



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ROSANA SOUSA DA SILVA

**QUALIDADE DE SEMENTES E ÓLEOS ESSENCIAIS DE ERVA
DOCE DE PLANTAS NÃO ATACADAS E ATACADAS PELO
PULGÃO E A INFLUÊNCIA DOS SEUS ÓLEOS ESSENCIAIS NO
CONTROLE DA ANTRACNOSE EM MANGA ‘PALMER’**

JOÃO PESSOA - PB

2015

ROSANA SOUSA DA SILVA

**QUALIDADE DE SEMENTES E ÓLEOS ESSENCIAIS DE ERVA
DOCE DE PLANTAS NÃO ATACADAS E ATACADAS PELO
PULGÃO E A INFLUÊNCIA DOS SEUS ÓLEOS ESSENCIAIS NO
CONTROLE DA ANTRACNOSE EM MANGA ‘PALMER’**

JOÃO PESSOA - PB

2015

ROSANA SOUSA DA SILVA

**QUALIDADE DE SEMENTES E ÓLEOS ESSENCIAIS DE ERVA DOCE
DE PLANTAS NÃO ATACADAS E ATACADAS PELO PULGÃO E A
INFLUÊNCIA DOS SEUS ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA
ANTRACNOSE EM MANGA ‘PALMER’**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Silvanda de Melo Silva, PhD

JOÃO PESSOA - PB

2015

S586q Silva, Rosana Sousa da.

Qualidade de sementes e óleos essenciais de erva doce de plantas não atacadas e atacadas pelo pulgão e a influência dos seus óleos essenciais no controle da antracnose em manga 'Palmer'/ Rosana Sousa da Silva.- João Pessoa, 2015.

132f.: il.

Orientadora: Silvanda de Melo Silva

Tese (Doutorado) – UFPB/CT

1. Tecnologia de alimentos. 2. *Foeniculum vulgare* Mill (erva doce). 3. *Hyadaphis foeniculi* (Pass.). 4. *Colletotrichum* spp. 5. *Mangifera indica*. 6. *Artocapus heterophyllus*.

UFPB/BC

CDU: 664 (043)

ROSANA SOUSA DA SILVA

**QUALIDADE DE SEMENTES E ÓLEOS ESSENCIAIS DE ERVA DOCE
DE PLANTAS NÃO ATACADAS E ATACADAS PELO PULGÃO E A
INFLUÊNCIA DOS SEUS ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA
ANTRACNOSE EM MANGA 'PALMER'**

Tese, em 18/12/2015

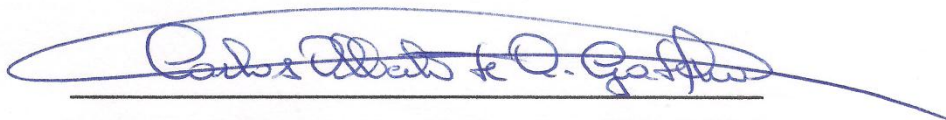
Banca Examinadora



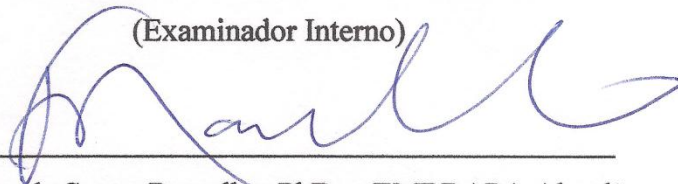
Silvana de Melo Silva, PhD. – CCA/UFPB
(Orientadora)



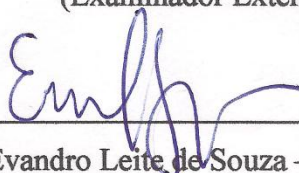
Marta Suelly Madruga, PhD. – CT/UFPB
(Examinador Interno)



Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha – DBM/UFPB
(Examinador Interno)



Francisco de Souza Ramalho, PhD. – EMBRAPA Algodão
(Examinador Externo)



Dr. Evandro Leite de Souza – CCS/UFPB
(Examinador Externo)

Agradecimentos

Agradeço a Deus, que além de me permitir a vida, mostrou-me possibilidades na sua infinita misericórdia com todas as provas de amor diárias, me presenteando família, amigos, estudo e trabalho, que fazem tudo ter mais sentido.

A minha Mãe Rosânia, que reza por mim todos os dias, que sempre me incentivou a seguir pelo caminho dos estudos, que me ama incondicionalmente e me compreende em todos os momentos.

Aos meus irmãos Rosimar, Ricardo e Raquel, que igualmente somam a minha vida, dando sentido ao que é verdadeiro.

Ao meu noivo, George Henrique Camêlo Guimarães, que me acompanha em todos os momentos desde o Mestrado, compartilhando e contribuindo com idéias e execução de qualquer coisa realizada.

A minha orientadora, Prof^a Silvanda de Melo Silva, pela atenção e cuidado com a minha formação desde a realização do meu Mestrado, ensinando sempre em uma agradável conversa e através do exemplo de estudo, compromisso, respeito e ética. Professora, agradeço imensamente pelas oportunidades que me proporcionou, pela paciência que sempre teve comigo, colaboração e apoio em tudo que sempre precisei realizar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial aos Professores que tive a oportunidade de conviver durante as disciplinas, à secretária Lindalva e as minhas duas colegas de turma Alline Lima de Souza Pontes e Katharina Kardinele Barros Sassi, pela convivência e amizade desde o nosso Mestrado.

Aos membros da banca do Processo de Qualificação de Doutorado, Prof^a Marta Suely Madruga, Prof^a Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, Prof^a Rejane Maria Nunes Mendonça e Dra. Maria Auxiliadora Coelho de Lima, que imensamente contribuíram no meu aprendizado nesta etapa.

Ao Pesquisador Dr. Francisco de Souza Ramalho, da Embrapa Algodão, por disponibilizar as amostras de erva-doce, através da parceria do Projeto financiado pelo FINEP.

Ao Laboratório de Análise de Flavor e Análises Cromatográficas da Universidade Federal de Sergipe, sob a coordenação do Prof. Narendra Narain, pela permissão de treinamento concedido através do projeto de Missão de Estudos-PROCAD n. 144/2009, sob a orientação da Prof^a Marta Suely Madruga, em análises de compostos voláteis, com a colaboração de Mercia de Sousa Galvão e Maria Terezinha Santos Leite Neta.

À Prof^a Marta Suely Madruga, por disponibilizar o Laboratório de Análise de Flavor, LAF, da Universidade Federal da Paraíba, para a realização das análises de voláteis e ácidos graxos, com a colaboração de Ana Carolyny Vieira da Costa e Taliana Kênia Alves Bezerra. Agradeço também pela disponibilidade em ajudar com orientação e pelo período de Coordenação do Programa Ciência e Tecnologia de Alimentos

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba, sob a Coordenação do Prof. Carlos Alberto de Almeida Gadelha, pela permissão de realização das análises de eletroforese, com a colaboração de Edilza Silva do Nascimento e Samara Montenegro.

Ao Laboratório de Análises de Combustíveis, LACOM, da Universidade Federal da Paraíba, sob a coordenação do Prof. Antonio Gouveia de Souza, com a colaboração da Prof^a Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro e do aluno de doutorado Bruno Raniere Lins de Albuquerque Meireles.

À pesquisadora Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco do Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, pela realização das análises de aminoácidos.

À Dra. Maria Auxiliadora Coelho de Lima e a Prof^a Rejane Maria Nunes Mendonça, pela viabilização da compra e transporte dos frutos de manga ‘Palmer’ na cidade de Petrolina-PE.

Ao Prof. Evandro Leite de Souza, pela orientação da realização das análises com microrganismo, com a colaboração da Dra. Raquel Ramos Berger.

Ao Laboratório de Fitopatologia, coordenado pela Prof^a Luciana Cordeiro do Nascimento, pela doação cepa do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, com a colaboração dos alunos Leonardo e Andréa Celina Ferreira Demartelaere.

Ao Laboratório de Entomologia, CCA, Areia, através do aluno Robério de Oliveira, pelo envio de fotos com ataque de pulgão em erva-doce.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita, LBTPC, que contribuem e me apoiam em qualquer atividade desenvolvida, em especial a George Henrique Guimarães, Ana Dantas, Renato Dantas, Renato Lima, Raylson Melo, Alex Sandro Sousa, Graça Andrade, Luciana Soares, Alanne Brito, Vanda Figueiredo, Thiane Rodrigues, Ricardo Nascimento, Mariany Silva, Francisco de Assys Souza, Matheus Andrade, Fernando Silva, Augusto Rodrigues, Leonardo Santos, Valdenia Ferreira, Talita Barros, Hellen Silva, Kayonara Kadrini, Expedito Cavalcante e Cassiara Souza. Agradeço também colaboração na realização do experimento de manga e análises de enzimas, compostos fenólicos e antioxidantes em erva-doce.

A Dona Rozani Barboza dos Santos, que tão bem acolhe todos em sua convivência no LBTPC. Muito obrigada pelas suas orações e sua amizade, com carinho materno!

A minha amiga Deborah Silva Amaral, que chegou em minha vida como soma de uma amizade de irmã verdadeira, trazendo fé, conhecimento, carinho e acolhimento.

À minha família de Ubajara, que tanto torce por mim e que tantas saudades tenho pelo tempo que passamos sem nos ver. A família Camêlo Guimarães, que sempre me acolheu com carinho!

Nada seria concretizado sem a colaboração em ações e bons pensamentos, de cada um que acreditou que seria possível!

MUITO OBRIGADA!

Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.

São Francisco de Assis

SILVA, R. S. **Qualidade de sementes e óleos essenciais de erva doce de plantas não atacadas e atacadas pelo pulgão e a influência dos seus óleos essenciais no controle da antracnose em manga ‘Palmer’**. João Pessoa, Centro de Tecnologia. Universidade Federal da Paraíba, 2015, 132 p. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Orientadora: Profª Silvanda de Melo Silva, PhD.

RESUMO

A erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.) é uma cultura de grande importância na agricultura familiar. Sua semente é utilizada na culinária e possui propriedades medicinais, além de produzir óleo essencial, que tem sido utilizado devido sua atividade antioxidante, antimicrobiana e inseticida. Porém, a cultura da erva-doce é susceptível ao ataque do pulgão *Hyadaphis foeniculi* (Pass.) (Hemiptera:Aphididae), que pode prejudicar a qualidade das sementes. O objetivo deste estudo foi caracterizar a semente e o óleo essencial de erva-doce, oriundos de plantas não atacadas e atacadas pelo pulgão, bem como a avaliar a potencialidade de cada óleo essencial associado a recobrimentos a base de amido de semente de jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.) como agente antifúngico contra o agente patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, comum na pós-colheita de manga (*Mangifera indica*). As diferenças entre as sementes não atacadas e atacadas pelo pulgão foram determinadas através do perfil de aminoácidos totais e livres, conteúdo de proteína total e solúvel, atividade das enzimas peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônio liase (PAL), inibição de protease, perfil eletroforético de proteínas, polifenóis extraíveis totais (PET), flavonoides amarelos, atividade antioxidante total (AAT) através da captura dos radicais livres DPPH[•] e ABTS^{•+}, perfil de compostos fenólicos, lipídeos totais e perfil de ácidos graxos. Os óleos essenciais das duas sementes foram diferenciados através do perfil dos compostos voláteis. A potencialidade dos óleos essenciais como agentes antifúngicos foi verificada através de testes *in vitro* em seis concentrações (0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 % v/v) para inibição do *C. gloeosporioides*, a fim de determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e a utilização da CIM de cada óleo essencial associada a recobrimento de amido de semente de jaca aplicado em manga para verificar sua capacidade de proteção contra este fungo e atuação nos parâmetros de qualidade: firmeza, acidez titulável (AT), sólidos solúveis (SS), relação SS/AT e pH. As sementes de erva-doce não atacadas por pulgão apresentaram maiores quantidades de aminoácidos livres, proteínas solúveis, atividade enzimática da POD e PPO, PET, flavonoides amarelos e AAT, enquanto a atividade enzimática da PAL e inibição de protease foram superiores em semente atacada. Foram observadas diferenças significativas no perfil de aminoácidos, perfil eletroforético de proteínas e perfil de compostos fenólicos entre estas sementes, entretanto o perfil de ácidos graxos das sementes não foi afetado. Houve diferença significativa para o perfil de compostos voláteis, que apresentou maior quantidade de fenilpropanóides na semente atacada pelo pulgão. A CIM para os dois tipos de óleos essenciais, foi verificada na concentração de 0,5%. A associação dos recobrimentos com os óleos essenciais apresentou comportamento semelhante para as características de qualidade em manga ‘Palmer’ e em relação à prevenção da antracnose, o recobrimento com óleo essencial de semente de erva-doce atacada pelo pulgão foi mais efetivo na redução da gravidade da lesão. O ataque do pulgão em erva-doce compromete a qualidade nutricional das sementes para uso alimentar, porém, o óleo essencial desta semente pode ser utilizado para inibir a incidência e severidade da antracnose em manga, fornecendo uma alternativa para a utilização de sementes atacadas, que tem baixo valor comercial.

Palavras-chave: *Foeniculum vulgare* Mill, *Hyadaphis foeniculi* (Pass.), *Colletotrichum* spp., *Mangifera indica*, *Artocarpus heterophyllus*.

SILVA, R. S. **Quality of fennel seeds and essential oils from non-attacked and attacked plants by aphid and influence of the essential oils on the control of anthracnose in 'Palmer' mango.** João Pessoa, Centro de Tecnologia. Universidade Federal da Paraíba, 2015, 132 p. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Orientadora: Prof^a Silvanda de Melo Silva, PhD.

ABSTRACT

Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) is an important crop for family farms. Its seed is used in the culinary and has medicinal properties, also produces the essential oil, which has been widely used due to its high antioxidant, antimicrobial, and insecticidal activity. However, fennel plants are susceptible to attack by the aphid *Hyadaphis foeniculi* (Pass.) (Hemiptera: Aphididae), which can decrease seeds quality. The aim of this study was to characterize seed and essential oil of fennel, from plants non-attacked and attacked by aphids, and to assess the potential of each essential oil associated with jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) seed starch coatings as an antifungal agent against *Colletotrichum gloeosporioides*, common disease in postharvest mango (*Mangifera indica*). The differences between seeds non-attacked and attacked by aphids, it was evaluated the profile of total and free amino acids, total and soluble protein content, activities of peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), and phenylalanine ammonia lyase (PAL), inhibitory activity of protease, electrophoretic profile of protein, total extractable polyphenols (TEP), yellow flavonoids and total antioxidant activity (TAA) by free radical capture DPPH[•] and ABTS^{•+} radical, profile of phenolic compounds, total lipids and fatty acid profile. The essential oils from two seeds were differentiated by the volatile compounds profile. The potential of essential oils as antifungal agents was verified *in vitro* tests at six concentrations (0.0; 0.05; 0.1; 0.2; 0.3 and 0.5% v/v) for inhibition of *C. gloeosporioides* in order to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) and the use of the MIC of each essential oil associated with jackfruit seed starch coating applied on mango to evaluate its ability to protect against this fungus and the quality through the parameters: firmness, titratable acidity (TA), soluble solids (SS), SS/TA and pH. Non-attacked fennel seeds by aphid showed higher contents of free amino acids, soluble protein, activities of POD and PPO, TEP, yellow flavonoids and TAA, while the activity of PAL and inhibition of protease were higher in attacked seed. Significant differences were observed in the amino acid profile, electrophoretic profile of proteins and in the profile of phenolic compounds from these seeds, however the fatty acid profile was not affected. There was a significant difference to the profile of volatile compounds, with the highest amount of phenylpropanoids in attacked seeds by aphids. The MIC for two types of essential oils was at 0.5%. The combination of coatings with essential oils showed similar behavior to the quality in 'Palmer' mangoes and the anthracnose prevention, coatings with essential oil from attacked seed by the aphids was more effective reducing the injury. The attack of aphid on fennel seeds compromises the nutritional quality for food use, however, the essential oil from this from seed can be used to inhibit the incidence and severity of anthracnose on the mango, providing an alternative use of attacked seeds that has low commercial value.

Key-words: *Foeniculum vulgare* Mill, *Hyadaphis foeniculi* (Pass.), *Colletotrichum* spp., *Mangifera indica*, *Artocarpus heterophyllus*.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1	Pulgão na erva-doce.....	24
Figura 2	Interconexões do H ₂ O ₂ , óxido nítrico (NO) e ácido salicílico (AS) para a ativação e coordenação das múltiplas reações de defesa das plantas.....	26
Figura 3	Biossíntese de ácidos graxos e triacilglicerois (TAG) em plantas superiores. Biossíntese de ácidos graxos envolve uma complexa série de enzimas localizadas no cloroplasto, conduzindo a síntese de ácidos graxos saturados (C16 e C18) e de ácidos graxos monossaturados (C18). A formação dos triacilglicerois ocorre no citosol nas membranas retículo endoplasmático, onde as insaturações dos ácidos graxos são formadas.....	29
Figura 4	Árvore volatiloma. Ramo (A), Compostos orgânicos voláteis (COVs) são produzidos por diferentes rotas bioquímicas. A via MEP (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate). Ramo (B), Sesquiterpenóides gerados por FPP (farnesyl diphosphate), derivados a partir da via MVA (mevalonato) citosólica. Ramo (C), oxilipídeos gerados a partir de ácidos graxos o qual são clivados dentro dos derivados GLVs (voláteis de folhas verdes) e JA (ácido jasmônico). Ramo (D), voláteis índoles gerados a partir de antronilato. Ramo (E), COVs aromáticos derivados a partir de felilpropanóides, enquanto MeSA (metil salicicato). Ramo (F), alternativamente, MeSA pode ser formado por metilação do ácido salicílico decorrente do isocorismato.....	31
Figura 5	Estrutura molecular dos maiores componentes bioativos do óleo essencial de <i>Foeniculum vulgare</i>	33
Figura 6	(a) Mancha preta na folha de manga, (b) ponta apical de manga, (C) sintomas de antracnose em frutos de manga, (d) cultura pura de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (e) esporos de <i>C. gloeosporioides</i>	38
Materiais e Métodos		
Figura 7	A: semente de erva-doce não atacada pelo pulgão; B: semente de erva-doce atacada pelo pulgão.....	39
Figura 8	A: Imagem microscópicas de esporos de <i>C. gloeosporioides</i> ; B: disco de 6 mm com esporos de <i>C. gloeosporioides</i> ; C: crescimento completo de <i>C.</i>	

	<i>gloeosporioides</i> após 8 dias.....	40
Figura 9	A: colheita da manga ‘Palmer’; B: sanitização da manga ‘Palmer’; C: secagem de manga ‘Palmer’ após sanitização.....	41
Figura 10	A: formação do recobrimento à base de amido de semente de jaca; B: recobrimento pronto para aplicação; C: demonstração do recobrimento formado.....	42
Figura 11	A: aplicação de recobrimentos em manga ‘Palmer’; B: secagem da manga ‘Palmer’ após aplicação dos recobrimentos; C: armazenamento da manga ‘Palmer’ após secagem dos recobrimentos.....	42
Figura 12	Curva padrão de soro albumina bovina, utilizada na calibração da solução de Bradford para determinação de proteínas solúveis na semente de erva-doce.....	44
Figura 13	Curva padrão de ácido gálico, utilizada como base para a definição das alíquotas e concentração do extrato fenólico para a determinação de polifenóis extraíveis totais na semente de erva-doce.....	49
Figura 14	Curva padrão de DPPH* utilizada como base para a definição das alíquotas do extrato fenólico na determinação de Atividade Antioxidante Total.....	50
Figura 15	Curva padrão de Trolox, utilizada como base para a definição das alíquotas e concentração do extrato fenólico para a determinação de Atividade Antioxidante Total através da captura do radical ABTS* ⁺ na semente de erva-doce.....	51
Figura 16	A: perfuração e implantação dos discos com esporos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; B: fixação do inóculo; C: lesão em manga ‘Palmer’ causada pelo <i>C. gloeosporioides</i>	55

Artigo 1

Figure 1	SDS-PAGE in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid. 1- Molecular Markers (Myosin, 200 kDa; β -galactosidase, 120 kDa; Bovine Serum, 91 kDa; Glutamin, 62 kDa; Albumin, 46 kDa; Carbonic anhydrase, 38 kDa; Myoglobin, 26 kDa; Lysozyme, 19 kDa; Aprotinin, 9 kDa); 2-Seed non- attacked; 3 Seed Attacked.....	96
Figure 2	A-PCA: Biplot of the loadings and scores of PC1 and PC2 of amino acids (AA) profile, total protein, soluble protein, POD, PPO, PAL, protease inhibitor, phenolic compounds profile, fatty acids profile, total lipids,	

TEP, yellow flavonoids, and TAA in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid; T (AA total), F (AA free), iso (isoleucine), tyr (tyrosine), Total (total amino acids), leu (leucine), gly (glycine), ser (serine), phe (phenylalanine), lys (lysine), met (methionine), his (histidine), threo (threonine), AspAc (aspartic acid), GlutAc (glutamic acid), ala (alanine), arg (arginine), pro (proline), ProtInib (protease inhibitor), YelFlav (yellow flavonoids), SolProt (soluble protein), Phen 1 (caffeic acid), Phen 2 (ellagic acid), Phen 3 (ferulic acid), Phen 4 (hydroquinonecarboxylic acid), Phen 5 (p-coumaric acid), Phen 6 (protocatechuic acid), Phen 7 (p-salicylic acid), Phen 8 (salicylic acid), Phen 9 (sinapic acid), Phen 10 (syringic acid), Phen 11 (vanillic acid), Phen 12 (catechin), Phen 13 (myricetin), Phen 14 (quercetin), Phen 15 (naringenin), Phen 15 (rutin). **B:** HCA and color map in amino acids profile, total protein, soluble protein, POD, PPO, PAL, protease inhibitor, phenolic compounds profile, fatty acids, lipids, TEP, yellow flavonoids, and TAA in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid.....

