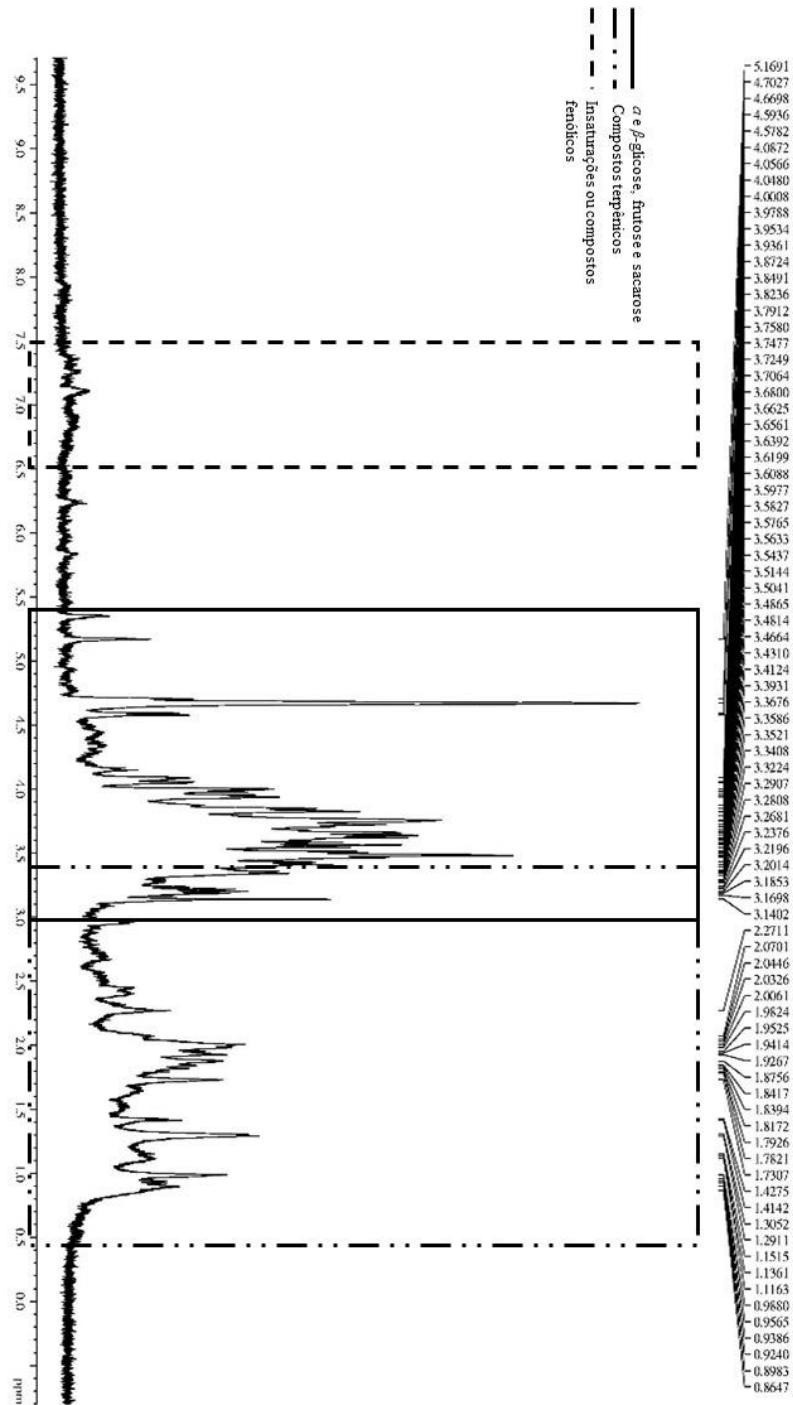
FCM: Extrato das folhas cultivadas de *Physalis angulata* obtido por maceração.
 Fonte: elaborada pela autora.

Figura 13 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FSMAC



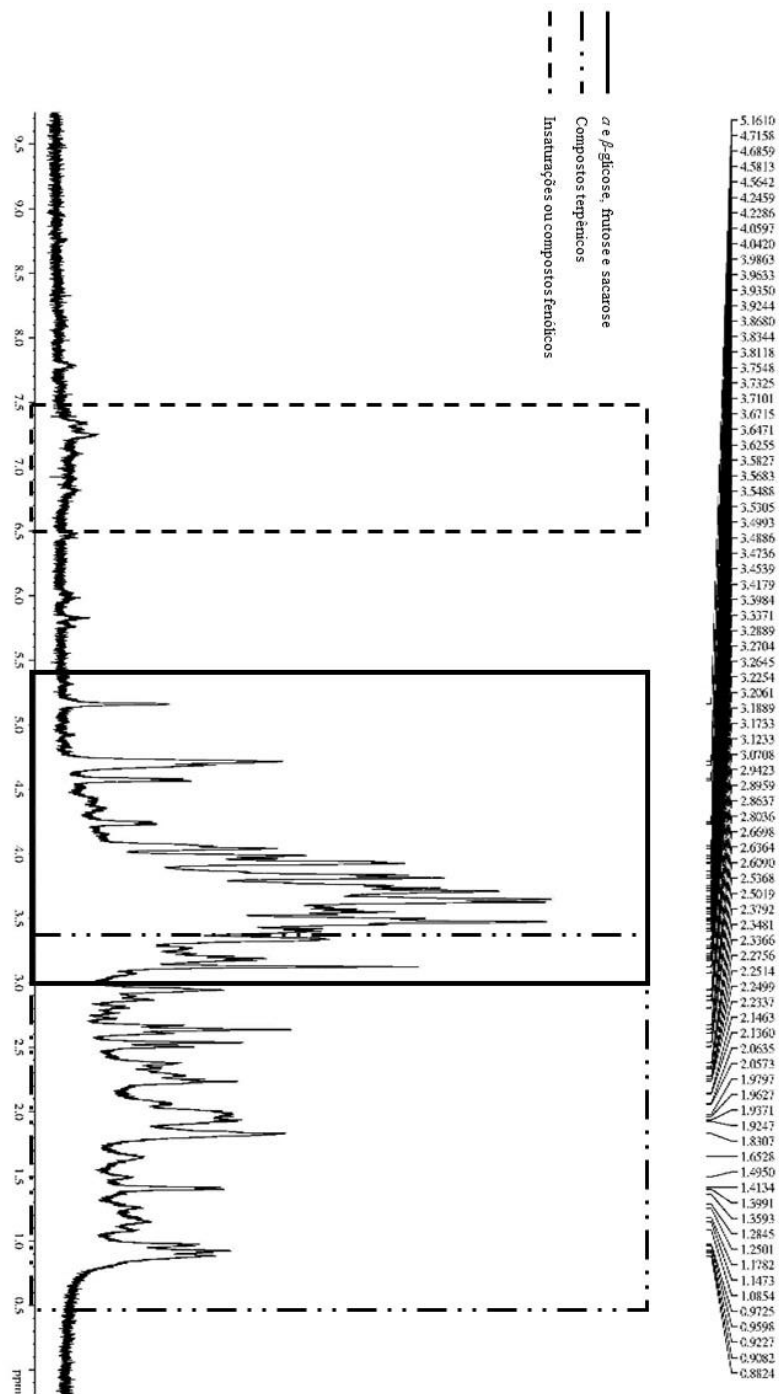
FSM: Extrato das folhas silvestres de *Physalis angulata* obtido por maceração.
 Fonte: elaborada pela autora.

Figura 14 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FCUS



FCUS: Extrato das folhas cultivadas de *Physalis angulata* assistidos por ultrassom. Fonte: elaborada pela autora.

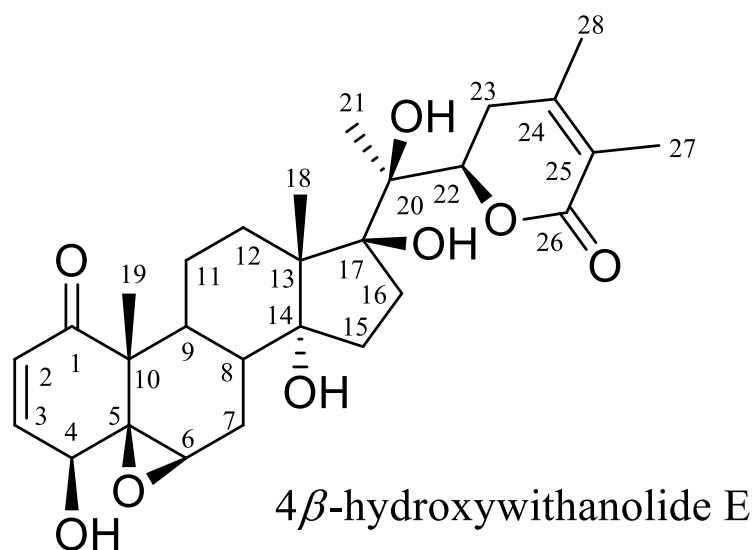
Figura 15 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FSUS.



FSD: Extrato das folhas de *Physalis angulata* silvestres assistidos por ultrassom. Fonte: elaborada pela autora.

