

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

ALINE WASEM ZANOTTO

EMPREGO DE COMPOSTOS AMÍDICOS PARA O CONTROLE DE
***Penicillium expansum* EM MAÇÃ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

FRANCISCO BELTRÃO

2016

ALINE WASEM ZANOTTO

EMPREGO DE COMPOSTOS AMÍDICOS PARA O CONTROLE DE
***Penicillium expansum* EM MAÇÃ**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Curso de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alessandra Machado-Lunkes

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Elisabete Hiromi Hashimoto

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Romio

FRANCISCO BELTRÃO

2016

EMPREGO DE COMPOSTOS AMÍDICOS PARA O CONTROLE DE
***Penicillium expansum* EM MAÇÃ**

Aline Wasem Zanotto

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, no Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Banca Avaliadora

Prof.^a Dr.^a Alessandra Machado-Lunkes
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR
(Orientador)

Prof.^a Dr.^a Elisabete Hiromi Hashimoto
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR
(Co-orientadora)

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Romio
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR
(Co-orientadora)

Prof. Dr. Eder da Costa dos Santos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Prof.^a Dr.^a Andréa Cátia Leal Badaró
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR
(Coordenadora de Curso)

O termo de aprovação assinado encontra-se na coordenação do curso

Francisco Beltrão, Junho de 2016

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Alessandra Machado Lunkes, pela orientação;

À Prof.^a Dr.^a Elisabete Hiromi Hashimoto e Prof.^a Dr.^a Ana Paula Romio, por co-orientar este trabalho;

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade, auxílio nas correções e críticas;

Aos técnicos do laboratório, em especial Sinara Queli Welter Nardi e João Paulo Fernando Mileski.

Aos meus amigos e colegas de laboratório pelo apoio e ajuda: Paola Maria Heidmann, Vanessa Patel, Naara Aparecida Almeida, Felipe Guilherme Brunetto Bretschneider, Ederson Griebler e Janice Ruschel;

Em especial ao Michel Yudi Shinkai Kanemaru pelo apoio, amizade, compreensão, carinho e ajuda;

A toda minha família e amigos;

E a todos que participaram de maneira indireta ou direta e aqui não foram citados, o meu Muito Obrigado.

“Qualquer caminho que você decida tomar existe sempre alguém para te dizer que você está errado. Existem sempre dificuldades surgindo que tentam a acreditar que as críticas estão corretas. Mapear um caminho de ação e segui-lo até o fim requer coragem”.

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

ZANOTTO, Aline. **Emprego de compostos amídicos para o controle de *Penicillium expansum* em maçã**. 2016. 72 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2016.

A produção de frutas no Brasil tem crescido, entretanto a fruticultura brasileira sofre perdas principalmente a deterioração na pós-colheita de fruta. A deterioração associada à contaminação fúngica, pode ocorrer durante o transporte e armazenamento, reduzindo sua qualidade. *Colletotrichum gloeosporioides* e *Penicillium expansum* são os principais representantes fúngicos responsáveis por causarem perdas em mamão e maçã, respectivamente. Assim, o uso de antifúngicos e estes seguros para saúde humana e ambientalmente corretos é de grande importância. De fato, compostos sintéticos molecularmente idênticos ou análogos a compostos naturais são uma alternativa para a substituição dos fungicidas. Neste contexto, o trabalho teve por objetivo usar o peptídeos antimicrobianos sintéticos, Astacidina-2 e c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm, e análogos do produto natural conhecido como capsaicina para inibição do crescimento dos fungos *C. gloeosporioides* e *P. expansum*. Especificamente, os análogos da capsaicina usados neste trabalho foram a N-benzilbutanamida, N-(3-metoxibenzil)butanamida, N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)hexanamida, N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)tetradecanamida. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em meio líquido usando natamicina como controle positivo de inibição de crescimento. Entre todos os compostos avaliados, o peptídeo c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm apresentou a menor CIM contra *C. gloeosporioides* e *P. expansum* (19,25 µM e 2,40 µM, respectivamente). Para *C. gloeosporioides* a capsaicina e seus análogos apresentaram CIM de 800 µM. A capsaicina inibiu o crescimento de *P. expansum* na concentração de 400 µM e foi observada perda de atividade com os análogos N-(3-metoxibenzil)butanamida e N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)hexanamida (ambos com CIM = 600 µM). A N-benzilbutanamida e N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)tetradecanamida foram duas vezes menos ativas que a capsaicina na inibição do crescimento de *P. expansum*. A análise *in vivo* foi realizada apenas em maçã com os compostos c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm, N-(3-metoxibenzil)butanamida e N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)hexanamida. Os compostos não apresentaram efeito fungicida nas concentrações testadas para *P. expansum*.

Palavras-chave: Antimicrobiano natural. Análogos da capsaicina. Peptídeo antimicrobiano. Antifúngico. Mofo azul.

ABSTRACT

ZANOTTO, Aline. **Use of amide compounds for control of *Penicillium expansum* on apple.** 2016. 72 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Federal University of Technology-Parana. Francisco Beltrão.

Brazilian fruit production is growing, but the production suffers losses, mainly the deterioration in the postharvest. The deterioration associated with fungal contamination can occur during transport and storage, reducing fruits quality. *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium expansum* are two main fungal diseases in papaya and apple production, respectively. The use of antifungal need to be safe for human health and environmentally friendly have great importance. Synthetic compounds molecularly identical or analogous to natural compounds could be an alternative to the replacement of fungicides. In this context, the study aimed to use synthetic antimicrobial peptides, Astacidina-2 and c(1-18)[Gln¹, Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm, and analogues of the natural product capsaicin to inhibiting the growth of fungi *C. gloeosporioides* and *P. expansum*. Specifically, capsaicin analogues used in this study were N-benzilbutanamide, N-(3-methoxybenzyl) butanamide, N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)hexanamide, N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl) tetradecanamide. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined in a liquid medium using natamycin as a growth inhibition control. Among all evaluated compounds, the peptide c(1-18)[Gln¹, Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm presented the lowest MIC against *C. gloeosporioides* and *P. expansum* (19.25 µM and 2.40 µM respectively). For *C. gloeosporioides* capsaicin and all analogues showed MIC of 800 µM. The capsaicin inhibited the growth of *P. expansum* at a concentration of 400 µM and loss of activity was observed with the analogous N-(3-methoxybenzyl)butanamide and N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)hexanamide (both MIC = 600 µM). N-benzilbutanamide and N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)tetradecanamide were two times less active than capsaicin. In vivo analysis was performed only on apple with the compounds c(1-18)[Gln¹, Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm, N-(3-methoxybenzyl)butanamide and N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)hexanamide. The compounds do not have fungicidal effect at the concentrations tested for *P. expansum*.

Keywords: Natural antimicrobial. Analogues of capsaicin. Antimicrobial peptide. Antifungal. Blue mold.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dados estatísticos da produção de mamão e maçã.	19
Figura 2 - (a) Deterioração característica causada por <i>Penicillium expansum</i> ; (b) internalização do fungo; (c) podridão característica do tecido da fruta.	20
Figura 3 - Variedades de maçãs: (a) Red Delicious, (b) Golden Supreme, (c) Empire, (d) McIntosh, (e) Fuji e (f) Gala.	23
Figura 4 - Característica estrutural da capsaicina que determina sua pungência. ...	31
Figura 5 – Sequência de aminoácidos da Astacidina – 2.	32
Figura 6 – Sequência de aminoácidos da Gomesina.	33
Figura 7 - Sequência de aminoácidos do análogo da Gomesina c(1-18)[Gln ¹ ,Thr ^{2,6,11,15} ,D-Pro ⁹]-Gm.	34
Figura 8 – Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Astacidina-2 (linha preta). Condições experimentais da CLAE-FR: Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm Scan de massas (linha azul). Condições experimentais do ESI-MS: módulo positivo, capilar 3kV, cone 37 kV.....	44
Figura 9 - Espectro de massas dos compostos eluídos em 11,6 minutos. Condições experimentais do ESI-MS: módulo positivo, capilar 3kV, cone 37 kV.	45
Figura 10 - Espectro de massas dos compostos eluídos em 12,3 minutos. Condições experimentais do ESI-MS: módulo positivo, capilar 3kV, cone 37 kV.	45
Figura 11 - Espectro de massas dos compostos eluídos em 13,7 minutos. Condições experimentais do ESI-MS: módulo positivo, capilar 3kV, cone 37 kV.	45
Figura 12 – Espectros de massas da N-Benzilbutanamida (A), N-(3-metoxibenzil)butanamida (B), N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida (C), N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)hexanamida (D) e N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)tetradecanamida (E). Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES+.	50
Figura 13 – Ensaio de crescimento fúngico entre os compostos selecionados com <i>Penicillium expansum</i> , compostos selecionados para a <i>in vivo</i> . A: CAP-3 [800 μ M]; [B: c(1-18)[Gln ¹ ,Thr ^{2,6,11,15} ,D-Pro ⁹]-Gm [4,80 μ M]; C: CAP-4 [800 μ M]; D: CAP SP-Pharma [800 μ M]. Após 7 dias de crescimento.....	54
Figura 14 - Tratamento <i>in vivo</i> com água em maçã fuji.....	55

Figura 15 - Tratamento <i>in vivo</i> com a c(1-18)[Gln ¹ ,Thr ^{2,6,11,15} ,D-Pro ⁹]-Gm em maçã fuji.	58
Figura 16 - Tratamento <i>in vivo</i> com a CAP SP-Pharma em maçã fuji.	58
Figura 17 - Tratamento <i>in vivo</i> com N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida a em maçã fuji.	58
Figura 18 - Tratamento <i>in vivo</i> com N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)hexanamida a em maçã fuji.	59
Figura 19 - Tratamento <i>in vivo</i> com Natamicina em maçã fuji.	59
Figura 20 - Tratamento <i>in vivo</i> com DMSO em maçã fuji.	59
Figura 21 - Tratamento <i>in vivo</i> com água+microrganismo em maçã fuji.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química dos principais capsaicinóides encontrados nas pimentas vermelhas.	30
Tabela 2 - Estruturas moleculares dos análogos da capsaicina estudados.	47
Tabela 3 - Caracterização química e determinação da pureza dos análogos da capsaicina.	48
Tabela 4 - Massa molar dos análogos na análise por espectrometria de massas. ..	51
Tabela 5 - Concentração inibitória mínima para os peptídeos.	52
Tabela 6 - Concentração inibitória mínima para os análogos da capsaicina	53
Tabela 7 - Eficácia de controle dos tratamentos em maçãs.	55
Tabela 8 – Estimativa da podridão apresentada nos frutos de maçã.	56

LISTA DE ABREVIações

ACN	Acetonitrila
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
BOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)fosfônio
CAP	Capsaicina
CBMAI	Coleção brasileira de microrganismos de ambiente e indústria
CCT	Centro de culturas tropicais
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
Cys	Cisteína
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase inversa
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	N,N'-dimetilformamida
ESI-MS	Espectrometria de massas de ionização por electrospray
Fmoc	9-fluorenilmetil
Gln	Glutamina
Gm	Gomesina
HOBt	N-hidroxi-benzotriazol
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MeOH	Metanol
MØs	Microrganismos
MPL	Caldo meio para levedura
NMP	N-metilpirrolidona
Ø	Desvio padrão

p-Glu	Piroglutâmico
Pro	Prolina
SPFS	Síntese de peptídeos em fase sólida
TEA	Trietilamina
TBTU	Tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
TFA	Ácido trifluoroacético
Thr	Treonina
T _R	Tempo de retenção
Tyr	Tirosina
Val	Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 PRODUÇÃO DE FRUTAS	18
3.2 PERDAS NA PÓS-COLHEITA	19
3.3 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DAS FRUTAS	22
3.3.1 Maçã	22
3.3.2 Mamão	25
3.4 FUNGOS DETERIORANTES	26
3.5 COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS	28
3.6 COMPOSTOS AMÍDICOS	29
3.6.1 Capsaicina	29
3.6.2 Astacidina-2	32
3.6.3 Gomesina	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAL DE ESTUDO	35
4.1.1 Resina	35
4.1.2 Agentes Ativadores	35
4.1.3 Reagentes e Solventes Químicos	36
4.1.4 Bolores Teste	36
4.1.5 Meios de Cultura	37
4.1.5.1 Ágar extrato de malte (MEA)	37
4.1.5.2 Ágar batata dextrose (BDA)	37
4.1.5.3 Caldo meio para levedura (MPL)	37
4.1.5.4 Caldo sabouraud (SDB)	37
4.2 MÉTODOS PREPARATIVOS	38
4.2.1 Procedimento Geral da Síntese em Fase Sólida da Astacidina-2	38
4.2.2 Métodos Analíticos	39
4.2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)	39
4.2.2.2 Espectrometria de massas	39
4.2.2.3 Análises de aminoácidos	40
4.3 MÉTODOS BIOLÓGICOS	40
4.3.1 Análise <i>In Vitro</i>	40
4.3.1.1 Preparo dos compostos amídicos e antifúngico padrão para o ensaio antifúngico	40
4.3.1.2 Preparação do inóculo	41
4.3.1.3 Atividade antifúngica pelo método de microdiluição	41
4.3.1.4 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	42
4.3.1.5 Análise antifúngica <i>in vivo</i>	42
4.3.1.6 Leitura e interpretação dos resultados	42
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43

5 RESULTADO E DISCUSSÃO	44
5.1 SÍNTESE DA ASTACIDINA-2	44
5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ANÁLOGOS DA CAPSAICINA.....	46
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	51
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e exportador de frutas (IBRAF, 2013; MAPA, 2007; SEAB, 2015). É o segundo maior exportador de mamão, perdendo apenas para o México (IBRAF, 2013; FAO, 2015; WEISS; SANTOS, 2014) e, em relação à maçã o Brasil não oferece competição ao maior exportador desta fruta os Estados Unidos (MAPA, 2007).

A produção de frutas é de grande importância econômica para as exportações, sendo imprescindível que as frutas possuam qualidades físicas, químicas e microbiológicas para serem comercializadas e exportadas (CHITARRA, 2005; DANTAS et al, 2003). Estima-se que 80% das perdas da fruticultura ocorram na pós-colheita (FAO, 2011; SEAB, 2015). Um dos principais responsáveis por essas perdas são os fungos, capazes de contaminar no campo, transporte e armazenamento (OSÓRIO; OLIVEIRA; PIERO, 2013; WELK et al., 2009). Eles são de difícil controle devido a sua natureza cosmopolita, ou seja, estão presentes em todos os ambientes (SANDERS; KORSTEN, 2003). Diversos são os gêneros fúngicos capazes de atacar as frutas, e especificamente para mamão e maçã as espécies de destaque são *Colletotrichum gloeosporioides* e *Penicillium expansum*, as principais causadoras de danos na produção dessas frutas (BAÑOS et al., 2013).

O fungo *C. gloeosporioides* é um dos principais fitopatógenos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, é o agente causador de podridão de pedúnculo, varicela e antracnose em manga, abacate e mamão (SILVA et al., 2006). Na produção de maçã o *P. expansum* também conhecido como mofo azul é o principal responsável por causar perdas na pós-colheitas, além dos danos microbiológicos produz uma toxina conhecida como patulina (BLUM et al., 2004; CELLI et al., 2009; NETO et al., 2016).

Para combater as contaminações fúngicas e reduzir os prejuízos pré- e pós-colheita são utilizados diversos fungicidas (BAMPI et al., 2013; CABALLERO; FINGLAS; TOLDRÁ, 2016; DUARTE; JULIATTI; FREITAS, 2009). Devido ao uso desenfreado desses compostos, existe um crescente aumento na resistência fúngica, e a seleção de fitopatógenos que são resistentes aos fungicidas convencionais (DENNING; PERLIN, 2011). Neste contexto, torna-se de grande

importância o estudo de métodos e compostos alternativos para controle desses fungos (FIEIRA et al., 2013; GOMES et al., 2005; VENTUROSOSO et al., 2011).

Os compostos amídicos apresentam uma ampla gama de atividades biológica, além disso, é a função química comum em diversos compostos farmacêuticos (HÖGESTÄTT et al., 2005; MALACCO et al., 2004; MCCARTY; PLOSKER; LYSENG-WILLIAMSON, 2007). A astacidina-2 é um peptídeo altamente catiônico, e sua sequência de aminoácidos é rica em prolina e arginina. Sua atividade antifúngica não foi determinada, mas sabe-se que peptídeos ricos em prolina apresentam ação inibitória contra fungos filamentosos e leveduras (CABRAS et al., 2008; RAHNAMAEIAN et al., 2009). A Gomesina (Gm) foi outro peptídeo antimicrobiano que expressou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bolores e leveduras sendo isolada do hemócito da *Acanthoscurria gomesina* (SILVA; DAFFRE; BULET, 2000). Em função do seu efeito tóxico as células sanguíneas, estudos foram desenvolvidos na síntese de análogos que fossem igual ou mais ativos que a Gm, entretanto sem expressão da atividade hemolítica (FAZIO et al., 2006). Assim, o análogo c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm apresentou atividade contra *Escherichia coli*, *Estafilococos aureus* e *Candida albicans* e baixa hemólise (MACHADO et al., 2012). A capsaicina é a principal responsável pelo sabor picante dos frutos das plantas *Capsicum*, e dentre as diferentes atividades biológicas tem ação antimicrobiana contra *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Colletotrichum capsici* (FIEIRA et al., 2013; KRAIKRUAN; SANGCHOTE; SUKPRAKARN, 2008). Com o objetivo de aplicar esta molécula como aditivo alimentar ou medicamento vários grupos pesquisam análogos que não possuam pungência, irritação da pele e mucosas (CASTILLO et al., 2006; IIDA et al., 2003; LEOBET et al., 2012).