99

Artigo 2

Figure 1 Hierarchical cluster analysis and color map, showing quantitative changes in volatile compounds and inhibition percentage (%) of *C. gloeosporioides* treated with fennel essential oil from seeds of fennel attacked and non-attacked by *Hyadaphis foeniculi*. D- day; C- concentration.....

129

Figure 2. Hierarchical cluster analysis and color map, showing quantitative changes in volatile compounds and lesion diameter of *C. gloeosporioides* and physicochemical quality in ‘Palmer’ mango coated added of fennel essential oil (EO) from seeds from plants attacked and non-attacked by *Hyadaphis foeniculi*. D- day.....

130

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1	Free and total amino acids in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid.....	94
Table 2	Total protein, soluble protein, peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and protease inhibitor in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid.....	95
Table 3	Total extractable polyphenols, yellow flavonoids, total antioxidant activity and profile phenolic compounds in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid.....	97
Table 4	Fatty acids and lipids in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid....	98

Artigo 2

Table 1	Volatiles compounds of fennel essential oils from seeds non-attacked and attacked with aphid	125
Table 2	Inhibition percentage (%) of <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> treated with fennel essential oil from seeds of fennel attacked and non-attacked by <i>Hyadaphis foeniculi</i>	126
Table 3	Lesion diameter (mm) in ‘Palmer’ mango coated with jack fruit (JS) starch at 3% added of fennel essential oil (EO) from seeds harvested from plants attacked and non-attacked by <i>Hyadaphis foeniculi</i> , and inoculated with <i>C. gloeosporioides</i>	127
Table 4	Physicochemical quality in ‘Palmer’ mango coated with jack fruit (JS) starch at 3% added of fennel essential oil (EO) from seeds from plants attacked and non-attacked by <i>Hyadaphis foeniculi</i> , during ten days of storage at room conditions.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Atividade Antioxidante Total
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	<i>Variance Analysis</i> (análise de variância)
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AT	Acidez Titulável
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> (adenosina trifosfato)
BDA	Ágar batata dextrose
BSA	Bovine Serum Albumin (albumina bovina sérica)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EC50	50% do efeito máximo
EON	<i>Essential oil from non-attacked seeds</i> (óleo essencial de semente não atacada)
EOA	<i>Essential oil from attacked seeds</i> (óleo essencial de semente atacada)
GC	<i>Gas Chromatograph</i> (cromatógrafo gasoso)
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i> (Análise de agrupamento hierárquico)
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
JS	<i>Jackfruit starch</i> (amido de jaca)
LRI	<i>Linear Retention Index</i> (índice de retenção linear)
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i> (Concentração Mínima Inibitória)
MS	<i>Mass Spectrum</i> (espectrômetro de massas)
MUFA	<i>Monounsaturated fatty acids</i> (ácidos graxos monoinsaturados)
NaCl	Cloreto de Sódio
PAL	Phenylalanine Ammonia Lyase (fenilalanina amônio liase)
PCA	<i>Principal Components Analysis</i> (Análise de componentes principais)
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> (ágar batata dextrose)
PET	Polifenóis extraíveis totais
pH	Potencial hidrogeniônico
POD	Peroxidase
PPO	<i>Polyphenol oxidase</i> (polifenoloxidase)
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i> (ácidos graxos poliinsaturados)

ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (espécies reativas de oxigênio)
SDS	Sulfato Dodecil Sódio
SFA	<i>Saturated fatty acids</i> (ácidos graxos saturados)
SS	<i>Soluble solids</i> / Sólidos Solúveis
TA	Titrateable acidity (acidez titulável)
TAA	<i>Total antioxidant activity</i> (atividade antioxidante total)
TEP	<i>Total extractable polyphenols</i> (polifenóis extraíveis totais)
Tris	Trisamina
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico
UI	Unidade de inibição
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	16
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Erva-doce.....	22
2.2 Pulgão <i>Hyadaphis foeniculi</i> (Pass.) (Hemiptera: Aphididae).....	23
2.3 Proteínas e aminoácidos	24
2.4 Enzimas	25
2.5 Inibidores de protease.....	27
2.6 Compostos fenólicos e atividade antioxidante	28
2.7 Ácidos graxos	28
2.8 Compostos voláteis.....	30
2.9 Óleo essencial de erva-doce	32
2.10 Recobrimentos associados a óleos essenciais.....	34
2.11 Amido de semente de jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> L.)	35
2.12 Manga ‘Palmer’	36
2.13 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Semente de erva-doce.....	39
3.2 Óleo essencial de erva-doce	39
3.3 Fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	39
3.4 Manga ‘Palmer’	40
3.5 Recobrimento de amido de semente de jaca em manga ‘Palmer’	41
3.6 Análises químicas da semente de erva-doce.....	43
3.6.1 Perfil de aminoácidos	43
3.6.2 Proteína total.....	43
3.6.3 Proteína solúvel	43
3.6.4 Atividade enzimática da peroxidase – POD	44

3.6.5 Atividade enzimática da polifenoloxidase – PPO	45
3.6.6 Atividade enzimática da fenilalanina amônio liase – PAL.....	46
3.6.7 Ensaio de Inibição de Protease	46
3.6.8 Perfil eletroforético de proteínas	47
3.6.9 Polifenóis extraíveis totais.....	47
3.6.10 Flavonoides amarelos	49
3.6.11 Atividade antioxidante total (AAT) através da captura do radical livre DPPH*	49
3.6.12 Atividade antioxidante total através da captura do radical ABTS ^{•+}	50
3.6.13 Perfil de compostos fenólicos	51
3.6.14 Determinação de lipídeos totais	52
3.6.15 Perfil de ácidos graxos.....	53
3.7 Compostos voláteis do óleo essencial de erva-doce.....	53
3.8 Atividade Antimicrobiana (<i>in vitro</i>) do óleo essencial de erva-doce	54
3.9 Ensaio de proteção em manga ‘Palmer’	55
3.10 Análises físicas e físico-químicas na manga ‘Palmer’	56
3.10.1 Firmeza	56
3.10.2 Acidez Titulável (AT)	56
3.10.3 Sólidos Solúveis (SS)	56
3.10.4 Relação SS/AT	56
3.10.5 pH	56
3.11 Análises Estatísticas	57
4. REFERÊNCIAS.....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
ARTIGO 1: Profiles of amino acid, proteins, phenolic, fatty acids and antioxidant activity of fennel seeds attacked and not attacked by aphids (<i>Hyadaphys foeniculum</i>)	70
ARTIGO 2: Inhibitory effects of coatings containing jackfruit starch and essential oil from fennel (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.) seeds on postharvest anthracnose in ‘Palmer’ mango fruit	100
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	131

1. INTRODUÇÃO

A erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.) é uma planta aromática perene (UUSITALO et al., 2016) que tem grande utilização na indústria médica, farmacêutica, química e de alimentos (SHOJAIEFAR et al., 2015; CHRANIOTI; TZIA, 2014). Trata-se de uma cultura com grande importância econômica, utilizada e comercializada internacionalmente há séculos, devido as suas propriedades terapêuticas e alimentares (IZADI-DARBANDI et al., 2013; CHITTORA; VEER, 2013; GROVER et al., 2013).

Todas as partes da planta são utilizadas, incluindo hastes, raízes, folhas, inflorescências e sementes, secas ou frescas (SHOJAIEFAR et al., 2015). As sementes da erva-doce são largamente utilizadas como aromatizantes para condimentos, perfumes e licores (ABDEL-WAHHAB; FAWZIB; MANNAA, 2016), além de desempenharem um papel importante na dieta, através do consumo em saladas, sopas, cozidos, grelhados e chás (BARROS; CARVALHO; FERREIRA, 2010). A erva-doce é utilizada tradicionalmente para fins medicinais, sendo recomendada para tratamentos nos sistemas digestivo, endócrino, reprodutivo e sistema respiratório (UUSITALO et al., 2016).

Plantas com propriedades medicinais são produtoras de metabólitos secundários, que são úteis para a saúde de humanos e animais (DADKHAH, 2013; RATHER et al., 2012; KAUR; ARORA, 2010; OLLE; BENDER, 2010). A erva-doce possui metabólitos importantes como aminoácidos, compostos fenólicos, fenilpropanóides e ácidos graxos (MOSER et al., 2014) e tem sido explorada na neutralização de espécies de radicais envolvidos no estresse oxidativo, associados a diversas doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares (BARROS et al., 2009).

No estado da Paraíba esta cultura é de grande importância social na agricultura familiar (MALAQUIAS et al., 2014; RAMALHO et al., 2012a; RAMALHO et al., 2015). Entretanto, apresenta susceptibilidade ao ataque de pragas, como o pulgão *Hyadaphis foeniculi* (Pass.) (Hemiptera: Aphididae), que suga a seiva desta planta, resultando na desidratação das flores, frutos e folhas, diminuindo assim seu tamanho e consequentemente o rendimento das sementes e óleos essenciais (MALAQUIAS et al., 2015; MALAQUIAS et al., 2014; FERNANDES et al., 2013; RAMALHO et al., 2015). No caso do óleo essencial de erva-doce, que é composto por vários monoterpenos e fenilpropanóides, sendo o trans-anetol, estragol, fenchone e limoneno, componentes do aroma e sabor (ABDEL-WAHHAB; FAWZIB; MANNAA, 2016; SHOJAIEFAR et al., 2015), podem ser alterados com o ataque de pragas como o pulgão, levando a modificação da qualidade de óleos essenciais de erva-

doce. Entretanto, os efeitos isolados do ataque do pulgão nos conteúdos de aminoácidos, expressão de enzimas do metabolismo secundário, perfil dos compostos fenólicos, perfil de ácidos graxos e nos compostos voláteis das sementes ainda não foram avaliados.

A semente e o óleo essencial de erva-doce têm sido utilizados devido as suas atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica e inseticida (CALEJA et al., 2015) e na manutenção da qualidade pós-colheita de frutos como a manga (*Mangifera indica*), através da associação com recobrimentos biodegradáveis (LIMA et al., 2012; AZERÊDO et al., 2016). Dentre as diversas fontes possíveis para a utilização em recobrimentos biodegradáveis, o amido proveniente de semente de jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.) é uma fonte alternativa e renovável para formulação destes recobrimentos, pois é um polímero com propriedades favoráveis para formação de géis e emulsões (NAYAK; PAL, 2015).

A manga ‘Palmer’ tem grande importância para exportação, porém um dos principais fatores para esta cultivar é a sua alta perecibilidade, que resulta em elevadas perdas pós-colheita (TRINDADE; LIMA; ASSIS, 2015). Um dos desafios na pós-colheita destes frutos é o controle de antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (KAMLE et al., 2013). O óleo essencial de erva-doce apresenta potencial no controle de doença na pós-colheita de manga (LIMA et al., 2012). Porém, sua aplicação direta pode causar necrose nos frutos, assim, a associação do óleo essencial de erva-doce à recobrimentos a base de amido, é uma alternativa de aplicação, sendo o amido de semente de jaca uma opção para utilização na pós-colheita de mangas.

Diante das características nutricionais, propriedades bioativas e da importância socioeconômica estratégica do cultivo da erva-doce no Estado da Paraíba, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do ataque do pulgão *H. foeniculi* na qualidade das sementes e do óleo essencial de erva-doce, oriundos de plantas não atacadas e atacadas, em termos de perfil de aminoácidos, conteúdos de proteínas totais, proteínas solúveis, perfil eletroforético de proteínas, atividade de enzimas do metabolismo secundário, inibição de protease, polifenóis extraíveis totais, flavonoides amarelos, capacidade antioxidante, perfil de compostos fenólicos, perfil de ácidos graxos e perfil de compostos voláteis, bem como avaliar a potencialidade de cada óleo essencial como agente antifúngico ao patógeno *C. gloeosporioides*, *in vitro* e na proteção da manga ‘Palmer’ contra antracnose, através da sua associação com amido de semente de jaca.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Erva-doce

A erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.), é cultivada em todo o mundo por sua característica aromática, representando uma das espécies mais importantes de plantas do gênero *Foeniculum*. A espécie apresenta uma grande diversidade morfológica e química, onde duas subespécies (*piperitum* e *vulgare*) e três variedades (*vulgare*, *dulce* e *azoricum*), têm sido descritas na literatura (GUDI et al., 2014).

A erva-doce, é uma erva anual, bienal ou perene pertencente a família Apiaceae (=Umbelliferae) (SHOJAIEFAR et al., 2015), que é caracterizada por possuir plantas aromáticas, principalmente com hastes ocas e muitas flores, possuindo mais de 3.700 espécies e 434 gêneros. Esta planta chega a alcançar 2,5 m de altura, com folhas leves que chegam a 40 cm de comprimento e as flores são produzidas em umbelas, onde cada seção possui de 20 a 50 pequenas flores amarelas, o fruto é uma semente seca marrom acinzentada ou esverdeada com ranhuras, que possui de 4 a 10 mm de comprimento e 1,5 a 2 mm de largura (IZADI-DARBANDI et al., 2013; CHITTORA; VEER, 2013; GROVER et al., 2013; RATHER et al., 2012; CSERNI; HUVELY; PETO, 2011; KAUR; ARORA, 2010).

A cultura da erva-doce é nativa da região do sul da Europa e região do Mediterrâneo, sendo bastante produzida em várias partes do mundo (IZADI-DARBANDI et al., 2013; SHOJAIEFAR et al., 2015) e foi introduzida no Brasil durante a colonização, onde rapidamente se espalhou nos estados da Bahia, Sergipe, Paraíba e Pernambuco (MALAQUIAS et al., 2014; FERNANDES et al., 2013; RAMALHO et al., 2015).

Na preparação de alimentos, a semente e o óleo essencial podem ser utilizados como chá, na preparação de saladas, na melhoria do *flavor* dos alimentos, como pães, sopas, molhos, tortas, pickles, queijo, produtos cárneos, peixes, assados, sorvetes, doces, bebidas alcoólicas e condimentos (IZADI-DARBANDI et al., 2013; GROVER et al., 2013; HASHMI et al., 2012; RATHER et al., 2012).

No uso medicinal, a erva-doce é utilizada para a fabricação de drogas para produção de antiinflamatórios, analgésicos e colírios. É amplamente utilizada como tratamento carminativo, tanto em humanos como em medicina veterinária, tratamento de tosse crônicas, hipertensão, anemia, doenças de pele, náuseas, glaucoma, cólicas, câibras etc. A indústria de cosméticos utiliza a erva-doce na produção de perfumes e sabonetes (DADKHAH, 2013;

BISHR et al., 2012; DAMAYANTI; SETYAWAN, 2012; HASHMI et al., 2012; KAUR; ARORA, 2010).

Segundo Rather et al. (2012), a composição química para *F. vulgare*, tem sido reportada com 9,5% de proteína, 10% de lipídeos, 13,4% de minerais, 18,5% de fibras e 42,3% de carboidratos. Os minerais e vitaminas presentes são cálcio, potássio, sódio, ferro, fósforo, tiamina, riboflavina, niacina e vitamina C.

Devido a grande importância econômica da erva-doce, tem-se investido cada vez mais em estudos sobre a forma de produção (DADKHAH, 2013; HASHMI et al., 2012), desenvolvimento de genótipos que tenham maior rendimento de semente e de óleo essencial, além de melhorias nas técnicas de extração e encapsulação do óleo essencial (CHRANIOTI; TZIA, 2014), a fim de manter suas propriedades características (SEMİZ et al., 2012; ORMEÑO; FERNANDEZ, 2012; CSERNI; HUVELY; PETO, 2011; OLLE; BENDER, 2010; ARRAZ; HASSAN; HAMAD, 2009).

2.2 Pulgão *Hyadaphis foeniculi* (Pass.) (Hemiptera: Aphididae)

O *Hyadaphis foeniculi* (Passerini) (Hemiptera: Aphididae), é considerada uma das maiores pragas de insetos em erva-doce no Brasil (MALAQUIAS et al., 2015; RAMALHO et al., 2012b), agindo sugando a seiva, provocando o murchamento e desidratação das flores, folhas e frutos e produzindo uma secreção que favorece o desenvolvimento do fungo *Capnodium* spp, que conduz a formação de fumagina, que por sua vez prejudica a transpiração, reduzindo a fotossíntese e enfraquecendo a planta, consequentemente o rendimento de sementes e óleos essenciais, causando um impacto econômico negativo (RAMALHO et al., 2015). A figura 1 mostra o ataque do pulgão na inflorescência e haste da erva-doce.

No estado da Paraíba, o *H. foeniculi*, normalmente se reproduz durante os períodos quentes, formando colônias dentro das flores das plantas de erva-doce (RAMALHO et al., 2015) e uma das formas de controle é a aplicação de meios químicos, porém, quando aplicado no período não adequado, torna-se ineficiente (MALAQUIAS et al., 2014; FERNANDES et al., 2013).



Figura 1: Pulgão na erva-doce.

Fonte: Autoria própria

No Nordeste brasileiro, especialmente no estado da Paraíba, uma das formas alternativas de cultivo da erva-doce é o consórcio com outras culturas, como a do algodão de fibra colorida (*Gossypium hirsutum* Linné). Este consórcio contribui com a redução de cerca de 80% dos danos causados por *H. foeniculi*, devido à diminuição da população do pulgão por planta, proporcionado pela concentração de recursos e ataque de inimigos naturais (FERNANDES et al., 2013; MALAQUIAS et al., 2010; RAMALHO et al., 2012b).

2.3 Proteínas e aminoácidos

As proteínas são formadas por aminoácidos e podem se diferenciar significativamente de acordo com o sistema biológico (ILISZ et al., 2012) e são um dos maiores e mais importantes componentes químicos vegetais, atuando como uma importante fonte de energia, nitrogênio e aminoácidos essenciais para a dieta humana (SFORZA; TEDESCHI, 2016). Porém, pouco se conhece sobre o perfil proteico e comportamento enzimático de espécies vegetais, e a quantificação de proteínas é a primeira etapa para fornecer bases científicas para a caracterização de materiais vegetais, bem como ampliar o uso comercial (AKASHA et al., 2016).

Aminoácidos são substâncias indispensáveis na saúde humana, atuando na síntese das proteínas que são componentes de vários tipos de alimentos. A dieta com a ingestão de aminoácidos atua no crescimento, ação antioxidante, estabilizadores de DNA e RNA, reguladores do metabolismo de nutrientes e hormonal, e como mensageiros secundários (GUO et al., 2015). Bihuniak; Insogna (2015) reportaram que a dieta com proteínas e aminoácidos de fonte animal ou vegetal, é necessária para o crescimento e maturação óssea, influenciando na formação de colágeno e beneficiando no metabolismo de minerais.

Existem 20 aminoácidos verdadeiros utilizados na biossíntese das proteínas, precursores para o anabolismo e em alguns casos que atuam como intermediários metabólicos na molécula de sinalização em mamíferos e plantas (BORDES; HOLMBERG, 2015). São divididos em duas classes, os essenciais e não essenciais. Os essenciais são aqueles que não podem ser sintetizados por seres humanos, portanto, plantas como legumes, frutas e sementes, são uma fonte importante desses aminoácidos (HÄUSLER; LUDEWIG; KRUEGER, 2014).

Em vegetais, os aminoácidos participam da regulação do crescimento de plantas e podem ter variabilidade química associada a vários fatores, tais como período da colheita, processamento e condições de armazenamento, influenciando na qualidade de produtos vegetais, como o sabor (SONG et al., 2013). Os aminoácidos podem ser alterados por fatores bióticos, como ataque de pragas, e abióticos, como deficiência nutricional e representam um importante papel como sinalizador celular e metabólico intermediário em diversas vias (HÄUSLER; LUDEWIG; KRUEGER, 2014). El-Awadi; Hassan (2010) reportaram que em erva-doce o triptofano e a metionina, promovem a biossíntese de pigmentos fotossintéticos, compostos fenólicos e quantidade total de proteína, em condições de estresse abiótico.

A determinação do perfil de aminoácidos fornece importantes informações nutricionais de produtos vegetais, bem como, podem influenciar no perfil proteico (ARISTOY; TOLDRA, 2016).