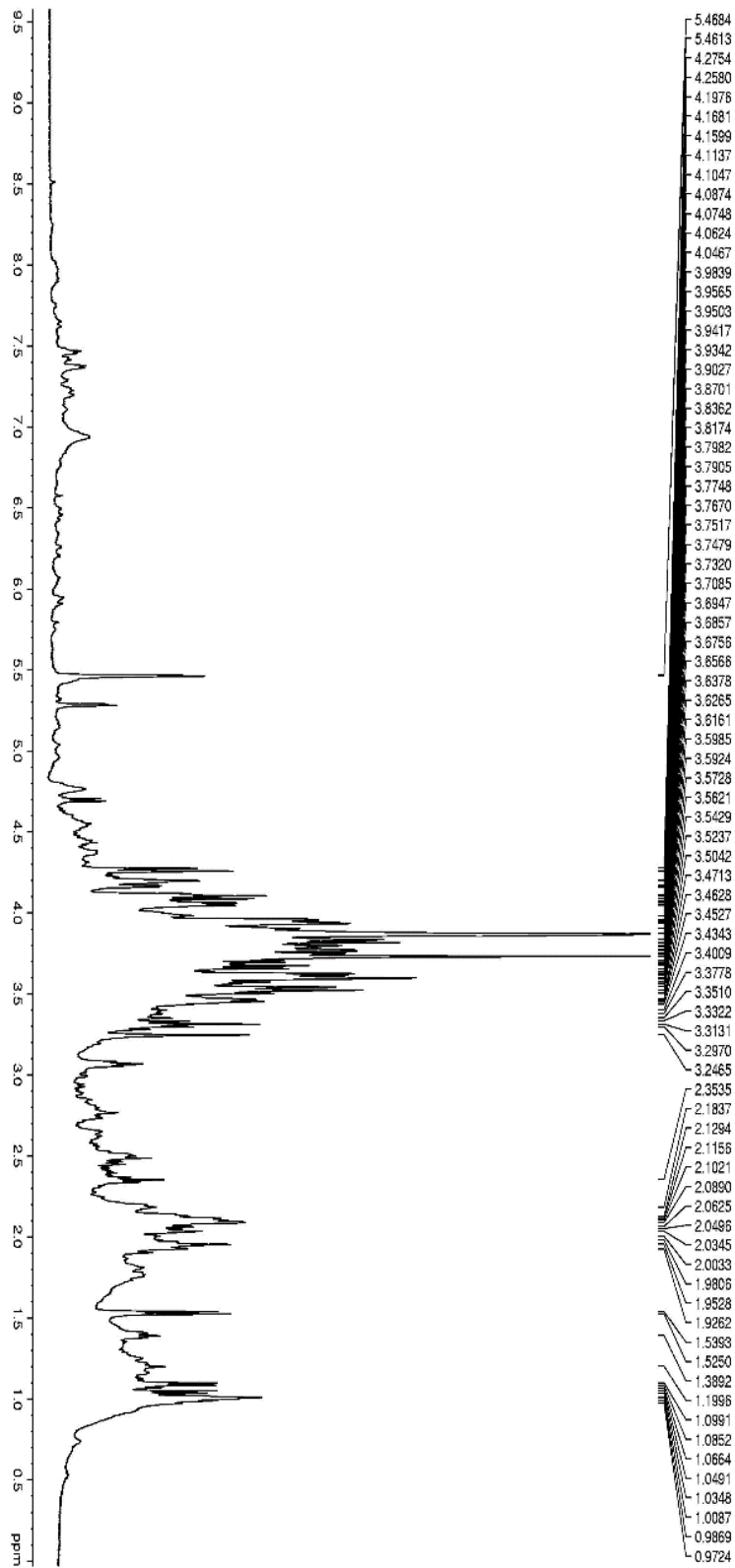
Os extratos com maior potencial antimicrobiano, FCDEC e FCUS, foram submetidos a extração de fase sólida. Após este procedimento os açúcares foram separados (fração aquosa; Figuras 17 e 18) dos compostos terpênicos (fração metanólica; Figuras 19 a 22). Em ambas as frações metanólicas foi identificado por RMN ^1H , ^{13}C e por comparação com a literatura o composto 4- β -hidroxivitanolideo E (Figura 16), como constituinte majoritário (MASTUTI; ROSYIDAH, 2019).

Figura 16 – Representação estrutural do composto 4 β -hidroxivitanolideo E



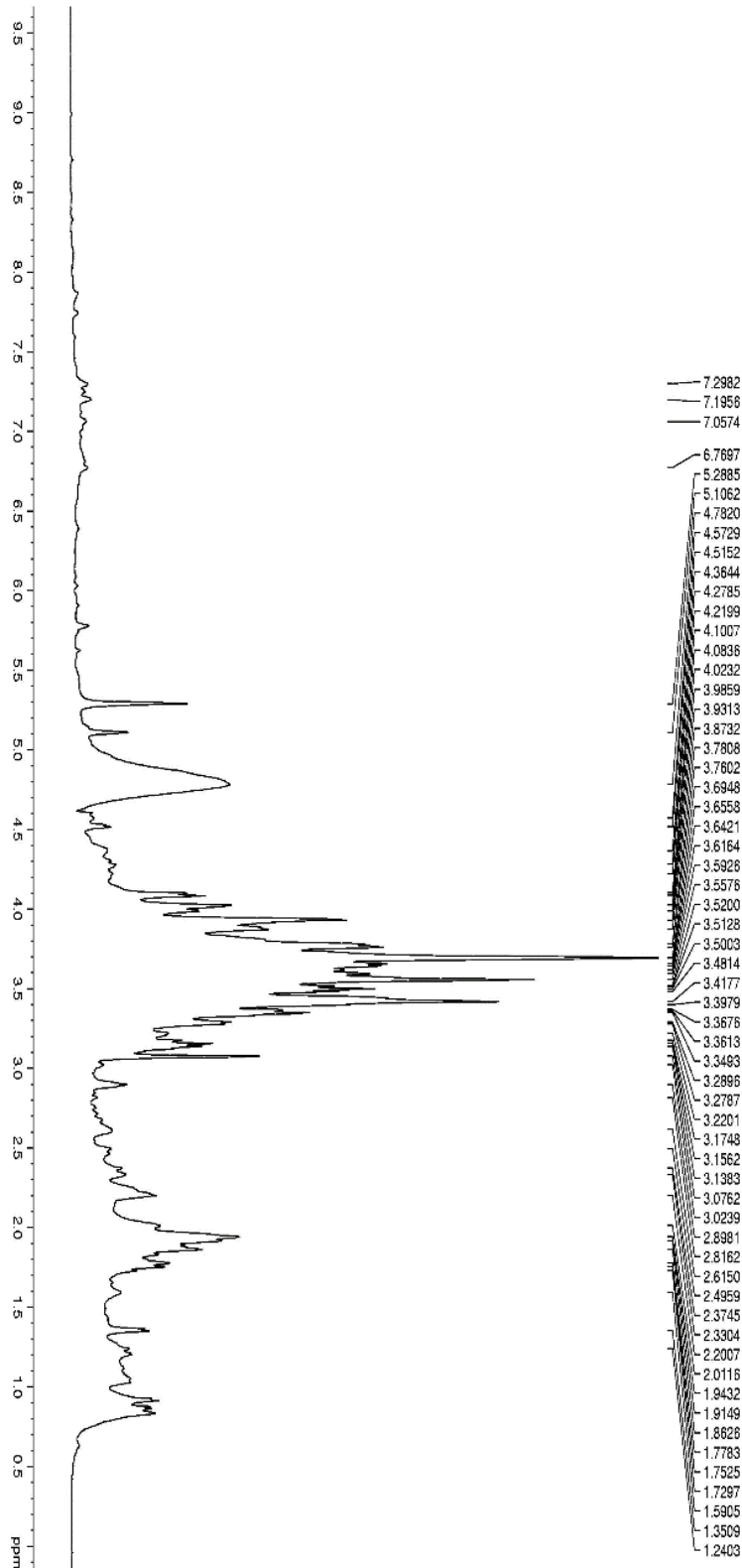
Fonte: Mastuti e Rosyidah (2019).