Devido à demanda dos consumidores por frutos isentos de fungicidas, livre de defeitos e seguros pode-se usar compostos naturais, ou produtos sintéticos que em sua composição apresentam substâncias capazes de inibir ou retardar o crescimento desses microrganismos. Eles representam uma alternativa para o controle desses patógenos (ADEME; AYALEW; WOLDETSADIK, 2013; LORENZETTI et al., 2011; MACHADO et al., 2012). Assim, a busca por novos antifúngicos pode contribuir com a redução das perdas na pós-colheita de frutas, bem como reduzir o impacto ambiental causado pelo uso de agroquímicos para o controle dos fungos deteriorantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antifúngico de compostos amídicos para o controle de proliferação de fungos filamentosos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar quimicamente (cromatografia líquida de alta eficiência, análise de aminoácidos e espectrometria de massas) o peptídeo antimicrobiano Astacidina-2;
- Caracterizar quimicamente (cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas) os análogos da capsaicina [(N-benzilbutanamida, N-(3-metoxibenzil)butanamida, N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida, N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)hexanamida, N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)tetradecanamida)];
- Avaliar a atividade antifúngica dos peptídeos antimicrobianos sintéticos {(Astacidina-2 e c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm)} e análogos da capsaicina *in vitro* contra os bolores *Colletotrichum gloeosporioides* e *Penicillium expansum*;
- Realizar análise antifúngica *in vivo* na maçã dos compostos que apresentaram resultado positivo na análise *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO DE FRUTAS

A produção de frutas vem crescendo nos últimos anos, sendo que os três maiores produtores de fruta são China, Índia e Brasil. A China é o maior produtor seguida pela Índia e Brasil, juntos representam aproximadamente 44,2 % da produção mundial de frutas (IBRAF, 2013; MAPA, 2007; SEAB, 2015).

No ano de 2013, o Brasil produziu aproximadamente 40 milhões de toneladas de frutas (SEAB, 2015). Dentre as principais frutas produzidas, o mamão e maçã são as mais procuradas pelo consumidor por estarem disponíveis no mercado o ano todo (IBRAF, 2013; SILVEIRA et al., 2011). A disponibilidade do mamão deve-se ao clima temperado do Brasil durante um longo período do ano, a qual contribui significativamente para produção desta fruta. Já a maçã essa disponibilidade está associada ao emprego do frio para a sua conservação, de modo que a mesma pode permanecer até 12 meses armazenados (ARGENTA; BRACKMANN, 1996), assim ambas as produções suprem as necessidades do mercado interno (FAO, 2015; IBRAF, 2013; MAPA, 2007).

O potencial produtivo do Brasil e seu bom desempenho nas exportações de frutos ficaram evidentes no ano de 2013 com 711, 869 mil toneladas de frutas exportadas, onde os principais destinos foram Holanda: 274, 203 mil toneladas de frutas em 2013, Reino Unido: 126, 866 mil toneladas e Espanha: 92, 554 mil toneladas (IBRAF, 2013; FAO, 2015; WEISS; SANTOS, 2014). No panorama mundial o Brasil encontra-se na segunda posição entre os maiores exportadores de mamão, ficando atrás somente do México. Com relação à maçã o Brasil não pode competir com os maiores exportadores desta fruta, onde os Estados Unidos destaca-se como o maior exportador, seguido da França, Itália, Chile e Nova Zelândia (MAPA, 2007).

Em 2013 o Brasil produziu 1.582.638 toneladas de mamão e 1.231.472 toneladas de maçã (FAO, 2015). A figura 1. a seguir apresenta a produção de mamão e maçã, onde é possível observar um aumento na produção ao longo dos anos de 1993 até 2013.

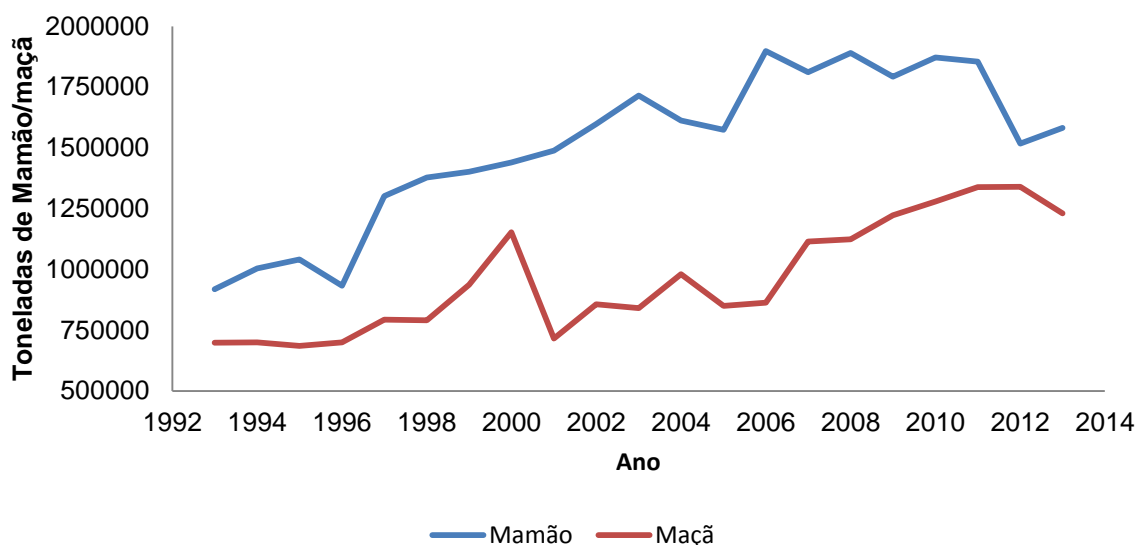


Figura 1 - Dados estatísticos da produção de mamão e maçã.
Fonte: Adaptado de FAO (2015).

Desde a década de 70, o Paraná tem focado seus esforços na produção de grãos, cereais e carnes, entretanto, o cultivo de frutíferas está presente em todo o estado, no ano de 2013 movimentou 1,13 bilhões de reais com a produção de 35 tipos de frutas (SEAB, 2015).

3.2 PERDAS NA PÓS-COLHEITA

De acordo com a FAO (2011) cerca de 33,33% dos alimentos destinados ao consumo humano são desperdiçados, mundialmente esse valor representa 1,3 bilhões de toneladas por ano. Os alimentos são perdidos durante toda a cadeia produtiva, desde o campo até o consumidor final. Dentre os alimentos jogados fora o maior número está entre as frutas e hortaliças (FAO, 2011; WEISS; SANTOS, 2014).

Aproximadamente 80% das perdas da fruticultura ocorre na pós-colheita (DANTAS et al, 2003; FAO, 2011; SEAB, 2015). Além dos danos mecânicos que os produtos sofrem durante o transporte e armazenamento, essas perdas também estão associadas a fatores fisiológicos do próprio fruto e a doenças ocasionadas por contaminações fúngicas (CHITARRA, 2005; DANTAS et al, 2003). Ao contrário dos produtos de origem animal as frutas continuam vivas após a colheita, realizando

todas as suas funções biológicas, nesta fase a respiração é o principal evento fisiológico ocorrente. Em função disso e a alta quantidade de água na sua composição química as torna mais perecíveis (CHITARRA, 2005).

A deterioração fúngica destaca-se como um dos principais problemas que afetam a qualidade das frutas. As doenças podem afetar os frutos na pré-colheita e manifestarem-se na pós-colheita onde apresentam condições ambientais favoráveis (BLUM et al., 2004; DANTAS et al., 2003). A contaminação pode ser classificada em dois grupos: inoculação primária e inoculação secundária. Na inoculação primária ocorre à infecção com esporos de fungos antes do armazenamento (com o fruto ainda no campo), a inoculação secundária acontece no transporte e armazenamento, onde os esporos são dispersos de um fruto contaminado para outro não contaminado (DUTOT; NELSON; TYSON, 2013). Essa contaminação se dá pelo manejo, ar e água, após a contaminação inicial os esporos necessitam de uma abertura no tecido para dar início à infecção (DUTOT; NELSON; TYSON, 2013). A figura 2. apresenta os efeitos da contaminação fúngica em maçã.

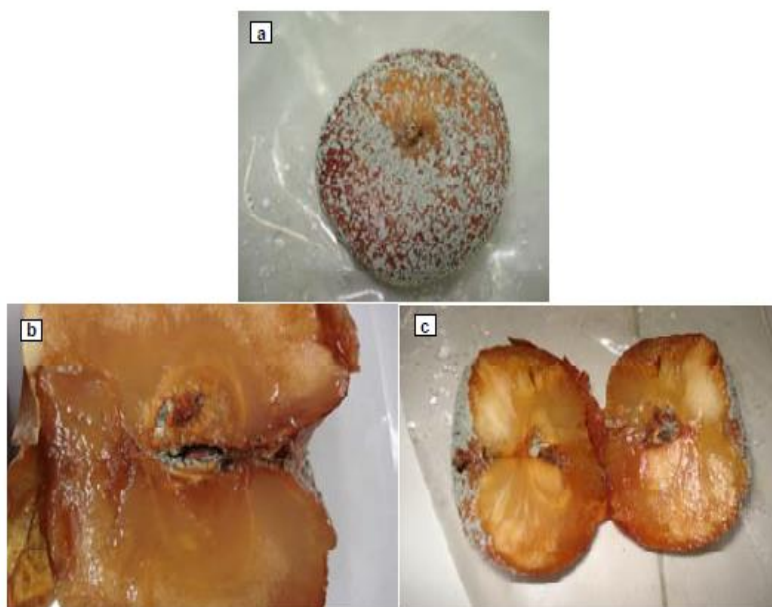


Figura 2 - (a) Deterioração característica causada por *Penicillium expansum*; (b) internalização do fungo; (c) podridão característica do tecido da fruta.
Fonte: SALOMÃO (2009, p. 34).

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza, como consequência os alimentos são susceptíveis a contaminações que podem ser causadas por uma ampla variedade de espécies fungicas (SILVA, 2008). Essas contaminações acarretam a alterações químicas e bioquímicas prejudiciais para qualidade dos alimentos, resultando em alterações de cor, sabor, odor e textura como consequência da atividade metabólica dos micro-organismos (CHITARRA, 2005; SILVA, 2008).

As linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* destacam-se na doença pós-colheita de frutíferas (BAÑOS et al., 2013; BLUM et al., 2004; OSÓRIO; OLIVEIRA; PIERO, 2013). O *C. gloeosporioides* é amplamente encontrado nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, é um fitopatógeno causador de podridão de pedúnculo, varicela e antracnose em manga, abacate e mamão (SILVA et al., 2006). *P. expansum* também conhecido como mofo azul é o principal responsável por causar perdas pós-colheitas de maçãs, e adicionalmente pode produzir patulina uma toxina termo-resistente prejudicial a saúde humana (BLUM et al., 2004; CELLI et al., 2009; NETO et al., 2016).

Considerando os danos causados por fungos na produção de frutas, é comum o uso de agroquímicos utilizados no controle de *C. gloeosporioides* e *P. expansum* (COTA et al., 2009; JENSEN et al., 2013; NETO et al., 2016; PANEBIANCO et al., 2015). Mas a fim de alcançar um nível satisfatório de controle destas doenças é necessária a aplicação de grandes quantidades de fungicidas, acarretando ao acúmulo de resíduos nos frutos bem como no solo e na água (COTA et al., 2009; JENSEN et al., 2013). Em função disso, medidas de controle alternativas são necessárias a fim de evitar o uso de antifúngicos sintéticos e reduzir o acúmulo de resíduos tóxicos no alimento, solo e água (JENSEN et al., 2013).

3.3 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DAS FRUTAS

3.3.1 Maçã

A macieira (*Malus domestica* Brokh), pertence à família *Rosaceae*, originária da Europa e Ásia, pertencente aos frutos do grupo climatéricos. A fruta apresenta formato redondo-cônico, com polpa de coloração amarelo claro e extremidade avermelhada (TESSMER, 2009).

A macieira é uma árvore frutífera que possui 7.500 variedades diferentes (SALOMÃO, 2009). No Brasil, quase toda a produção se concentra em duas cultivares, a Gala e a Fuji colhidas no mês de fevereiro e março, respectivamente (RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005; SALOMÃO, 2009).

A fim de prolongar o armazenamento, existe a necessidade de definir o ponto ideal de colheita. Para isto, são realizadas avaliações químicas e físicas, tais como, amido, sólidos solúveis totais, acidez total, firmeza de polpa e cor de fundo da epiderme (MAPA, 2002; VASQUES et al., 2006). Mais de um parâmetro deve ser usado já que as variações nas medidas são grandes e as plantas devem estar nas mesmas condições de idade, porta-enxerto, umidade, fertilidade do solo e época de quebra de dormência (MAPA, 2002; VASQUES et al., 2006).

O índice de degradação de amido indica a quantidade de açúcar na fruta, o qual é determinado através de uma escala que varia de 0 a 6 de acordo com Brookfield et al., (1997). O teor de açúcares na polpa é responsável pela qualidade organoléptica da fruta, conforme ocorre avanço da maturação aumenta o teor de açúcares simples, pela transformação do amido (COSTA et al., 2004; PAGANINI, et al., 2004). O conteúdo de açúcar é importante para dar sabor agradável à fruta, no entanto não é um fator decisivo para a colheita (MAPA, 2002). Com a maturidade a acidez diminui e assim, determinar a acidez é importante para avaliar o *flavor* da fruta, isso porque o baixo teor de ácido pode deixar o produto insípido (PAGANINI, et al., 2004).

A firmeza de polpa avalia a mudança na estrutura celular dos frutos já que a parede celular dos tecidos torna-se mais mole com o aumento do tamanho e amadurecimento da fruta (MAPA, 2002; ROCHA et al., 2001). A modificação da cor

da epiderme é o principal ponto de colheita observado. No entanto, as frutas que apresentam uma coloração da epiderme avançada não são ideais para o armazenamento por longos períodos, pois estão muito maduras. A evolução da pigmentação verde para amarela ocorre devido a degradação das clorofilas presentes nos cloroplastos formando os carotenoides (cor amarela). A coloração vermelha/alaranjada está presente em frutos quase maduros e essa pigmentação é decorrente das antocianinas (CHITARRA, 2005; TOEBE et al., 2011).

As maçãs podem ser classificadas como comerciais quando consumidas *in natura* ou industriais que resultam da seleção de frutas que não se adequam aos padrões comerciais (apresentam defeito de ordem física, fisiológica ou fitopatológica) e são destinadas para produção de sucos, sidra, vinagre, purê, geleias e alimentos infantis (RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005; SALOMÃO, 2009). A figura 3. apresenta algumas variedades de maçã, as quais se diferem com relação ao tamanho, cor e brilho.

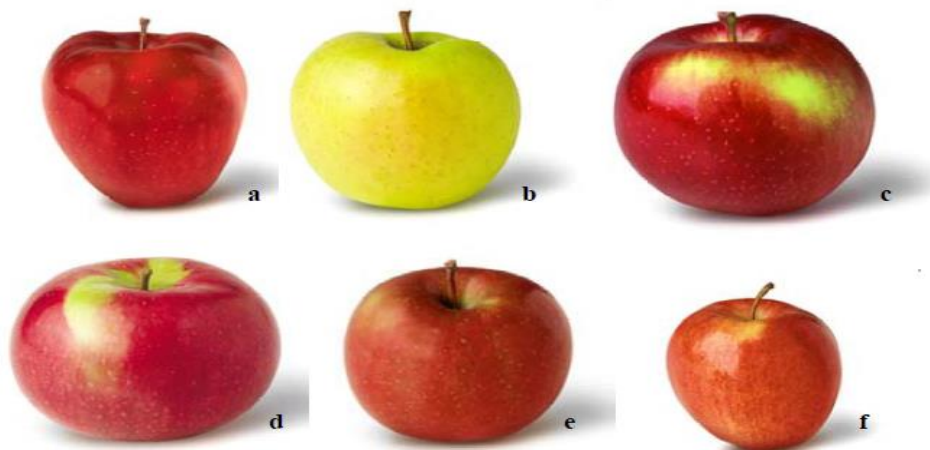


Figura 3 - Variedades de maçãs: (a) Red Delicious, (b) Golden Supreme, (c) Empire, (d) McIntosh, (e) Fuji e (f) Gala.
Fonte: SALOMÃO (2009, p. 66).

Após a colheita as maçãs devem ser pré-resfriadas a fim de reduzir o processo de respiração e promover o abaixamento da temperatura, evitando consequentemente o amadurecimento no período de armazenamento (MAPA, 2002). As frutas a serem armazenadas devem ser recém-colhidas e não

apresentarem injúrias, distúrbios fisiológicos ou deterioração (GIRARDI; BENDER, 2003).

O armazenamento pode ser convencional ou em atmosfera controlada, ambas devem obedecer limites de temperatura evitando o *chilling* (injúrias pelo frio) (CHITARRA, 2005; WEBER et al., 2013). A forma de conservação mais utilizado é o armazenamento sob refrigeração. Nesse método utilizado pode variar a temperatura, umidade relativa e período de armazenamento de acordo com a cultivar (MAPA, 2002). Assim, na maioria dos casos a temperatura pode variar de -1 a 0 °C e o período de armazenamento de 4 a 7 meses dependendo da cultivar. Para a maçã Gala utiliza-se 0 °C com armazenamento de 4-5 meses, e para a Fuji de -1 a 0 °C, podendo ser conservada de 6-7 meses (GIRARDI; BENDER, 2003).

Mais de 40% da produção do país utiliza o sistema de atmosfera controlada para o armazenamento de maçãs, apresentando um aumento na conservação de 50 a 80% (MAPA, 2002). Esse método baseia-se no princípio da modificação da concentração de gases na atmosfera natural, onde a concentração de CO₂ é aumentada e o O₂ é reduzido, retardando assim o amadurecimento, pois pode eliminar o etileno produzido pelo processo de respiração (BRACKMANN et al., 2008; WEBER et al., 2013). No entanto, apresenta algumas desvantagens como, o auto custo da instalação; o baixo teor de oxigênio que causa danos nos frutos; o armazenamento por muito tempo que acarreta a diminuição da produção de aroma. Ainda, a limitação com a abertura da câmara para retirada das frutas, a dificuldade de armazenar diferentes cultivares na mesma câmara em função de diferentes exigências na composição da atmosfera (CHITARRA, 2005; CORRÊA et al., 2010).