2.4 Enzimas

As enzimas são um tipo específico de proteína, que desempenham atividade catalizadora, são macromoléculas que estão relacionadas com diversas reações metabólicas envolvidas em todos os processos vitais em seres vivos (TALENS-PERALES; MARÍN-NAVARRO; POLAINA, 2016). Existem enzimas que estão diretamente relacionadas com o metabolismo secundário, como a peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e a fenilalanina amônio liase (PAL).

A enzima peroxidase, é comum em plantas e está envolvida em uma ampla gama de funções fisiológicas, incluindo do metabolismo do peróxido de hidrogênio, reticulação dos componentes da parede celular e mecanismos de defesa da planta (JIANG; PENNER, 2015). A figura 2 mostra a ação da peroxidase durante o processo de defesa na planta.

A enzima polifenoloxidase é responsável pelo escurecimento de materiais vegetais e é acionada principalmente em condição de estresse. Sua ação é devido a catalização dos compostos fenólicos em quinonas altamente reativas que polimerizam a melanina, que é responsável pela cor escura. Em algumas plantas, a PPO também pode catalisar a hidroxilação dos monofenóis a ortodifenóis, seguido pela oxidação mais comum de ortodifenóis a ortoquinonas. A PPO está envolvida na cicatrização de feridas, na defesa contra patógenos e vários outros processos celulares, tais como o controle dos níveis de oxigênio nos cloroplastos (CHEEMA; SOMMERHALTER, 2015).

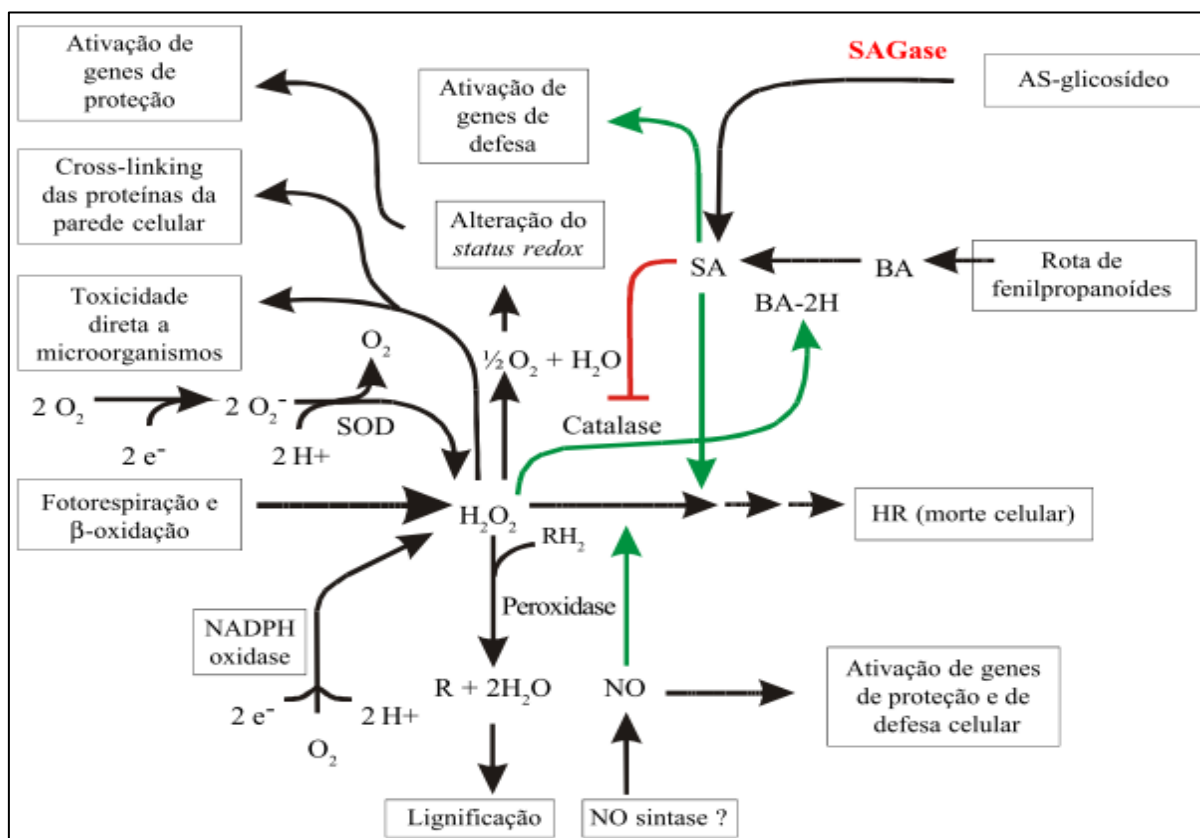


Figura 2: Interconexões do H_2O_2 , óxido nítrico (NO) e ácido salicílico (AS) para a ativação e coordenação das múltiplas reações de defesa das plantas. SOD (superóxido dismutase), SAGase (AS glicosiltransferase) e BA-2H (ácido benzóico 2-hidrolase).

Fonte: Resende; Salgado; Chaves (2003)

A enzima fenilalanina amônio liase (PAL), é a primeira enzima que entra na biossíntese de fenilpropanóides, desviando carbono a partir do metabolismo primário para a síntese de fenóis e sua atividade é bastante acentuada durante estímulos ambientais, como o ataque de patógenos, ferimento do tecido, irradiação UV, exposição a metais pesados, temperaturas baixas, etc. (ZHANG; LIU, 2015). A atividade desta enzima é promovida pela conversão de L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, que é transformado em fenol por uma série de reações enzimáticas (CHENG et al., 2015).

2.5 Inibidores de protease

Proteases são enzimas importantes em resposta na defesa plantas atacadas por insetos, que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas. As plantas acumulam inibidores de protease em seus vários tecidos, o qual uma das suas funções é a defesa contra insetos, atuando na inibição das proteinases digestivas da larva, prejudicando a ingestão de aminoácidos, retardando o seu crescimento (PADUL; TAK; KACHOLE, 2012).

Inibidores de proteases são proteínas de baixo e alto peso molecular, encontrados em altas concentrações em sementes, inibem tripsina, quimiotripsina, amilase e carboxipeptidase, reduzindo a digestibilidade de proteínas e absorção de aminoácidos (MATUDA; MARIA NETTO, 2005). Portanto, os inibidores de tripsina classificam-se como fatores antinutricionais, assim como as lectinas, fitatos, taninos, glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos, glicoalcalóides, flatulentos e aflatoxinas (BIJINA et al., 2011).

Os inibidores de protease têm papel importante na regulação de muitos processos biológicos e sua função principal é limitar a atividade das proteínas, tanto aquelas que tem amplas ações proteolíticas, tais como enzimas digestivas e os fatores de virulência de organismos patogênicos e aqueles com substratos específicos, tais como as proteases de componentes de cascatas de sinalização (GUBB et al., 2010; MOLINA et al., 2014).

No entanto, estudos em biotecnologia vem apontando os inibidores de proteases, como uma alternativa para hidrólise específica de proteínas, mudando propriedades nutricionais, bioativas e funcionais de proteínas alimentares, que incluem melhor digestibilidade, modificações na qualidade sensorial, capacidade antioxidantes ou redução de compostos alergênicos (TAVANO, 2013). Oliveira et al. (2013), apontam os inibidores de protease como alternativa para fabricação de inseticidas.

2.6 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Em *F. vulgare*, os compostos fenólicos representam importantes fitoquímicos desta espécie, os quais contêm ácidos fenólicos, glicosídeos fenólicos e flavonoides no extrato aquoso das sementes, que estão associados a prevenção de doenças que são induzidas pelo estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares, câncer e inflamação (GROVER et al., 2013; RATHER et al., 2012).

Os compostos fenólicos são derivados da via do ácido chiquímico ou ácido malônico. Por fim, os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são também derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (PERES, 2012).

Os flavonoides são uma classe de pigmentos muito presente em frutas e hortaliças, que apresentam efeito biológico, pois atuam na ação antioxidante. Os compostos fenólicos possuem forte atividade na eliminação de radicais livres e podem reduzir o estresse oxidativo, tais como a peroxidação lipídica, que está associada ao envelhecimento precoce e doenças cardiovasculares, câncer, aterosclerose, diabetes e inflamações (ABDEL-WAHHAB; FAWZIB; MANNAA, 2016).

2.7 Ácidos graxos

Os óleos de sementes ricos em ácidos graxos ω -3, especificamente o ácido linolênico que é o principal componente desta família, incluem soja, canola e linhaça (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMMA, 2010), mas em sementes de erva-doce este ácido graxo também já foi identificado (BARROS et al., 2010; MOSER et al., 2014). O ácido linoléico é abundantemente encontrado na natureza, presente em sementes de muitas plantas, bastante comum em óleo de cozinha como milho e girassol (RUIZ-RODRIGUEZ; REGLERO; IBÁÑEZ, 2010).

A Figura 3 representa o esquema geral da biossíntese de ácidos graxos em plantas. A síntese dos ácidos graxos saturados procede de 2 unidades de carbono por ciclo, geralmente de 8 a 9 vezes para produzir de 16 a 18 produtos de carbono. A abundância relativa de cada PUFA (ácidos graxos poli-insaturados) C18 em tecidos de plantas é alta devido a diferença da atividade de enzimas de dessaturação presentes em cada espécie, o qual é geneticamente regulada. Embora poucas plantas tenham 6 atividades de dessaturações, algumas espécies são

produtoras de GLA (ácido γ -linolêico). A partir destes dois últimos PUFAs, param as vias metabólicas em plantas superiores, ou seja, faltam enzimas necessárias para o alongamento de PUFAs C20-22, assim existindo EPA (ácido eicosapentanóico), DHA (ácido docosahexanóico) e AA (ácido araquidônico) (GUIL-GUERRERO, 2014).

Em óleos de semente, utilizados para consumo alimentício, a análise de ácidos graxos tem sido aplicada para determinar a qualidade e autenticidade dos óleos, além de caracterizar fontes de ácidos graxos essenciais de interesse na indústria farmacêutica (SEÑORÁNS; IBAÑEZ, 2002). A composição de ácidos graxos, já foi relacionada à resistência de doenças pós-colheita em frutos durante armazenamento, referindo-se aos ácidos linoleico e linolênico, confirmando sua sinalização molecular na defesa contra doenças (CAO et al., 2014).

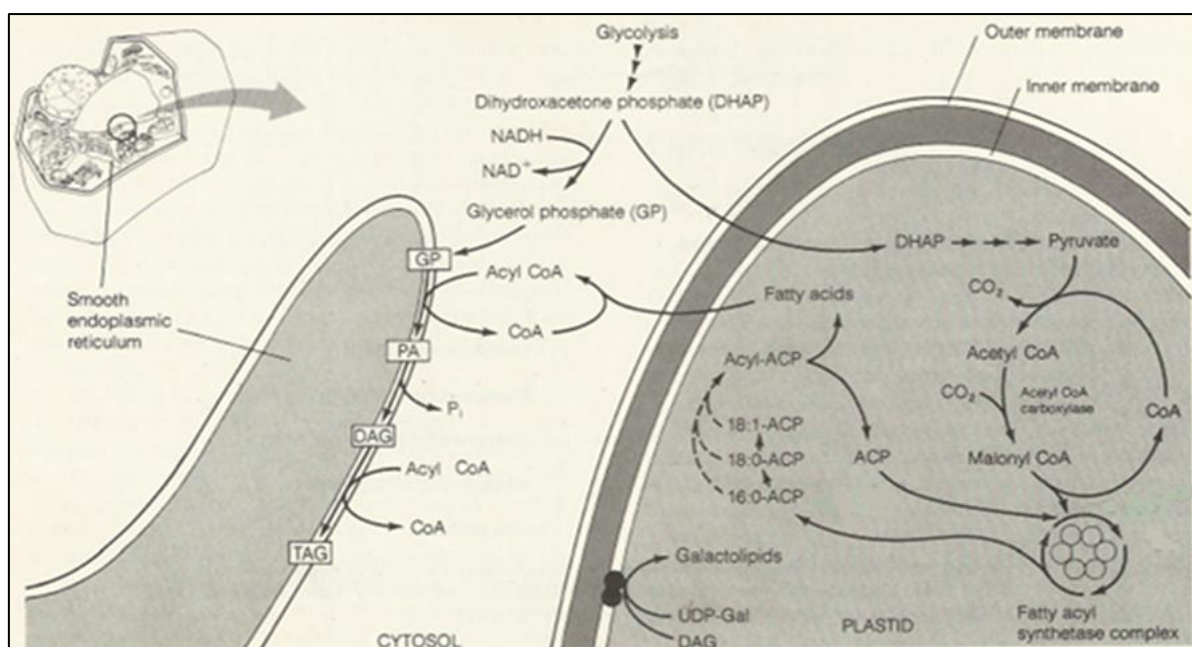


Figura 3: Biossíntese de ácidos graxos e triacilgliceróis (TAG) em plantas superiores. Biossíntese de ácidos graxos envolve uma complexa série de enzimas localizadas no cloroplasto, conduzindo a síntese de ácidos graxos saturados (C16 e C18) e de ácidos graxos monossaturados (C18). A formação dos triacilgliceróis ocorre no citosol nas membranas retículo endoplasmático, onde as insaturações dos ácidos graxos são formadas.

Fonte: Taiz; Zeiger (1991).

Os procedimentos para análise dos ácidos graxos envolvem várias etapas, como a extração de lipídeos da amostra, que geralmente baseia-se no método de Folch; isolamento do ácido graxo do restante dos lipídeos por cromatografia em camada fina e/ou extração em fase sólida; derivatização dos ácidos graxos para ésteres metílicos (FAMES); e extração dos FAMES para determinação cromatográfica, a qual é realizada principalmente por

cromatografia gasosa ou por cromatografia líquida (RUIZ-RODRIGUEZ; REGLERO; IBÁÑEZ, 2010; FUCHS et al., 2011).

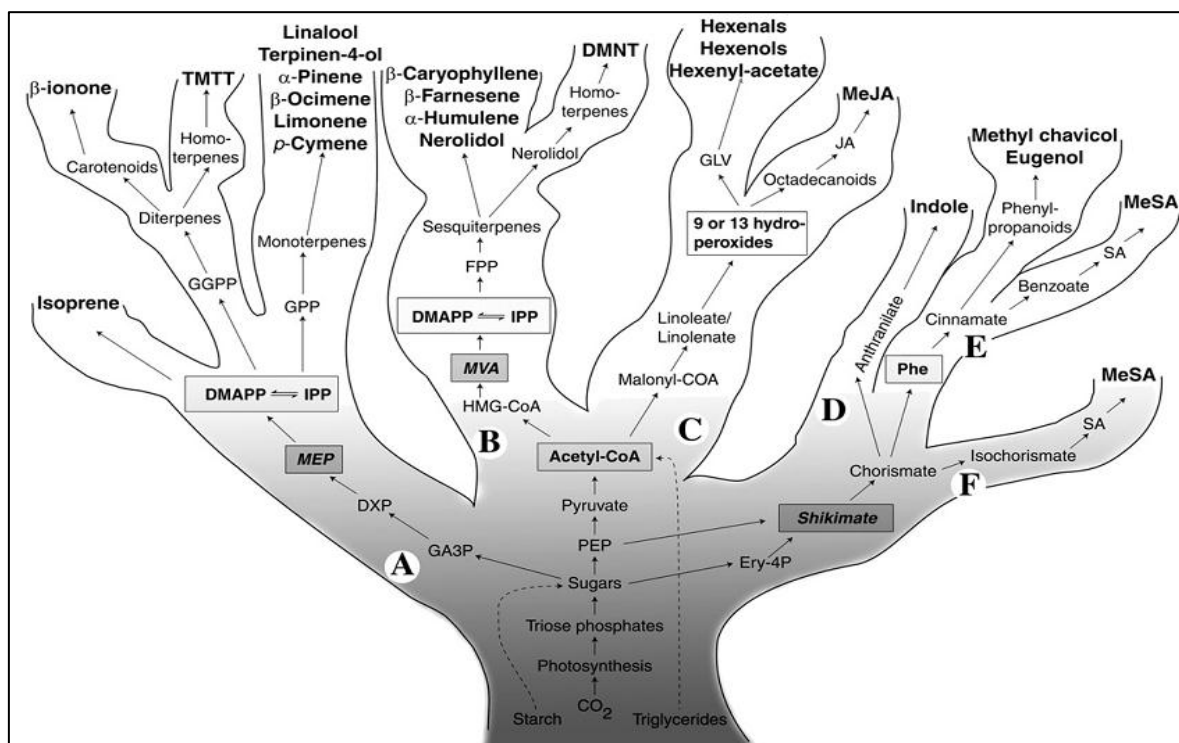
2.8 Compostos voláteis

Os compostos voláteis de plantas ocorrem tipicamente como uma mistura complexa de compostos lipofílicos de baixo peso molecular derivados de diferentes vias biossintéticas, e que são aparentemente produzidos como parte de uma estratégia de defesa contra o estresse biótico e abiótico, bem como para contribuir para várias funções biológicas da planta (MAFFEI; GERTSCH; APPENDINO, 2011). Estes compostos desempenham importância fundamental no crescimento e desenvolvimentos dos vegetais, como defesa contra insetos e pragas, e contra microrganismos patogênicos (YANG; WANG, 2013).

Os compostos voláteis podem ser representados pelos fenilpropanóides, que são compostos aromáticos derivados dos fenilpropanos; ou terpenos, que são compostos de baixo peso molecular e na maioria das vezes cíclicos, os quais estão abundantemente presentes em óleos essenciais. Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades C₅, chamadas isopreno, onde os compostos que possuem uma unidade são chamados de hemiterpeno, duas unidades (C₁₀), como monoterpeno e três unidades (C₁₅), sesquiterpeno. Existem ainda os diterpenos (C₂₀) e os triterpenos (C₃₀). Os terpenos que contém oxigênio são chamados terpenóides (ORMEÑO; FERNANDEZ, 2012; BAKKALI et al., 2008).

Além disso, os compostos voláteis são responsáveis por sabores de muitos condimentos e ervas, sendo biossintetizados por meio da via isoprenóide, onde o ácido mevalônico de cinco carbonos é o precursor obrigatório desta via. Estes compostos costumam gerar impacto de aroma extremamente forte, sendo muitos identificados com facilidade, possuindo muitos isômeros que podem gerar características bastante diferenciadas (MAFFEI, 2010).

A Figura 4 representa o volatiloma, apresentando a biossíntese de compostos orgânicos voláteis, que são produzidos por diferentes rotas bioquímicas. A exemplo, a via MEP (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate), que dá origem a formação dos monoterpenos e diterpenos. Os últimos são precursores dos homoterpenos TMTT (4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene) e do derivado de carotenoide, β -ionano. Isopreno é gerado a partir de DMAPP (dimethylallyl diphosphate). Os Sesquiterpenóides são gerados por FPP (farnesyl diphosphate), derivados a partir da via MVA (mevalonato) citosólica. Os homoterpenos DMTT derivam de sesquiterpenos nerolidol. Os oxilipídeos são gerados a partir de ácidos



Fonte: Maffei (2010).

Os principais processos de extração de óleos essenciais são extração por fluido supercrítico, extração por solvente, ultrassom, extração assistida por microondas e hidrodestilação (DAMAYANTI; SETYAWAN, 2012; MOSER et al., 2014).

Sistemas de hidrodestilação, ou arraste a vapor, são comumente utilizados para extração de óleo essencial em sementes e flores (MEKNI et al., 2013, HUANG et al., 2011; MAIWULANJIANG et al., 2014). O vapor passa através de uma armadilha que permite remover do condensador qualquer partícula que possa sair da linha. Esta técnica é simples e fácil, onde o vapor e os voláteis são condensados em uma série de armadilhas arrefecidas, com uma sucessão de agentes refrigerantes, variando de água gelada, para acetona gelada ou metanol (SAMEJO et al., 2013).

2.9 Óleo essencial de erva-doce

Óleos essenciais são metabólitos secundários voláteis com aplicações em perfumes, cosméticos, sabonetes, incenso, aromaterapia, aroma de alimentos, bebidas e produtos de limpeza, além de exercerem atividades antioxidantes e biológicas, como agentes bactericidas, viricida, fungicida, antiparasitários e inseticidas (MOSER et al., 2014).

A erva-doce é uma planta aromática e o óleo essencial extraído das suas sementes é o principal produto. Dentre as diversas características deste óleo essencial, a atividade antioxidante é uma das possibilidades de estudo, pois possui capacidade antimicrobiana (ROBY et al., 2013).

Segundo Chittora; Veer (2013), a espécie *F. vulgare*, é conhecida pela característica da semente doce e seu óleo essencial é composto principalmente dos componentes que são derivados de fenilpropanóides, que são o trans-anetol e estragol, seguido pelos terpenos limoneno, fenchone e α pineno (Figura 5). A composição do óleo essencial contribui para os efeitos farmacológicos da erva-doce e seu rendimento médio varia de 3 a 6 % em frutos maduros (GROVER et al., 2013; SEMÍZ et al., 2012; OLLE; BENDER, 2010).