Figura 17 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FCDEC



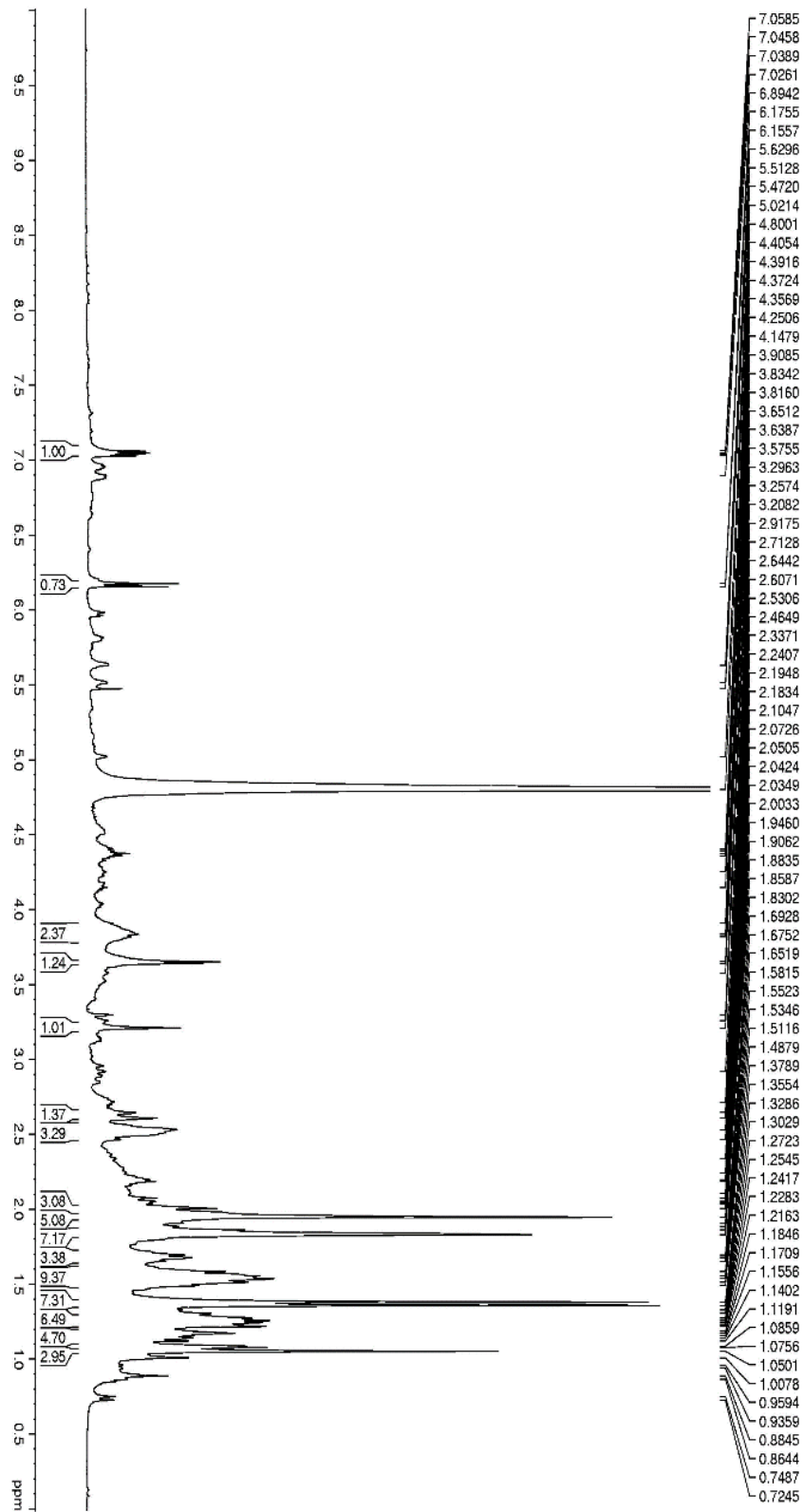
FCD: Extrato das folhas de *Physalis angulata* cultivadas obtido por decocção. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 18 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em D2O) de FCUS.



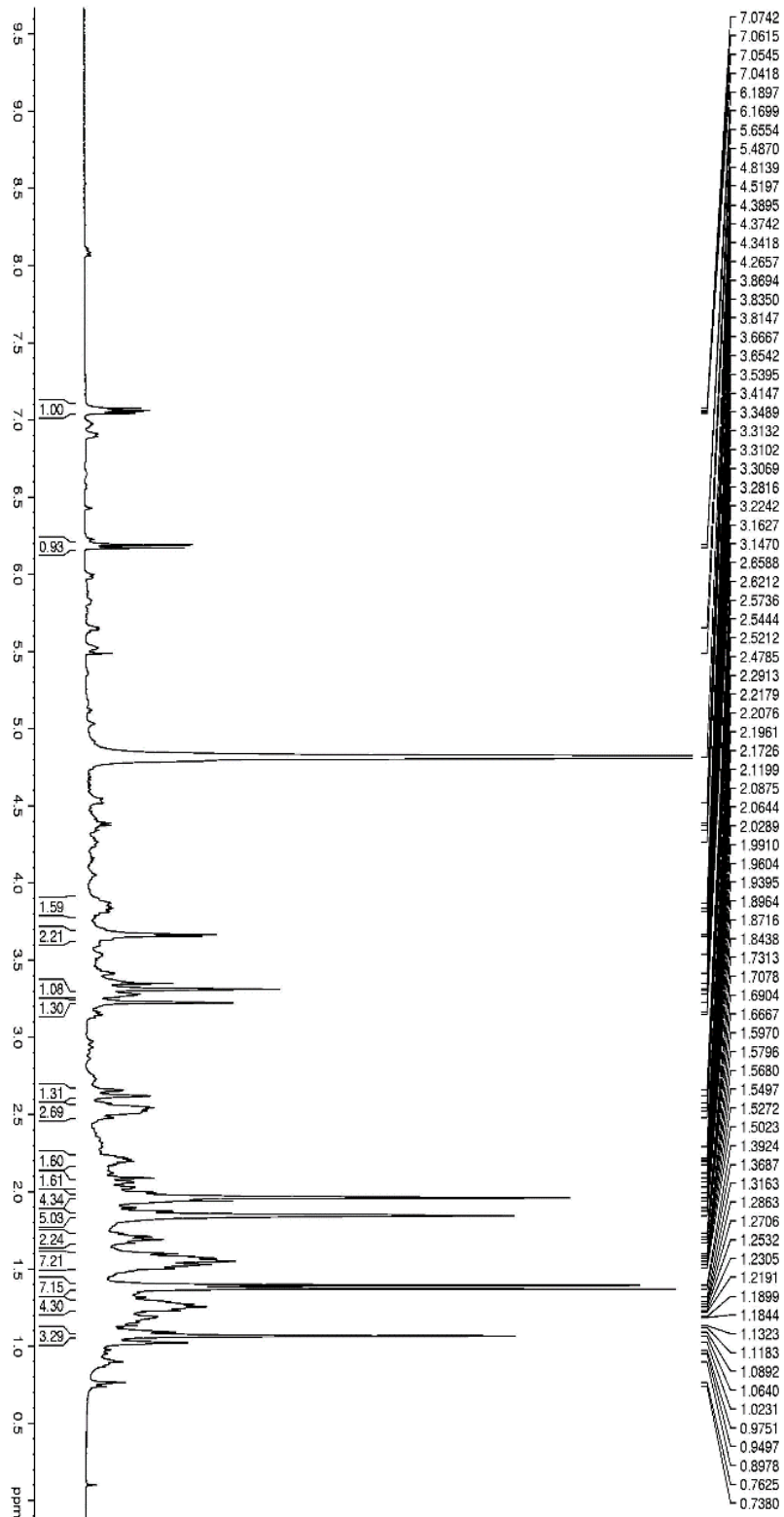
FCUS: Extrato das folhas de *Physalis angulata* cultivadas assistido por ultrassom. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 19 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em MeOD) de FCDEC



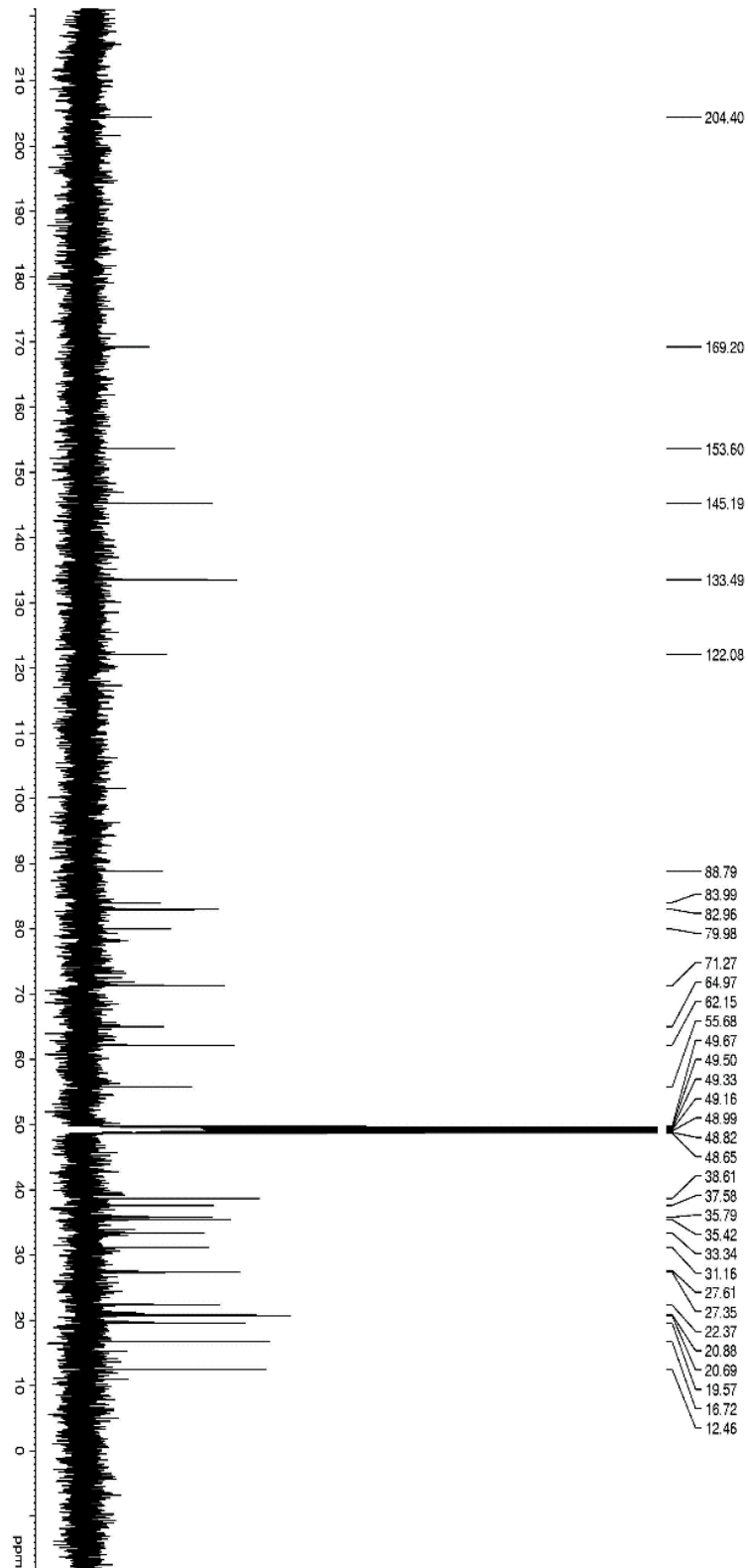
FCD: Extrato das folhas de *Physalis angulata* cultivadas obtido por decoção. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 20 – Espectro de RMN 1H (500 MHz em MeOD) de FCUS-2