A temperatura, concentração de O₂, CO₂ e o período de conservação em atmosfera controlada também podem variar de acordo com a cultivar (CORRÊA et al., 2010; WEBER et al., 2013). A temperatura varia de -0,5 a 1 °C, a concentração de O₂ de 0,75-1,5 kPa, a concentração de CO₂ de <0,5-4 kPa, e o período de armazenamento de 8 a 10 meses (CORRÊA et al., 2010; GIRARDI; BENDER, 2003). Para a maçã Gala a temperatura usada varia de 0 a 1 °C, o O₂ usado é 1 kPa, o CO₂ varia de 2-3 kPa, e o período de armazenamento é 6 a 9 meses. Já para a Fuji a temperatura de conservação é de -0,5 a 1 °C, o O₂ usado é 1 a 1,5 kPa, o CO₂ varia de <0,5 a 3 kPa, podendo permanecer armazenada de 8 a 9 meses (GIRARDI; BENDER, 2003).

O controle de qualidade das frutas armazenadas é realizado através de análises laboratoriais, as quais avaliam qualidade interna e externa do produto (firmeza de polpa, acidez) e reações das frutas expostas as condições de armazenamento (CHITARRA, 2005; MAPA, 2002).

3.3.2 Mamão

O mamão (*Carica papaya*) é uma planta herbácea, originária da América do Sul que pertence à família *Caricaceae*, com um formato ovalado e macio podendo atingir até 5 kg (BAÑOS, 2013). É uma planta de clima tropical cuja temperatura ótima de cultivo está em torno de 25 °C, cerca de 85% do fruto é constituído de água, na parte interior a uma cavidade central a qual apresenta sementes negras envolvidas pela exotesta (BAÑOS, 2013; FILHO, 2005; SANTOS, 2009; SOUSA 2004). Antes do seu amadurecimento a casca produz um látex leitoso que pode ser usado como amaciante de carnes já que é rica em papaína, uma enzima proteolítica (SANTOS, 2009).

A qualidade do fruto pode ser influenciada por alguns fatores que são de extrema importância, tais como, cultivar utilizado, ponto de colheita, técnicas de colheita, manuseio dos frutos, e por diversos fatores pós-colheita como: temperatura, umidade, influência de micro-organismo e armazenamento (ANDRADE, 2006).

Para a realização da colheita é importante que o fruto apresente pleno desenvolvimento fisiológico, e para isso algumas características físico-químicas precisam ser analisadas, como firmeza de polpa, sólidos solúveis, cor e aspecto da casca (ANDRADE, 2006; SHINAGAWA, 2009). Quando o mamão atingir o ponto ideal de colheita apresentará uma coloração passando de verde escuro para verde claro e duas listras levemente amareladas na casca (CHITARRA, 2005).

É importante que os frutos apresentem um bom desenvolvimento fisiológico, pois se colhidos antes do pleno desenvolvimento prejudicam o processo de amadurecimento, e frutos colhidos muito maduros apresentam redução da vida útil (DIAS et al., 2011). O mamão é uma fruta que amadurece aproximadamente uma

semana após a colheita e conseqüentemente é uma fruta altamente perecível (NETO et al., 2013; SHINAGAWA, 2009).

O etileno desempenha um papel fundamental no processo de amadurecimento, fazendo com que o mesmo ocorra de maneira rápida. No auge da maturação o etileno desencadeia o início da atividade de um complexo enzimático que causa a senescência do fruto (GALO et al., 2014). Em condições aceitáveis para o consumo, ele apresenta uma casca amarelada, com poupa amarela ou avermelhada e sucosa, devido a transformação da sacarose em açúcares redutores e a destruição do látex (CHITARRA, 2005).

Sua vida útil é relativamente curta, podendo variar de alguns dias para 3 a 4 semanas. O emprego do frio (refrigeração) para sua conservação é amplamente usado para reduzir a taxa metabólica do fruto sendo que as temperaturas ideais de conservação estão entre 9 e 12 °C (ANDRADE, 2006). Temperaturas mais baixas dificultam o amadurecimento. Neste caso, a poupa pode apresentar tecido com textura aquosa e pode ocorrer congelamento. Temperaturas elevadas ocasionarão a redução da vida útil favorecendo o aparecimento de doenças (DIAS et al., 2011).

3.4 FUNGOS DETERIORANTES

Os fungos estão classificados dentro do reino fungi, sendo estes organismos macroscópicos, eucarióticos, unicelulares (leveduras) ou pluricelulares (fungos filamentosos) (JAY, 2005). Os fungos filamentosos crescem em forma de massa irregular, o qual compõem-se de ramos filamentosos em forma de tubos chamados hifas que variam entre contínuas, não septadas ou cenocítica e septadas, a esse conjunto de hifas é denominado micélio (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os bolores são aeróbicos, absorvem oxigênio e desprezam anidrido carbônico no seu metabolismo oxidativo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Eles necessitam de água, para que se desenvolvam e realizem suas funções metabólicas. Ainda, podem apresentar morfologia diferente, dependendo da variação das condições nutricionais e temperatura. A maioria dos bolores apresenta crescimento micelial entre 22 °C e 28 °C (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os fungos são os principais responsáveis por causar deterioração em uma gama de alimentos, tais como, frutas, hortaliças, grãos e cereais. Podem contaminar os produtos já no campo devido a falta de cuidados com o manejo, ou no armazenamento. Essas deteriorações podem ser causadas por diversos gêneros fúngicos, e especificamente para a contaminação de frutos destacam-se o *Colletotrichum gloeosporioides* e *Penicillium expansum* (ANDRADE et al, 2007; BAÑOS et al., 2013; REIS; COSTA, 2011; SANDERS; KORSTEN, 2003; WELKE et al., 2009).

O *Colletotrichum* pertence à classe dos *Coelomycetes*, o qual formam conídios simples e alongados dentro do acérvulo que é em forma de disco, ceroso e normalmente de cor escura. Produzem conídios hialinos, ovóides ou retangulares (JAY, 2005). O *C. gloeosporioides* é um fitopatógeno responsável por causar antracnose, podridão-peduncular e a mancha-marrom em frutos do mamoeiro (ANDRADE et al, 2007; BAÑOS et al., 2013; SANDERS; KORSTEN, 2003). Dentre essas, a antracnose é a principal doença encontrada em mamões, que caracteriza-se como uma infecção necrótica no fruto injuriado com o crescimento de conídios (ANDRADE et al, 2007; SILVA et al., 2006). A infecção por *C. gloeosporioides* começa com o fruto ainda no campo com a epiderme intacta, assim, a doença continua se desenvolvendo e na maioria das vezes só é visível na fase de maturação (MAPA, 2002). O mofo-marrom caracteriza-se por pequenas manchas superficiais de coloração marrom avermelhada (SILVA et al., 2006). A doença nem sempre é percebida antes da fase avançada de maturação dos frutos, assim seu controle deve ser feito antes dessa fase (JUNIOR et al., 2012; SILVA et al., 2006).

O *Penicillium*, pertencente à classe dos *Hyphomycetes*, as cores de crescimento desse fungo varia de azul a azul esverdeado (JAY, 2005). O *P. expansum* é uma das principais espécies desse gênero fúngicos, é comumente encontrado em frutas como maçã, uva, pêra. Ele é responsável pela síntese e contaminação dos alimentos por metabólitos secundários conhecido por patulina, um importante representante das micotoxinas (WELKE et al., 2009). A deterioração causada por *P. expansum* comumente encontrada em maçã, forma um mofo azul. A infecção tem início a partir de tecidos danificados, tanto em condições ambientes ou sob refrigeração (MAPA, 2002; OSÓRIO et al., 2013). A doença normalmente ocorre em função da alta umidade e o bolor se desenvolve rapidamente (SILVA, 2008).

3.5 COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS

A maioria dos produtos agrícolas apresenta vulnerabilidade a doenças fúngicas na pré- e pós-colheita (SEAB, 2015). Seu controle é realizado a décadas através de agroquímicos sendo que os classificados como compostos orgânicos são os triazóis, benzimidazóis, ditiocarbamato, fenilpirróis (derivado de pirrolnitrina), anilino pirimidinas, ftalimida, dicarboximida, fenilamida, fenoxiquinolina e estrubirulinas. O outro grupo classificado como inorgânico tem estrutura química baseada nos átomos de cobre e enxofre, como sulfato de cobre, hidróxido de cobre, oxiclreto de cobre e óxido cuproso. Estes agroquímicos são utilizados no combate as doenças fúngicas de maneira isolada ou em combinações sinérgicas (BAMPI et al., 2013; CABALLERO; FINGLAS; TOLDRÁ, 2016; DUARTE; JULIATTI; FREITAS, 2009).

A comunidade científica vem a alguns anos relatando grande preocupação com o uso destes agroquímicos (DENNING; PERLIN, 2011). Existe uma preocupação quanto a aplicação indiscriminada destes compostos que desencadeiam o aumento de cepas fúngicas resistentes, bem como o fato de que esses compostos provocam efeitos toxicológicos ao homem e o ambiente (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRÁ, 2016; DENNING; PERLIN, 2011). Este cenário instiga a busca por novos antifúngicos, e novas estratégias de controle (DUNCAN; O'NEIL, 2013; SIVAKUMAR; BAÑOS, 2014).

Para o controle destes patógenos, métodos alternativos de controle efetivo estão sendo pesquisados (FIEIRA et al., 2013; GOMES et al., 2005; VENTUROSO et al., 2011). Compostos produzidos pelo mecanismo de defesa de plantas e animais tem demonstrado potencial no controle de fungos. Dentre os grupos de compostos conhecidos os óleos essenciais de plantas tem sido um dos mais extensivamente estudados, diversos óleos essenciais demonstram atividade antifúngica, das quais podemos citar os óleos essenciais de plantas comuns como: alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), capim limão (*Cymbopongo citratus*), cravo-da-índia (*Syzygium aromatiium*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) (ADEME; AYALEW; WOLDETSADIK, 2013; BONETT et al., 2012; SIVAKUMAR; BAÑOS, 2014; VENTUROSO et al., 2011).

3.6 COMPOSTOS AMÍDICOS

As amidas são compostos derivados de amônia pela substituição de um dos hidrogênios por radical acila (MORRINSON, 2005). É uma função química comum em estruturas orgânicas, e está presente em diversas moléculas essenciais a vida como nos aminoácidos e proteínas, ceramidas, glicoesfigolipídeos e lipídeos N-acilados (GILBERT; ŞENYUVA, 2009; MCCARTY; JOHNSON, 2001).

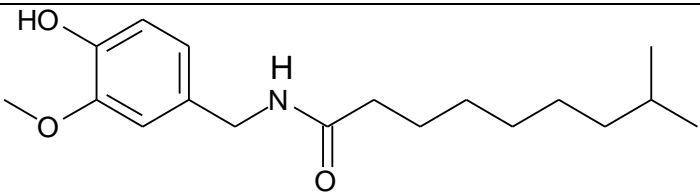
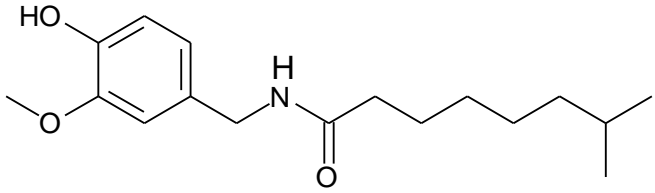
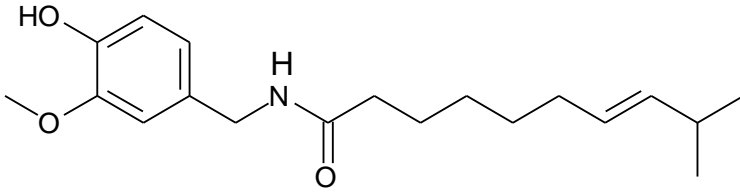
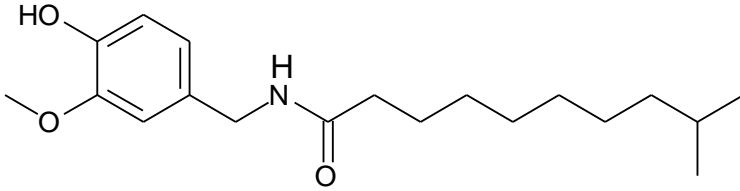
Devido a suas atividades biológicas é uma função comum em diversos compostos farmacêuticos, tais como, antibióticos (tetraciclina), analgésicos (paracetamol), antipiréticos (fenacetina), controle de colesterol no sangue (atorvastatina), redução da pressão arterial (lisinopril) e muitos outros compostos (CLISSOLD, 1986; DEMBITSKY; SHKROB; ROZENTSVET, 2000; HÖGESTÄTT et al., 2005; MALACCO et al., 2004; MCCARTY; JOHNSON, 2001; PLOSKER; LYSENG-WILLIAMSON, 2007).

Na agricultura desde a síntese da carboxina por Schmeling e Kulkain em 1966, os fungicidas amídicos são de grande importância e amplamente utilizados para controlar doenças fúngicas em plantas. Além disso, os derivados amídicos devido a sua ampla gama de atividades biológicas e sua alta eficiência se tornaram de grande interesse no desenvolvimento de diversos pesticidas, inseticidas e herbicidas (AN et al., 2008; CHARTONE-SOUZA et al., 2005; KIM et al., 2010; TANG et al., 2013; WU et al., 2012).

3.6.1 Capsaicina

Os frutos das diferentes espécies de *Capsicum* caracterizam-se principalmente pela sua pungência, formato e cor (SMITH; HEISER, 1951). Assim, a pungência das pimentas é produzida por uma mistura de substâncias denominadas capsaicinóides os quais aparecem em maior ocorrência são a capsaicina seguida de diidrocapsaicina, nordiidrocapsaicina, homocapsaicina e homodiidrocapsaicina (ZHIGILA et al., 2014) (Tabela 1).

Tabela 1 - Estrutura química dos principais capsaicinóides encontrados nas pimentas vermelhas.

ESTRUTURA DOS CAPSAICINÓIDES	
Dihidrocapsaicina	
Nordihidrocapsaicina	
Homocapsaicina	
Homodihidrocapsaicina	

Fonte: Adaptado de LUO, PENG e LI (2011).

Dentre os metabólitos secundários com propriedades medicinais, a capsaicina [(E)-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-8-metil-6-nonenamida] é um composto amídico de grande importância devido as diversificadas atividades biológicas, sendo atribuída a ela atividades anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana (LUO; PENG; LI, 2011; URBAN et al., 2000; TSUCHIYA, 2001).

No que tange sua atividade antimicrobiana estudos relataram sua capacidade de inibir o crescimento de *Streptococcus mutans* (SANTOS et al., 2012) *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas solanacearum* (MOLINA-TORRES et al., 1999) e *Helicobacter pylori* (ZEYREK; OGUZ, 2005). A atividade antifúngica foi relatada para microcápsulas que continham capsaicina contra *Botrytis cinerea* e *Aspergillus niger* (XING; CHENG; YI, 2006), mas recentemente foi capaz de isoladamente retardar o crescimento de *Penicillium expansum* e *Colletotrichum capsici* (FIEIRA et al., 2013; KRAIKRUAN; SANGCHOTE; SUKPRAKARN, 2008).

Apesar da capsaicina apresentar efeito contra microrganismos sua aplicação é restrita por promover irritabilidade no seu contato por exemplo com pele, olhos e mucosa (IIDA et al., 2003). Assim, uma alternativa para sua aplicação é a síntese de análogos de menor pungência, já que o grau de ardência está intimamente ligado ao número de carbonos da cadeia acila e os substituintes no anel vanilila (CASTILLO et al., 2007) (Figura 4).

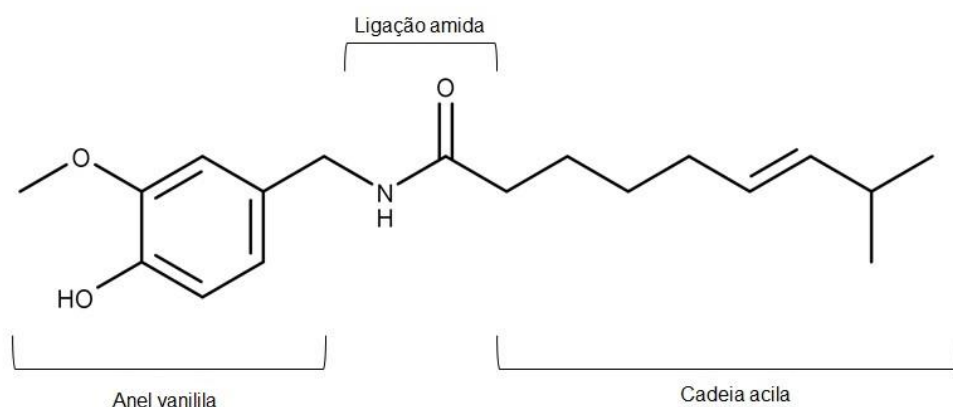


Figura 4 - Característica estrutural da capsaicina que determina sua pungência.
Fonte: CASTILLO et al., (2007, p. 1203).

Especificamente, Castilho e colaboradores detectaram que análogos com cadeia acila (C-8 e C-10) e substituinte no anel aromático semelhante a estrutura da capsaicina apresentaram pungência inferior a capsaicina na ordem de 66 e 36 %, respectivamente. Em análogos com cadeias acila menores que 6 carbonos e maiores que 12 carbonos não apresenta pungência significativa sendo esta inferior a 10 %. Os substituintes hidroxila e metoxila do anel aromático contribuem para o aumento da pungência dos compostos, especificamente sem a hidroxila a pungência é indetectável (CASTILLO et al., 2007).