A qualidade da erva-doce é determinada pelo conteúdo de anetol (DAMAYANTI; SETYAWAN, 2012). O *trans*-anetol, na maioria das vezes é o componente mais prevalente na composição do óleo essencial de erva-doce, possuindo o sabor característico de anis, o fenchone caracteriza o sabor amargo e o estragol (metil cavicol), caracteriza o sabor doce (ABDEL-WAHAB; FAWZIB; MANNAA, 2016). Porém, o estragol em altas doses, é considerado carcinogênico e mutagênico (UUSITALO et al., 2016).

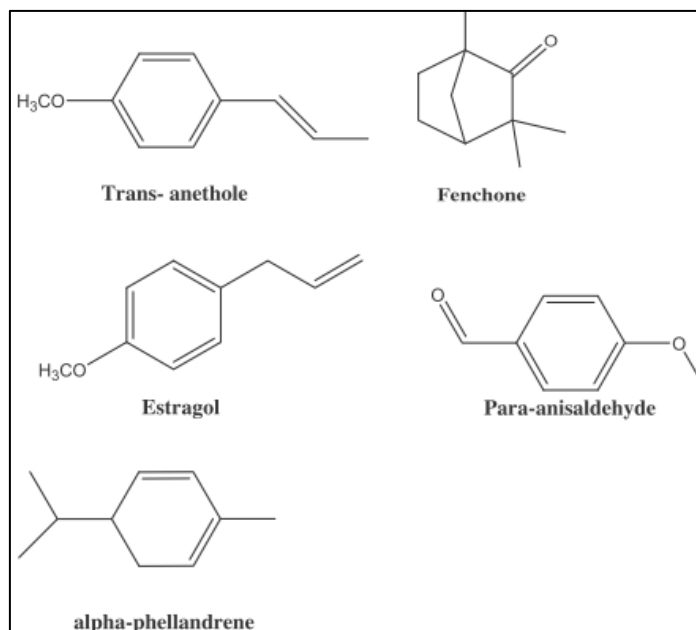


Figura 5: Estrutura molecular dos principais componentes bioativos do óleo essencial de *Foeniculum vulgare*.

Fonte: RATHER et al., 2012

O aroma característico da erva-doce e, portanto, seus princípios ativos, podem ser encontrados em todas as partes da planta (raízes, caule, brotos, flores e frutos) e a variação da composição do óleo essencial depende dos fatores ambientais, práticas agrícolas, época de colheita, fatores bióticos e abióticos que afetam a planta, como estágio de maturação, genética e condições ecológicas, ou ainda, os métodos de extração do óleo essencial e sua origem geográfica (GROVER et al., 2013; RATHER et al., 2012; GÓMEZ-ESTACA et al., 2010).

O óleo essencial de *F. vulgare*, possui propriedades antibacterianas (GROVER et al., 2013), antifúngica (KAUR; ARORA, 2010), antiinflamatória, analgésica e antioxidante (ABDEL-WAHAB; FAWZIB; MANNAA, 2016). Em vários estudos, a utilização do óleo essencial de erva-doce já confirmou a diminuição ou inibição do crescimento micelial e germinação de fungos fitopatogênicos como *Aspergillum niger*, *Aspergillum flavus*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium moniliforme* (JOUKI et al., 2014; TAVARES et al., 2010).

Segundo Bakkali et al. (2008), a citotoxicidade do óleo essencial no microrganismo, depende do estado de crescimento celular e divisão de células, sendo mais eficaz nos locais de brotamento. Em geral a citotoxicidade é devido a presença de fenóis, aldeídos e alcóois.

2.10 Recobrimentos associados a óleos essenciais

Os estudos sobre a utilização de produtos naturais para o controle de doença pós-colheita, têm mostrado resultados promissores como o desenvolvimento de fungicidas naturais (MATTIUZ et al., 2015) e a aplicação de recobrimentos associados à óleos essenciais (LIMA et al., 2012; AZERÊDO et al., 2016), os quais são mais seguros para humanos e meio ambiente.

Produtos naturais podem apresentar um efeito antimicrobiano, agindo diretamente contra fitopatógenos através da inibição do crescimento micelial, produção e germinação de esporos, devido a presença de moléculas bioativas, que também podem atuar como indutores de resistência que são capazes de induzir ou ativar os mecanismos de defesa da planta (MATTIUZ et al., 2015).

Os revestimentos naturais atuam na formação de uma barreira seletiva para a troca gasosa, resultando na redução do metabolismo dos frutos e prolongando a sua vida pós-colheita, diminuindo a perda de peso durante o armazenamento e transporte, principalmente devido às propriedades de resistência mais elevada de vapor de água (FALGUERA et al., 2011).

A utilização de óleos essenciais nos revestimentos naturais de matrizes poliméricas, ajuda a retardar a taxa de difusão de agentes antimicrobianos, deixando os compostos ativos mais concentrados quando há um contato com a superfície do fruto. Este método de aplicação através da incorporação do óleo mais benéfico do que a aplicação por pulverização, devido a redução do inóculo dos fitopatógenos (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

Filmes biodegradáveis associados a óleos essenciais já produziram efeito contra patógenos, como *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer* que foram inibidos em tomate cereja quando tratados com recobrimentos com associação de óleos essenciais e quitosana (GUERRA et al., 2015).

O crescimento de *R. stolonifer* e *A. niger* em uvas (*Vitis labrusca* L.) foi inibido através da aplicação de revestimento com quitosana associada a óleo essencial de orégano (SANTOS et al., 2012). Recobrimento composto por micilagem de semente de marmelo e óleo essencial de orégano apresentou inibição *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera* e *Shewanella putrefaciens* (JOUKI et al., 2014). Revestimentos comestíveis com alginato de sódio adicionados em uma nanoemulsão com óleo essencial de

capim-limão exibiram maior e mais rápida inativação de *Escherichia coli* e na microflora natural quando comparada com emulsões convencionais em maçãs Fuji minimamente, processadas durante duas semanas de armazenamento (SALVIA-TRUJILLO et al., 2015).

Bosquez-Molina et al. (2010), inibiram *in vitro* e *in vivo* o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e *R. stolonifer* tratados como óleos essenciais isolados e incorporados em revestimentos a base de algaroba na aplicação em mamão. A combinação de revestimentos de *Aloe vera* e quitosana com óleo essencial de timol, também aumentou o potencial de redução da incidência de antracnose em abacate (BILL et al., 2014).

2.11 Amido de semente de jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.)

A busca por polissacarídeos naturais de diversas fontes vegetais tem sido cada vez mais estudada, devido as suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta capacidade de inchaço, fácil disponibilidade e baixo custo de extração (NAYAK; PAL; SANTRA, 2014). A aplicação destes polissacarídeos tem usos potenciais na formação de micropartículas, nanopartículas, géis, emulsões e suspensões (NAYAK; PAL; SANTRA, 2015).

A importância da utilização de amidos naturais é justificada pela utilização de recursos renováveis, os quais se cultivados ou colhidos de forma sustentável, pode atender ao fornecimento constante de matérias primas (NAYAK; PAL, 2013a). Assim, faz-se necessário explorar novas fontes para atender as demandas da utilização de polissacarídeos na formação de filmes biodegradáveis para revestimento com associação a óleos essenciais na pós-colheita de frutos.

Os amidos de fonte natural são geralmente extraídos de raízes, tubérculos e cereais, entretanto, sementes de frutos como a jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam., família: Moraceae), que é um fruto tropical popular, normalmente são descartadas durante o processamento ou consumo, apesar de serem fontes de amido (RENGSUTTHI; CHAROENREIN, 2011; KITTIPONGPATANA; KITTIPONGPATANA, 2011; MADRUGA et al., 2014).

O amido de semente de jaca é um dos derivados naturais de plantas que tem potencial para aplicação farmacêutica e na indústria de alimentos (NAYAK; PAL, 2013b). Este amido qual possui características desejáveis à estabilidade ácida e propriedades mecânicas em comparação com amidos comuns (KITTIPONGPATANA; KITTIPONGPATANA, 2011),

apresenta característica de cor branca, rendimento de 18.86%, sem odor e sem sabor, solubilidade em água fria e quente (NAYAK; PAL; SANTRA, 2015).

2.12 Manga ‘Palmer’

A manga (*Mangifera indica* L.) é um fruto subtropical e tropical, consumida na forma fresca e largamente utilizada na indústria de alimentos para a produção de frutas em conservas, geleias e suco concentrado (NARESH et al., 2015). Esta fruta é considerada uma das favoritas no mundo, amplamente aceita pelos consumidores pela sua cor atraente, suculência, aroma agradável, sabor doce e exótico, além de seu valor nutricional, possuindo vitaminas e antioxidantes como carotenoides, compostos fenólicos e ácido ascórbico (MUSHARRAF et al., 2016; SIVANKALYANI et al., 2016).

No Brasil, a manga ‘Palmer’ é uma cultivar norte-americana monoembrionica, sendo uma das principais variedades de exportação, com mercado consolidado nos Estados Unidos e na Europa e sua área cultivada vem expandindo, porém possui rápida perecibilidade, um dos principais fatores responsáveis por perdas pós-colheita (TRINDADE; LIMA; ASSIS, 2015). Esta fruta tem característica de casca roxa e vermelha quando madura e características superiores para o consumo *in natura*. A polpa é amarela, firme, tem sabor agradável, pouca ou nenhuma fibra (SANTOS et al., 2008; PINTO; PINHEIRO NETO; GUIMARÃES, 2011).

A manga é um fruto climatérico que amadurece muito rapidamente em condições climáticas adversas (KHALIQ et al., 2016) e normalmente a sua colheita é no estágio ‘verde maduro’ e seu amadurecimento envolve mudanças nos processos físico-químico e bioquímicos complexos, caracterizado por mudanças de cor de casca e polpa, firmeza e sabor, envolvendo enzimas, açúcares e ácidos (HO et al., 2016).

O período de maturação da manga é curto, afetando seu valor econômico, e para prolongar sua vida de prateleira e reduzir suas perdas, diferentes métodos têm sido utilizados como refrigeração, atmosferas modificadas, revestimento com recobrimentos ou uso de reguladores da maturação, como o 1-methylcyclopropene e o óxido nítrico (VÁZQUEZ-CELESTINO et al., 2016).

2.13 *Colletotrichum gloeosporioides*

A manga por ser um fruto climatérico, torna-se bastante susceptível a infecções de agentes patogênicos, devido a diminuição da resistência da casca e do amaciamento da polpa, aumentando a disponibilidade de água e açúcares (ZHANG et al., 2013).

Entre as doenças pós-colheita, a mais grave é a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, que é o responsável por restringir a produção de manga em todas as regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (HU et al., 2014). O ciclo de vida deste patógeno começa quando os conídios aderem à superfície do fruto, germinam e produzem estruturas de penetração, permanecendo latente até os frutos e os fatores ambientais favorecerem o desenvolvimento da doença e o início dos sintomas, que podem aparecer muito depois das fases iniciais de infecção (BAUTISTA-ROSALES et al., 2014; ZHANG et al., 2013).

A figura 6 apresenta as lesões causadas por *C. gloeosporioides* que muitas vezes se fundem para formar grandes áreas necróticas (KAMLE et al., 2013). O controle da doença é normalmente realizado utilizando produtos químicos, porém, devido aos efeitos nocivos de fungicidas no ambiente e na saúde humana, a aplicação de agroquímicos tem sido reduzida. Além disso, a aplicação química pode induzir o desenvolvimento de resistência do agente patogênico aos ingredientes ativos (SHI et al., 2012), portanto, estratégias de controle alternativo devem ser desenvolvidas.

Em frutos verdes, esta doença atua como uma infecção de repouso e pode manifestar seus sintomas somente durante ou após o processo de amadurecimento, quando as condições para o desenvolvimento de agentes patogênicos são mais favoráveis, resultando em grandes perdas pós-colheita que chegam até 60% em algumas regiões de produção (BAUTISTA-ROSALES et al., 2013).

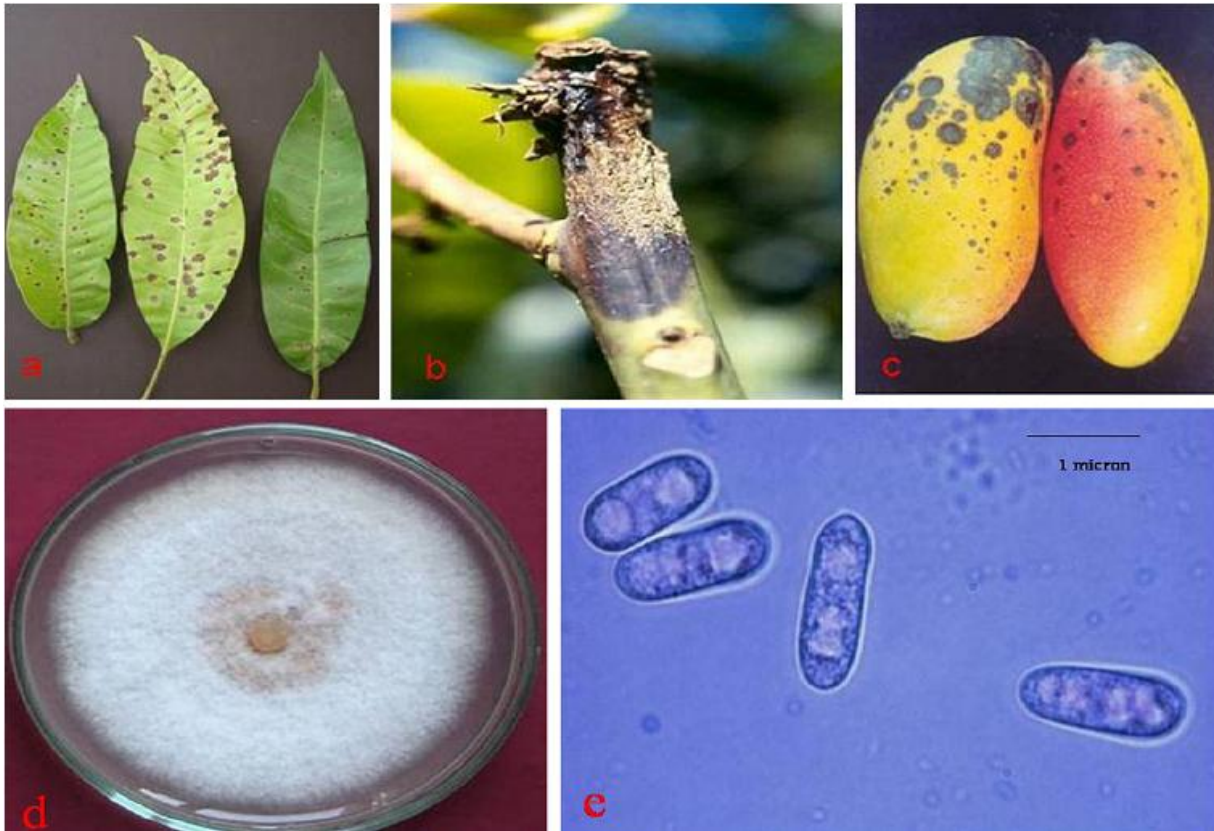


Figura 6. (a) Mancha preta na folha de manga, (b) ponta apical de manga, (C) sintomas de antracnose em frutos de manga, (d) cultura pura de *Colletotrichum gloeosporioides* (e) esporos de *C. gloeosporioides*.

Fonte: Kamle et al., 2013.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Semente de erva-doce

Foram analisadas sementes de erva-doce (*Foenicullum vulgare* Mill), provenientes de plantas não atacadas e atacadas pelo pulgão *Hyadaphys foeniculum*, fornecidas pela Embrapa Algodão, PB (altitude 634 m, S 7°10'5" W 35°51'13") (RAMALHO et al., 2015).



Figura 7. A: semente de erva-doce não atacada pelo pulgão; B: semente de erva-doce atacada pelo pulgão.

Fonte: Autoria própria.

3.2 Óleo essencial de erva-doce

O óleo essencial foi extraído das sementes de erva-doce através da técnica de hidrodestilação a 60 °C, com o sistema de Clevenger, na proporção 1:9 (m:v; massa:água destilada).

3.3 Fungo *Colletotrichum gloeosporioides*

A cepa do fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* foi isolada a partir de mangas com sintomas de antracnose, apresentando lesões necrosadas de coloração marrom escura e formato circular (KAMLE et al., 2013), no Laboratório de Fitopatologia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal da Paraíba, e identificada através das características morfológicas descritas segundo Menezes e Assis (2004). Para a total purificação, discos com

5,0 mm de diâmetro com esporos de *C. gloeosporioides*, foram reisolados consecutivamente para o centro de placas de Petri com meio de cultura Ágar Batata Dextrose e incubados a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h, durante 8 dias, no Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita, Departamento de Ciências Fundamentais e Sociais, Universidade Federal da Paraíba (Figura 8).

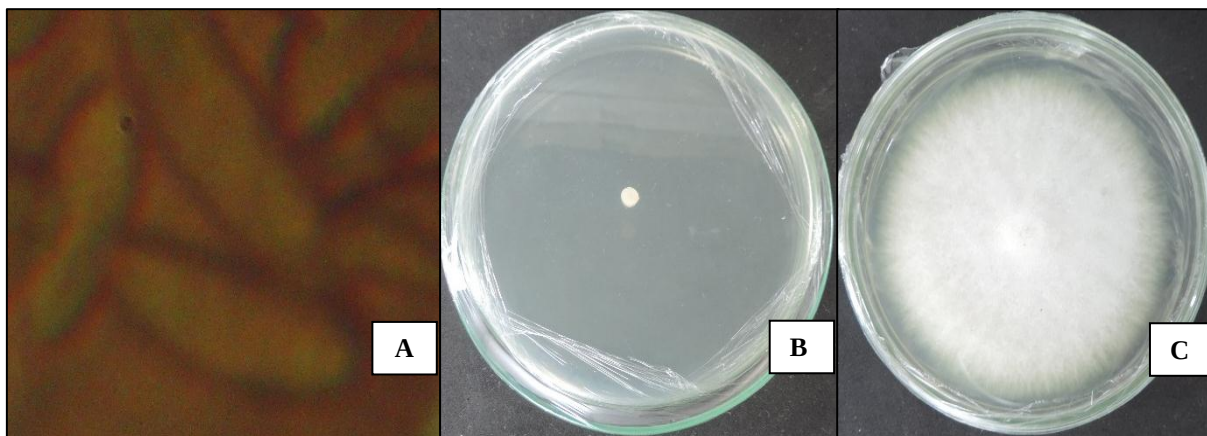


Figura 8. A: Imagem microscópica de esporos de *C Colletotrichum gloeosporioides*; B: disco de 6 mm com esporos de *C. gloeosporioides*; C: crescimento completo de *C. gloeosporioides* após 8 dias.

Fonte: Autoria própria.

3.4 Manga ‘Palmer’

As mangas ‘Palmer’, com padrão comercial de exportação, foram colhidas pela manhã no estágio de maturação ‘3’, caracterizado pela coloração da casca verde amarelada, polpa amarela e sólidos solúveis até 6,5% (EMEX, 1998), em um pomar comercial (09°19'53"S, 40°41'29"W), na cidade de Petrolina-PE. Os frutos foram colhidos com hastes de 3 a 4 cm de comprimento, colocados em caixas de plástico (~15 kg) e transportados para o Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita, UFPB, Areia-PB, onde foram classificados pela uniformidade da cor, forma e tamanho, sendo que as frutas deterioradas ou doentes foram descartadas. Os frutos foram sanitizados como solução de hipoclorito 150 ppm e deixados sob secagem ao ar (Figura 9).

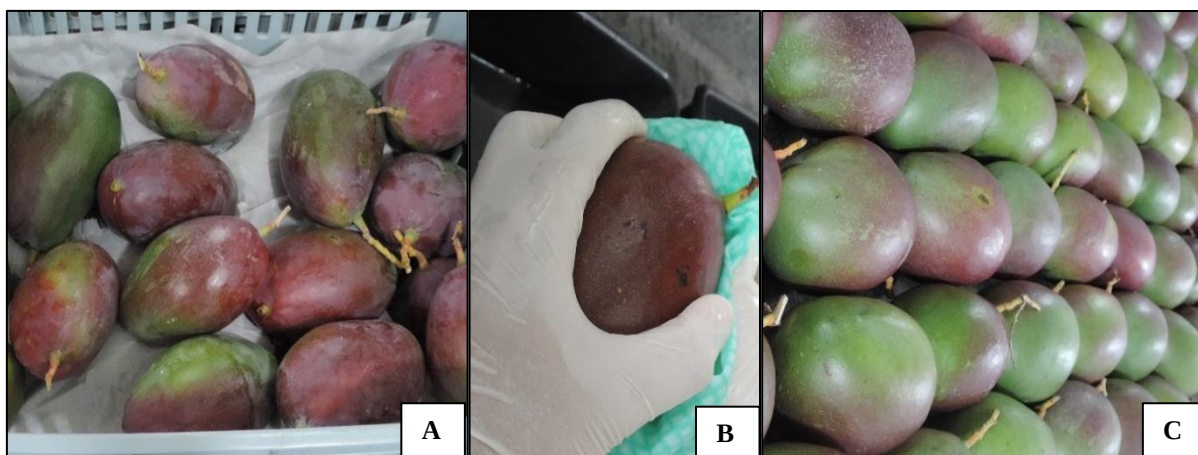


Figura 9. A: colheita da manga ‘Palmer’; B: sanitização da manga ‘Palmer’; C: secagem de manga ‘Palmer’ após sanitização.