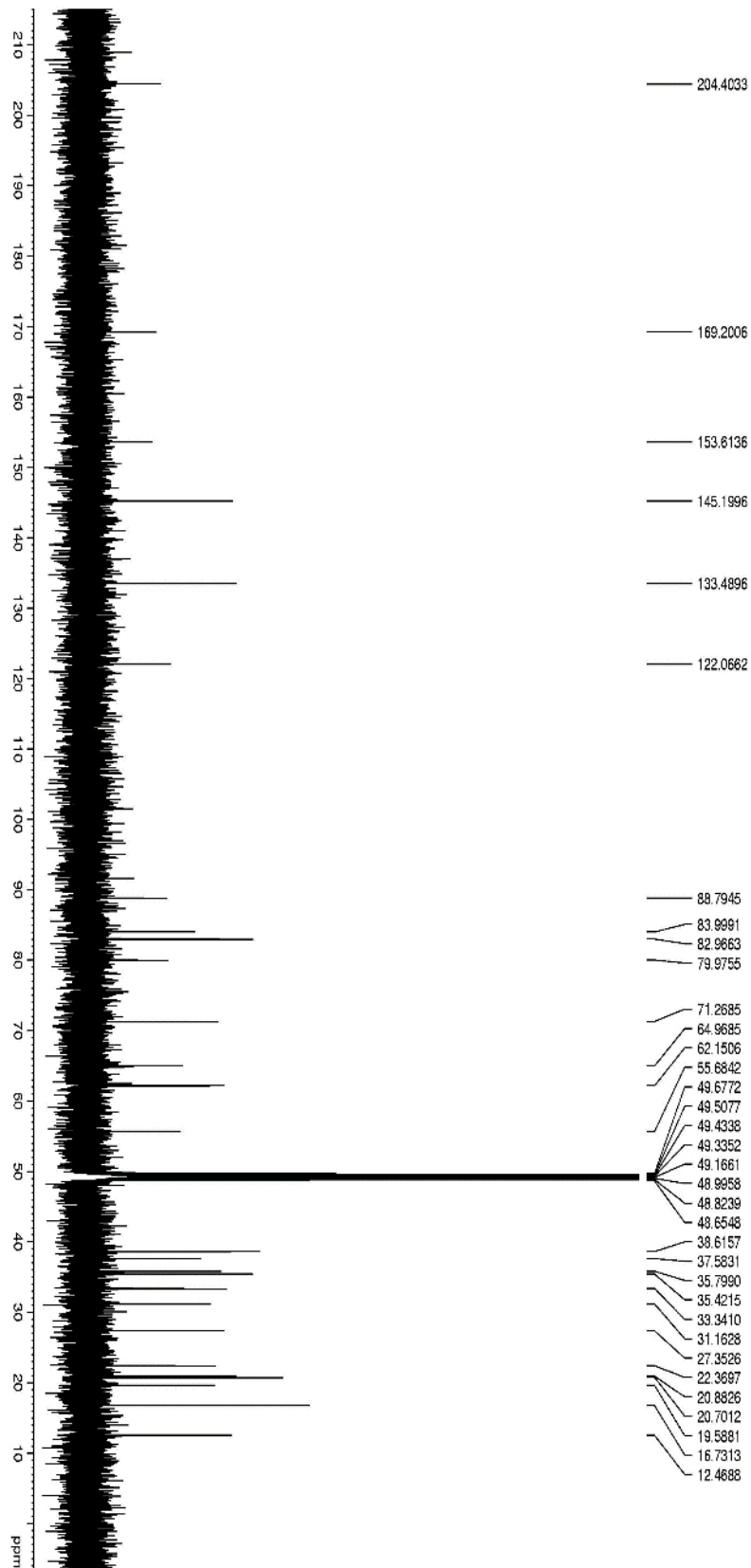
FCUS: Extrato das folhas de *Physalis angulata* cultivadas assistido por ultrassom. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 21 - Espectro de RMN 13C (125 MHz em D2O) de FCDEC-2



FCD: Extrato das folhas de *Physalis angulata* cultivadas obtido por decoção. Fonte: elaborada pela autora.

Figura 22 – Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz em D_2O) de FCUS



FCD: Extrato das folhas de *Physalis angulata* cultivadas assistido por ultrassom. Fonte: elaborada pela autora.

Os vitanolídeos são os principais metabólitos secundários produzidos pelas Solanaceas, especialmente as do gênero *Physalis* com cerca de 60 tipos sintetizados, entre eles as fisalinas, ixocarpalactonas e acnistinas (ZHANG; TONG, 2016). As concentrações destes compostos nas plantas estão principalmente relacionadas com as variações sazonais e geográficas (MISICO *et al.*, 2011).

Mastuti e Rosyidah (2019) identificaram 32 tipos de vitanolídeos com níveis variáveis entre 2,76 a 51,59 µg/ g de extrato seco das folhas de *Physalis angulata*, incluindo o 4β-hidroxivitanolideo E. Brar e Gupta *et al.* (2017) em seus estudos fitoquímicos com os extratos de várias partes de *Physalis angulata* identificaram maior quantidade de vitanolídeos no extrato das folhas.

5.5.2 Atividade biológica das frações aquosas e metanólicas dos extratos de *Physalis angulata*

As frações aquosas e metanólicas dos extratos das folhas de *Physalis angulata* foram avaliadas quanto ao potencial antimicrobiano, antioxidante, conteúdo fenólico e toxicidade sobre *A. salina* conforme pode ser observado na Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 – Atividade biológica das frações aquosas e metanólicas obtidas a partir dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata*

Frações de <i>Physalis angulata</i>	Atividade antimicrobiana CMI (mg/ mL)		Toxicidade CL ₅₀ (µg/mL)	Atividade antioxidante (µM Trolox/g)	CFT (mg EAG/100 g PS)
	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. salina</i>	Média ± DP	Média ± DP
FCDM	2,7	1,0	> 1000	205,05± 12,91	725,41±0,038
FCDA	> 3,0	> 3,0	> 1000	246,98 ± 24,40	459,14±0,025
FCUSM	1,0	1,0	> 1000	174,85 ±12,81	357,48±0,009
FCUSA	> 3,0	> 3,0	> 1000	43,029 ±9,82	245,59±0,014

FCDM: Fração metanólica dos extratos das folhas cultivadas obtidos por decocção; FCDA: Fração aquosa dos extratos das folhas cultivadas obtidos por decocção; FCUSM: Fração metanólica dos extratos das folhas cultivadas obtidos através do método assistido por ultrassom; FCUSA: Fração aquosa dos extratos das folhas cultivadas obtidos através do método assistido por ultrassom; CMI: Concentração mínima inibitória; CFT: Compostos fenólicos totais. Fonte: elaborada pela autora.

As frações metanólicas dos extratos das folhas de *Physalis angulata* (FCDM e FCUSM) mostraram ação inibitória sobre as bactérias Gram-positivas, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. A ação bactericida não foi evidenciada no presente estudo, sendo necessária concentrações maiores que 3,0 mg/ mL para ambas as frações testadas. Já as frações aquosas não apresentaram potencial antimicrobiano, podendo-se inferir que esta atividade está

realcionada com a presença do vitanolideo 4β -hidroxivitanolideo E identificado no presente estudo como o composto majoritário em ambas as frações metanólicas e/ou a outros metabólitos secundários como por exemplo, os compostos fenólicos.