Gonçalves (2009) avaliou a atividade antibacteriana usando os análogos N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3,7-dimetilocta-2(E),6-dienamida, N-(3,7-dimetilocta-2(E),6-dienil)-4-hidroxi-3-metoxi-benzamida, 3,7-dimetilocta-2(E),6-dienilamina, N-(4-hidroxifeniletíl)-decanamida e N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)decanamida contra a bactéria *Streptococcus mutans*. O análogo N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3,7-dimetilocta-2(E),6-dienamida apresentou atividade contra *S. mutans* duas vezes superior a capsaicina (GONÇALVES, 2009).

Em fungos o mecanismo de ação da capsaicina ainda é desconhecido. Entretanto, Tsuchiya (2001) em estudo que avaliou a interação da capsaicina e de seu análogo N-(4hidroxi-3metoxibenzil)nonanamida sobre células bacterianas, discutiu que a expressão da atividade antimicrobiana dela possa acontecer pela fluidização da membrana celular do microrganismo causando assim a sua morte.

3.6.2 Astacidina-2

Recentemente vem sendo estudado alguns PAMs isolados de crustáceos. Os crustáceos são organismos aquáticos e dentre os membros mais explorados estão, o lagostim, lagosta, camarão e caranguejo (ROSA; BARRACCO, 2010). O primeiro PAMs foi isolado do hemócitos do *Carcinus maenas* um peptídeo rico em prolina 6,5 kDa. Posteriormente um PAMs isolado do plasma do lagostim *Pacifastacus leniusculus* foi denominado de Astacidina-1, este é catiônico e contém 16 resíduos de aminoácidos e possui atividade contra bactérias Gram negativas (LEE; LEE; SÖDERHÄLL, 2003).

Jiravanichpaisal e colaboradores (2007) isolaram a Astacidina-2 hemócitos do lagostim *Pacifastacus leniusculus* um peptídeo altamente catiônico apresenta 14 resíduos de aminoácidos e sua sequência é rica em prolina e arginina (Figura 5). A Astacidina-2 apresenta atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, no entanto, sua atividade antifúngica ainda não foi determinada, mas estudos apontam que peptídeos ricos em prolina possuem atividade contra fungos (ROSA; BARRACCO, 2010).

ArgProArgProAsnTyrArgProArgProlleTyrArgPro-NH₂

Figura 5 – Sequência de aminoácidos da Astacidina – 2.
Fonte: Autoria própria.

3.6.3 Gomesina

Os peptídeos são encontrados em todas as espécies vivas, alguns se destacam por expressarem atividade antifúngica e antibacteriana, assim são nomeados de peptídeos antimicrobianos (PAMs) (HEGEDEUS; MARX, 2013). Entre os PAMs podemos citar a Nisina, peptídeo antimicrobiano produzido pelo metabolismo de *Lactococcus lactis*, destacando-se como a única bacteriocina legalmente aprovada como segura para uso em alimentos e bebidas (PUNYAUPPA-PATH; PHUMKHACHORN; RATTANACHAIKUNSOPON, 2015). Na área médica as equinocandinas foram a última classe de antifúngicos aprovada pela Food and Drug Administration (FDA). Elas são uma classe de lipopeptídeos produzidos por fungos e que sofreram modificações sintéticas para originar as equinocandinas comerciais conhecidas como caspofungina, micafungina e anidulafungina (DENNING, 2002; SUCHER; CHAHINE; BALCER, 2009).

A Gomesina (Gm) um peptídeo isolado nos hemócitos da aranha tarântula *Acanthoscurria gomesina* apresenta 18 resíduos de aminoácidos, duas pontes dissulfeto e massa molecular de 2270,4 daltons (Figura 6) (SILVA; DAFFRE; BULET, 2000).



Figura 6 – Sequência de aminoácidos da Gomesina.
 Fonte: Adaptado de MACHADO et al., (2012).

Ela possui atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos. Apresentando expressiva atividade contra bactérias gram-positivas das quais pode-se citar *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Pediococcus acidolactici*. Também apresenta atividade contra bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella hyphinurium*. Ainda, foi capaz de inibir o crescimento dos fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium oxysporum*, e as

leveduras *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (SILVA; DAFFRE; BULET, 2000).

Em estudo realizado por Fázio et al., (2006) foi determinada a importância das pontes dissulfeto na atividade antimicrobiana da Gomesina, o qual determinou a relação estrutura-atividade biológica empregando os análogos ciclo(2–15)[Asp², Ser^{6,11}, Orn¹⁵]-Gm, ciclo(6–11)[Ser^{2,15}, Asp⁶, Orn¹¹]-Gm, biciclo(2–15, 6–11)[Cys^{2,15}, Glu⁶, Lys¹¹]-Gm, biciclo(2–15, 6–11)[Cys^{2,15}, Asp⁶, Orn¹¹]-Gm, biciclo(2–15, 6–11)[Cys^{2,15}, Asp⁶, Dap¹¹]-Gm, biciclo(2–15, 6–11)[Glu², Cys^{6,11}, Lys¹⁵]-Gm, biciclo(2–15, 6–11)[Asp², Cys^{6,11}, Orn¹⁵]-Gm e biciclo(2–15, 6–11)[Asp², Cys⁶, Dap¹⁵]-Gm. Neste estudo ficou claro que a atividade antimicrobiana dos compostos depende de uma ponte dissulfeto, e a atividade hemolítica de duas pontes dissulfeto o que torna a Gomesina tóxica a células vermelhas.

Posteriormente, Machado et al., (2012) sintetizou e caracterizou análogos da Gomesina dentre estes a c(1-18)[Gln¹, Thr^{2,6,11,15}, D-Pro⁹]-Gm, está possui atividade contra *Escherichia coli* em 2,56 µM, *Staphylococcus aureus* em 10,24 µM e *Candida albicans* em 0,64 µM. A sequência de aminoácidos da c(1-18)[Gln¹, Thr^{2,6,11,15}, D-Pro⁹]-Gm está expresso na figura 7.

Gln-Thr-Arg-Arg-Leu-Thr-Tyr-Lys-Pro-Arg-Thr-Val-Thr-Tyr-Thr-Arg-Gly-Arg




Figura 7 - Sequência de aminoácidos do análogo da Gomesina c(1-18)[Gln¹, Thr^{2,6,11,15}, D-Pro⁹]-Gm.

Fonte: Adaptado de MACHADO et al., (2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A síntese e análise de aminoácidos da Astacidina-2, e a espectrometria de massas de todos os compostos estudados foram realizadas no Laboratório de Química do Departamento de Bioquímica do IQ-USP, coordenado pela Profa. Dra. Maria Terêsa Machini. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Equipamentos Finos e Laboratório Microbiologia da UTFPR – Campus Francisco Beltrão, respectivamente.

4.1 MATERIAL DE ESTUDO

4.1.1 Resina

O suporte polimérico utilizado na síntese da Astacidina-2 foi à resina Rink amida, 200 mesh onde o grau de funcionalização era de 0,6 mmol de grupo amino. g⁻¹ de resina obtida da Bachem Califórnia, Estados Unidos.

4.1.2 Agentes Ativadores

Os reagentes ativadores do grupo carbonila dos derivados de aminoácidos foram, tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU) e hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)fosfônio (BOP) adquiridos da Advanced Chemtech (Estados Unidos), e N-hidroxi-benzotriazol (HOBt) e diisopropilcarbodimida (DIC) da Sigma Chemical (Estados Unidos).

4.1.3 Reagentes e Solventes Químicos

Os derivados de aminoácidos protegidos em suas cadeias laterais utilizados na síntese foram Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Tyr(But)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Asn(Tritil)-OH, adquiridos da Bachem Califórnia (Estados Unidos) e da Novabiochem (Estados Unidos).

Os reagentes requeridos para a síntese foram: ácido trifluoracético (TFA), trietilamina (TEA), piperidina, diisopropiletilamina (DIPEA), N-metilpirrolidona (NMP) e N,N'-dimetilformamida (DMF), provenientes da Merck KgaA (Alemanha), Sigma Chemical (Estados Unidos) e Applied Biosystems (Estados Unidos).

Os solventes empregados foram: diclorometano (DCM), N,N'-dimetilformamida (DMF), metanol (MeOH) seco (máximo 0,005 % de água), isopropanol, éter diisopropílico, dimetilsulfóxido (DMSO), tolueno e N-metilpirrolidona (NMP), procedentes da Merck KGaA (Alemanha), Sigma Chemical (Estados Unidos) e Applied Biosystem (Estados Unidos). Ambos os reagentes e solventes eram de grau analítico e foram aplicados sem tratamento prévio.

Para preparação dos eluentes do CLAE-FR e ESI-MS foram utilizados acetonitrila (ACN) (Vetec Química Fina Ltda., Brasil) e TFA (Merck KGaA, Alemanha) de grau espectroscópico.

4.1.4 Bolores Teste

Os bolores utilizados para a realização das análises foram *Colletotrichum gloeosporioides* CBMAI 864 e *Penicillium expansum* CCT 7549.

4.1.5 Meios de Cultura

4.1.5.1 Ágar extrato de malte (MEA)

O ágar extrato de malte foi utilizado no cultivo do *Colletotrichum gloeosporioides*, e formulado com as seguintes proporções de reagentes: 40 g.L⁻¹ de glicose, 10 g.L⁻¹ de extrato de malte e 20 g.L⁻¹ de ágar ágar.

4.1.5.2 Ágar batata dextrose (BDA)

A ágar batata dextrose (Himedia®) foi acidificada com ácido tartárico 10%, para o cultivo de *Penicillium expansum* (pH 3,5).

4.1.5.3 Caldo meio para levedura (MPL)

O caldo MPL, foi usado na análise *in vitro* para determinação da atividade antifúngica dos análogos da capsaicina. Este meio foi formulado de acordo com as seguintes proporções: 20 g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 2,3 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄, 10 g.L⁻¹ de NaCl e 5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ (pH 5,0).

4.1.5.4 Caldo sabouraud (SDB)

O caldo sabouraud (Himedia®) foi usado na análise *in vitro* onde determinou-se a atividade antifúngica dos peptídeos, e quando necessário o pH foi ajustado para 6,0.

4.2 MÉTODOS PREPARATIVOS

4.2.1 Procedimento Geral da Síntese em Fase Sólida da Astacidina-2

A Astacidina-2 foi sintetizada manualmente pelo método de síntese em fase sólida (SPFS) a 60 °C utilizando a estratégia Fmoc (ATHERTON; SHEPPARD, 1989), em um frasco de reação jaquetado acoplado a um banho de circulação de água da PolyScience, modelo 8001 (PROTI; REMUZGO; MIRANDA, 2007). Primeiramente, a resina Rink amida (500 mg) foi submetida à desproteção do grupamento amino usando uma solução de 20% piperidina/DMF e a amioacilação foi realizada pela adição de Fmoc-Pro-OH e os reagentes acopladores DIC/HOBt. O processo de alongamento do peptídeo sobre o suporte polimérico utilizado foi razoavelmente simples. Foi utilizado a combinação de DIC/HOBt nos acoplamentos das Fmoc-AA-OH e TBTU/DIPEA somente nas etapas que exigiram reacoplamento. Todas as etapas de desproteção e acoplamento foram monitoradas pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970). Após o acoplamento do último resíduo de aminoácido [Fmoc-Arg(Pmc)-OH] na peptidil-resina em crescimento, a síntese foi interrompida e a peptidil-resina foi seca sob vácuo e estocada a -4°C.

Para a clivagem do peptídeo da resina 400 mg de Astacidina-2-Rink amida foram tratadas 1% TFA/DCM. Essa mistura permaneceu 2 minutos em uma incubadora com agitação tipo shaker, posteriormente o sobrenadante foi separado por filtração em um funil de sinterizado. Este procedimento foi repetido por 4 vezes. Ao final, os sobrenadantes foram misturados e secos em um rotaevaporador.

O último passo foi a purificação do peptídeo bruto por CLAE-FR utilizando um sistema da Waters modelo 600E preparativo em uma coluna preparativa (Vydac C₁₈, 10 µm, 300 Å, 2,2 x 25 cm).

4.2.2 Métodos Analíticos

4.2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

O peptídeo bruto e purificado foi analisado em um cromatógrafo da marca Waters, o qual era composto de duas bombas Waters 510, um detector (Waters 486), um injetor Rheodyne 7125, um integrador (Waters 745B Data Module) e uma coluna Vydac C₁₈ analítica (0,45 x 25,0 cm, tamanho da partícula de 5 µm e poro de 300 Å), gradiente linear de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos; fluxo de 1 mL.min⁻¹; comprimento de onda de 210 nm; solvente A constituído por TFA 0,1% em água; solvente B constituído por ACN e H₂O contendo 0,09% de TFA.

Os produtos resultantes das sínteses dos análogos da capsaicina foram analisados em cromatógrafo da marca Thermo Scientific, composto uma bomba Binary Analytical Pump HPG-3x00SD, um detector UV-Vis e um integrador Chromeleon 7.2. A coluna de fase reversa utilizada foi uma ACE 221-2546 C18-300 analítica (0,45 x 25,0 cm tamanho da partícula de 4,6 µm e poro de 300 Å), gradiente linear de 5% a 95% de solvente B em 30 minutos; fluxo de 1 mL/min; comprimento de onda de 210 nm; solvente A constituído por TFA 0,1% em água; solvente B constituído por ACN e H₂O contendo 0,09% de TFA. As purificações da Astacidina-2 foram realizadas em condições similares em coluna preparativa.

4.2.2.2 Espectrometria de massas

A massa molecular das amidas foi determinada em um sistema de CLAE-FR acoplado a um espectrômetro quadrupolo simples com fonte de ionização por electrospray modelo Micromass ZMD, os dados foram analisados com auxílio do software MassLynxTM para análise dos espectros.

4.2.2.3 Análises de aminoácidos

A hidrólise da Astacidina-2-Rink amida (1 mg) foi realizada em estação de trabalho Pico-Tag (Waters, Millipore, Massachussets, USA) em presença de 600 µl de ácido clorídrico-ácido propiônico (1:1, v/v) a 130°C por 24 ou 48 h. Após diluição com água deionizada o conteúdo de aminoácidos do hidrolisado foi determinado em um CLAE (coluna de troca iônica) com detecção amperométrica pulsada em analisador automático Dionex BIOLC® Chromatography System (Dionex, EUA) acoplado a um computador com o programa Chromeleon para aquisição e tratamento dos dados (SMILLIE; NATTRISS, 1991).

4.3 MÉTODOS BIOLÓGICOS

4.3.1 Análise *In Vitro*

4.3.1.1 Preparo dos compostos amídicos e antifúngico padrão para o ensaio antifúngico

N-benzilbutanamida, N-(3-metoxibenzil)butanamida, N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida, N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)hexanamida, N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)tetradecanamida foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO ≥ 99,9%, Sigma) na concentração de 800 µM. e a diluição seriada foi realizada com água destilada estéril até a concentração mínima de 6,25 µM. Para os peptídeos foi utilizado nas diluições água destilada estéril. A concentração estudada para a Astacidina-2 variou de 1,56 a 200 µM e o c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm de 0,60 a 77 µM. A natamicina (Delvocid®) foi o controle positivo usado nas concentrações que variaram de 3,12 a 100 µM, sua diluição ocorreu em água destilada estéril.

A concentração de trabalho da CAP SP-Pharma e CAP-Aldrich variaram de 6,25 a 800 μM e foram diluídos em DMSO. Os cálculos de dissolução de ambos os produtos levaram em consideração a massa molar da capsaicina de 305,4162 g/mol.

4.3.1.2 Preparação do inóculo

O repique das culturas foram realizados periodicamente, para o *Colletotrichum gloeosporioides* o cultivo foi realizado a 28 °C por oito dias e o *Penicillium expansum* foi cultivado a 25 °C por sete dias, em estufa tipo BOD. Em seguida uma quantidade de esporos foi retirada da placa após crescimento e transferido para 2 mL de caldo (sabouraud ou MPL) o conteúdo do tubo foi agitado em vortex durante 15 segundos para posterior contagem de esporos na câmara de Neubauer. A concentração final do inóculo utilizada foi de 10^5 esporos.mL⁻¹.

4.3.1.3 Atividade antifúngica pelo método de microdiluição

A atividade antifúngica foi avaliada por ensaio de inibição de crescimento em caldo sabouraud para os peptídeos e caldo MPL para os análogos como descrito por FEHLBAUM et al., (1994), com algumas modificações realizadas por FIEIRA et al., (2013). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em microplaca de 96 poços, onde cada poço continha 10 μL do composto sintético, 10 μL de água destilada estéril e 80 μL de inóculo a 10^5 esporos.mL⁻¹.

As microplacas com *C. gloeosporioides* foram incubadas a 28 °C por 48 e para *P. expansum*, a incubação foi realizada a 25 °C por 48 horas. Foi observado o crescimento microbiano com o auxílio do leitor de microplacas a uma absorbância de 630 nm. O valor da CIM corresponde a menor concentração que o composto amídico causa 100 % de inibição do crescimento dos fungos. O antifúngico natamicina foi usado como controle positivo de inibição de crescimento celular.

4.3.1.4 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Para determinação da concentração fungicida mínima (CFM) foi retirado o conteúdo total do poço que não apresentou crescimento fúngico. Então, o volume foi inoculado em ágar (plaqueamento por superfície) na condição ideal o crescimento do microrganismo conforme descrito no item 4.1. Após a incubação por 168 horas foi realizada a contagem de colônias total. A CFM foi determinada como a mínima concentração em que não houve crescimento em ágar.

4.3.1.5 Análise antifúngica *in vivo*

As maçãs utilizadas na análise foram da variedade Fuji standart plantio 1993, coletadas na fazenda Invernadinha, estrada dos Andrades em Palmas. Após a coleta as frutas foram higienizadas em solução de hipoclorito de sódio (2,5 % de cloro ativo) a 500 ppm durante 15 minutos. Em seguida foram enxaguadas com água destilada estéril e secadas a temperatura ambiente.