Fonte: Autoria própria

3.5 Recobrimento de amido de semente de jaca em manga ‘Palmer’

Frutos de jaca (*Artocarpus heterophyllus*) sadios foram coletados na zona rural do município de Areia-PB e encaminhados ao Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita, Departamento de Ciências Fundamentais e Sociais, Universidade Federal da Paraíba, onde as sementes foram retiradas e colocadas para secar à sombra para eliminação do excesso de látex. Após a secagem foi retirada a película das sementes através de descasque manual, com auxílio de lâminas. Em seguida, as sementes foram sanitizadas com hipoclorito de sódio à 50 ppm e submetidas a uma sequencia de três triturações com água destilada. O amido foi extraído por trituração das sementes de jaca com água destilada, seguida por filtração e 12 h de decantação e, em seguida, liofilizou-se de modo que o teor final de umidade atingiu 10% (RODRIGUES, 2015).

A elaboração do recobrimento de amido de semente de jaca foi através da sua geleificação na concentração de 3% com água destilada à 60 °C. Após o resfriamento da emulsão foi adicionado 1% de glicerina, 0,5% de Tween 20[®] e 0,5% (v/v) de óleo essencial de erva-doce adicionados através de sonicação (Missonix ultrasonic liquid procesors - S4000), durante 3 minutos (Figura 10).

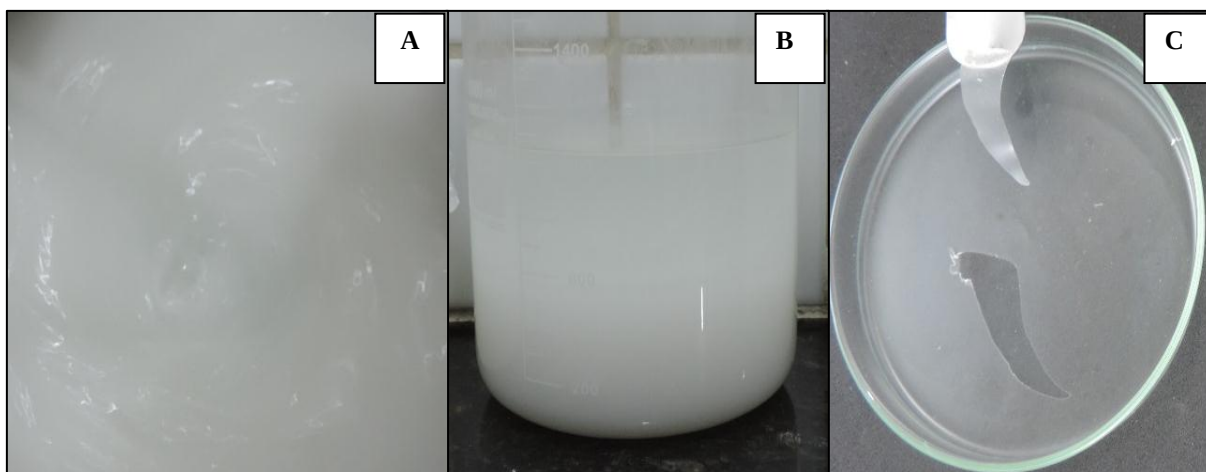


Figura 10. A: formação do recobrimento à base de amido de semente de jaca; B: recobrimento pronto para aplicação; C: demonstração do recobrimento formado.

Fonte: Autoria própria

Após a secagem, as mangas foram imersas durante 1 minuto no recobrimento, seguindo quatro diferentes tratamentos: controle (sem recobrimento), recobrimento sem adição de óleo essencial, recobrimento com adição de óleo essencial de semente não atacada e recobrimento com adição de óleo essencial de semente atacada pelo pulgão. Os frutos do controle foram imersos em água destilada (Figura 11).

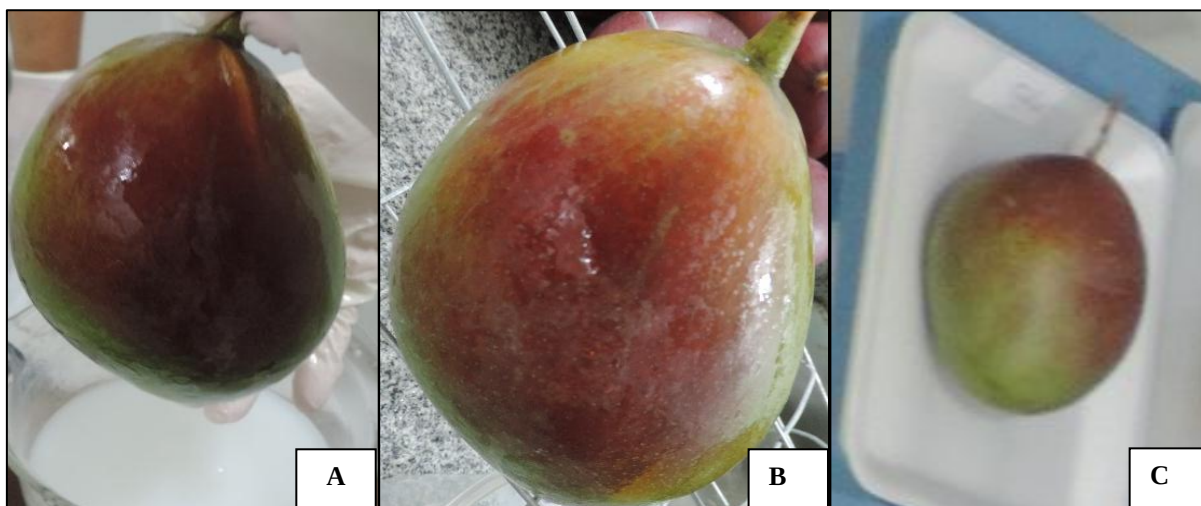


Figura 11. A: aplicação de recobrimentos em manga ‘Palmer’; B: secagem da manga ‘Palmer’ após aplicação dos recobrimentos; C: armazenamento da manga ‘Palmer’ após secagem dos recobrimentos.

Fonte: Autoria própria

3.6 Análises químicas da semente de erva-doce

3.6.1 Perfil de aminoácidos

O perfil de aminoácidos livres e totais foi realizado de acordo com o método descrito por White et al. (1986), no qual os aminoácidos foram determinados em amostra previamente hidrolisada em ácido clorídrico bidestilado 6 N, seguida de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenil isotiocianato (PITC). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em cromatógrafo líquido de alta resolução (VARIAN, Waters 2690, California, USA) acoplado com coluna de fase reversa C18 (PICO-TAG, 3,9 x 150 mm). As fases móveis empregadas consistiram de um tampão acetato de concentração 0,0011 g/mL e pH 6,4 e, uma solução de acetonitrila a 60%. A injeção da amostra (20 µL) foi efetuada manualmente e a detecção ocorreu a 254 nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1 ml/min, à temperatura de 35 °C. O tempo de corrida cromatográfica foi de 21 minutos. A curva de calibração foi construída com nove pontos, traçando-se um gráfico das alturas dos picos obtidos pela injeção de 20 µL da solução de aminoácido preparada numa faixa de 0,1875 µmol/mL a 0,25 µmol/mL. Em cada curva de calibração, o primeiro ponto correspondeu ao limite de quantificação nas condições empregadas, ou seja, a menor quantidade detectável pelo método. Os resultados foram expressos em g.100g⁻¹.

3.6.2 Proteína total

Foi realizada utilizando aproximadamente 0,5 g de semente seca, através do método de Micro-Kjedahl descrito pela AOAC (2010), aplicando-se um fator de 6,25 para a conversão de nitrogênio total em nitrogênio protéico em g.100g⁻¹.

3.6.3 Proteína solúvel

Determinada segundo o método descrito por Bradford (1976), através da ligação do corante (Coomassie Brilliant Blue G-250) à proteína. As amostras de sementes foram maceradas e desengorduradas com hexano. Para a extração foram testados três tipos de tampões: Tris HCl 0,1 M pH 7,6; Glicina 0,1 M pH 2,6 + NaCl 0,15 M; Glicina 0,1 M pH 9,0 + NaCl 0,15 M. Utilizou-se aproximadamente 0,5 g de semente adicionados de 5 mL de

tampão, submetidos a uma agitação durante 3 h. Foi utilizado o sobrenadante obtido de uma centrifugação a 5000 rpm, durante 30 min, sob a temperatura de 4 °C. Para cada uma das amostras foram feitas 5 diluições com extrato e água nas seguintes proporções: 1:2 ; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 v/v. As diluições foram finalizadas em 100 µL e adicionadas de 2,5 mL de solução de Bradford. Agitou-se os tubos e após 10 min realizou-se a leitura em Espectrofotômetro a 595 nm. Os dados obtidos foram comparados com uma curva padrão de precipitação de albumina bovina sérica – BSA e calculados com a seguinte fórmula:

$$Proteína\ Solúvel\ (\mu g.g^{-1}) = \frac{F \times diluição \times Abs}{Peso}$$

Onde:

F: Fator da Solução de Bradford

Diluição: diluição com leitura dentro da curva de BSA

Abs: Absorbância obtida a 595 nm

Peso: peso da amostra

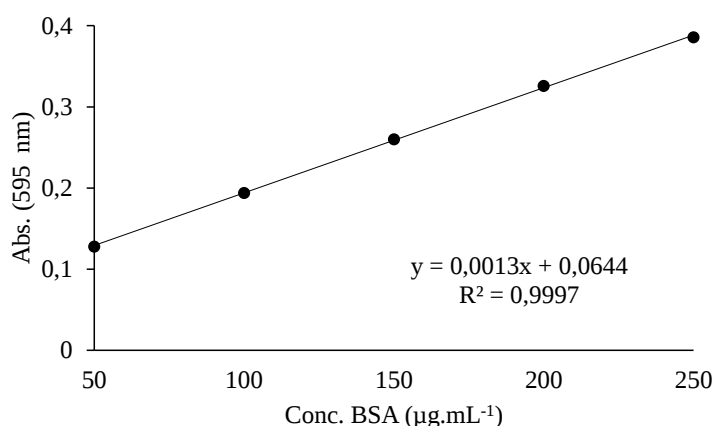


Figura 12. Curva padrão de soro albumina bovina, utilizada na calibração da solução de Bradford para determinação de proteínas solúveis na semente de erva-doce.

3.6.4 Atividade enzimática da peroxidase – POD

Determinada conforme recomendação de Matsuno e Uritani (1972). Para a determinação da atividade da POD, foram pesados 4 g de semente e utilizado 20 mL do tampão de extração fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,0). O tampão de reação foi fosfato-citrato 0,1 M pH 5,0. A partir da extração e da reação, foi definida a razão de diluição do extrato enzimático (1:5 – g de semente:mL do tampão de extração) e a alíquota utilizada 1,5 mL, de modo que a absorbância obtida fosse mantida entre 0,300 e 0,700. A mistura semente

e tampão foi mantida sob agitação magnética por três minutos, filtrando-se em seguida o homogenato a vácuo utilizando papel qualitativo Whatman nº 1. O homogenato foi centrifugado a 5.000 rpm por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante resultante constituiu o extrato enzimático. Todos os procedimentos foram realizados em banho de gelo, mantendo a temperatura a ± 4 °C.

Para a determinação da atividade enzimática, foi adicionado o extrato enzimático a 2,5 mL do tampão de reação e, em seguida, adicionou-se 0,25 mL de guaiacol 0,5% (diluído em etanol P.A.). Após agitação, foi adicionado 0,25 mL do substrato H₂O₂ 3% e agitou rapidamente, cujo procedimento foi realizado a ± 4 °C. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria por 5 minutos a 30 °C, sendo, em seguida, transferido para banho de gelo onde foi adicionado 0,25 mL de bissulfito 2% para parar a reação. As leituras da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (GenesysTM 10s UV VIS) a 470 nm. Os resultados foram expressos em U.min⁻¹.g⁻¹ de semente, calculados pela seguinte fórmula:

$$POD \text{ (U. min}^{-1}\text{.mL}^{-1}\text{)} = \left(\frac{abs/T}{0,001} \right) / \left(p * \frac{al}{V} \right)$$

Onde:

abs = absorbância do filtrado a 470 nm;

T = tempo de incubação;

0,001 = fator de conversão para Unidade de atividade enzimática (U);

p = massa de polpa utilizada para obtenção do extrato enzimático;

al = alíquota do extrato utilizada na determinação;

V = volume do tampão fosfato utilizado na obtenção do extrato.

3.6.5 Atividade enzimática da polifenoloxidase – PPO

A determinação foi feita de acordo com Wissemann e Lee (1980), utilizando 2 g de semente adicionado de 20 mL do tampão de extração fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,0). Foram definidas alíquotas de 0,15 mL para a semente não atacada e 0,3 mL para a semente atacada, do extrato enzimático. Adicionou-se 1,85 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0), contendo 0,1 M de KCl e 0,1 M de catecol, sendo o procedimento realizado a ± 4 °C. Incubou-se por 30 minutos a 30 °C, sendo a reação interrompida pela adição de 0,8 mL de HClO 2 M. As amostras foram filtradas a vácuo utilizando papel qualitativo Whatman nº 1 e as leituras de absorbância foram realizadas em até no máximo 30 minutos após a interrupção

da reação, a 395 nm em Espectrofotômetro Genesys™ 10s UV VIS. Para a calibração do espectrofotômetro, fez-se o branco substituindo o extrato enzimático por água destilada. Os resultados foram expressos em $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de semente e calculados seguindo o mesmo procedimento utilizado na determinação da peroxidase.

3.6.6 Atividade enzimática da fenilalanina amônio liase – PAL

A extração foi realizada segundo Rhodes e Woollorton (1971). Pesou-se 1 g de semente, adicionou-se 40 mL de uma solução extratora (tampão Tris-HCl, EDTA, sacarose e PVP em água, pH 8,0), homogeneizando por 3 minutos. Em seguida, filtrou-se com auxílio de bomba à vácuo em filtro qualitativo Whatman nº 1 e centrifugou-se a 5.000 rpm durante 20 min, obtendo-se o extrato final (sobrenadante). Ajustou-se o pH do extrato para 8,9 com solução KOH 2 M. Para a determinação da atividade enzimática, utilizou-se uma alíquota de 0,1 mL do extrato, adicionando 2,0 mL do tampão Tris-HCl (pH 8,9) e 0,5 mL de L-fenilalanina (49,6 mg/ mL). Incubou-se por 1 h a 40 °C, interrompendo a reação com banho de gelo. Para cada amostra avaliada, fez-se uma prova em branco, substituindo a L-fenilalanina por água destilada. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Genesys™ 10S UV VIS) a 290 nm e os resultados expressos em $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ de semente, seguindo o mesmo procedimento utilizado na determinação da peroxidase e polifenoloxidase (ZUCKER, 1968).

3.6.7 Ensaio de Inibição de Protease

Realizado através da determinação da atividade inibitória da enzima tripsina, utilizando o método descrito por Xavier-Filho et al. (1989). A atividade inibitória foi realizada através de ensaio enzimático com tripsina suína (Sigma-Aldrich) e o substrato BAPNA (benzoyl-arginina-paranitroanilida). No meio de pré-incubação adicionou-se, sob banho de gelo, 10 μL de tripsina 0,3 mg/mL (volume determinado a partir da curva de melhor atividade enzimática), 120 μL de HCl 2,5 mM, alíquotas de 370 μL de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 e 100 μL das amostras. Ressalta-se que nos tubos de controle negativo, acrescentou-se 100 μL do tampão e não de amostras.

A pré-incubação ocorreu durante 10 minutos a 37 °C. Após este período foi adicionado 500 μL do substrato cromogênico BAPNA aos tubos testes, prosseguindo-se a incubação por mais 15 minutos nas mesmas condições de temperatura. A reação foi interrompida pela adição

de 120 μ L de ácido acético 30% (v/v), seguida da adição de 500 μ L do BAPNA nos brancos. A hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada por leitura em espectrofotômetro a 410 nm. O cálculo da atividade inibitória foi realizado a partir da determinação da atividade residual da tripsina e os resultados foram expressos como unidades inibitórias (UI) por grama de proteína, sendo 1 UI equivalente ao aumento de 0.01 da absorbância em relação ao controle.

3.6.8 Perfil eletroforético de proteínas

A técnica de eletroforese foi utilizada para verificar a expressão de proteínas da amostra com base no peso molecular das proteínas, utilizando marcadores, segundo Laemmli (1970). Para a separação, foi utilizado um gel SDS com 12,5% de poliacrilamida e para concentração, utilizou-se com 3,5% de poliacrilamida. Os extratos obtidos de amostras de semente preparadas com o tampão Glicina 0,1 M pH 9,0 + NaCl 0,15 M, utilizado na determinação de proteína solúvel, foram diluídos para uma concentração de 5 mg/mL e depois submetidos a uma condição de desnaturação e adição de azul de bromofenol 0,02%. A amostra foi submetida a uma corrida eletroforética a condição constante de 20 mA, 200 V e 15 W, por um período aproximado de 3 h. O tampão de corrida foi constituído de solução tampão Tris-HCl 0,25 M, pH 8,3, contendo glicina 1,92 M e SDS 1%. Após a corrida, o gel foi corado em Commassie brilliant blue R – 250. A remoção do excesso de corante do gel foi com a solução descorante de ácido acético glacial, metanol e água (10:45:45 v/v).

Para estimar o peso molecular das proteínas, aplicou-se 10 μ L de marcador molecular de faixa ampla de proteínas conhecidas (Miosina, 200 kDa; β -galactosidase, 120 kDa; Soro Bovino, 91 kDa; Glutamina, 62 kDa; Ovalbumina, 46 kDa; Anidrase Carbônica, 38 kDa; Mioglobina, 26 kDa; Lisozima, 19 kDa; Aprotinina, 9 kDa).

3.6.9 Polifenóis extraíveis totais

Obtenção do extrato fenólico: Obtido conforme metodologia descrita por Dantas et al. (2015), onde pesou-se aproximadamente 0,5 g de semente de erva-doce, adicionando 4 mL de metanol 50%, homogeneizando por aproximadamente 10 s, deixando em repouso por 60 min para extração e centrifugado durante 20 min a 9.000 rpm sob temperatura ambiente. Retirou-se o sobrenadante, colocando-o em tubo falcon graduado e com tampa. Adicionou-se 4 mL de acetona 70% ao resíduo, agitou-se por aproximadamente 10 s, deixando-se em repouso por 60

min, centrifugou-se novamente durante 20 min, 9.000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e colocado junto com o primeiro sobrenadante, completando-se o volume final para 10 mL com água destilada. Todo procedimento foi realizado na ausência de luz. O extrato foi utilizado em até 7 dias, sendo conservado em freezer.

Determinação dos Polifenóis extraíveis totais (mg.100g⁻¹): determinada de acordo com Dantas et al. (2015). Para a semente de erva-doce não atacada, tomou-se uma alíquota de 50 µL do extrato fenólico e para a semente de erva-doce atacada pelo pulgão, tomou-se uma alíquota de 300 µL do extrato fenólico, completando-se cada uma para 1000 µL com água destilada. Essa diluição foi acrescida de 1000 µL do reagente de Folin Ciocalteu, 2000 µL de carbonato de sódio 20% e 2000 µL de água destilada. Homogeneizou-se, deixando descansar por 30 minutos, em seguida realizou-se as leituras da absorbância em espectrofotômetro (GenesysTM 10S UV VIS) no comprimento de onda a 700 nm. Para o branco, substituiu-se o volume de extrato por água destilada. Todas as avaliações foram determinadas em triplicata. Para determinação da quantidade de polifenóis totais foi levado em consideração a equação da reta obtida através da curva padrão de ácido gálico (Figura 13). Todo procedimento foi realizado sob ausência da luz.

Para a quantificação dos polifenóis extraíveis totais (PET), expressos em mg de semente.100g⁻¹ de ácido gálico, procedeu-se com a seguinte fórmula:

$$PET \text{ (mg. } 100g^{-1}) = \left(x * \frac{FD1 * FD2}{1000} \right) * 100$$

Onde:

x = Calculado a partir da equação da curva padrão do ácido gálico (µg. mL⁻¹), usando a absorbância da amostra como valor de y ;

$FD1$ (g. mL⁻¹) = Vol. final do extrato (10 mL) / semente (g);

$FD2$ = Vol. final da mistura no tubo de reação (extrato + água destilada) – 1 mL / vol. da alíquota de extrato utilizada.