Estudos com extratos de *Physalis angulata* utilizando solventes como o etanol, metanol, n-hexano, cloroformio e extrações a quente têm sido relacionados com a presença de vitanolideos (GIBSON *et al.*, 2012). Estes autores também relataram a atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *Physalis virginiana* contendo fisagulina V (composto majoritário) sobre *Bacillus cereus*, *Corynebacterium xerosis*, *Micrococcus luteus* e *Micrococcus roseus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e *Mycobacterium smegmatis*, atribuindo esta atividade a capacidade de penetração deste composto às membranas estruturais das células bacterianas Gram-positivas.

Khan, Bakht e Shafi (2016) em seus estudos com extratos de *Physalis ixocarpa* utilizando solventes de diferentes polaridades observaram a atividade inibitória sobre *S. aureus* e *K. Pneumoniae*. Estes autores atribuíram esta atividade biológica a metabólitos secundários presentes nas frações metanólicas dos frutos e folhas de *P. ixocarpa*. Igualmente a estes autores Shu *et al.* (2016) atribuíram a atividade antibacteriana sobre *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* aos metabólitos secundários (fisalinas e flavonas), vitanolideos, identificados em extratos hidroalcoólicos das folhas de *Physalis Alkekengi*.

Há muito se vêm investigando sobre os vitanolideos presentes nas espécies do gênero *Physalis* e conseqüentemente, importantes propriedades biológicas têm sido relatadas na literatura, tais como a atividade antiproliferativa de células cancerígenas de vitanolideos (fisalinas) isolados das folhas e caules de *Physalis angulata* (SUN *et al.*, 2017), a atividade antileishmanial das fisalinas B, D e F isoladas de *Physalis angulata* (GUIMARÃES *et al.*, 2010), propriedades analgésicas de extratos metanólicos das folhas de *Physalis angulata* (UKWUBILE; OISE, 2016), entre outras.

No presente estudo os maiores teores de compostos fenólicos foram observados para as frações metanólica (725,41 mg EAG/100 g PS) e aquosa (459,14 mg EAG/100 g PS), ambas obtidas a partir do decocto das folhas de *Physalis angulata*. Estas frações também apresentaram maior potencial antioxidante quando comparado às frações do extrato obtido pelo método assistido por ultrassom.

Brar e Gupta (2017) realizando uma triagem fitoquímica com extratos das folhas, caules e frutos de *Physalis angulata* observaram maiores teores de compostos fenólicos e vitaesteroides nos extratos das folhas. Carniel *et al.* (2018) relataram teores de compostos fenólicos totais que variaram de 3,0 a 374,00 mg EAG/ 100 g de extrato hidroalcoólico dos

frutos de *Physalis angulata*. Outros estudos com os extratos metanólicos das folhas, frutos e raízes demonstraram maiores teores de compostos fenólicos e conseqüentemente maior potencial antioxidante para os extratos das folhas e frutos de *Physalis angulata* (KRISHNA *et al.*, 2013).

Medina-Medrano *et al.* (2015) avaliaram os extratos metanólicos das folhas, cálices e frutos de seis espécies de *Physalis* entre elas *Physalis angulata* e constataram por meio de cromatografia líquida de alta eficiência um total de 28 compostos fenólicos em tecidos foliares, principalmente, kaempferol-3-O-glicosídeos, sendo este encontrado nos três tipos de tecidos indicando especificidade da espécie. Além dos derivados de Kaempferol, também foram revelados derivados de quercetina e ácidos fenólicos.

Uma comparação dos valores absolutos entre esses estudos é limitada devido a diferenças metodológicas na quantificação de compostos, produção de extrato e tipos de partes de plantas estudadas. Sabe-se que os compostos fenólicos, metabólitos secundários, podem atuar combatendo radicais livres nas células humanas, conferindo propriedades antioxidantes e conseqüentemente, inibindo processos patológicos e degenerativos. Portanto, estes resultados indicam que os extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* podem ser uma fonte promissora de compostos bioativos com propriedades relevantes à saúde.

A toxicidade das frações, assim como a dos extratos de origem, apresentaram valores de $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/ mL}$. Segundo Meyer (1982), são consideradas atóxicas ou isilvestres, amostras que apresentarem CL_{50} superior a $1000 \mu\text{g/ mL}$. Em função destes resultados, da composição fitoquímica e do potencial biológico demonstrados no presente estudo ficou evidenciado que os extratos de *Physalis angulata* podem ser considerados fontes potenciais de antioxidantes e antimicrobianos naturais com possível aplicação nas indústrias farmacêuticas e alimentícias.

6 CONCLUSÃO

Os extratos aquosos das folhas (cultivada e silvestre) de *Physalis angulata* L. foram obtidos por diferentes métodos de extração apresentam potencial antioxidante antes e após a digestão gastrointestinal simulada. O maior potencial antimicrobiano foi observado para os extratos das folhas cultivadas obtidos pelo método assistido por ultrassom, seguido por decocção sobre as bactérias Gram – positivas, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, não sendo observada a ação antimicrobiana sobre as bactérias Gram – negativas estudadas;

A ação inibitória frente às bactérias *S. aureus* e *L. monocytogenes* foi observada apenas para as frações metanólicas dos extratos de *Physalis angulata*, não sendo determinadas concentrações bactericidas.

Os extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* foram obtidos por decocção, assistidos por ultrassom e suas respectivas frações metanólicas não apresentam toxicidade sobre *Artemia salina*.

O vitanolideo 4 β -hidroxivitanolideo E identificado nas frações metanólicas obtidas dos extratos aquosos das folhas de *Physalis angulata* pode estar relacionado com o potencial antioxidante e antimicrobiano.

De forma geral, o extrato das folhas silvestres obtido por decocção apresenta os maiores teores de compostos fenólicos e maior potencial antioxidante. O método de decocção obteve maior resposta biológica frente as variáveis teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante (ABTS e DPPH) antes e após digestão, seguido pelo método de maceração e o método assistido por ultrassom.

Os extratos em estudo apresentaram valores reduzidos de compostos fenólicos após digestão gastrointestinal simulada, o que pode ser atribuído às variações de pH, a ação enzimática, e conseqüentemente, mudanças na estrutura destes compostos.

REFERÊNCIAS

- Anvisa. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002.** Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/alimentos>. Acesso em: 17 abr. 2019.
- AYBASTIER, Ö. *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, [S.l.], v. 44, p. 558-565, 2013.
- ABREU, C. B.; SOUZA, M. O.; MIRANDA, F. M.; RODRIGUES, T. G. S.; DIAS, F. S. Growth and evaluation of phenolic compounds in *Physalis angulata* L. at two different periods in the Bahia Reconcavo, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, [S.l.], v. 9, n. 10, p. 145-155, 2017.
- ABREU, A. O.; FRANCA, M. G. A.; NETO, A. L. L.; BATISTA, F. L. A.; MOURA, L. W. M. G.; MAGALHÃES, F. E. A. Potencial toxicológico e fitoquímico de extratos etanólicos de *Piptadenia stipulacea* (jurema branca, Fabaceae) coletada em Tauá-CE. ENCONTRO DE INICIAÇÃO À PESQUISA DA UNIFOR, XXII, 2016, Fortaleza. **Anais [...]** Fortaleza, 2016.
- ALVES, M. S. M.; MENDES, P. C.; VIEIRA, J. G. P.; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. R.; JÚNIOR, J. O. C. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. **Rev. Brasileira de Farmacognosia**, [S.l.], v. 20, n. 2, p. 215-221, 2010.
- ALVARADO, P. A.; BERDUGO, C. A.; FISHER, G. Efecto de um tratamiento a 1,5 °C y de las humedades relativas sobre las características físico-químicas de fruto de uchuva *Physalis peruviana* L. durante el posterior transporte y almacenamiento. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 22, n. 2, p. 147-159, 2004.
- AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, [S.l.], v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- AHSAN, R.; ISLAM, M.; HAQUE, E.; MOSSADDIK, A. *In vitro* antibacterial screening and toxicity study of some different medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, [S.l.], v. 5, n. 5, p. 617-621, 2009.
- ÁVILA, J.; MORENO, P.; FISHER, G.; MIRANDA, D. Influencia de la madurez del fruto y del secado del calíz en uchuva (*Physalis peruviana*), almacenada a 18°C. **Acta Agronomica**, Colombia, v. 55, n. 4, p. 29-38, 2006.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, Malasya, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.
- BARRIADA- BERNAL, L. G.; ALMARAZ- ABARCA, N.; DELGADO- ALVARADO, E.