Após a secagem, 3 furos foram feitos em cada fruto (8,03 mm de largura e aproximadamente 8 mm de profundidade). Em cada fruto foi empregado 1 tratamento, a concentração dos compostos amídicos definidas através da CIM {Gomesina c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm 4,40 µM; N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida e N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)hexanamida 800 µM}, bem como para o controle natamicina. Após, a absorção dos 15 µL dos compostos teste e controle foi inoculado 15 µL de uma suspensão de esporos 10⁵ esporos dos bolores teste (FIEIRA et al., 2013).

4.3.1.6 Leitura e interpretação dos resultados

Os frutos foram monitorados de 2 em 2 dias até completarem 7 dias, e a cada avaliação foi realizada as medidas da podridão com o auxílio de um

paquímetro digital (Paquímetro digital com haste de profundidade redonda 1119-150, da Inzize). Após a realização das leituras foi calculado o valor médio das medidas e comparado com o controle positivo e negativo. E assim, foi possível calcular o valor absoluto, onde, os valores percentuais de feridas infectadas foram transformados em percentagem de eficácia de proteção (PE), de acordo com a equação abaixo:

Equação:

$$EC = \frac{C-T}{C} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

C = é o número de feridas infectadas no controle de agentes patogénicos (água + tratamento);

T = é o número de feridas infectadas no tratamento examinadas;

EC = Eficácia de controle, pode variar de 0 (sem EC) a 100 % (no máximo EC).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi realizada para os diâmetros de podridão em maçãs e os resultados expressos como médias \pm desvio padrão. Após a verificação da normalidade dos dados, os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey para a comparação das médias ao nível de significância de 5 % utilizando o programa ActionStat uma ferramenta do Excel (ACTION STAT, 2016).

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DA ASTACIDINA-2

O perfil cromatográfico do peptídeo bruto após desproteção total e clivagem simultânea da peptidil-resina indica a presença de um pico majoritário (Figura 7) e que este de $T_R=12,3$ min pela análise por espectrometria de massas (ESI-MS) refere-se ao peptídeo desejado (Figura 9). Neste espectro foi possível identificar a ocorrência de ionização múltipla do composto ($M^+ 3H^+$ e $M^+ 4H^+$), entretanto as ionizações $M^+ 1H^+$, $M^+ 2H^+$, não foram observadas talvez pelo considerável número de aminoácidos carregados positivamente cuja estrutura favorece a ionização do peptídeo.

Os espectros de massas dos picos com $T_R=11,7$ min e 12,3 min correspondem a peptídeos de massa molecular superior a 1837 Da (massa molar da Astacidina-2) que não puderam ser confiavelmente identificados (Figura 8 e 9).

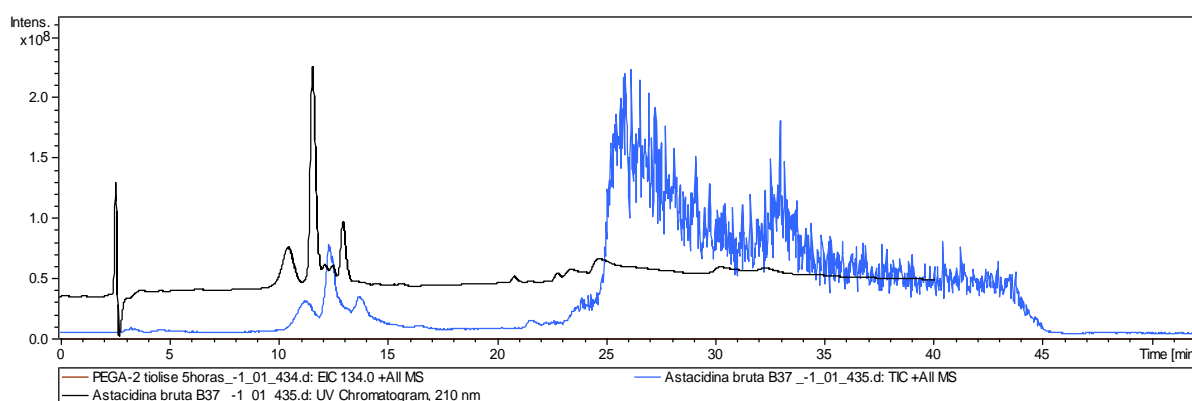


Figura 8 – Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Astacidina-2 (linha preta). Condições experimentais da CLAE-FR: Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm Scan de massas (linha azul). Condições experimentais do ESI-MS: módulo positivo, capilar 3kV, cone 37 kV.

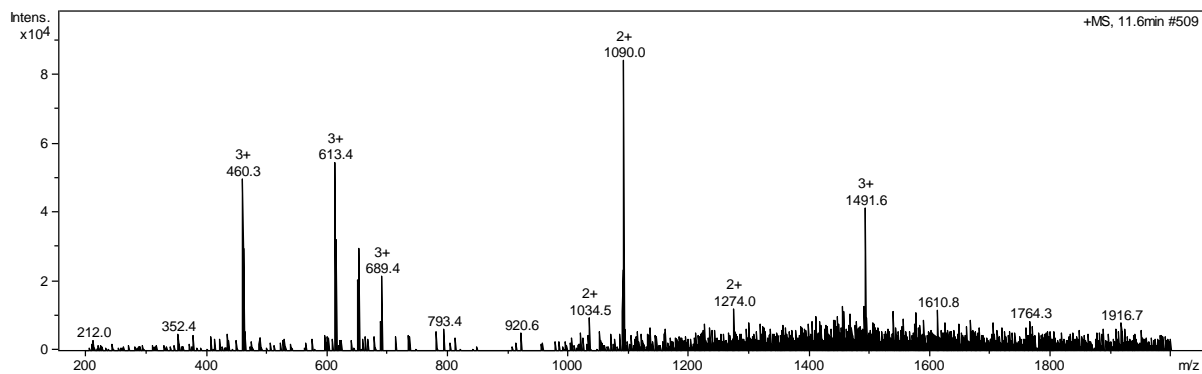


Figura 9 - Espectro de massas dos compostos eluídos em 11,6 minutos. Condições experimentais do ESI-MS: módulo positivo, capilar 3kV, cone 37 kV.

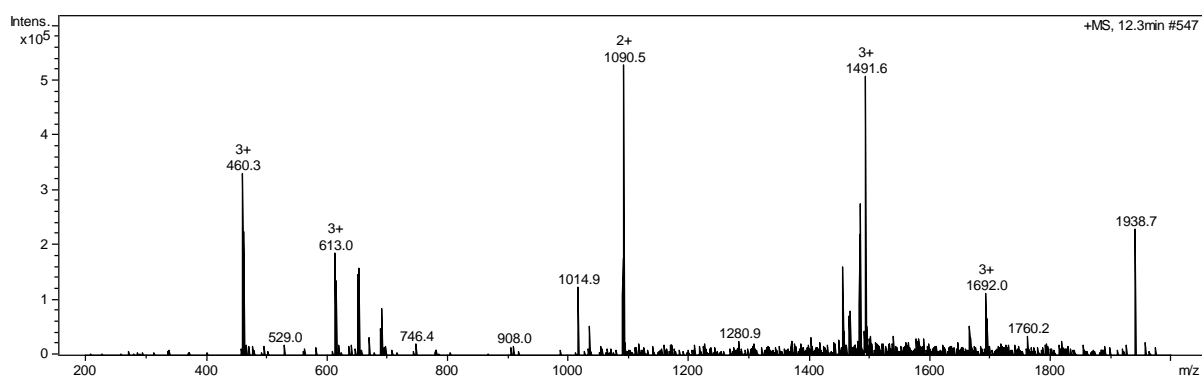


Figura 10 - Espectro de massas dos compostos eluídos em 12,3 minutos. Condições experimentais do ESI-MS: módulo positivo, capilar 3kV, cone 37 kV.

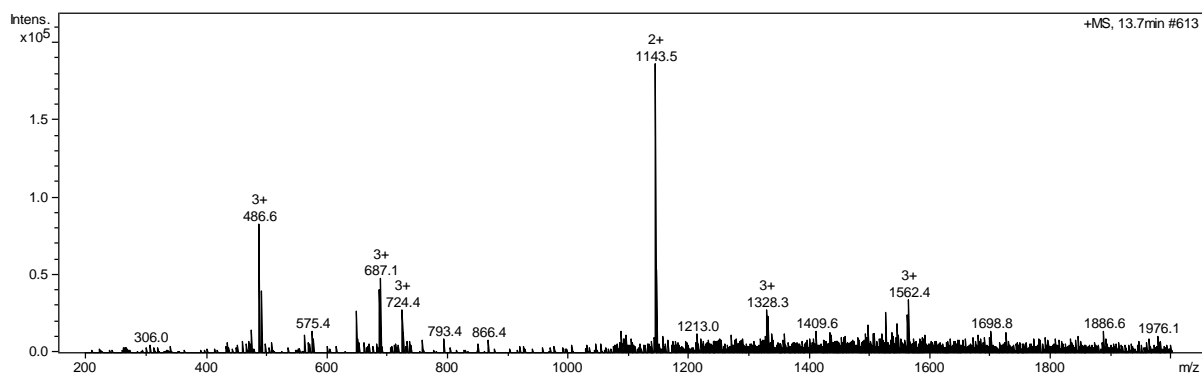


Figura 11 - Espectro de massas dos compostos eluídos em 13,7 minutos. Condições experimentais do ESI-MS: módulo positivo, capilar 3kV, cone 37 kV.

Posteriormente, a Astacidina-2 foi purificada em duas etapas para eliminação dos contaminantes que coeluem com o peptídeo. Inicialmente, foi empregado o sistema de solventes constituído por solução de TEAP ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{TEA}$ em H_2O , pH 2,05) como solvente A e ACN 40%/TEAP como solvente B. Em seguida, as frações que continham o peptídeo desejado foram submetidas à dessalinização

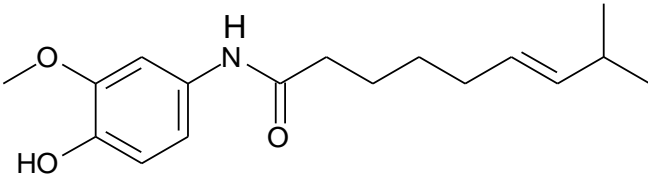
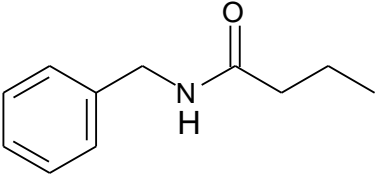
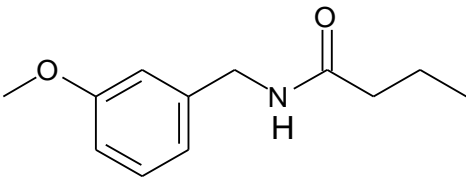
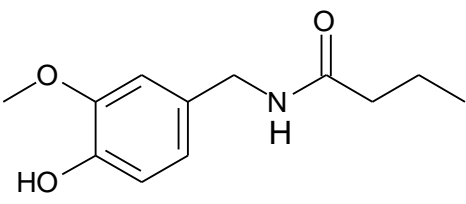
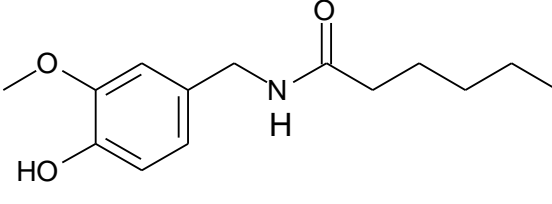
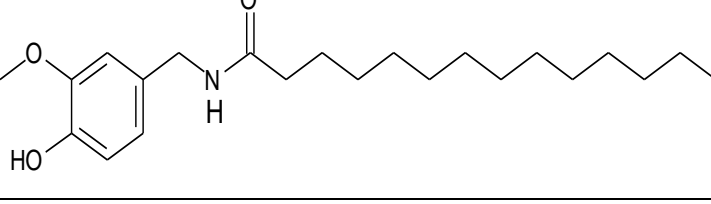
empregando-se o sistema TFA como par iônico (solvente A: 0,1 % TFA; solvente B: 60% ACN/H₂O). Cortes e coletas manuais foram realizados para que a purificação fosse mais controlada e eficiente. O peptídeo purificado apresentou pureza de 97 % nos sistemas de solventes TFA e TEAP.

A determinação do conteúdo peptídico é fundamental para caracterização química e compreensão da sua atividade biológica. Essa análise compreendeu duas etapas onde a primeira constitui-se da hidrólise que pode levar a reações secundárias as quais alteram a estrutura química de alguns aminoácidos. No caso da Astacidina-2 a asparagina é convertida a ácido aspártico, e neste caso no hidrolisado peptídico foi quantificado em cromatografia de troca iônica como ácido aspártico.

5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ANÁLOGOS DA CAPSAICINA

A capsaicina é o principal composto responsável pela pungência dos frutos do gênero *Capsicum* (LUO; PENG; LI, 2011; URBAN et al., 2000; TSUCHIYA, 2001) e em estudos realizados no grupo de pesquisa deste trabalho, análogos menos pungentes foram sintetizados com vistas a avaliação de sua atividade antioxidante (LEOBET et al., 2012). Os análogos foram sintetizados via aminólise de cloretos de ácido em sistema bifásico (WANG et al., 2009) com rendimentos que variaram de 54 a 95 %. As massas molares obtidas nas análises de espectrometria de massas confirmaram a obtenção dos análogos. Na tabela 2 são apresentadas as estruturas moleculares dos análogos estudados neste trabalho.

Tabela 2 - Estruturas moleculares dos análogos da capsaicina estudados.

Código	Nome	Estrutura
CAP	Capsaicina	
CAP-1	N-Benzilbutanamida	
CAP-2	N-(3-metoxibenzil)butanamida	
CAP-3	N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida	
CAP-4	N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)hexanamida	
CAP-5	N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)tetradecanamida	

A cromatografia líquida foi utilizada para determinar a pureza dos compostos sintéticos já que a confiabilidade das respostas biológicas depende do trabalho com produtos acima de 95 % de pureza. Como pode ser observado na tabela (3), a N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida foi a única com uma pureza um pouco abaixo do desejável e todos os outros análogos da capsaicina apresentaram pureza ≥ 95 %. O tempo de retenção e porcentagem de acetonitrila para eluição das amidas também foi analisado em CLAE-FR com o intuito de obter-se informações aproximadas sobre

a polaridade dos análogos (Tabela 3). Ainda neste trabalho, foram avaliados produtos comerciais de capsaicina para melhor entender a atividade biológica dos capsacinóides, para os quais são atribuídas todas as atividades antimicrobianas das pimentas vermelhas (GONÇALVES, 2009). Estes foram adquiridos de duas empresas diferentes uma da SP Pharma e a outra da Sigma Aldrich, codificadas como CAP SP-Pharma e CAP Sigma-Aldrich, respectivamente. Estes produtos apresentam diferentes porcentagens de capsacinóides, a CAP SP-Pharma é constituída de 55 % capsaicina, 20 % dihidrocapsaicina e 15 % nordihidrocapsaicina, e a CAP Sigma-Aldrich de ≥ 50 % capsaicina e ~ 35 % dihidrocapsaicina.

Tabela 3 - Caracterização química e determinação da pureza dos análogos da capsaicina.

Análogos	CLAE-FR Solvente B	T _R (min); ACN para eluição (%)	Pureza (%)
Capsaicina	60% ACN/ água	22,61/ 43,69	99
CAP SP-Pharma			
Dihidrocapsaicina		24,22/ 46,59	
Nordihidrocapsaicina	60% ACN/ água	22,22/ 43,00	95
Capsaicina		22,60/ 43,68	
CAP Sigma-Aldrich			
Dihidrocapsaicina		24,18/ 46,53	
Nordihidrocapsaicina	60% ACN/ água	22,19/ 42,94	94
Capsaicina		22,57/ 43,62	
CAP-1	60% ACN/ água	19,53/ 38,16	>99
CAP-2	60% ACN/ água	20,40/ 39,72	99
CAP-3	60% ACN/ água	14,03/ 28,26	93
CAP-4	60% ACN/ água	22,80/ 44,04	97
CAP-5	90% ACN/ água	32,77/ $\geq 92,97$	98

T_R: tempo de retenção, ACN: acetonitrila.

Após a determinação em CLAE dos compostos comerciais quantificou-se a proporção real de seus capsacinóides constituintes. Os mesmos são formados por proporções diferentes das descritas pela empresa, as verdadeiras proporções são: 55 % capsaicina, 38 % dihidrocapsaicina e 7 % nordihidrocapsaicina para CAP SP-Pharma e 52 % capsaicina, 40 % dihidrocapsaicina e 7 % nordihidrocapsaicina para

CAP Sigma-Aldrich. Os resultados mostraram que a quantidade de capsaicina é superior na CAP SP-Pharma.

Dos produtos analisados a CAP-5 foi o único composto onde a porcentagem de acetonitrila necessária para eluir o composto da coluna não pode ser determinado com certeza. Isto ocorreu porque a molécula é a mais apolar de todas os análogos sintetizados, ou seja, ela interagiu mais com a coluna (C-18), deste modo o seu tempo de retenção foi de 32,77 minutos. Dada as condições de análise, esse tempo evidencia a saída da CAP-5 nas condições de lavagem da coluna, demonstrando que o CAP-5 necessita de maior concentração de ACN para ser eluido da coluna.

O tempo de retenção na cromatografia indica a polaridade das moléculas, deste modo quanto maior o tempo de retenção em uma coluna de fase reversa mais apolar é o composto. De acordo com os tempos encontrados nas análises em CLAE-FR as estruturas foram classificadas em ordem decrescente de apolaridade: N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)tetradecanamida, N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)hexanamida, N-(3-metoxibenzil)butanamida, N-benzilbutanamida, N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida.