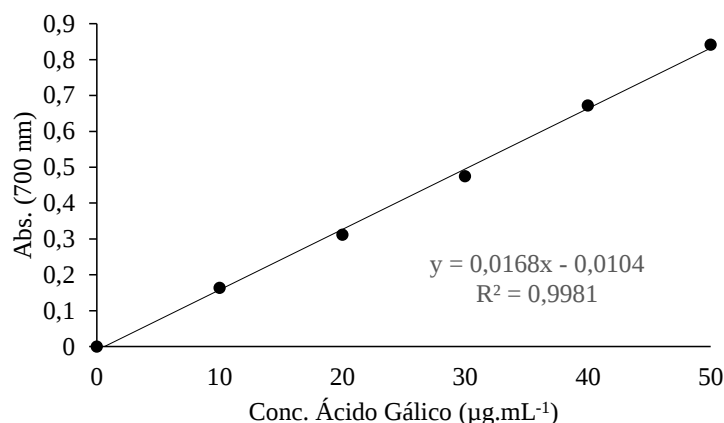


Figura 13. Curva padrão de ácido gálico, utilizada como base para a definição das alíquotas e concentração do extrato fenólico para a determinação de polifenóis extraíveis totais na semente de erva-doce.

3.6.10 Flavonoides amarelos

A análise foi realizada nas sementes não atacadas e atacadas pelo pulgão, de acordo com a metodologia de Francis (1982). Os flavonoides foram extraídos por maceração em almofariz e pistilo com solução de Etanol-HCl e quantificados em espectrofotômetro (Genesys™ 10S UV VIS) a 374 nm. Na quantificação, utiliza-se o fator 76,6 que é o coeficiente de absorção para flavonóides amarelos e flavonóis totais. Os resultados foram expressos em mg.100g⁻¹ e calculados através da fórmula:

$$F = \left(\frac{\text{Abs} \times \text{FD}}{76,6} \right) \times 100 \quad \text{FD} = \frac{\text{Volume Final}}{\text{Massa da Amostra}}$$

Onde,

F = Flavonóides

FD = Fator de diluição

Abs = Absorbância da amostra após leitura no espectrofotômetro.

3.6.11 Atividade antioxidante total (AAT) através da captura do radical livre DPPH*

Determinada de acordo com Dantas et al. (2013). A partir do extrato fenólico, foram preparadas três diluições para a semente não atacada (100, 200 e 350 µL.mL⁻¹) e três diluições para a semente atacada pelo pulgão (300, 500 e 700 µL.mL⁻¹) em triplicata, determinadas através de testes. De cada diluição, utilizou-se uma alíquota de 100 µL para 3,9 mL do radical

DPPH (60 μM). Como controle, utilizou-se 100 μL da solução controle (álcool metílico 50% + acetona 70%). Para calibração do espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm, utilizou-se álcool metílico P.A. As leituras foram realizadas 60 min após a adição do radical DPPH para os dois tipos de sementes, tempo necessário para redução e estabilização da absorbância (obtido através de cinética). Todas as determinações foram feitas em triplicata. Para calcular a AAT foi determinada a equação da reta (Figura 14), a partir da absorbância das três diluições, substituindo-se em seguida na equação a absorbância equivalente a 50% da concentração do DPPH (Abs. Inicial do controle/2), encontrando-se a quantidade da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC 50). Para esta determinação, todo procedimento foi realizado na ausência da luz. Os resultados foram expressos em g de semente.g DPPH⁻¹.

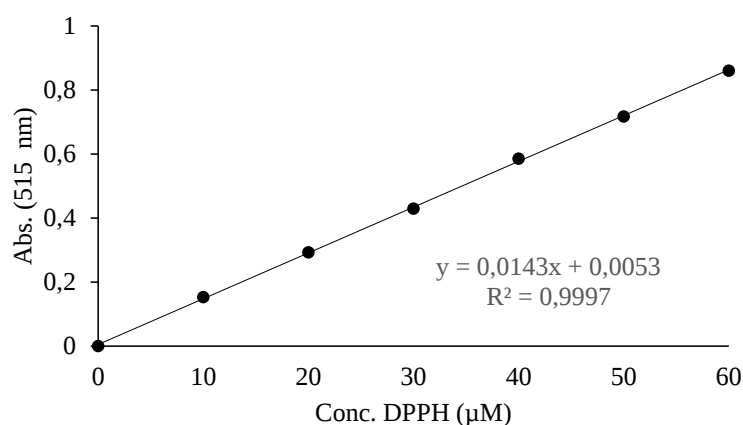


Figura 14. Curva padrão de DPPH* utilizada como base para a definição das alíquotas do extrato fenólico na determinação de Atividade Antioxidante Total.

3.6.12 Atividade antioxidante total através da captura do radical ABTS^{•+}

Determinada de acordo com Dantas et al. (2015). O preparo do radical consistiu da mistura de 5 mL da solução de ABTS^{•+} 7 mM com 88 μL da solução de persulfato de potássio 140 mM, repousando em temperatura ambiente por 16 horas na ausência de luz. Antes do ensaio, o radical foi diluído em álcool etílico até absorbância de 0,700 nm $\pm$ 0.05 nm a 734 nm. A partir do extrato fenólico foram preparadas três diluições em triplicata de 42, 83 e 125 mg. mL⁻¹, para amostra não atacada e três diluições de 167, 334 e 501 mg. mL⁻¹, para amostra atacada pelo pulgão. Cada uma das diluições teve o volume final de 30 μL , onde foram adicionados 3,0 mL de radical ABTS^{•+} (0,700 nm) e a absorbância foi lida após 6 minutos a

734 nm. Para a determinação tomou-se como base a curva padrão do Trolox (Figura 15) com concentrações variando de 100 a 2000 μM , respeitando a faixa de linearidade da curva. Os resultados foram expressos em μM de Trolox.g semente⁻¹. Os resultados foram expressos em μg de Trolox. g semente⁻¹.

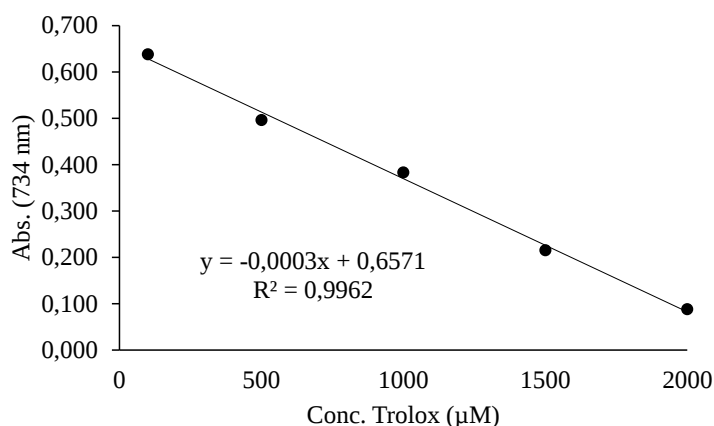


Figura 15. Curva padrão de Trolox, utilizada como base para a definição das alíquotas e concentração do extrato fenólico para a determinação de Atividade Antioxidante Total através da captura do radical ABTS^{*+} na semente de erva-doce.

3.6.13 Perfil de compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos foi realizada com aproximadamente 5 g de semente, segundo Dantas et al. (2015). As análises foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, utilizando o Cromatógrafo (LC-20 AT, Shimadzu Corporation, Japão), equipado com coluna C_{18} (SUPELCOSIL™ LC-PAH HPLC Column, 250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 μm , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e detector UV-Visível (Rheodyne, EUA). As amostras foram eluídas com um sistema gradiente consistindo de solvente A (ácido acético 2%, v/v), utilizada como a fase móvel, com um fluxo de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 25°C e o volume de injeção foi 10 μL . O sistema de gradiente foi iniciado a partir de 90% de A em 0 min, a 80% de A em 10 min, 70% de A em 15 min, 60% de A em 25 min, 50% de A de 30 a 40 min, 75% de A em 42 min e 90% de A em 44 min (Nagendra et al., 2009). Os picos dos compostos fenólicos foram monitorados a 270 nm. Os espectros de absorção UV-Vis foram registrados em linha entre 200 e 600 nm, durante a análise por HPLC. A identificação dos compostos fenólicos foi

obtida por comparação com os tempos de retenção dos padrões, com resultados expressos em mg.mL^{-1} .

3.6.14 Determinação de lipídeos totais

Os lipídeos totais foram determinados de acordo com a metodologia de Folch et al. (1957), submetendo a amostra a extração com uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1) seguida de evaporação do solvente em estufa a 105°C .

Colocou-se os Becker de 50 mL em estufa a 105°C por uma hora, a seguir deixou-se esfriar e pesou-se. Pesou-se 2 g da amostra em béquer 50 mL e transferiu-se para um recipiente de vidro fundo e adicionou-se 30 mL da mistura clorofórmio: metanol (2:1) e tampou-se imediatamente

Agitou-se a mistura amostra+solvente contida no recipiente por 2 a 3 minutos em triturador e tampou-se em seguida. Filtrou-se a mistura triturada em papel de filtro qualitativo em proveta de 100 mL e adicionou-se 10 mL da mistura do solvente, para lavar as paredes do frasco e filtrou-se juntando ao filtrado da mistura. Anotou-se o volume final do extrato filtrado da proveta.

Adicionou-se 20% do volume final do extrato filtrado de sulfato de sódio a 1,5%, agitou-se e deixou-se separar as fases mantendo a proveta fechada. A fase superior deve ficar com 40% e a inferior com 60%. Anotou-se o volume da fase inferior, e descartou-se a fase superior.

Tomou-se uma alíquota de 5 mL do extrato (fase inferior) e transferiu-se para o Becker seco e pesado anteriormente. Colocou-se o Becker em estufa a $\pm 90^{\circ}\text{C}$ para evaporar a mistura de solventes com cuidado para não queimar, aguardou-se o resfriamento em dessecador, e então pesou-se o Becker mais o resíduo de gordura. Os resultados foram expressos em $\text{g. } 100 \text{ g}^{-1}$, através do cálculo:

$$\% \text{ Lipídeos} = \frac{P_f \times V_{\text{inf}}}{5 \times P_{\text{amostra}}} \times 100$$

Onde:

P_f : peso final

V_{inf} : Volume inferior

P_{amostra} : peso da amostra

3.6.15 Perfil de ácidos graxos

A metilação dos ácidos graxos presentes nos extratos lipídicos, obtidos a partir do método descrito por Folch et al. (1957), foi realizada seguindo a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973). A identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos foi realizada utilizando Cromatógrafo Gasoso VARIAN 430 (California, EUA), acoplado com detector de ionização de chama (DIC), coluna capilar de sílica fundida (CP WAX 52 CB, VARIAN, Califórnia, EUA) com dimensões de 60 m x 0,25 mm e 0,25µm de espessura do filme. Foi utilizado o hélio como gás de arraste (vazão de 1mL/min). A temperatura inicial do forno foi de 70 °C, com programação para atingir 240 °C, aumentando 2,5 °C por minuto, permanecendo por 20 minutos, totalizando 88 minutos de corrida. A temperatura do injetor foi mantida em 250 °C e a do detector em 260 °C. Alíquotas de 5 µL do extrato esterificado foram injetadas em injetor tipo Split/Splitless (1:50). Os cromatogramas foram registrados em *software* tipo *Galaxie Chromatography Data System*. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com padrões Supelco ME19-Kit (*Fatty Acid Methyl Esters C6-C22*). Os resultados dos ácidos graxos foram quantificados por normalização das áreas dos ésteres metílicos e expressos em percentual de área.

3.7 Compostos voláteis do óleo essencial de erva-doce

A extração dos compostos voláteis foi realizada diluindo 35 µL de óleo essencial para 1000 µL de n-Hexano (padrão HPLC). A separação cromatográfica foi utilizado um cromatógrafo gasoso marca VARIAN (modelo Saturn 2000R 3800) com injetor split/splitless, acoplado a um espectrômetro de massas com analisador de armadilha de íons (Varian Saturn 2000R 2000). Os voláteis foram dessorvidos durante 5 min a 250°C no sistema de injeção, no modo Split 1:200. O gás de arraste foi o Hélio à uma velocidade constante fluxo de 1,0 mL/min. A coluna capilar analítica utilizada foi de fase estacionária apolar Methylpolysiloxano-5% Fenil (DB-5, Varian), de 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. A programação da temperatura do forno inicial foi de 5 min à 60 ° C, a temperatura do forno foi levantada a 3°C/min até 240 °C. Os espectros de massa total e íon cromatogramas (TIC) foram registrados no modo impacto positivo de elétrons (EI+) sobre a faixa de 29-400 m/z (frequência de varredura de 5,8 Hz), a

aplicação de energia de elétrons foi de 70 eV. O tempo total de execução foi de 60 min. A aquisição e controle de dados o sistema foram obtidos com o software MS Data Review Workstation Toolbar, Versão 6.9.1 (Varian). A identificação dos compostos voláteis foi realizada pela comparação dos espectros de massas dos compostos das amostras com o padrão e com o banco de dados “NIST” (National Institute of Standards & Technology) e pela comparação do índice de retenção linear (IRL) dos compostos com os de artigos da literatura e database Adams (2007), calculados com base nos tempos de retenção de uma série de n-alcenos (C6 – C21) sob condições analíticas idênticas.

3.8 Atividade Antimicrobiana (*in vitro*) do óleo essencial de erva-doce

O efeito de inibição do óleo essencial sobre o crescimento micelial foi avaliado usando o método de ensaio de difusão em ágar (GUERREIRO et al., 2015), através de seis concentrações dos óleos essenciais (0,0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 e 0,5 % v/v), em seis repetições, onde foram incorporados em meio de cultura BDA (ágar batata dextrose), pH 5,6, e autoclavados à 121 °C durante 15 min (aquecidos à 40 °C). O ágar BDA contendo óleo essencial foi colocado em placas de Petri de 90 mm de diâmetro para inoculação de discos de 6 mm de diâmetro de crescimentos micelial de *C. gloeosporioides*, retirados a partir da borda de uma colônia ativa de 8 dias de crescimento, seguida de incubação a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h. O diâmetro das colônias foi medido com auxílio de paquímetro no intervalo de 3 dias de incubação, até que a colônia com a maior taxa de crescimento atingisse a borda da placa de Petri (9 dias). O experimento foi repetido duas vezes para confirmação dos resultados. O crescimento micelial do fungo foi calculado a partir da equação:

$$\text{Inibição de crescimento micelial (\%)} = [(C-T/C) \times 100]$$

Onde, C e T representam a média de seis repetições de crescimento micelial (mm) no controle (C) e em placas com óleo essencial (T), respectivamente (ELSHARBINY; AMIN; BAKA, 2016).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada pela mais baixa concentração de óleo essencial necessária para inibir o crescimento micelial do fungo isolado (SIROLI et al., 2015).

3.9 Ensaio de proteção em manga ‘Palmer’

Para o ensaio de prevenção à antracnose em manga ‘Palmer’, cada óleo essencial foi testado com a MIC (0,5% v/v), onde quatro tratamentos foram formulados para aplicação dos revestimentos na manga: controle (sem recobrimento), recobrimento com solução de amido de semente de jaca a 3%, recobrimento com amido de semente de jaca e óleo essencial de semente não atacada e recobrimento com amido de semente de jaca e óleo essencial de semente atacada.

Após a secagem ao ar de cada fruto com recobrimento, foram realizadas duas perfurações em lados opostos, utilizando uma alça metálica estéril para permitir a inserção de discos de *C. gloeosporioides* com 6 mm de diâmetro. Em seguida, os frutos foram incubados a temperatura de 25 °C em ambiente escuro durante 24 h, sob umidade elevada. Cada tratamento realizado com nove repetições com medição do diâmetro da lesão com paquímetro a cada dois dias, durante 10 dias de incubação. Um controle absoluto (sem inoculação do fungo) foi observado para avaliação de incidência natural de doença.



Figura 16. A: perfuração e implantação dos discos com esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*; B: fixação do inóculo; C: lesão em manga ‘Palmer’ causada pelo *C. gloeosporioides*.

Fonte: Autoria própria.

3.10 Análises físicas e físico-químicas na manga ‘Palmer’

3.10.1 Firmeza

Determinada em N, através do penetrômetro manual Magness Taylor Pressure Tester, região de inserção de 2/8 polegadas de diâmetro, sendo feitas duas leituras na região equatorial do fruto inteiro em lados opostos.

3.10.2 Acidez Titulável (AT)

Foi determinada por titulometria utilizando solução de NaOH 0,1M com indicador fenolftaleína, até obtenção de coloração róseo claro permanente, utilizando 5 g da amostra em 50 mL de água destilada (AOAC, 2010). Os resultados foram expressos em g. de ácido cítrico.100g⁻¹ de polpa.

3.10.3 Sólidos Solúveis (SS)

Foram determinados em % por leitura direta com refratômetro de bancada tipo ABBE com controle de temperatura (20°C) conforme Association of Official Analytical Chemistry – AOAC (2010).

3.10.4 Relação SS/AT

Obtida mediante divisão dos resultados de sólidos solúveis (SS) e acidez titulável (AT) (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

3.10.5 pH

Potencial hidrogeniônico – pH, utilizando potenciômetro digital, conforme metodologia da AOAC (2010).

3.11 Análises Estatísticas

Para demonstrar a diferença entre os dois tipos de sementes e óleos essenciais, os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP) de determinação de quatro replicatas e, em seguida submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o software SAS/STAT 9.3 (SAS, 2011), onde o teste F foi utilizado como conclusivo.

Os efeitos do crescimento do fungo *C. gloeosporioides* com a aplicação dos óleos essenciais em testes *in vitro* e na sua aplicação em recobrimentos em manga ‘Palmer’ foram verificados através de análise de variância (ANOVA), utilizando software SAS/STAT 9.3 (SAS, 2011), aplicando teste de Tukey para determinar a significância entre os tratamentos ($P < 0.05$).

Para verificar os efeitos dos compostos voláteis dos óleos essenciais sobre os ensaios *in vitro* com o fungo *C. gloeosporioides* e na prevenção deste fungo através da aplicação de recobrimentos em manga ‘Palmer’, foi realizada uma análise de agrupamento hierárquico e um mapa de cor com base nas alterações quantitativas dos compostos utilizando o software JMP® 10.0.0.

4. REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHHAB, K. G.; FAWZIB, H.; MANNAA, F. A. Paraoxonase-1 (PON1) inhibition by tienilic acid produces hepatic injury: Antioxidant protection by fennel extract and whey protein concentrate. **Pathophysiology**, v. 1, p. 1-7, 2016.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation. USA. 805 p. 2007.
- AKASHA, I.; CAMPBELL, L.; LONCHAMP, J.; EUSTON, S. R. The major proteins of the seed of the fruit of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): Characterisation and emulsifying properties. **Food Chemistry**, 197, 799–806, 2016.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. Gaithersburg, MD, USA, 2010.
- ARISTOY, A., C.; TOLDRÁ, F. Amino Acids: Determination. **Encyclopedia of Food and Health**. 141–148, 2016.
- ARRAZ, N. A.; HASSAN, E. A.; HAMAD, E. H. The Chemical Constituent and Vegetative and Yielding Characteristics of Fennel Plants Treated with Organic and Bio-fertilizer Instead of Mineral Fertilizer. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.3, n. 2., p. 579-587, 2009.
- AZERÊDO, L. P. M.; SILVA, S. M., LIMA; M. A. C.; DANTAS, R. L.; PEREIRA; W. E. Qualidade de manga ‘Tommy Atkins’ da produção integrada recoberta com fécula de mandioca associada a óleos essenciais e quitosana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, xxx-xxx (in press), 2016.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARROS, L.; HELENO, S.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculum vulgare* Mill. from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2458–2464, 2009.
- BARROS, L.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C.F.R. The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 814-818, 2010.
- BAUTISTA-ROSALES, P. U.; CALDERON-SANTOYO, M.; SERVÍN-VILLEGAS, R.; OCHOA-ÁLVAREZ, N. A.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. ARTURO. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, v. 65, n. 3, p. 293-301, 2013.
- BAUTISTA-ROSALES, P. U.; CALDERON-SANTOYO, M.; SERVÍN-VILLEGAS, R.; OCHOA-ÁLVAREZ, N. A.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A. Biocontrol action mechanisms of *Cryptococcus laurentii* on *Colletotrichum gloeosporioides* of mango. **Crop Protection**, v. 65, p. 194-201, 2014.

BIHUNIAK, J. D.; INSOGNA, K. L. The effects of dietary protein and amino acids on skeletal metabolism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2015.

BIJINA, B.; CHELLAPPAN, S.; KRISHNA, J. G.; BASHEER, S. M.; ELYAS, K. K.; BAHKALI, A. H.; CHANDRASEKARAN, M. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* with potential for use as therapeutic drug and as seafood preservative. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 3, p. 273-281, 2011.