- A.; GALLARDO- VELÁZQUEZ, T.; ÁVILA- REYES, J. A.; TORRES- MORÁN, M. I.; GONZÁLEZ- ELIZONDO, M. S.; HERRERA- ARRIETA, Y. Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). **CyTA J Food.**, México, v.12, n. 2, p. 105–114, 2014.
- BASTOS, G. N. T.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, A. M. R.; COSTA, C. I.; BISPO, C. I.; SILVEIRA, A. J. A.; NASCIMENTO, J. L. M. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Belém, v. 103, p. 241-245, 2006.
- BENELLI, P.; RIEHL, C.A.S.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E.F.A.; FERREIRA, S.R.S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S.l.], v. 55, n. 1, p. 132–141, 2010.
- BRANEN, J. K.; DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 90, p. 63-74, 2004.
- BRANDT, A. L. *et al.*, Inhibition of *L. monocytogenes* by Food Antimicrobials Applied Singly and in Combination. **Journal of Food Science**, [S.l.], v. 75, n. 9, p. 57-63, 2010.
- BRAR, R.; GUPTA, R. C. Phytochemical analysis of two cytotypes (2x and 4x) of *Physalis angulata* an important medicinal plant, collected from Rajasthan. **Biochemistry & Molecular Biology Journal**, [S.l.], v. 3, n. 15, p. 1-7, 2017.
- BRIONES-LABARCA, V. *et al.*, Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 128, n. 2, p. 520–529, 2011.
- CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: Quo vadis? **Trends in Food Science & Technology**, [S.l.], v. 45, p. 284-295, 2016.
- CÁRCEL, J. A.; PÉREZ, J. V. G.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. **Journal Food Engineering**, Valência, v. 110, p. 200-207, 2012.
- CARDOSO, I. C.; PEREIRA, H.M.G.; TAPPIN, M.R.R.; BHRENS, M.D. Influência da técnica de extração e do tamanho de partícula do material vegetal no teor de compostos fenólicos totais da tintura das folhas de *Alpinia zerumbet*. **Revista Fitos**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 62-68, set. 2017.
- CARNIEL, N.; DALLAGO, R. M.; BILIBIO, D.; NUNES, A. L.; BENDER, J. P.; PRIAMO, W. L. The effects of ultrasound-assisted extraction on polyphenolic compounds obtained from *Physalis angulata* using response surface approach. **Science Food Technology and Food Engineering**, [S.l.], v. 40, p. 3-6, 2018.
- CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F. P. Analytical applications of ultrasound. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 26, 413 p., 2007.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. CLSI supplement M100. 27. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Institute, 2017.

COBADELA-VELASCO, M.; ALMARAZ-ABARCA, N.; ALANIS-BANUELOS, R. E.; URIBE-SOTO, J. N.; GONZÁLEZ-VALDEZ, L. S.; MUNOZ-HERNANDEZ, G.; ZACA-MORAN, O.; ROJAS-LOPEZ, M. Phenolic profiles and antioxidant properties of *Physalis angulata* L.as quality indicators. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 114-128, 2017.

COELHO, F. S.; MARQUES, E. A. Etiologia. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 24-26, 2006.

CRISTOFOLI, N. L. **Obtenção de extratos com potencial antioxidante e antimicrobiano da folha da cajazeira (*Spondias mombin*)**. 113 f. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

CRISTOFOLI, N. L.; LIMA, C. A. R.; VIEIRA, M. M. C.; ANDRADE, K. S.; FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial potential of cajazeira leaves (*Spondias mombin*) extracts, **Separation Science and Technology**, [S.l.], v. 54, n. 4, p. 580 – 590, 2018.

CRUZ, C. D. Programa Genes - **Estatística Experimental e Matrizes**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006.

DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, Gloria; MARINA, María Luisa; PLAZA, Merichel. Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. **Journal of Chromatography A**, [S.l.], p.1-15, 2017.

DONKOR, A. M.; GLOVER, R. L. K.; BOATENG, J.K.; GAKPO, V.Y. Antibacterial activity of the fruit extract of *Physalis angulata* and its formulation. **Journal of Medical and Biomedical Sciences**, [S.l.], v. 1, n. 4, p. 21 – 26, 2012.

DONKOR, A.; ODURO-MENSAH, D.; FIAZORLI, M. Extracts of *euphobia hirta linn* and *Physalis angulata* and their amalgamation demonstrate potency against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 8, n. 4, p. 322-326, 2016.

ELOFF, J. N. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Med. Pretoria**, [S.l.], v. 64, p. 711-713, 1998.

EMERENCIANO, V. P.; MILITÃO, J. S.; CAMPOS, C. C.; ROMOFF, P.; KAPLAN, M. A.; ZAMBON, M.; BRANT, A. J. Flavonoids as chemo taxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**. São Paulo, v. 29, n. 9, p. 947– 957, 2001.

ESTAKHR, J.; JAVDAN, N. Preliminary study of phytochemical screening and antibacterial activity of *Physalis alkekengi* against *Staphylococcus aureus*. **Pharmacologyonline**, Iran, v. 3, p. 97-103, 2011.

FAWOLE, F. J.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; LAKRA, W. S. Evaluation of antioxidant

properties of selected India medicinal plants. **Int. J. Med. Arom. Plants**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 69-77, 2013.

FARMACOPÉIA Brasileira, 4 ed. São Paulo: Ateneu, 1988.

FERREIRA, S. B. *et al.*, Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato hidroalcoólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análise Clínica**, [S.l.], v. 42, n. 1, p. 7-31, 2010.

FERREIRA, L. M. S. L. **Caracterização anatômica e fitoquímica da *Physalis angulata* L. e seu efeito sobre células de indivíduos com mielopatia associada ao HTLV-1**. Tese (Doutorado em Medicina e Saúde Humana). Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina e Saúde Pública, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, 2018.

FREITAS, R. V. S.; SOUZA, P. A.; SENHOR, R. F.; MOURA, C. F. H.; COSTA, F. B. Post-harvest storage of papaya fruits coated with extracts of leaves and fruits of nem. **Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 31, n. 2, p. 290 – 296, 2018.

FRESCO, P.; BORGES, F.; DINIZ, C.; MARQUES, M.P.M. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. **Medicinal Research Reviews**, [S.l.], v. 26, n. 6, p. 747 - 766, 2006.

GARBETTA, A.; CAPOTORTO, I.; CARDINALI, A.; D'ANTUONO, I.; LINSALATA, V.; PIZZI, F.; MINERVINI, F. Antioxidant activity induced by main polyphenols present in edible artichoke heads: influence of in vitro gastro-intestinal digestion. **Journal of Functional Foods**, [S.l.], v. 10, p. 456-464, 2014.

GIBSON, K. A.; REESE, R. N.; HALAWEISH, F. T.; REN, Y. Isolation and characterization of a bactericidal withanolide from *Physalis virginiana*. **Pharmacognosy Magazine**, [S.l.], v. 8, n. 29, p. 22-28, 2012.

GIL-CHÁVEZ, G. j.; VILLA, J. A.; AYALA-ZAVADA, J. F.; HEREDIA, J. B.; SEPULVEDA, D.; YEHA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food**, México, v.12, n.1, p. 5–23, 2013.

GOMIDE, R. Operações com sistemas sólidos granulares. In: GOMIDE, R. **Operações unitárias**, v. 1. São Paulo, 1980.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; COMAS-SERRA, F; FEMENIA, A.; ROSSELLÓ, C.; SIMAL, S. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling, **Ultrasonics Sonochemistry**, [S.l.], v. 22, p.506-514, 2015.

GOVEAS, S. W.; ABRAHAM, A. evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of stem and leaf extracts of *Coscinium fenestratum*. **Asian J Pharm Clin Res**, [S.l.], v. 6, n. 3, p. 218-221, 2013.

GONÇALVES, A. P. P.; VIEIRA, G. D.; CUMHA, P. N. A.; KISSLER, T. V. L.; HERNANDÉZ, E. A. F.; TELES, C. B. G. Phytochemical characterization and antimicrobial activity of *Solanum subinerme* (Solanaceae) extracts. **Rev. Bras. Pesq. Saúde**, Vitória, v.18, n. 2, p. 8-16, 2016.

GUERGOLETTI, K. B.; COSTABILE, A.; FLORES, G.; GARCIA, S.; GIBSON, G. R. *In vitro* fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 196, p. 251-258, 2016.

GUIMARÃES, E. T.; LIMA, M. S.; SANTOS, A. L.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T. B. C.; SANTOS, R. R.; SANTOS, W. L. C.; SOARES, M. B. P. Effects of secosteroids purified from *Physalis angulata* L., *Solanaceae*, on the viability of *Leishmania* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Salvador, v. 20. n. 6, p. 945-949, 2010.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agentes. **Food Control**, Greensboro, v. 46, p. 412-429, 2014.

HAWKES, J. G. *et al.* **Solanaceae III** – Taxonomy, chemistry, evolution. The Royal Botanic Gardens. Londres: The Linnean Society of London, 1991.

HENNEKINNE, J. A.; BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiol Rev.**, [S.l.], v. 36, n. 4, p. 815-36, 2011.

HAYEK, S. A.; GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Antimicrobial natural products. Microbial pathogens and atrategies for combating them. **Science, technology and education**, Greensboro, v. 2, p. 910-921, 2013.

HELAL, A.; TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; CONTE, A. Bioaccessibility of polyphenols and cinnamaldehyde in cinnamon beverages subjected to *in vitro* gastropancreatic digestion. **Journal of Functional Foods**, [S.l.], v. 7, p. 506-516, 2014.

HERRERO, M.; PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Green processes for the extraction of bioactives from rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromtography-tandemmassapectrometry and *in vitro* as says. **Journal of chromtography**, Madrid, v. 1217, p. 2512-2520, 2010.