Comparando os tempos de retenção e a porcentagem de ACN para eluição do produto da coluna, ficou evidente que a ausência de substituintes no anel aromático e o aumento da cadeia acila tornam as estruturas mais apolares. Um exemplo disso é a CAP e a CAP-5, já que ambas possuem substituintes no anel aromático (grupos metoxila e hidroxila) e a diferença está no tamanho da cadeia acila que confere a CAP-5 maior apolaridade.

A espectrometria de massas possibilitou a confirmação dos produtos sintetizados (Figura 11).

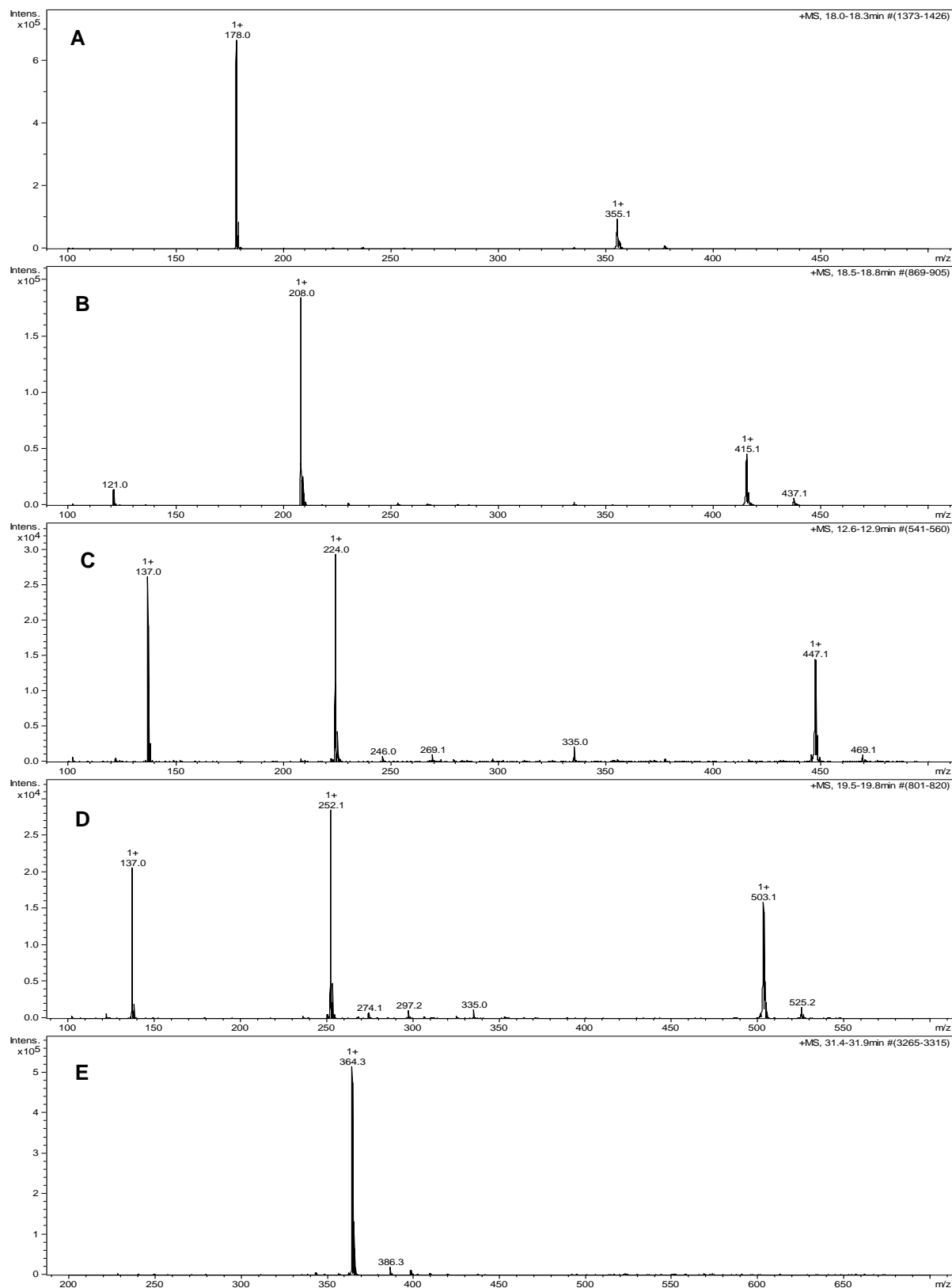


Figura 12 – Espectros de massas da N-Benzilbutanamida (A), N-(3-metoxibenzil)butanamida (B), N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida (C), N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)hexanamida (D) e N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)tetradecanamida (E). Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES+.

Na figura 11 A-D é possível observar que os cromatogramas dos análogos apresentam dois picos no espectro de massas, que correspondem ao produto e seu respectivo dímero. Com relação as outras massas que aparecem não é possível identifica-las confiavelmente. Os dados de espectrometria de massas dos análogos são expressos na tabela 4.

Tabela 4 - Massa molar dos análogos na análise por espectrometria de massas.

Análogos da capsaicina	Massa molar m/z: observada (calculada)
CAP-1	177 (177,24)
CAP-2	207 (207,31)
CAP-3	223 (223,187)
CAP-4	251 (251,33)
CAP-5	363 (363,56)

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os ensaios antifúngicos em microdiluição foram realizados em dois meios de cultivo distintos. Os ensaios com a capsaicina e seus análogos foram realizados em caldo MPL seguindo a método utilizado por Fieira et al., (2013). Entretanto, para os peptídeos o meio MPL apresenta uma concentração salina acima de 100 mM, e segundo Shamova et al., (1999) essa concentração é considerada alta, capaz de afetar a atividade antimicrobiana dos peptídeos. Assim, os ensaios antifúngicos para a Astacidina-2 e c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm foram realizados em caldo sabouraud que não contem concentração salina alta em sua formulação.

Os resultados da atividade antifúngica da c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm e da Astacidina-2 testada contra *Colletotrichum gloeosporioides* e *Penicillium expansum* estão expressos na tabela 5.

Tabela 5 - Concentração inibitória mínima para os peptídeos.

Peptídeo	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CIM (µM)#	<i>Penicillium expansum</i> CIM (µM)#
c(1-18)[Gln ¹ ,Thr ^{2,6,11,15} ,D-Pro ⁹]-Gm	19,25	2,40
Astacidina-2	> 200	> 200

ensaios com 3 repetições em duplicata

O *P. expansum* demonstrou-se mais sensível ao c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm do que o *C. gloeosporioides*. A Astacidina-2 não apresentou atividade contra nenhum dos bolores testados, talvez porque ela não tenha os elementos estruturais e/ou conformacionais que permitam sua interação com a membrana celular de fungos filamentosos (AKKAM, 2016). De fato, a Astacidina-2 apresenta atividade contra bactérias, e sabe-se que estas possuem membrana celular diferente de fungos (YEAMAN; YOUNT, 2003).

A tabela 6. Apresenta a atividade da capsaicina e seus análogos. Com vistas a ampliar o conhecimento acerca da atividade antifúngico da capsaicina foram analisados os produtos comerciais CAP SP-Pharma e CAP Sigma-Aldrich em CLAE-FR para confirmação da proporcionalidade entre os capsacinóides que são apresentados pela ficha técnica dos produtos. Verificou-se que a CAP SP-Pharma possuía uma maior concentração de capsaicina em sua composição em comparação a CAP Sigma-Aldrich, justificando sua atividade ser 2 vezes maior. O CAP SP-Pharma foi duas vezes mais ativa que a capsaicina contra o *C. gloeosporioides*, e para *P. expansum* ambos os compostos apresentaram a mesma atividade. A capsaicina não inibiu os dois bolores na mesma concentração, sendo que para *P. expansum* apresentou atividade 2 vezes maior.

In vitro os análogos CAP-3 e CAP-4 apresentaram-se um pouco menos ativos do que a capsaicina e a CAP SP-Pharma, ambos com uma CIM de 600 µM para *P. expansum*. Enquanto, para o *C. gloeosporioides* apresentaram a mesma atividade de 800 µM. O CAP-3 e CAP-4 diferem em suas estruturas pelo tamanho da cadeia acila, mas isto não foi o fator determinante para que houvesse diferença em sua atividade, independente do microrganismo estudado. Já que os análogos apresentaram uma polaridade muito semelhante a da capsaicina (Tabela 3).

Os resultados evidenciaram que o CAP-3 difere sua atividade do CAP-2, sendo que o CAP-2 foi necessária uma concentração 1,5 vezes maior para

apresentar a mesma atividade que a CAP-3. Essa diferença pode ser atribuída pela presença da hidroxila no anel aromático que diminuiu a polaridade da molécula, sendo que a atividade antimicrobiana da capsaicina é atribuída à existência da parte polar (grupo hidroxila do anel vanilila) e a parte lipofílica da estrutura (cadeia acila) (TSUCHIYA, 2001). Uma hipótese para estes acontecimentos pode estar baseada na presença da porção polar e lipofílica capsaicina e seus análogos facilite a interação da com a membrana celular, essa interação pode promover o enrijecimento da membrana celular e posterior morte celular (TSUCHIYA, 2001).

Em relação a CAP-1 e CAP-5 que foi necessário uma concentração 2 vezes maior que a capsaicina para *P. expansum*, talvez a lipofilicidade das moléculas superior a da capsaicina seja a responsável pela redução da atividade fúngica.

Para *C. gloeosporioides* não fica claro como as variações estruturais dos análogos influenciam na atividade antifúngica, já que todos os análogos apresentaram a mesma atividade que a capsaicina (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima para os análogos da capsaicina

Compostos amídicos	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Penicillium expansum</i>
	CIM (µM)#	CIM (µM)#
CAP SP-Pharma	400	400
CAP Sigma-Aldrich	800	800
CAP	800	400
CAP-1	800	800
CAP-2	800	800
CAP-3	800	600
CAP-4	800	600
CAP-5	800	800

ensaios com 3 repetições em triplicata.

O controle positivo para inibição do crescimento dos fungos usado nas análises (natamicina) apresentou uma CIM de 6,25 µM para *C. gloeosporioides* e *P. expansum*. O controle do solvente usado na diluição da CAP e análogos, o DMSO, não influenciou o crescimento fúngico, assim como observado por Fieira et al., (2013).

Para identificar se os compostos que apresentaram uma CIM também eram fungicidas, foi determinada a concentração fungicida mínima (CFM) frente a *P.*

expansum. A natamicina apresentou uma CFM de 25 μM e a c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm na concentração de 4,80 μM . A capsaicina e seus análogos nas concentrações testadas não apresentaram efeito fungicida, entretanto uma baixa contagem de colônias entre 3 a 30 colônias foi quantificada para CAP SP-Pharma, CAP-3 e CAP-4 (Figura 12).

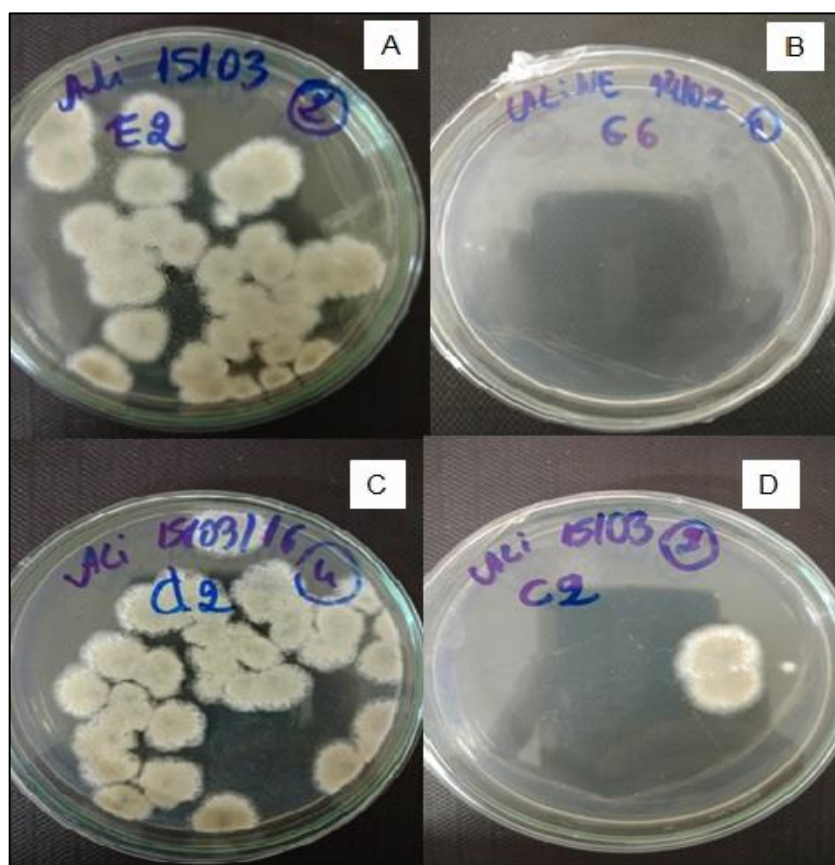


Figura 13 – Ensaio de crescimento fúngico entre os compostos selecionados com *Penicillium expansum*, compostos selecionados para a *in vivo*. A: CAP-3 [800 μM]; [B: c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm [4,80 μM]; C: CAP-4 [800 μM]; D: CAP SP-Pharma [800 μM]. Após 7 dias de crescimento.

Baseando-se nos resultados obtidos na análise *in vitro*, as concentrações usadas na *in vivo* foram definidas em: c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm 4,80 μM , CAP SP-Pharma 800 μM , CAP-3 800 μM e CAP-4 800 μM .

Inicialmente, foi realizado o ensaio *in vivo* apenas com água para determinar a estabilidade microbiológica das frutas. Verificando assim, que o tratamento de higienização foi eficiente, pois não foi detectado bolores e leveduras nos frutos que

tinham apenas as perfurações durante as 168 horas em que os frutos foram avaliados (Figura 13).

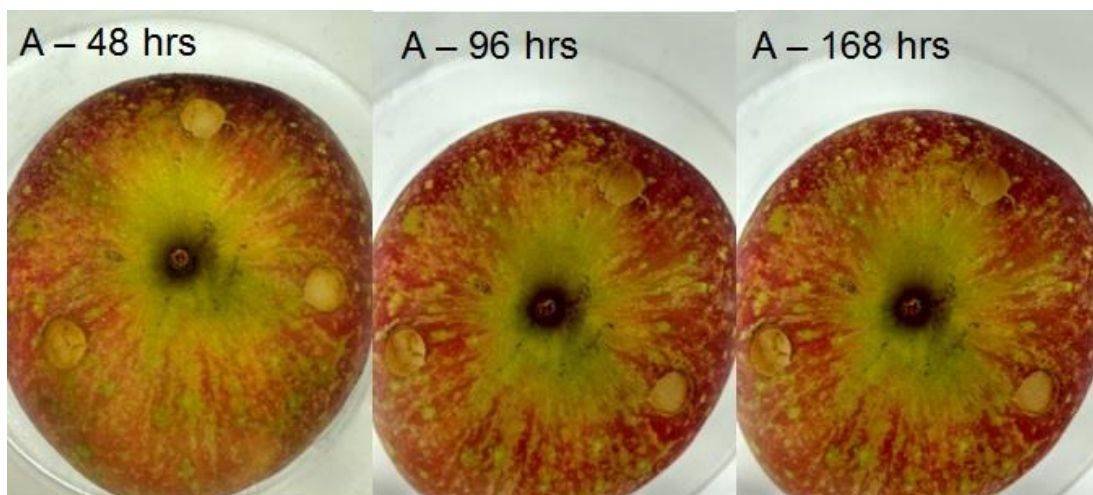


Figura 14 - Tratamento *in vivo* com água em maçã fuji.

A eficácia do tratamento foi expressa como o número lesões em que apresentavam sinais de podridão e foi transformada em eficácia de controle (EC) (Tabela 7). Para a realização do cálculo os valores de 48 horas não foram considerados, pois não há crescimento aparentemente mensurável, o dano visível pode ter sido causado pelo processo de oxidação enzimática (peroxidases e polifenoloxidase), culminando em resultados falsos.

Tabela 7 - Eficácia de controle dos tratamentos em maçãs.

Tratamento	<i>Penicillium expansum</i> #	
	EC % (96 hrs)	EC % (168 hrs)
c(1-18)[Gln ¹ ,Thr ^{2,6,11,15} ,D-Pro ⁹]-Gm	N.D	N.D
CAP SP-Pharma	N.D	N.D
CAP-4	N.D	N.D
CAP-5	N.D	N.D
Natamicina	66,66	22

ensaios com 3 repetições em triplicata, N.D: não detectado nas concentrações testadas.

Pela avaliação da eficácia de controle (EC) nenhum dos compostos amídicos apresentou capacidade de controlar *P. expansum in vivo*. O controle positivo (natamicina) apresentou efeito inibitório superior a 50 % nas 96 horas e inferior a 30 % no final do período de avaliação.

Outro parâmetro avaliado foi o diâmetro de podridão dos tratamentos. E pelo mesmo motivo da porcentagem de eficácia de controle não foram considerados os resultados de 48 horas, e são expressos na tabela 8.

Tabela 8 – Estimativa da podridão apresentada nos frutos de maçã.