BILL, M.; SIVAKUMAR, D.; KORSTEN, L.; THOMPSON, A. K. The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. **Crop Protection**, v. 64, p. 159-167, 2014.

BISHR, M. M.; HAGGAG, E. G.; MOAWED, M. M.; SALAMA, O. M. Characterization of Fennel Fruits: Types and Quality. **Journal of American Science**, v. 8, n. 5, p. 35-40, 2012.

BORDES, R.; HOLMBERG, K. Amino acid-based surfactants – do they deserve more attention? **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 1-13, 2015.

BOSQUEZ-MOLINA, E., JESÚS, E. R., BAUTISTA-BAÑOS, S., VERDE-CALVO, J. R.; MORALES-LÓPEZ, J. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, p. 132-137, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CALEJA, C.; BARROS, L.; ANTONIO, A. L.; CIRIC, A.; SOKOVIĆ, M.; OLIVEIRA, M. B. P.P.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C.F.R. *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 428-438, 2015.

CAO, S.; YANG, Z.; CAI, Y.; ZHENG, Y. Antioxidant enzymes and fatty acid composition as related to disease resistance in postharvest loquat fruit. **Food chemistry**, v. 163, p. 92-96, 2014.

CHEEMA, S.; SOMMERHALTER, M. Characterization of polyphenol oxidase activity in Ataulfo mango. **Food Chemistry**, v. 171, p. 382-387, 2015.

CHENG, Y.; LIU, L.; ZHAO, G.; SHEN, C.; YAN, H.; GUAN, J.; YANG, KUN. The effects of modified atmosphere packaging on core browning and the expression patterns of PPO and PAL genes in ‘Yali’ pears during cold storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1243-1248, 2015.

CHRANIOTI, C.; TZIA, C. Arabic Gum Mixtures as Encapsulating Agents of Freeze-Dried Fennel Oleoresin Products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 4, p. 1057-1065, 2014.

CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras : UFLA, 785p, 2005.

CHITTORA, M.; VEER, C. Biology and biotechnology of fennel. **International Journal Bioassays**, v. 2, n.12, p. 1616-1619, 2013.

CHRANIOTI, C.; TZIA, C. Arabic Gum Mixtures as Encapsulating Agents of Freeze-Dried Fennel Oleoresin Products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n 4, p. 1057-1065, 2014.

CSERNI, I.; HUVELY, A.; PETO, J. B. Production and quality of fennel. **Acta Universitatis Sapientiae Agriculture and Environment**, v. 3, p. 132–143, 2011.

DADKHAH, A. Effect of Chemicals and Bio-fertilizers on Yield, Growth Parameters and Essential Oil Contents of Fennel (*Foeniculum vulgare* Miller.). **Journal of Medicinal Plants and By-products**, v. 2, p. 101-105, 2013.

DAMAYANTI, A.; SETYAWAN, E. Essential Oil Extraction of Fennel Seed (*Foeniculum vulgare*) Using Steam Distillation. **International Journal of Science Engineering**, v. 3, n. 2, p. 12-14, 2012.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennemma**. Tradução Adriano Brandelli et al. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 900 p., 2010.

DANTAS, A.L.; SILVA, S.M.; LIMA, M.A.C.; DANTAS, R.L.; MENDONÇA, R.M.N. Bioactive compounds and antioxidant activity during maturation of strawberry guava fruit. **Revista de Ciências Agronômicas**, v. 44, p. 805-814, 2013.

DANTAS, R.L.; SILVA, S.M.; BRITO PRIMO, D.M.; SOUSA, A.S.B.; BRITO, E.S.; MACEDO, E.M.S. Changes during maturation in the bioactive compounds and antioxidant activity of *Opuntia Stricta* (haw.) Fruits. **Acta Horticulture**, v. 1067, 159-165, 2015.

EL-AWADI, M. E.; HASSAN, E. A. Physiological Responses of Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill) Plants to Some Growth Substances . The Effect of Certain Amino Acids and a Pyrimidine Derivative. **Journal of American Science**, v. 6, n. 7, p. 120-125, 2010.

ELSHERBINY, A. E.; AMIN, B. H.; BAKA, Z. A. Efficiency of pomegranate (*Punica granatum L.*) peels extract as a high potential natural tool towards Fusarium dry rot on potato tubers. **Postharvest Biology and Technology**, v. 111, p. 256-263, 2016.

EMEX, A.C. Norma de calidad para mango fresco de exportación. México: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, 1998. 4 p.

FALGUERA, V.; QUINTERO, J. P.; JIMÉNEZ, A.; MUÑOZ, J. A.; IBARZ, A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, p. 292-303, 2011.

FERNANDES, F. S.; RAMALHO, F. S.; GODOY, W. A. C.; PACHU, J. K. S.; MALAQUIAS, J. B.; ZANUNCIO, J. C. Within Plant Distribution and Dynamics of *Hyadaphis foeniculi* (Hemiptera:Aphididae) in Field Fennel Intercropped with Naturally Colored Cotton. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 1, 2013.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

FUCHS, B.; SÜSS, R.; TEUBER, K.; EIBISCH, M.; SCHILLER, J. Lipid analysis by thin-layer chromatography--a review of the current state. **Journal of chromatography. A.**, v. 1218, p. 2754-2774, 2011.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ DE LACEY, A.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food microbiology**, v. 27, p. 889-96, 2010.

GROVER, S.; MALIK, C. P.; HORA, A.; KUSHWAHA, H. B. Botany, Cultivation, Chemical Constituents and Genetic Diversity in Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill): A Review. **LS - An International Journal of Life Sciences**. v. 2, p. 128-139, 2013.

GUBB, D.; SANZ-PARRA, A.; BARCENA, L.; TROXLER, L.; FULLAONDO, A. Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. **Biochimie**, v. 92, n. 12, p. 1749-1759, 2010.

GUDI, G.; KRÄHMER, A.; KRÜGER, H.; HENNIG, L.; SCHULZ, H. Discrimination of Fennel Chemotypes Applying IR and Raman Spectroscopy: Discovery of a New γ -Asarone Chemotype. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, p. 3537-3547, 2014.

GUERRA, I. C. D., OLIVEIRA, P. D. L. O., PONTES, A. L. S., LÚCIO, A. S. S. C., TAVARES, J. F., BARBOSA-FILHO, J. M., MADRUGA, M. S.; SOUZA, E. L. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha × villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 168-178, 2015.

GUERREIRO, A. C.; GAGO, C. M.L.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G.C.; ANTUNES, M. D.C. The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 226-233, 2015.

GUIL-GUERRERO, J. L. Common mistakes about fatty acids identification by gas-liquid chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, p. 153-154, 2014.

GUO, M.; SHI, T.; DUAN, Y.; ZHU, J.; LI, J.; CAO, Y. Investigation of amino acids in wolfberry fruit (*Lycium barbarum*) by solid-phase extraction and liquid chromatography with precolumn derivatization. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2015.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, v. 22, p. 475-477, 1973.

HASHMI, N.; KHAN, M. M. A.; IDREES, M.; KHAN, Z. H.; ALI, A.; VARSHNEY, L. Depolymerized carrageenan ameliorates growth, physiological attributes, essential oil yield and active constituents of *Foeniculum vulgare* Mill. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 407–412, 2012.

HÄUSLER, R. E.; LUDEWIG, F.; KRUEGER, S. Plant Science Amino acids – A life between metabolism and signaling. **Plant Science**, v. 229, p. 225-237, 2014.

HO, B. T.; HOFMAN, P. J.; JOYCE, D. C.; BHANDARI, B. R. Uses of an innovative ethylene- α -cyclodextrin inclusion complex powder for ripening of mango fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 113, p. 77-86, 2016.

HU, M.; YANG, D.; HUBER, D. J.; JIANG, Y.; LI, M.; GAO, Z.; ZHANG, Z. Reduction of postharvest anthracnose and enhancement of disease resistance in ripening mango fruit by nitric oxide treatment. **Postharvest Biology and Technology**, v. 97, p. 115-122, 2014.

HUANG, B.; LEI, Y.; TANG, Y.; ZHANG, J.; QIN, L.; LIU, J. Comparison of HS-SPME with hydrodistillation and SFE for the analysis of the volatile compounds of Zisu and Baisu, two varietal species of *Perilla frutescens* of Chinese origin. **Food Chemistry**, v. 125, p. 268-275, 2011.

ILISZ, I.; ARANYI, A.; PATAJ, Z.; PÉTER, A. Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 28-41, 2012.

IZADI-DARBANDI, A.; BAHMANI, K.; RAMSHINI, H. A.; MORADI, N. Heritability Estimates of Agronomic Traits and Essential Oil Content in Iranian Fennels. **Journal of Agricultural Science Technology**, v. 15, p. 1275-1283, 2013.

JIANG, S.; PENNER, M. H. Selective oxidation of enzyme extracts for improved quantification of peroxidase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 476, p. 20-25, 2015.

JOUKI, M.; YAZDI, T. F.; MORTAZAVI, S. A.; KOOCHKEI, A. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 9-19, 2014.

KAMLE, M.; KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; TIWARI, A. K.; MISRA, A. K.; PANDEY, B. K. Identification and phylogenetic correlation among *Colletotrichum gloeosporioides* pathogen of anthracnose for mango. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 285-287, 2013.

KAUR, G. J.; ARORA, D. S. Bioactive potential of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* belonging to the family Umbelliferae - Current status. **Journal of Medical Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 87-94, 2010.

KHALIQ, G.; MUDA MOHAMED, M. T.; GHAZALI, H. M.; DING, P.; ALI, A. Influence of gum arabic coating enriched with calcium chloride on physiological, biochemical and quality responses of mango (*Mangifera indica* L.) fruit stored under low temperature stress. **Postharvest Biology and Technology**, v. 111, p. 362-369, 2016.

KITTIPONGPATANA, O. S.; KITTIPONGPATANA, N. Preparation and physicochemical properties of modified jackfruit starches. **LWT- Food Science and Technology**, v. 44, p. 1766–1773, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LIMA, A. B., SILVA, S. M., ROCHA, A., NASCIMENTO, L. C., RAMALHO, F. S. 2012. Conservação pós-colheita de manga 'Tommy Atkins' orgânica sob recobrimentos bio-orgânicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 704-710.

MADRUGA, M. S.; ALBUQUERQUE, F. S. M.; SILVA, I. R. A.; AMARAL, D. S.; MAGNANI, M.; QUEIROGA NETO, V. Chemical, morphological and functional properties of Brazilian jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) seeds starch. **Food Chemistry**, v. 143, p. 440-445, 2014.

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 612–631, 2010.

MAFFEI, M. E.; GERTSCH, J.; APPENDINO, G. Plant volatiles: production, function and pharmacology. **Natural product reports**, 28, 1359-80. 2011.

MAIWULANJIANG, M.; CHEN, J.; XIN, G.; GONG, A. G. W.; MIERNISHA, A.; DU, C. Y. Q.; LAU, K. M.; LEE, P. S. C.; CHEN, J.; DONG, T. T. X.; AISA, H. A. J. I.; TSIM, K. W. K. The volatile oil of *Nardostachys Radix et Rhizoma* inhibits the oxidative stress-induced cell injury via reactive oxygen species scavenging and Akt activation in H9c2 cardiomyocyte. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 491-498, 2014.

MALAQUIAS, J. B.; RAMALHO, F. S.; SOUZA, J. V. S.; RODRIGUES, K. C. V.; WANDERLEY, P. A. The influence of fennel feeding on development, survival, and reproduction in *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). **Turk. J. Agric. For**, v. 34, p. 235–244, 2010.

MALAQUIAS, J. B.; RAMALHO, F. S.; LIRA, A. C. S.; OLIVEIRA, F. Q.; FERNANDES, F. S.; GODOY, W. A. C.; ZANUNCIO, J. C. The biology and thermal requirements of the fennel aphid *Hyadaphis foeniculi* (Passerini) (Hemiptera: Aphididae). **Plos One**, v. 9, p. 1-7, 2014.

MALAQUIAS, J. B.; RAMALHO, F. S.; LIRA, A. C. S.; OLIVEIRA, F. Q.; FERNANDES, F. S.; ZANUNCIO, J. C.; GODOY, W. A. C. Estimating the development of the fennel aphid, *Hyadaphis foeniculi* (Passerini) (Hemiptera: Aphididae), using non-linear models. **Pest Management Science**, v. 71, p 744-751, 2015.

MATTIUZ, B.; DUCAMP-COLLIN, M.; MATTIUZ, C. F. M.; VIGNEAULT, C.; MARQUES, K. M.; SAGOUA, W.; MONTET, D. Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of 'Kent' mango. **Scientia Horticulturae**, 184, 160-168, 2015.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, Tokio, v. 13, p. 1091-1101, 1972.

MATUDA, T. G.; MARIA NETTO, F. Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 353-357, 2005.

MEKNI, M.; FLAMINI, G.; GARRAB, M.; HMIDA, R. B.; CHERAIEF, I.; MASTOURI, M.; HAMMAMI, M. Aroma volatile components, fatty acids and antibacterial activity of four Tunisian *Punica granatum* L. flower cultivars. **Industrial Crops and Products**, v. 48, p. 111-117, 2013.

MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P., 2004. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. 2 ed. Recife. UFRPE. 183 p.

MOLINA, D.; PATINO, L.; QUINTERO, M.; CORTES, J.; BASTOS, S. Effects of the aspartic protease inhibitor from *Lupinus bogotensis* seeds on the growth and development of *Hypothenemus hampei*: An inhibitor showing high homology with storage proteins. **Phytochemistry**, v. 98, p. 69-77, 2014.

MOSER, B. R.; ZHELJAZKOV, V. D.; BAKOTA, E. L.; EVANGELISTA, R. L.; GAWDE, A.; CANTRELL, C. L.; WINKLER-MOSER, J. K.; HRISTOV, A. N.; ASTATKIE, T.; JELIAZKOVA, E. Method for obtaining three products with different properties from fennel (*Foeniculum vulgare*) seed. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 335-342, 2014.

MUSHARRAF, S. G.; UDDIN, J.; SIDDIQUI, A. J.; AKRAM, M. I. Quantification of aroma constituents of mango sap from different Pakistan mango cultivars using gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1355-1360, 2016.

NAGENDRA, P.; BAO, Y.; SHAOYU Y.; YULONG, C.; MOUMING, Z.; MUHAMMAD, A.; YUEMING, J. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis*Sonn.) seeds. **Food Chemistry**, v. 116, p. 1-7, 2009.

NARESH, K.; VARAKUMAR, S.; VARIYAR, P. S.; SHARMA, A.; REDDY, O.; VIJAYA, S. Effect of γ -irradiation on physico-chemical and microbiological properties of mango (*Mangifera indica* L.) juice from eight Indian cultivars. **Food Bioscience**, v. 12, p. 1-9, 2015.

NAYAK, A. K.; PAL, D. Formulation optimization and evaluation of jackfruit seed starch-alginate mucoadhesive beads of metformin HCl. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 264-272, 2013a.

NAYAK, A. K.; PAL, D. Blends of jackfruit seed starch – pectin in the development of mucoadhesive beads containing metformin HCl. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 137– 145, 2013b.

NAYAK, A. K.; PAL, D.; SANTRA, K. *Artocarpus heterophyllus* L. seed starch-blended gellan gum mucoadhesive beads of metformin HCl. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, 329-339, 2014.

NAYAK, A. K.; PAL, D.; SANTRA, K. Screening of polysaccharides from tamarind, fenugreek and jackfruit seeds as pharmaceutical excipients. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 756-760, 2015.

OLIVEIRA, C. F. R.; SOUZA, T. P.; PARRA, J. R. P.; MARANGONI, S.; SILVA-FILHO, M. C.; MACEDO, M. L. R. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 165, 19–25, 2013.

OLLE, M.; BENDER, I. The content of oils in umbelliferous crops and its formation. **Agronomy Research** (Special Issue III), v. 8, p. 687–696, 2010.

ORMEÑO, E.; FERNANDEZ, C. Effect of Soil Nutrient on Production and Diversity of Volatile Terpenoids from Plants. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, n. 1, 2012.

PADUL, M. V.; TAK, R. D.; KACHOLE, M. S. Protease inhibitor (PI) mediated defense in leaves and flowers of pigeonpea (protease inhibitor mediated defense in pigeonpea). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 77-82, 2012.

PINTO, A. C. Q.; PINHEIRO NETO, F.; GUIMARÃES, T. G. Estratégias do melhoramento genético da manga a visando atender a dinâmica de mercado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 64-72, 2011.

RAMALHO, F. S.; FERNANDES, F. S.; NASCIMENTO, A. R. B.; NASCIMENTO JR, J. L.; MALAQUIAS, J. B.; SILVA, C. A. D. Assessment of fennel aphids (Hemiptera: Aphididae) and their predators in fennel intercropped with cotton with colored fibers. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 113–119, 2012a.

RAMALHO, F. S.; FERNANDES, F. S.; NASCIMENTO, A. R. B.; NASCIMENTO JR, J. L.; MALAQUIAS, J. B.; SILVA, C. A. D. Feeding Damage From Cotton Aphids, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Heteroptera: Aphididae), in Cotton With Colored Fiber Intercropped With Fennel. **Entomological Society of America**, v. 105, n. 1, p. 20–27, 2012b.

RAMALHO, F. S.; MALAQUIAS, J. B.; BRITO, B. D. S.; FERNANDES, F. S.; ZANUNCIO, J. C. Assessment of the attack of *Hyadaphis foeniculi* (Passerini) (Hemiptera: Aphididae) on biomass, seed and oil in fennel intercropped with cotton with colored fibers. **Industrial Crops and Products**. v. 77, p. 511-515, 2015.

RATHER, M. A.; DAR, B. A.; SOFI, S. N.; BHAT, B. A.; QURISHI, M. A. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. **Arabian Journal of Chemistry**. 2012.

RENGSUTTHI, K.; CHAROENREIN, S. Physico-chemical properties of jackfruit seed starch (*Artocarpus heterophyllus*) and its application as a thickener and stabilizer in chilli sauce. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 5, p. 1309-1313, 2011

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

RHODES, M. J. C.; WOOLTORTON, L. S. C. The effect of ethylene on the respiration and on the activity of phenylalanine ammonia lyase in swede and parsnip root tissue. **Phytochemistry**, Oxford, v.10, n.9, p.1989-1997, 1971.

ROBY, M. H. H.; SARHAN, M. A.; SELIM, K. A.; KHALEL, K. I. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 437–445, 2013.

RODRIGUES, A. A. M. Qualidade, compostos bioativos e conservação pós-colheita de goiaba ‘Paluma’ sob recobrimentos a base de fécula de semente de jaca. (Dissertação de Mestrado). Areia: UFPB, 2015.

RUIZ-RODRIGUEZ, A.; REGLERO, G.; IBÁÑEZ, E. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, p. 305-326, 2010.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: Impact on safety and quality attributes of fresh-cut Fuji apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 105, p. 8-16, 2015.

SAMEJO, M. Q.; MEMON, S.; BHANGER, M. I.; KHAN, K. M. Essential oil constituents in fruit and stem of *Calligonum polygonoides*. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 293-295, 2013.

SANTOS, C. A. F.; LIMA NETO, F. P.; RODRIGUES, M. A.; COSTA, J. G. Similaridade genética de acessos de mangueira de diferentes origens geográficas avaliadas por marcadores AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 736-740, 2008.

SANTOS, N. S. T.; AGUIAR, A. J. A. A.; OLIVEIRA, C. E. V.; SALES, C. V.; SILVA, S. M.; SILVA, R. S.; STAMFORD, T. C. M.; SOUZA, E. L. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). **Food Microbiology**, v. 32, p. 345-353, 2012.

SAS. SAS/STAT 9.3 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2011, 8621 p.

SEMİZ, G. D.; ÜNLÜKARA, A.; YURTSEVEN, E.; SUAREZ, D. L.; TELCİ, I. Salinity Impact on Yield, Water Use, Mineral and Essential Oil Content of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Journal of Agricultural Sciences**, v. 18, p. 177-186, 2012.

SEÑORÁNS, F.J.; IBÁÑEZ, E. Analysis of fatty acids in foods by supercritical fluid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 465, p. 131-144, 2002.

SFORZA, S.; TEDESCHI, T. Proteins: Chemistry, Characterization, and Quality. **Encyclopedia of Food and Health**. p. 548–553. 2016.

SHI, X.; LI, B.; QIN, G.; TIAN, S. Mechanism of antifungal action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* related to mitochondrial degradation in spores. **Postharvest Biology and Technology**, v. 67, p. 138-143, 2012.

SHOJAIEFAR, S.; MIRLOHI, A.; SABZALIAN, M. R.; YAGHINI, H. Seed yield and essential oil content of fennel influenced by genetic variation and genotype×year interaction. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 97-105, 2015.

SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D. I.; TAPPI, S.; ROCCULI, P.; GARDINI, F.; LANCIOTTI, R. Natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed lamb's lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 103, p. 35-44, 2015.