HOOTON, S. P. T.; ATTERBURY, R. J.; CONNERTON, I. F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella Typhimurium* U288 contamination on pig skin. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 151, p. 157-163, 2011.

HYACIENTH, D. C.; ALMEIDA, S. S. M. S. Estudo fitoquímico, toxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antibacteriana de *Pseudoxandra cuspidata* Maas. **Biota Amazônia**, [S.l.], v. 5, n. 4, p. 4-7, 2015.

HSEU, C. Y.; WU, C.; CHANG, H.; KUMAR, K. J. S.; LIN, M.; CHEN, C.; CHO, H.; HUANG, C.; LEE, H.; HSIEH, W.; CHUNG, J.; WANG, H.; YANG, H. Inhibitory effects of *Physalis angulata* on tumor metastasis and angioneses. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 135, n. 3, p. 762-771, 2011.

- HUANG, W. Y.; CAL, Y.; ZHANG, Y. Natural phenolics compounds from medicinal herbs dietary plants: potential use for cancer prevention. **Nutrition and Cancer**, [S.l.], v. 62, n. 1, p. 1 – 20, 2009.
- JANUÁRIO, A. H.; RODRIGUES-FILHO, E.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N. FRANÇA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Phytotherapy Research**, São Paulo, v. 16, n. 5, p. 445-448, 2002.
- JIAMBOONSRI, P.; PITHAYANUKUL, P.; BAVOVADA, R.; CHOMNAWANG, M. T. The inhibitory potential of thai mango seed kernel extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, [S.l.], v. 16, p. 6255-6270, 2011.
- KAMONWANNASIT, S.; NANTAPONG, N.; KUMKRAI, P.; LUECHA, P.; KUPITTAYANANT, S.; CHUDAPONGSE, N. Antibacterial activity of *Aquilaria crassna* leaf extract against *Staphylococcus epidermidis* by disruption of cell wall. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [S.l.], v. 12, n. 20, p.1-7, 2013.
- KHAN, W.; BAKHT, J.; SHAFI, M. Antimicrobial potentials of different solvent extracted samples from *Physalis ixocarpa*. **Pak. J. Pharm. Sci.**, [S.l.], v. 29, n. 2, p.467-475, 2016.
- KOÇAK, E.; PAZIR, F. Effect of extraction methods on bioactive compounds of plant origin. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, [S.l.], v. 6, n. 6, p. 663-675, 2018.
- KRISHNA, M. T.; VADLURI, R.; KUMAR, E. M. *In vitro* determination of antioxidant activity of *Physalis angulata* L. **Int. J. Pharm. Bio. Sci.**, [S.l.], v. 4, n. 3, p. 541-549, 2013.
- KUSUMANINGTYASA, R. W.; LAILYA, N.; LIMANDHAA, P. Potential of ciplukan (*Physalis angulata* L.) as source of functional ingredient, **Procedia Chemistry**, Indonesia, v.14, p. 367 – 372, 2015.
- LACERDA, C. F.; VIEIRA, M. R.; CARVALHO, C. M. de.; NOBRE, J. G. A.; NEVES, A. L. R.; RODRIGUES, C. F. Análise de crescimento de milho e feijão sob diferentes condições de sombreamento. **Rev. Bras. Ciênc. Agrár.**, [S.l.], v. 5, n.1, p.18-24, 2010.
- LAMBERS, H.; CHAPIN III, F.S., PONS, T.L. **Plant Physiological Ecology**. Nova York: Springer, 1998.
- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURACALIXTO, F. Effect of drying temperatura on the stability of polyphenols and antioxidant activityof red grape pomacepeels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 45, n. 4, p. 1390-1393, 1997.
- LENCASTRE, H.; OLIVEIRA, D.; TOMAS, A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. **Curr Opin Microbiol.**, [S.l.], v. 10, n. 5, p. 428-35, 2007.
- LEVIN, D. A. The role of trichomes in plant defense. **The Quarterly Review of Biology**, [S.l.], v. 48, n. 1, 1973.
- LOPES, D. C.; FREITAS, Z. M. F.; SANTOS, E. P.; TOMASSINI, T. C. B. Atividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes de *Physalis angulata* L. **Rev. Bras.**

Farmacognosia, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 206-210, 2006.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. Plantas medicinais no Brasil/ Silvestres e exóticas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, v.1, n. 2, p.249-254, 2002.

LIU, Z., DANG, J., WANG, Q., YU, M., JIANG, L., MEI, L.TAO, Y. Optimization of polysaccharides from *Lycium ruthenicum* fruit using RSM and its anti-oxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 61, p. 127- 134, 2013.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, Londres, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MASTUTI, R.; ROSYDAH, M. In vitro environmental stresses for enhancing withanolides production in *Physalis angulata* L. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [S.l.], v. 239, n. 1, p. 1-8, 2019.

MEDINA-MEDRANO, J. R.; ALMARAZ-ALBARCA, N.; GONZÁLEZ ELIZONDO, M. S.; URIBE-SOTO, J. N.; GONZÁLEZ -VALDEZ, L. S.; HERRERA - ARRIETA, Y. Phenolic constituents and antioxidant properties of five wild species of *Physalis* (*Solanaceae*). **Botanical Studies**, México, v. 56, n. 1, p. 1-13, 2015.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, DE, MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, [S.l.], v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MINJARES-FUENTES, R.; FEMENIA, A.; GARAU, M. C.; MEZA-VELÁZQUEZ, J. A.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 106, p. 179-189, 2014.

MISICO, R. I.; NICOTRA, V. E.; OBERTI, J. C.; BARBOZA, G. E.; GIL, R. R.; BURTO, G. Withanolides and related steroids. **Prog. Chem. Org. Nat. Prod.**, [S.l.], v. 94, p. 127-229, 2011.

MORAIS. H.; MARUR, C. J.; CARAMORI, P. H.; RIBEIRO, A. M. de A.; GOMES, J.C. Características fisiológicas e de crescimento de cafeeiro sombreado com guandu e cultivado a pleno sol. **Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 10, p. 1131-1137, 2003.

MULAMBA, N. N.; MOCK, J. J. Improvement of potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L) population by breeding for plant traits. **Egyptian Journal Genetics and Cytology**, [S.l.], v. 7, p.40-51,1978.

NETO, J.J.L. **Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos de sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd (*Polygonaceae*)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Vegetal), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

NIJS, A.; CARTUYVELS, R.; MEWIS, A.; PEETERS, V.; RUMMENS, J. L.;

MAGERMAN, K. Comparison and evaluation of osiris and sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Bélgica, v. 41, n. 8, p. 3627-3630, 2003.

OGUNDAJO, A. L.; AKPOME, A. S.; TIJANI, N. A.; OGUNWANDE, I. A. Chemical constituents of the leaf essential oil of *Physalis angulata* L. **Asian Journal of Applied Sciences**, [S.l.], v. 3, n. 4, p. 652-655, 2015.

OLIVEIRA, J. A. R.; MARTINS, L. H. S.; VASCONCELOS, M. A. M.; PENA, R. S.; CARVALHO, A. V. Caracterização física, físico-química e potencial tecnológico de frutos de camapu (*Physalis angulata* l.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Paraná, v. 5, n. 2, p. 573-583, 2011.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. F. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, Dicksoniaceae. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.230-239, 2016.

OROIAN, M.; ESRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, Valência, v. 74, p. 10-36, 2015.

ORTEGA-RAMIREZ, L. A.; RODRIGUEZ-GARCIA, I.; LEYVA, J. M.; CRUZVALENZUELA, M. R.; SILVA-ESPINOZA, B. A.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; SIDDIQUI, M. W.; AYALA-ZAVALA, J. F. Potentialof medicinal plants as antimicrobial and antioxidantagents in foodindustry: a hypothesis. **Journal of Food Science**, México, v. 79, p. 130-137, 2014.

OSHO, A.; ADENTUJI, T.; FAYEMI, S. O.; MORONKOLA, D. O. Antimicrobial activity of essential oils of *Physalis angulata* L. **Afr J Tradit Complement Altern Med.**, [S.l.], v. 7, n. 4, p. 303-306, 2010.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PALADINO, S.C.; ZURITZ, C.A. Antioxidant grape seed (*Vitis vinífera* L.) extracts: efficiency of different solvents on the extraction process. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias**, v. 43, n. 1, p. 187 – 199, 2011.

PALAFIX-CARLOS, H., AYALA-ZAVALA, J. F., GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 76, n.17, 1750-3841, 2011.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. **Clinical Microbiology Reviews**. Iowa, v. 17, n. 2, p. 268-280, 2004.

PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; JANUÁRIO, A. H.; FRANÇA, S. C. In

vitro antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, [S.l.], v. 7, n. 4, p. 335-338, 2000.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, [S.l.], v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000.

QUIGNARD *et al.* Screening of plants found in amazonas state for lethality towards *brine shrimp*. **Acta Amazonica**, [S.l.], v. 33, n. 1, p. 93-104, 2003.