Tratamento	<i>Penicillium expansum</i> #	
	96 horas	168 horas
	Diâmetro ± DP*	Diâmetro ± DP*
c(1-18)[Gln ¹ ,Thr ^{2,6,11,15} ,D-Pro ⁹]-Gm	17,95 ± 4,44 ^{Bab}	29,85 ± 5,29 ^{Aa}
CAP SP-Pharma	15,01 ± 2,85 ^{Bab}	21,92 ± 1,16 ^{Abc}
CAP-3	14,48 ± 2,04 ^{Bab}	22,03 ± 1,58 ^{Abc}
CAP-4	13,82 ± 2,59 ^{Bab}	20,61 ± 1,86 ^{Ac}
DMSO	15,55 ± 3,62 ^{Bab}	22,76 ± 2,25 ^{Abc}
Natamicina	11,93 ± 4,55 ^{Bb}	20,09 ± 7,70 ^{Ac}
Água + MØS	18,33 ± 2,66 ^{Ba}	28,35 ± 1,35 ^{Aab}

(*) Os diâmetros das lesões foram medidos em milímetros ± desvio padrão. (#) ensaios com 3 repetições em triplicata; Letras maiúsculas na mesma linha diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para melhor entendimento do comportamento dos compostos quando aplicados *in vivo*, foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$) de comparação de médias comparando os valores experimentais entre os tratamentos e tempos de 96 e 168 horas. Estatisticamente foi possível observar que existe uma diferença ($p < 0,05$) entre os tempos 96 e 168 horas.

Comparando os tratamentos há 96 horas, todos os tratamentos tiveram crescimento fúngico igual ao controle negativo (água+MØS) ($\emptyset = 18,33$ mm) e positivo (natamicina) ($\emptyset = 11,93$ mm) não sendo possível identificar diferenças entre os compostos c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm, CAP SP-Pharma, CAP-3 e CAP-4. Nas primeiras 96 horas de ensaio *in vivo* não foi possível determinar se o DMSO influenciou o crescimento fúngico.

Nas 168 horas finais já foi possível identificar a diferença entre os tratamentos, onde o análogo CAP-4 ($\emptyset = 20,61$ mm) foi o único que não apresentou diferença com a natamicina ($p < 0,05$). A c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm foi o composto de menor eficiência sendo sua média próxima apenas com o controle negativo, assim é possível dizer que ela não controlou o crescimento de *P. expansum*.

A natamicina mesmo não sendo o antifúngico aplicado em frutos foi utilizada como controle nos testes, porque a mesma apresentou eficácia na inibição de *P. expansum in vitro*.

Surpreendentemente, a c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm que na análise antifúngica *in vitro* foi o melhor composto no controle de *P. expansum*, na análise *in vivo* foi o mais ineficiente de todos os compostos amídicos testados. Um estudo realizado por Cavallarin et al., (1998) relata que a inatividade dos peptídeos *in vivo* pode estar relacionada a inativação dos mesmos pela ação de proteases presentes nos produtos de origem vegetal, ou fluidos celulares que compõem o tecido.

A capsaicina, CAP-3 e CAP-4 *in vitro* apenas retardaram o crescimento de *P. expansum*. Entretanto, *in vivo* os diâmetros das feridas foram próximos aos observados pela ação da natamicina. Essa diferença *in vitro* e *in vivo* pode ser atribuída as características dos tecidos da fruta, tal como o pH, proporção de vitaminas, minerais, compostos fenólicos entre outros (RUPASINGHE et al., 2006).

Considerando os diâmetros das lesões da CAP SP-Pharma, CAP-3 e CAP-4 estes são inferiores ao controle negativo (água+MØS) e o DMSO, ficando mais próximos da natamicina (no caso da CAP-4), indicando que os tratamentos não foram totalmente ineficientes. Sabendo que a maçã permanece de 8 a 10 meses em armazenamento sob refrigeração (CORRÊA et al., 2010; GIRARDI; BENDER, 2003) uma possibilidade de aplicação da CAP SP-Pharma, CAP-3 e CAP-4 seria na proteção dos frutos nas etapas de transporte e armazenamento, a fim de estender sua vida útil. Já que os produtos testados apresentam efeito fungistático, talvez estes possam também reduzir a produção de patulina, a conhecida micotoxina produzida por *P. expansum*. As figuras de 15 a 21 apresentam os ensaios *in vivo* em maçã.

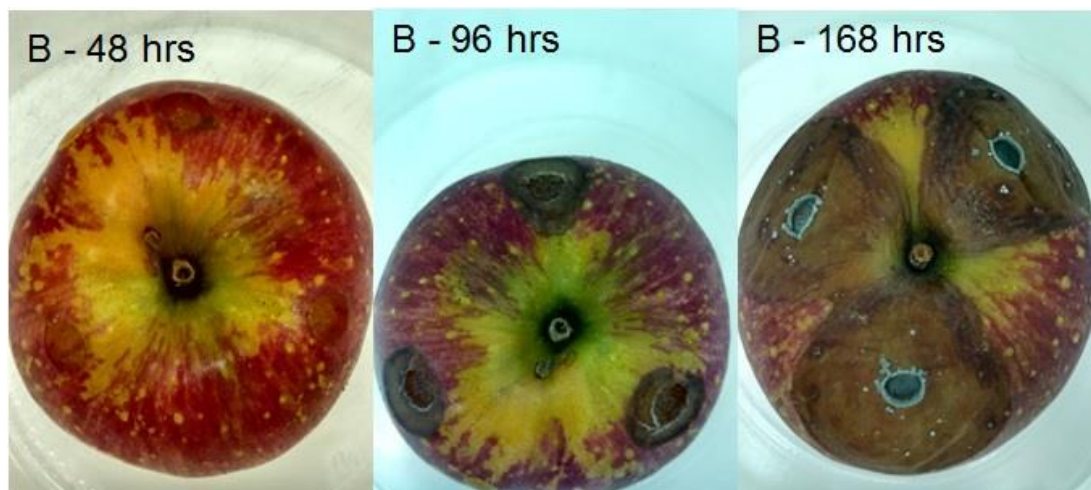


Figura 15 - Tratamento *in vivo* com a c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm em maçã fuji.

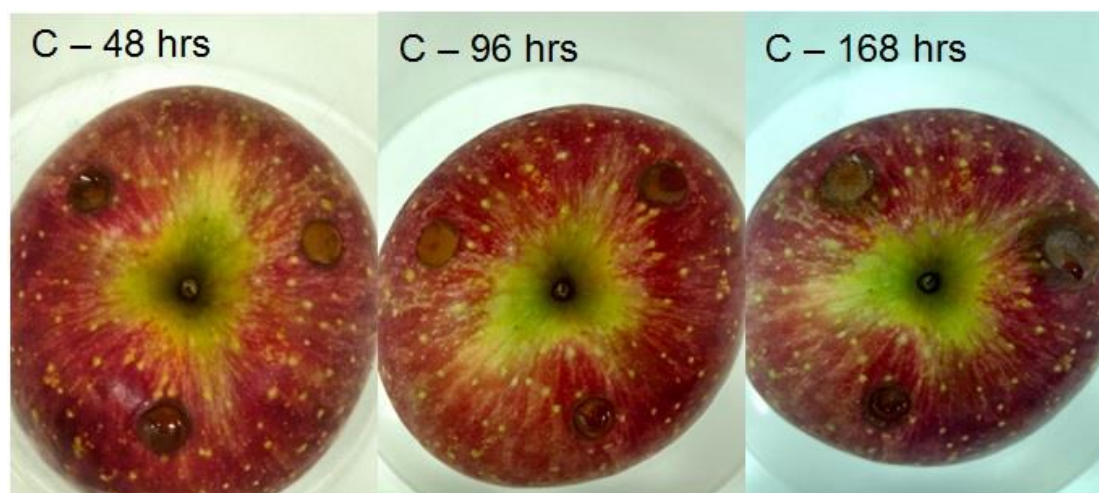


Figura 16 - Tratamento *in vivo* com a CAP SP-Pharma em maçã fuji.

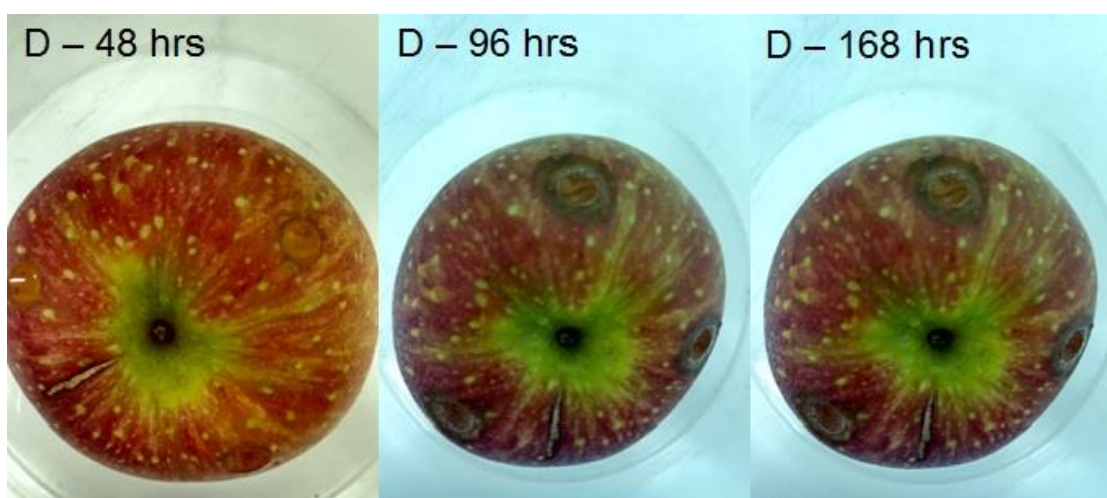


Figura 17 - Tratamento *in vivo* com N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)butanamida a em maçã fuji.

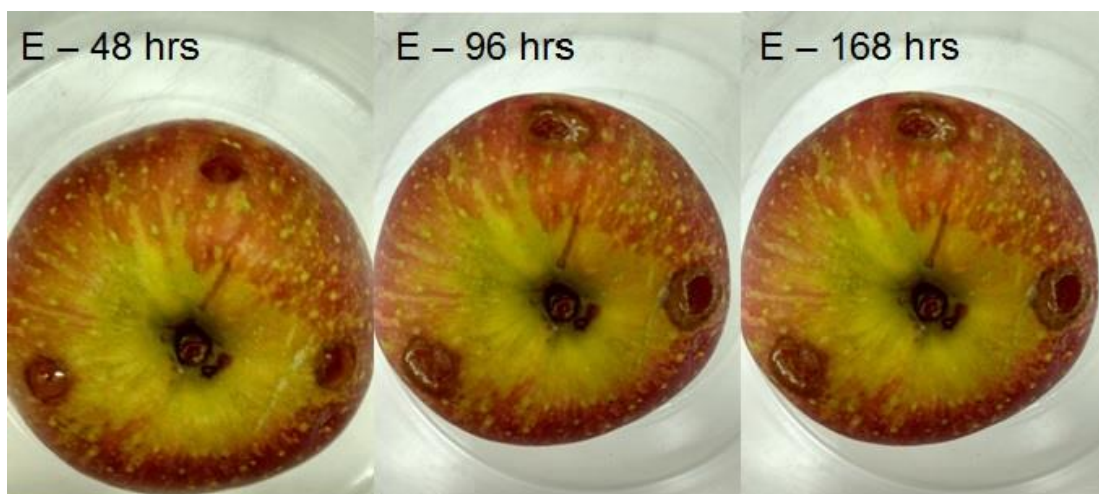


Figura 18 - Tratamento *in vivo* com N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)hexanamida a em maçã fuji.

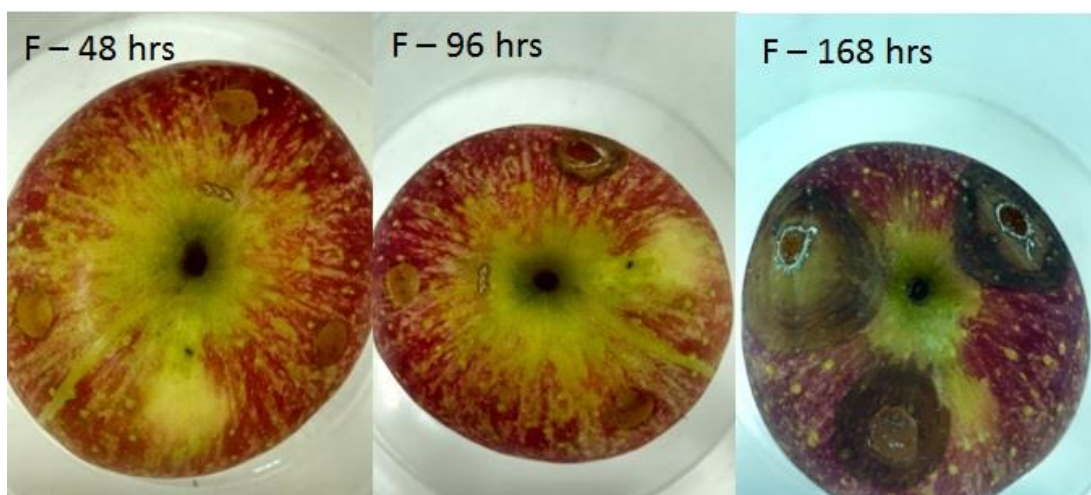


Figura 19 - Tratamento *in vivo* com Natamicina em maçã fuji.

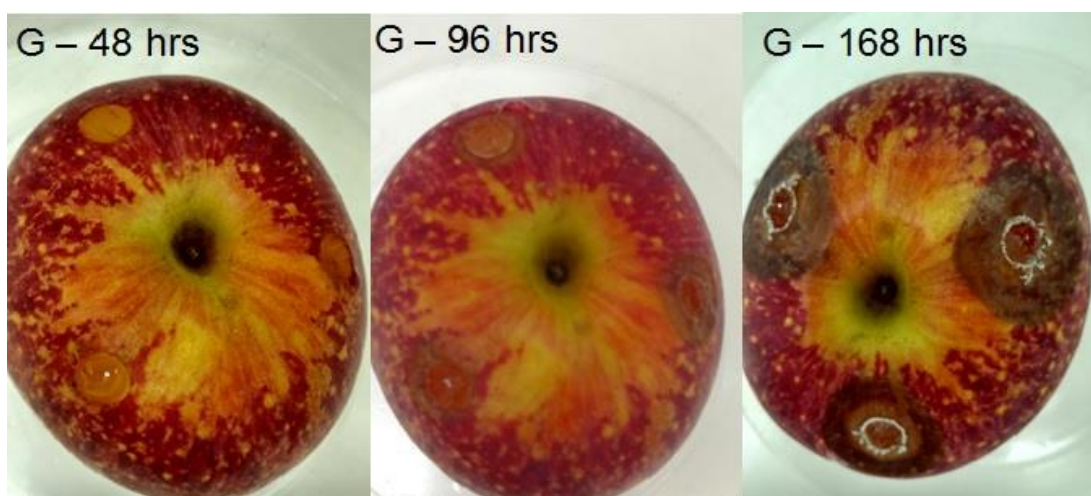


Figura 20 - Tratamento *in vivo* com DMSO em maçã fuji.

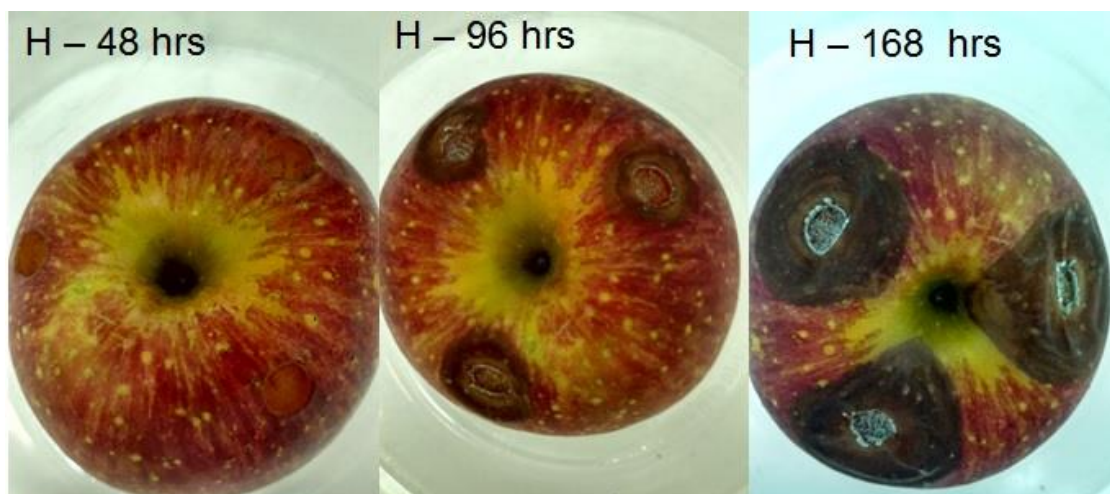


Figura 21 - Tratamento *in vivo* com água+microrganismo em maçã fuji.

6 CONCLUSÃO

A Astacidina-2 apesar de possuir características biofísicas que conferem a um peptídeo antimicrobiano expressar ação antifúngica, não foi capaz de inibir a proliferação de *C. gloeosporioides* e *P. expansum*. Dos peptídeos testados a c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm apresentou atividade em concentrações muito baixas (CIM = 2,40 µM) *in vitro* contra os bolores testados, no entanto *in vivo* não teve a mesma eficiência sendo visível a podridão na fruta.

Em relação aos outros compostos testados a capsaicina e seus análogos apresentaram efeito fungistático *in vitro*, e dos análogos avaliados os melhores foram a CAP-3 e CAP-4, que *in vivo* demonstraram-se mais eficientes do que a c(1-18)[Gln¹,Thr^{2,6,11,15},D-Pro⁹]-Gm. Apesar da baixa eficácia dos análogos no controle de *C. gloeosporioides* e *P. expansum* sua aplicação seria viável apenas para prevenir a contaminação fúngica em frutos, pois os compostos foram capazes apenas de retardar o crescimento dos fungos. Pode-se ressaltar que os análogos CAP-3 e CAP-4 mesmo que apresentando ação inibitória em altas concentrações (CIM = 600 µM), a sua simplicidade estrutural aliada a baixa pungência, torna estes compostos bons candidatos para aplicação na conservação de maçãs no processo de transporte e armazenamento na pós-colheita.

REFERÊNCIAS

ADEME, A.; AYALEW, A.; WOLDETSADIK, K. Evaluation of antifungal activity of plant extracts against papaya anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Plant Pathology and Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 4-10, 2013.

AKKAM, Y. A Review of antifungal peptides: basis to new era of antifungal drugs. **Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 51-75, 2016.

ANDRADE, E. M. et al., Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 021-031, 2007.

ANDRADE, S. R. R. de. **Processamento mínimo de mamão (*Carica papaya* L.): efeitos de aditivos químicos e atmosfera modificada na qualidade do produto**. 2006. 169 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2006.

AN, H. X. U. et al. Synthesis and herbicidal activities of novel derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n.1, p. 6567–6572, 2008.

ARGENTA, L. C.; BRACKMANN, A. Condições ideais para conservação de maçãs golden delicious em câmara de armazenagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 6, 387-392, 1996.

ATHERTON, E.; SHEPPARD, R.C. Solid phase peptide synthesis: a practical approach. **Oxford University Press**. p. 216, 1989.

BAMPI, D. et al., Sensibility of *Stenocarpella macrospora* to fungicide. **Journal Bioscience**, v. 29, n. 4, p. 787-795, 2013.

BAÑOS, S. B. et al., A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Crop Protection**, v. 49, n. 1, p. 8-20, 2013.

BONETT, L. P. et al., Extrato etanólico de representantes de cinco famílias de plantas e óleo essencial da família asteraceae sobre o fungo *colletotrichum gloeosporioides* coletados de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 7, n. 3, p. 116-125, 2012.

BLUM, L. E. B. et al., *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 433-436, 2004.

BRACKMANN, A. et al., Manutenção da qualidade pós-colheita de maçãs 'royal gala' e 'galaxy' sob armazenamento em atmosfera controlada. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2478-2484, 2008.

BROOKFIELD, P.; MURPAY, P.; HARKER, R.; MACRAE, E. Starch degradation and starch pattern indices; interpretation and relationship to maturity. **Postharvest Biology and Technology**, v. 11, n. 1, p. 23 - 30, 1997.

CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRA, F. **Encyclopedia of Food and Health**. v. 3. Elsevier. p. 169, 2016.

CABRAS, T. et al., Structural and functional characterization of the porcine proline-rich antifungal peptide sp-b isolated from aalivary gland granules. **Journal of Peptide Science**, v. 14, n. 3, p. 251–260, 2008.

CASTILLO, E. et al., Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1202–1208, 2007.

CAVALLARIN, L., D. et al., Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 11, n. 3, p. 218–227, 1998.

CELLI, M. G. et al., Patulina: incidência e controle em derivados de maçã. **Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 135-162, 2009.

CHITARRA, M.I.F.; Chitarra, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2ed. Lavras: FAEPE, p. 783, 2005.

CHARTONE-SOUZA, E. et al. Synthesis and characterization of a tetracycline-platinum (ii) complex active against resistant bacteria. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 5, p. 1001–1008, 2005.

CLISSOLD, S. P. Paracetamol and Phenacetin. **Drugs**, v. 32, n. 4, p. 46–59, 1986.

DEMBITSKY, V. M.; SHKROB, I.; ROZENTSVET, O. A. Fatty acid amides from freshwater green alga *Rhizoclonium hieroglyphicum*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 8, p. 965–967, 2000.

CORRÊA, T. R. et al., Qualidade de maçãs 'fuji' armazenadas em atmosfera controlada e influência do clima na degenerescência da polpa. **Pesquisa Agropecuária**, v. 45, n. 6, p. 531-538, 2010.

COSTA, W. S. da et al., Influência da concentração de sólidos solúveis totais no sinal fotoacústico de polpa de manga. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 6, n. 2, p. 141-147, 2004.

DANTAS, Susana A. F. et al. , Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na central de abastecimento do recife. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 528-533, 2003.

DENNING, D. W. Echinocandins: a new class of antifungal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 889 – 891, 2002.

DENNING, D. W; PERLIN, D. Azole resistance in *Aspergillus*: a growing public health menace. **Future Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1229-1232, 2011.

DIAS, T. C. et al., Conservação pós-colheita de mamão formosa com filme de PVC e refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 666-670, 2011.

DUARTE, R. P.; JULIATTI, F. C.; FREITAS, P.T. Efficacy of different fungicides on maize crop. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 4, p. 101-111, 2009.

DUNCAN, D.; O'NEIL. A. Commercialization of antifungal peptides. **Fungal biology reviews**, v. 2, n. 6, p. 156-165, 2013.

DUTOT, M.; NELSON, L. M.; TYSON, R.C. Predicting the spread of postharvest disease in stored fruit, with application to apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 85, n. 1, p. 45–56, 2013.

FAO. **Perspectivas Agrícolas 2015-2024**. 2015. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2016.

FAO. **Food and agriculture organization of the united nations statistics division**. 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em 18 de Janeiro de 2016.

FAO. **Global food losses and food waste – extent, causes and prevention**. 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.htm>>. Acesso em 18 de Janeiro de 2016.

FÁZIO, M. A. et al., Structure–activity relationship studies of gomesin: importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability. **Biopolymers**, v. 84, n. 2, p. 205–218, 2006.

FÁZIO, M. A. et al., Biological and structural characterization of new linear gomesin analogues with improved therapeutic indices. **Peptide Science**, v. 88, n. 3, p. 386–400, 2007.

FEHLBAUM, P. et al., Insect immunity. septic injury of drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 52, p. 33159–33163, 1994.

FIEIRA, C. et al., *In Vitro* and *In Vivo* antifungal activity of natural inhibitors against *Penicillium expansum*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 40–46, 2013.

FILHO, A. G. **Ocorrência da mancha fisiológica do mamão (*carica papaya* L.) sob diferentes lâminas de irrigação e coberturas de solo**. 2005. 54 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF Campos dos Goytacazes – RJ, 2005.

GALO, J. Q. B. et al., Conservação pós-colheita de mamão ‘*Sunrise solo*’ com uso de quitosana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 305–312, 2014.

GIRARDI, C.; BENDER, R. J. **Produção integrada de maçã no brasil**. Embrapa. 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Maca/ProducaoIntegradaMaca/colheita.htm>>. Acesso em: 20 de Janeiro de 2016.

GILBERT, J.; ŞENYUVA, H. Z. **Bioactive compounds in foods**. Oxford: Blackwell, 2009.

GOMES, A. M. A. et al. Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 108–111, 2005.

GONÇALVES, P. **Síntese de análogos de capsaicina e nova síntese da dihidrocapsaicina como potenciais substâncias antibacterianas**. 2009. 119 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Naturais) – Programa de Pós graduação Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009.

HEGEDEUS, N.; MARX, F. Antifungal proteins: more than antimicrobials. **Fungal Biology reviews**, v. 26, n. 1, p. 132 -145, 2013.

HÖGESTÄTT, E. D. et al. Conversion of acetaminophen to the bioactive n-acylphenolamine am404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31405–31412, 2005.

IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutas. **Panorama da cadeia produtiva de frutas em 2012 e projeção para 2013**. 2013. Disponível em: <www.todafruta.com.br/noticia_anexo_arquivo.php?id=39>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2016.

IIDA, T. et al., TRPV1 Activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, Capsiate. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 7, p. 958–967, 2003.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, p.21-675.

JENSEN, B. et al., Characterization of microbial communities and fungal metabolites on field grown strawberries from organic and conventional production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 313–322, 2013.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, S. Y.; KIM, Y. A.; ANDRÉN, T.; SÖDERHÄLL, I.; Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *pacifastacus leniusculus*: characterization and expression pattern. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 31, n. 1, p. 441-455, 2007.

JÚNIOR, C. L. S. et al., Control of papaya fruits anthracnose by essential oil of *Ricinus communis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 75-80, 2012.

KAISER E, et al. Color test for the detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KIM, B. J. et al. Synthesis of benzoxazole amides as novel antifungal agents against *malassezia furfur*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 31, n. 5, p. 1270–1274, 2010.

KRAIKRUAN, W.; SANGCHOTE, S.; SUKPRAKARN, S. Effect of capsaicin on germination of *Colletotrichum capsici* conidia. **Kasetsart Journal: Natural Science**, v. 42, n. 3, p. 417 - 422, 2008.

LEE, S. Y.; LEE, B.L.; SODERHALL, K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Paci-fastacus leniusculus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 7927–33, 2003.

LEOBET, E. L. et al., **DPPH and FRAP assays for estimating antioxidant activity of capsaicin analogues**. 2012. Disponível em: <<http://iufost.org.br/en/bookofabstracts.html>>. Acesso em: 13 de Maio de 2016.

LIMA, G. et al. Integrated control of blue mould using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, n. 2, p. 164-172, 2011.

LORENZETTI, E. R. **Controle de doenças no morangueiro com óleos essenciais e *Trichoderma spp.*** 2012. 90 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras - UFLA, Minas Gerais, 2012.

LUO, X.J.; PENG, J.; LI, Y. J. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 1–7, 2011.

MACHADO, A. et al., Synthesis and properties of cyclic gomesin and analogues. **Journal of Peptide Science**, v. 18, n. 9, p. 588–598, 2012.

MALACCO, E. et al., Comparison of valsartan 160 mg with lisinopril 20 mg, given as monotherapy or in combination with a diuretic, for the treatment of hypertension: the blood pressure reduction and tolerability of valsartan in comparison with lisinopril (prevail) study. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 855–865, 2004.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Cadeia produtiva de frutas**. Brasília: IICA, 2007. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/x_files/Documentos/Cadeia_Produtiva_de_Frutas_S%C3%A9rie_Agroneg%C3%B3cios_MAPA.pdf>. Acesso em: 10 Janeiro de 2015.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manejo pós colheita e rastreabilidade na produção integrada de maçãs**. 2002. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir031.pdf>>. Acesso em 20 de Janeiro de 2016.

MCCARTY, R. E.; JOHNSON, E. A. **Encyclopedia of physical science and technology: biochemistry**. 3 ed ed. [s.l.] Academic Press, 2001.

MOLINA-TORRES, J. et al., Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in mesoamerica: affinin and capsaicin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 241–248, 1999.

MORRISON, R. **Química orgânica**. 14 edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.

NETO, A. C. da R. et al., Efficacy of salicylic acid to reduce *penicillium expansum* inoculum and preserve apple fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, n. 1, p. 1-27, 2016.

NETO, A. F. et al., Avaliação pós-colheita de mamão variedade 'formosa' submetido a danos mecânicos e ensaios de compressão durante o armazenamento. **Ciências Técnicas Agropecuárias**, v. 22, n. 2, p. 5-10, 2013.

OSÓRIO, G. T.; OLIVEIRA, B. S.; PIERO, R. M. Efeito de agentes fumigantes sobre o bolor azul e o mofo cinzento em frutos de maçã. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 63-67, 2013.

PAGANINI, C et al., Análise da aptidão industrial de seis cultivares de maçãs, suas avaliações físico-químicas (dados da safra 2001/2002). **Ciências Agrotecnológicas**, v. 28, n. 6, p. 1336-1343, 2004.

PANEBIANCO, A. et al., Detection of *botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in sicily. **Crop Protection**, v. 77, n. 1, p. 65-73, 2015.

PLOSKER, G. L.; LYSENG-WILLIAMSON, K. A. Atorvastatin: a pharmaco-economic review of its use in the primary and secondary prevention of cardiovascular events. **Pharmacoeconomics**, v. 25, n. 12, p. 1031–1053, 2007.

PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M. Comparison of procedures for directly obtaining protected peptide acids from peptide-resins. **Journal Peptide Science**, v. 13, n. 6, p. 386-392, 2007.

PUNYAUPPA-PATH, S.; PHUMKHACHORN, P.; RATTANACHAIKUNSOPON, P. Nisin: Production and mechanism of antimicrobial action. **Journal of Current Research and Review**, v. 7, n. 2, p. 47-53, 2015.

RAHNAMAEIAN, M., LANGEN, G., IMANI, J., KHALIFA, W., ALTINCICEK, B., von Wettstein, D., KOGEL, K-H, VILCINSKAS, A.; Insect peptide metchnikowin confers on barley a selective capacity for resistance to fungal ascomycetes pathogens. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n.14, p. 4105–4114, 2009.

RIZZON, L. A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã gala, golden delicious e fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas**, v. 25, n. 4, p. 750-756, 2005.

ROCHA, R. H. C. et al., Uso do índice de degradação de amido na determinação da maturidade da manga 'Tommy Atkins'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 302-305, 2001.

ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate Survival**, v. 7, n. 1, p. 262-284, 2010.

RUPASINGHE, H. P. V. et al., Vanillin inhibits pathogenic and spoilage microorganisms in vitro and aerobic microbial growth in fresh-cut apples. **Food Research International**, v. 39, n. 5, p. 575-580, 2006.

SANDERS, G. M.; KORSTEN, L. Comparison of cross inoculation potential of south african avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbiological Research**, v. 158, n. 2, p.143–150, 2003.

SALOMÃO, B. de C. M. **Detecção de patulina e desinfecção de maçãs destinadas à produção de suco**. 2009. 233 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Programa em pós- graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

SANTOS, S. A. dos. **Aspectos morfoanatômicos e genéticos em relação à germinação de sementes de mamão**. 2009. 80 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF Campos dos Goytacazes, 2009.

SANTOS, M. M. P. et al., Antibacterial activity of *capsicum annum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 2, p. 354 - 356, 2012.

SEAB. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Fruticultura: Maio de 2015**. 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2014_15.pdf>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2015.

SHAMOVA, O et al., Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. **American Society for Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 4106-4111, 1999.

SHINAGAWA, F. B. **Avaliação das características bioquímicas da polpa de mamão (*Carica papaya* L.) processada por alta pressão hidrostática**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

SILVA, L. F. da. **Fungos: um estudo sobre a sua ocorrência nos alimentos**. 2008. 30 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso - Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

SILVA, K. S. et al ., Patogenicidade causada pelo fungo *colletotrichum gloeosporioides* (penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 131-133, 2006.

SILVA, P. I.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* Hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33464–33470, 2000.

SIVAKUMAR ,D.; BAÑOS, S. B. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**, v. 64, n. 2, p. 27-37, 2014.

SILVEIRA J. et al., Quem é o consumidor brasileiro de frutas e hortaliças. **Hortifruti Brasil**, v. 10, n. 103, p. 8-16, 2011.

SOUZA, L. M. de. **Algumas características físicas e químicas de mamões (*carica papaya* L.) dos grupos “formosa” (*tainung 01*) e “solo” (*golden*), com e sem mancha fisiológica, colhidos em diferentes estágios de maturação.** 2004. 82 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) (Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF Campos dos Goytacazes, 2004.

SMILLIE, L.B.; NATTRIS, M. Amino acid analyses of proteins and peptides: an overview. em: high performance liquid chromatography of peptides and proteins: separation, analyses and conformation. **CRC press, Boca Raton.** p. 847-858, 1991.

SMITH, P. G.; HEISER, C. B. Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers, *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. **American Journal of Botany**, v. 38, n. 5, p. 362-368, 1951.

SUCHER, A. J.; CHAHINE, E. B.; BALCER, H. Echinocandins: the newest class of antifungals. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 43, n. 1, p. 1647 – 1657, 2009.

TANG, R. et al., Synthesis, antifungal and antibacterial activity for novel amide derivatives containing a triazole moiety. **Chemistry Central journal**, v. 7, n. 1, p. 30, 2013.

TESSMER, M. A. **Características anatômicas e físico-químicas de frutos de (*Malus domestica* Borkh) e sua relação com a lenticelose.** 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de plantas) - Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2009.

TOEBE, M. et al., Dimensionamento amostral para avaliar firmeza de polpa e cor da epiderme em pêssego e maçã. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 4, p. 1026-1035, 2011.

TSUCHIYA, H. Biphasic membrane effects of capsaicin, an active component in *Capsicum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2, p. 295–299, 2001.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 5 ed. São Paulo: Atheneu, p.3-741, 2008.

URBAN, L. et al., *In Vivo* Pharmacology of SDZ 249-665, A Novel, non-pungent capsaicin analogue. **Pain**, v. 89, n. 1, p. 65-74, 2000.

VASQUES, A. R. et al., Avaliação sensorial e determinação de vida-de-prateleira de maçãs desidratadas. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 6, n. 4, p. 759-765, 2006.

VENTUROSO, L. dos R. et al., Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathol**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

WANG, B., YANG, F., SHAN, Y-F., QIU, W-W., TANG, J. Highly efficient synthesis of capsaicin analogues by condensation of vanillylamine and acyl chlorides in a biphasic H₂O/CHCl₃ system. **Tetrahedron**, v. 65, n. 27, p. 5409–5412, 2009.

WEBER, A. et al., Atmosfera controlada para o armazenamento da maçã 'Maxi Gala'. **Ciência Agrônômica**, v. 44, n. 2, p. 294-301, 2013.

WEISS, C.; SANTOS, M. **A logística de distribuição e as perdas ao longo da cadeia produtiva das frutas frescas**. Convibra, 2014. Disponível em: <<https://www.convibra.org>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2016.

WELKE, J. E. et al., Ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle da patulina em alimentos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 300-308, 2009.

WU, R. et al. Synthesis, crystal structure and larvicidal activity of novel diamide derivatives against culex pipiens. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 1–5, 2012.

XING, F.; CHENG, G.; YI, K. Study on the antimicrobial activities of the capsaicin microcapsules. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, n. 2 p. 1318–1321, 2006.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 28-44, 2003.

ZEYREK, F. Y.; OGUZ, E. *In vitro* activity of capsaicin against *Helicobacter pylori*. **Annals of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 125-127, 2005.

ZHIGILA, D. A. et al., Fruit morphology as taxonomic features in five varieties of *Capsicum annuum* L. Solanaceae. **Journal of Botany**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2014.