RAMÍREZ, L. B.; ARMIZU, M. L.; PÉREZ, E. S.; RODRÍGUEZ, S. V.; RADILLO, J. J. V.; REYES, B. A. B.; LÓPEZ, M. A. R. Polyphenols content and antioxidant capability of wild and under cultivation *Physalis chenopodifolia* Lam. **Revista Mexicana de Ciencias Forestales**, [S.l.], v.10, n. 51, p. 182-200, 2018.

RAMÍREZ-MORENO, E.; HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; SÁNCHEZ-MATA, M. C.; DÍEZ-MARQUÉS, C.; GOÑI, I. Intestinal bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of pulp and seeds of cactus pear. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [S.l.], v. 62, p. 839-843, 2011.

REDDY, V.; UROOJ, A.; KUMAR, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 90, p. 317–321, 2005.

REGINFO-SALGADO, E.; VARGAS-ARANA, G. *Physalis angulata* L. (Bolsa Mullaca): A review of its traditional uses, chemistry and pharmacology. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, [S.l.], v. 12, n. 5, p. 431 – 445, 2013.

RIBEIRO, I. M.; SILVA, M. T. G.; SOARES, R. D. A.; STUTZ, C. M.; BOZZA, M.; TOMASSINI, T. C. B. *Physalis angulata* L. antineoplastic activity, *in vitro*, evaluation fromit's stems and fruit capsules. **Rev. Bras. Farmacogn.** Maringá, v. 12, n. 1, p. 2123, 2002.

RIBEIRO, L. P. **Bioprospecção de extratos vegetais e sua interação com protetores de grãos no controle de *Sitophilus zeamais* Mots.** (Coleoptera: Curculionidae). Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Centro de Ciências, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

RODRIGUES, T. S.; GUIMARÃES, S. F.; RODRIGUES-DAS-DÔRES, R. G.; GABRIEL, J. V. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldoda-terra) e *P. ornatos* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, [S.l.], v. 13, p. 587-590, 2011.

RODRIGUEZ-ROJO, S.; VISENTIN, A; MAESTRI, D.; COCERO, M. J. Assisted extraction of rosemary antioxidants with Green solvents. **Journal of Food Engineering**, Córdoba, v. 109, p. 98-103, 2012.

RUFINO, M. S. M. *et al.*, Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Embrapa Agroindústria Tropical**, n. 128, p. 1-4, 2007.

SANTHOSHKUMAR, J.; KUMAR, S. V.; RAJESHKUMAR, S. Synthesis of zinc oxide nanoparticles using plant leaf extract against urinary tract infection pathogen. **Resource-Efficient Technologies**, [S.l.], p.1-7, 2017.

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GONI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 101, p. 492-501, 2007.

SENGUL, H.; SUREK, E.; NILUFER-ERDIL, D. Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. **Food Research International**, [S.l.], v. 62, p. 1069-1079, 2014.

SEYFRIED, M. **Triagem da atividade antitumoral de extratos vegetais utilizando ensaios de toxicidade in vivo sobre *Artemia salina* e in vitro sobre células da linhagem hela.** Monografia do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2010.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Food Sci. Nutr.**, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHU, Z.; XING, N.; WANG, Q.; LI, X.; XU, B.; LI, Z.; KUANG, H. Antibacterial and anti-inflammatory activities of *Physalis Alkekengi* var. *franchetii* and its main constituents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S.l.], v. 1, p. 1-10, 2016.

SCHULZ, M.; BILUCA, F. C.; GONZAGA, L. V.; BORGES, G. DA S. C.; VITALI, L.; MICKE, G. A.; GOIS, J. S. DE; ALMEIDA, T. S. DE; BORGES, D. L. G.; MILLER, P. R. M.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant potential of juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius) subjected to in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 228, p. 447-454, 2017.

SOARES, M. B.; BELLITANI, M. C.; RIBEIRO I. V.; TOMASSINI, T. C. B.; SANTOS, R. R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* Lin. **Eur. J. Pharmacol.**, [S.l.], v. 459, n. 1, p. 107-112, 2003.

SILVA, C.; GARCIA, V.A.S.; FRANCISCATO, L.M.S.S. Extração assistida por ultrassom de compostos bioativos das cascas de lichia (*Litchi Chinensis* Sonn.). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, [S.l.], v. 37, n. 3, p. 81-96, 2016.

SILVA, K. N.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandraphysalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Rev. Bras. Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 344-351, 2005.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, J. J. M.; ROGÉZ, H. Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo bruto de açai (*Euterpe oleracea*) na presença de compostos fenólicos puros ou de extratos vegetais amazônicos. **Quím. Nova**, Belém, v. 36, n. 3, p. 400-406, 2013.

SIMONETTI, E. *et al.*, Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, [S.l.], v. 18, n.1, pp. 9-18, 2016.

SRINIVASAN, D.; NATHAN, S.; SURESH, T.; PERUMALSAMY, P. L. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 74, n. 3, p. 217-220, 2001.

SCHNEIDER, A. L. S. *et al.*, Caracterização química e atividade biológica de extratos aquosos de *Brunfelsia cuneifolia* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n.4, p.1103-1111, 2015.

SUN, C.; QIU, C.; ZHAO, F.; KANG, N.; CHEN, L.; QIU, F. Physalins V-IX, 16,24-cyclo-13, 14-seco withanolides from *Physalis angulata* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities. **Scientific Reports**, [S.l.], v.7, n. 4057, p. 1-10, 2017.

SUSANTI, R.F. *et al.*, Phenol, flavanoid and antioxidant activity of *Physalis angulata* leaves extract by subcritical water extraction. **Modern Applied Science**, [S.l.], v. 9, n. 7, p. 190-198, 2015.

TAO, Y.; WU, D.; ZHANG, Q. A.; SUN, D. W. Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S.l.], v. 21, n. 2, p. 706-715, 2014.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, Greensboro, v. 21, n. 9, p. 119-1218, 2010.

TOMASSINI, T. C. B.; BARBI, N. S.; RIBEIRO, I. M.; XAVIER, D. C. D. Gênero *Physalis* – Uma revisão sobre vitaesteróides. **Química nova**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 47-57, 2000.

THOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNKYK, L.; MASON, T.J. Investigation of the Effects of Ultrasound on Vegetal Tissues During Solvent Extraction, **Ultrasonics Sonochemistry**, [S.l.], v. 8, p. 137-142, 2001.

TIWARI, P.; KUMAR, B.; KAUR, M.; KAUR, G.; KAUR, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **International e Pharmaceutica Scientia**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 98-106, 2011.

TUOHY, K. M.; CONTERNO, L.; GASPEROTTI, M.; Viola, R.. Up-regulating the Human Intestinal Microbiome Using Whole Plant Foods, Polyphenols, and/or Fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 60, p. 8776-8782, 2012.

UGART, S.D.M. **Atividade antimicrobiana da cobertura comestível de quitosana adicionada com trans-cinalmadeído sobre *Escherichia coli* e *Listeria innocua* em melão *Cantaloupe* minimamente processado**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Centro de Ciências Agrárias, Universidade federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

UKWUBILE, C. A.; OISE, I. E. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Physalis angulata* linn. (solanaceae) leaf methanolic extract in swiss albino mice. **International Biological and Biomedical Journal**, [S.l.], v. 2, n. 4, p. 167-170, 2016.

VASCONCELOS, E. A. F.; BARBOSA, R. M.; MEDEIROS, M. G. F.; MOURA, T. F. A. Influence of extractive process, solvent and particle size of plant material on the total solids

content of *Schinus terebinthifolius* raddi extractive solutions. **Revista Fitos.**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 74-79, 2005.

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

WU, S. J.; CHANG, S. P.; LIN, D. L.; WANG, S. S.; HOU, F. F.; NG, L. T. Supercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. **Food Chem Toxicol.**, Taiwan, v. 47, n. 6, p.1132–1138, 2009.

UKWUBILE, C. A.; OISE, I. E. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Physalis angulata* Linn. (Solanaceae) leaf methanolic extract in swiss albino mice. **International Biological & Biomedical Journal**, [S.l.], v. 2, n. 4, p. 167 – 170, 2016.

WARNER, K.; NEEF, W. E.; ELLER, F. J. Enhancing quality and oxidative stability of aged fried food with g-tocopherol. **Journal Agriculture Food Chemistry**, [S.l.], v. 51, n. 3, p. 623, 2003.

YI, S.M.; ZHU, J.L.; FU, L.L.; LI, J.R. Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane. **Int. J. Food Microbiol.**, [S.l.], v. 144, p. 111-117, 2010.

XYNOS, N.; PAPAEFSTATHIOU, G.; PSYCHIS, M.; ARGYOPOULOU, A.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A. L. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **The Journal of Supercritical Fluids**, Greece, v. 67, p. 89-93, 2012.

ZHANG, W. N.; TONG, W.Y. Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Physalis*. **Chem. Biodivers.**, [S.l.], v. 13, n.1, p. 48-65, 2016.

ZHANG, H.; WU, J.; GUO, X. Effects of antimicrobial and antioxidante activities of spice extracts on raw chicken meat quality. **Food Science Human Wellness**, [S.l.], v. 5, p. 39 -48, 2016.