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

SIVANKALYANI, V.; FEYGENBERG, O.; DISKIN, S.; WRIGHT, B.; ALKAN, N. Increased anthocyanin and flavonoids in mango fruit peel are associated with cold and pathogen resistance. **Postharvest Biology and Technology**, v. 111, p. 132-139, 2016.

SONG, J.; LIU, C.; LI, D.; GU, Z. Evaluation of sugar, free amino acid, and organic acid compositions of different varieties of vegetable soybean (*Glycine max* [L.] Merr). **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 743-749, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, F. **Fisiologia Vegetal. Trad.** SANTARÉM, E. R. et al. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 1991, p.687.

TALENS-PERALES, D., MARÍN-NAVARRO, J.; POLAINA, J. Enzymes: Functions and Characteristics. **Encyclopedia of Food and Health**. p. 532–538. 2016.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 90, p. 1-11, 2013.

TAVARES, A. C.; GONÇALVES, M. J.; CRUZ, M. T.; CAVALEIRO, C.; LOPES, M. C.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L. R. Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 3, p. 593-598, 2010.

TRINDADE, D. C. G.; LIMA, M. A. C.; ASSIS, J. S. Ação do 1-metilciclopropeno na conservação pós-colheita de manga 'Palmer' em diferentes estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileria**, v. 50, n. 9, p. 753-762, 2015.

UUSITALO, L.; SALMENHAARA, M.; ISONIEMI, M.; GARCIA-ALVAREZ, A.; SERRA-MAJEM, L.; RIBAS-BARBA, L.; FINGLAS, P.; PLUMB, J.; TUOMINEN, P.; SVELA, K. Intake of selected bioactive compounds from plant food supplements containing fennel (*Foeniculum vulgare*) among Finnish consumers. **Food Chemistry**, v. 194, p. 619-625, 2016.

VÁZQUEZ-CELESTINO, D.; RAMOS-SOTELO, H.; RIVERA-PASTRANA, D. M.; VÁZQUEZ-BARRIOS, M. E.; MERCADO-SILVA, E. M. Effects of waxing, microperforated polyethylene bag, 1-methylcyclopropene and nitric oxide on firmness and

shrivel and weight loss of 'Manila' mango fruit during ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 111, p. 398-405, 2016.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WISSEMANN, K. W.; LEE, C. Y. Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 31, n. 3, p. 206-211, 1980.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P.; ARY, M. B.; SILVA, C. P.; CARVALHO, M. M. M.; MACEDO, M. L. R.; LEMOS, F. J. A.; GRANT, G. (1989). Poor Correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.37, n. 4, p. 1.139-1.143.

YANG, C.; WANG, J.; LI, D. Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review. **Analytica Chimica Acta**, v.799, p. 8-22, 2013.

ZHANG, Z.; YANG, D.; YANG, B.; GAO, Z.; LI, M.; JIANG, Y.; HU, M. β -Aminobutyric acid induces resistance of mango fruit to postharvest anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 78-84, 2013.

ZHANG, X.; LIU, C. Multifaceted Regulations of Gateway Enzyme Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Biosynthesis of Phenylpropanoids. **Molecular Plant**, v. 8, n.1 p. 17-27, 2015.

ZUCKER, M. Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase and lyase-inactivating system in potato tuber Diks. **Plant Physiology**, Baltimore, v.43, p. 365-374, 1968.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com o desenvolvimento desta pesquisa proporcionaram a elaboração de dois artigos:

Artigo 1: “Profiles of amino acid, proteins, phenolic, fatty acids and antioxidant activity of fennel seeds attacked and not attacked by aphids (*Hyadaphys foeniculum*)”, que foi submetido ao periódico Food Chemistry, Qualis A2.

Artigo 2: “Inhibitory effects of coatings containing jackfruit starch and essential oil from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds on postharvest anthracnose in ‘Palmer’ mango fruit”, que foi submetido ao periódico Postharvest Biology and Technology, Qualis A2.

ARTIGO 1: Profiles of amino acid, proteins, phenolic, fatty acids and antioxidant activity of fennel seeds attacked and not attacked by aphids (*Hyadaphys foeniculum*)

Abstract

Fennel is an economically important crop in Northeastern Brazil for the production of seeds that are widely used due to their therapeutic and alimentary properties. However, this crop is often attacked by aphids (*Hyadaphys foeniculum*), which can change the quality and availability of nutrients in the seeds. The objective of this research was to evaluate the profiles of total and free amino acids, total protein content, soluble protein, activity of peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), and phenylalanine ammonia lyase (PAL), inhibition of protease, profiles of electrophoretic protein, phenolic compounds, fatty acids, total lipids, total extractable polyphenols (TEP), yellow flavonoids, and total antioxidant activity (TAA) by DPPH[•] and ABTS^{•+} free radical capture in fennel seeds attacked and non-attacked by aphids. For non-attacked fennel seeds, we observed higher contents of free amino acids, soluble proteins, POD and PPO activities, TEP, yellow flavonoids, and TAA through DPPH[•] free radical capture and ABTS^{•+} radical. Also, there was increased PAL activity and protease inhibition, as well as higher phenylalanine content for seeds that were attacked. Overall, the attack by the aphid compromises the nutritional quality of fennel seeds.

Keywords: *Foeniculum vulgare* Mill., amino acids, POD, PPO, PAL, phenolics, antioxidant activity, fatty acids.

1. Introduction

Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) is an important economic crop that is used and traded around the world, due to its therapeutic use and as food, it is widely used in cooking, and pharmaceutical and cosmetic products (Barros, Carvalho, & Ferreira, 2010). However, most of the crops are attacked by aphids *Hyadaphis foeniculi* (Pass.) (Hemiptera: Aphididae), which may influence the production and chemical composition of the seeds (Ramalho, Malaquias, Brito, Fernandes, & Zanuncio, 2015).

Plant metabolites can be changed by biotic factors such as attack by pests. There are also amino acids, which play an important role in cell signaling and as a metabolic intermediate in several pathways (Häusler, Ludewig, & Krueger, 2014). Therefore, the determination of amino acid profiles provides important nutritional information of plant products, and can also influence the protein profile (Guo et al., 2015). Proteins, which are one of the largest and most important macromolecules in plant, are important sources of energy, nitrogen and essential amino acids for the human diet, in addition to performing catalytic activity in several metabolic pathways involved in vital processes in living organisms (Nelson & Cox, 2014). However, more studies are needed on the protein profile and enzymatic activity of plant species, and the identification of amino acids is the first step for providing information on the characterization of widely used plant material, and the conditions for which these are produced (El-Awad & Hassan, 2010).

In this regard, proteases are important in the defense response of plants attacked by insects. Thus, plants accumulate protease inhibitors in their various tissues, whose function is to defend against insects, acting on the inhibition of digestive proteases in the larva, damaging amino acid intake, slowing its growth (Padul, Tak, & Kachole, 2012). However, the presence

of these most active inhibitors in the fennel seed may impair its quality for human consumption, thereby positioning it as an anti-nutritional factor.

Many studies related to fennel seed composition have been conducted, identifying its antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and diuretic properties (Salama, El Baz, Gaafar, & Zaki, 2015). Part of the antioxidant activity is attributed to phenolic compounds, which are mostly formed by at least one phenolic ring, comprising an important class of phytochemicals (Heleno, Martins, Queiroz, & Ferreira, 2015).

In plants attacked by aphids, the synthesis of phenolic compounds is most likely stimulated. These compounds can be used in plant defense against insect attack (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008). Furthermore, the phenolic compounds also exhibit great interest for the human diet in preventing cardiovascular diseases, diabetes and cancer (Caleja et al., 2015).

It is known that a fatty acid-derived signal modulates crosstalk between different defense signaling pathways in plants. Fatty acids are assigned to their roles in mediating plant defense such as biosynthetic precursors for phytohormone jasmonic acid, that when under attack, release ROS, which drives lipid peroxidation (Kachroo & Kachroo, 2009). Therefore, changes in the composition of fatty acids can also provide relevant information on the nutritional quality of fennel seeds.

The attack of aphids on fennel can modify the production of plant defense metabolites by altering the profiles of protein, phenolic compounds, and fatty acids, and therefore the nutritional quality of the attacked seeds in contrast to those non-attacked. However, studies that provide information on the chemical composition of seeds that have been attacked and non-attacked by aphids are still scarce. Therefore, the objective of this research was to evaluate the changes in the chemical composition and enzyme activity in fennel seeds attacked and non-attacked by aphids.

2. Material and methods

2.1 Fennel seeds

Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) seeds from attacked and non-attacked plants by aphids (*Hyadaphis foeniculi* (Pass.) (Hemiptera: Aphididae)) were provided by EMBRAPA Algodão, Paraíba, Brazil (altitude 634 m, S 7°10'5" W 35°51'13") (Ramalho et al., 2015).

2.2 Profiles of amino acids, proteins and electrophoretic, and enzyme activities

2.2.1 Free and total amino acid profiles

Free and total amino acid profiles ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) were performed according to White et al. (1986). Amino acids were determined in samples previously hydrolyzed in 6N bidistilled chloridric acid followed by precolumn derivatization of free amino acids with phenyl isothiocyanate (PITC). Separation of phenylthiocarbamyl amino acid (PTC-AA) derivatives was performed in an HPLC system (Varian, Waters 2690, California, USA) and a C18 reversed-phase column (PICO-TAG, 3.9 x 150 mm). The mobile phase consisted of an acetate buffer at pH 6.4, with a concentration of $0.0011 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 60% acetonitrile solution. Samples of 20 μL were manually injected and detection was performed at 254 nm. Chromatographic separation was at a constant flow rate of $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ at 35°C. The chromatographic run time was 21 minutes. A calibration curve of nine points was used.

2.2.2 Total and soluble proteins

Total protein ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) was performed using 0.5g of seed by the Micro-Kjeldahl method (AOAC, 2010), applying a factor of 6.25 for total nitrogen conversion to protein nitrogen. Soluble protein was determined according to Bradford (1976). The seed samples were ground and defatted with hexane. For extraction, around 0.5g of seeds were added to 5mL of 0.1 M glycine buffer pH 9.0 + 0.15 M NaCl and stirred for 3h. Following extraction, samples were centrifuged at 5000 rpm for 30 minutes at 4°C. The supernatant was diluted in water at the following proportions: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16, 1:32 v.v⁻¹. The dilutions were finalized at 100 μL and 2.5 mL of Bradford solution was added. The tubes were stirred and then after 10 min readings were performed in a spectrophotometer at 595 nm. A standard curve of bovine serum albumin precipitation was used and the data expressed as $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

2.2.3 Enzymatic activities – POD (EC.1.11.1.7), PPO (EC.1.10.3.1), and PAL (E.C. 4.3.1.5)

POD activity was determined according to Matsuno & Uritani (1972), in $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ of seed. Four grams of seed and 20 mL of the extraction buffer 0.05 M potassium phosphate (pH 7.0) were used. The reaction buffer was 0.1 M citrate-phosphate (pH 5.0), with a dilution ratio of the enzyme extract of 1:5 (seed grams:mL extraction buffer) and a 1.5 mL aliquot was used, so that the absorbance obtained was maintained between 0.300 and 0.700. The seed and buffer mixture was stirred for three minutes and filtered under vacuum using qualitative Whatman paper n° 1. The homogenate was centrifuged at 5,000 rpm for 20 minutes and the supernatant was an enzymatic extract. All the procedures were conducted at 4°C.

To determine the enzyme activity, 2.5 mL of the reaction buffer and 0.25 mL of 0.5% guaiacol (diluted in ethanol) was added to the enzymatic extract. Next, 0.25 mL of 3% H_2O_2 (substrate) was added and stirred. The tubes were then placed in a water bath for 5 minutes at

30°C and transferred to an ice bath where 0.25 mL of 2% bisulphite was added to stop the reaction. Absorbance readings were performed in a spectrophotometer at 470 nm.

PPO activity was determined by Wissemann & Lee (1980), in $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ of seed, two grams of seed samples were used and 0.05 M potassium phosphate (pH 7.0) as extraction buffer. We used 0.15mL and 0.3mL from the enzymatic extract for the non-attacked and attacked seeds, respectively. Next, 1.85 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) was added containing 0.1 M KCl and 0.1 M catechol at 4°C, then incubated for 30 minutes at 30°C. Then reaction was stopped by adding 0.8 ml of 2M HClO. Samples were filtered under vacuum using qualitative Whatman paper (n° 1). The absorbance readings at 395 nm were performed up to 30 minutes after stopping the reaction. We conducted a blank reading by replacing enzymatic extract with distilled water to calibrate the spectrophotometer.

PAL activity was determined according to Rhodes & Woollorton (1971). One gram of seed was used and 40 mL of an extraction solution was added (Tris-HCl, EDTA, sucrose and PVP in water, pH 8.0) and homogenized for 3 minutes. Samples were filtered under vacuum, using qualitative Whatman paper (n° 1), and centrifuged at 5,000 rpm for 20 min. The supernatant was the enzymatic extract. The enzymatic extract pH was adjusted to 8.9 with 2M KOH solution. An aliquot of 0.1 mL of the extract with adding 2.0 mL of the Tris-HCl buffer (pH 8.9) and 0.5 mL L-phenylalanine (49.6 mg/ml) was used for determining the enzymatic activity, then samples were incubated for 1 hour at 40°C, then stopping the reaction with an ice bath. A blank reading was performed for each sample by replacing L-phenylalanine with distilled water. The absorbance readings were performed with a spectrophotometer at 290 nm, following the same procedure used to determine the POD and PPO (Zucker, 1968). POD, PPO and PAL were quantified in $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ of seed.

2.2.4 Inhibitory activity of protease

The inhibitory activity of protease was performed by determining the enzyme inhibitory activity of trypsin using the method described by Xavier-Filho et al. (1989). The inhibitory activity was performed by enzyme assay with porcine trypsin (Sigma-Aldrich) and BAPNA (benzoyl-arginine-paranitroanilide). In the pre-incubation, the medium was added under an ice bath with 10 μ L of 0.3 mg/mL trypsin (determined from the volume of better enzymatic activity curve), 120 μ L of 2.5 mM HCl, aliquots of 370 μ L Tris-HCl 0.05 M pH 7.5 buffer and 100 μ L of the samples. For negative control tubes, 100 μ L of buffer was added instead of samples.

The pre-incubation was performed for 10 minutes at 37°C, then 500 μ L of chromogenic substrate BAPNA was added to the test tubes, and then continued to incubate for another 15 minutes under the same temperature conditions. The reaction was stopped by adding 120 μ L of 30% acetic acid (v/v), followed by the addition of 500 μ L of BAPNA in a blank. The hydrolysis of the substrate by the enzyme was monitored by spectrophotometric reading at 410 nm. The calculation of the inhibitory activity was performed by determining the residual activity of trypsin and the results were expressed as inhibitory units (IU) per gram of protein, with 1 IU equivalent to 0.01 absorbance increase compared to the control.

2.2.5 Electrophoretic profile analysis

The eletrophoretic profile of proteins was performed according to Laemmli (1970). The extracts from the samples were prepared in 0.1 M glycine buffer pH 9.0 + 0.15 M NaCl, which were used for the determination of soluble protein and were diluted to a concentration of 5 mg/mL, and then placed in a denaturing boiling temperature condition. The sample was set in constant electrophoretic conditions of 20 mA, 200 V, and 15 W for 3h. The running

buffer consisted of 0.25 M Tris-HCl buffer, pH 8.3, containing 1.92 M glycine and 1% SDS. For the separation we used an SDS gel and 12.5% polyacrylamide. Next, the gel was stained in a Bright blue R – 250 Commassie.

We used 10 μ L of the BlueStep Broad Range Protein Marker (Amresco) molecular marker to estimate the molecular weight of protein within a wide range of known proteins (Myosin, 200 kDa; β -galactosidase, 120 kDa; Bovine serum, 91 kDa; Glutamine, 62 kDa; Ovalbumin, 46 kDa; Carbonic anhydrase, 38 kDa; Myoglobin, 26 kDa).

2.3 Bioactive compounds and antioxidant activity

2.3.1 Total extractable polyphenols

Phenolic extracts were prepared according to Rufino et al. (2010). Seed samples of 0.5 grams were used and 4mL of 50% methanol were added. After one hour at 23°C, the samples were then centrifuged for 20 min at 9,000 rpm and 23°C. Following this, the supernatant was removed and placed in a graduated tube with a lid. Then 4 mL of 70% acetone were added to the residue, and after one hour at 23°C the samples were centrifuged for 20 min at 9,000 rpm at 23°C. The supernatant was removed and placed together with the first supernatant, completing the volume to 10 mL with distilled water.

Quantification of total extractable polyphenols (mg of gallic acid per 100 g of seed) was done by using 50 μ L of the phenolic extract for non-attacked and 300 μ L of the extract for the attacked fennel seeds, completing the volume of each tube to 1000 μ L with distilled water. Then 1000 μ L of Folin Ciocalteu, 2000 μ L of 20% sodium carbonate and 2000 μ L of distilled water were added to this dilution. Absorbance readings were conducted using a spectrophotometer at 700 nm. For a blank reading, the extract was replaced by distilled water

and a standard garlic acid curve was used to calculate total extractable polyphenols. All procedures were performed in the dark room.

2.3.2 *Yellow flavonoids*

Yellow flavonoids ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) extraction was measured according to Rufino et al. (2010). Fennel seed samples were crushed and extracted by maceration with the extraction solution of 85 mL ethanol and 15 mL of 1.5 M HCl. After maceration, samples were centrifuged at 9000 rpm for 15 minutes, removing the supernatant and completing the final volume to 15 mL with the extraction solution. The reading was performed using a spectrophotometer at 374 nm.

2.3.3 *Total antioxidant activity (TAA)*

Total antioxidant activity by DPPH radical and ABTS^{•+} radical was performed according to Rufino et al. (2010). The DPPH method was determined using phenolic extracts. Three dilutions were prepared for non-attacked seeds (100, 200 and 350 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$) and three dilutions for the seeds attacked by aphids (300, 500 and 700 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$), in three replications. Each dilution was used at a rate of 100 μL to 3.9 mL of the DPPH (60 μM). Absorbance readings were performed after 30 minutes (time required for reduction and stabilization of the absorbance, obtained by kinetic curve) in a spectrophotometer at 515 nm. The calibration was carried out with methyl alcohol PA. To calculate the TAA, the straight line equation was determined from the absorbance of three dilutions, then substituting in the equation of the absorbance equivalent to 50% of the concentration of DPPH ($\text{abs. Control Initial}/2$) lying on the amount of sample required to reduce the initial concentration of DPPH (EC₅₀) by 50%.

To determine AAT using the ABTS method (μg of Trolox. grams seed^{-1}) the phenolic extract was used. Three dilutions were prepared in triplicate for 42, 83, and 125 mg. mL^{-1} for non-attacked seeds, and three dilutions of 167, 334 and 501 mg. mL^{-1} for attacked seeds. Each dilutions had a final volume of 30 μL , to which 3.0 mL radical ABTS^{•+} (0.700 nm) were added, and the absorbance was read after 6 minutes at 734 nm. A standard Trolox curve was prepared with concentrations ranging from 100-2000 μM .

2.3.4 Phenolic compounds profile

We used 5 grams of seeds for the extraction of phenolic compounds, according method using by Rufino et al. (2010). Analyses were performed by reversed-phase high efficiency liquid chromatography using a chromatograph (LC-20 AT, Shimadzu Corporation, Japan) equipped with C18 column (Supelcosil™ LC-PAH HPLC Column, 250 x 4.6 mm, 5 μm particle size, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and UV-visible detector (Rheodyne, USA). Samples were eluted with a gradient system consisting of solvent A (2% acetic acid, v/v), used in the mobile phase with a flow rate of 1 mL.min^{-1} . The column temperature was maintained at 25°C and the injection volume was 10 μL . The gradient system was started from 90% of A at 0 min, 80% of A over 10 min, 70% of A over 15 min, 60% of A over 25 min, 50% of A from 30 to 40 min, 75% of A at 42 min, and 90% of A at 44 min (Nagendra et al., 2009). The phenolic compound peaks were monitored at 270 nm. UV-Vis absorption spectra were recorded on-line from 200 to 600 nm for HPLC analysis. The identification of phenolic compounds was obtained by comparison with the retention times of the standards and expressed in mg.100g^{-1} .

2.3.5 Fatty acids profile

Total lipids were determined according to the Folch, Less, and Stanley (1957) method. Lipids were extracted from samples with a mixture of chloroform and methanol (2:1) followed by solvent evaporation in an oven at 105°C and the content expressed in g.100 g⁻¹.

The methylation of fatty acids present in the lipid extract was carried out following the method described by Hartman and Lake (1973). The identification and quantification of fatty acid esters was performed by gas chromatography (Varian 430-GC, California, USA) and flame ionization detector (FID), a capillary column of fused silica (CP WAX 52 CB, Varian, California, USA) with dimensions of 60 x 0.25 mm and film thickness of 0.25µm was used. Helium was used as a carrier gas (flow rate of 1mL/min). The initial oven temperature was 70°C with programming to reach 240°C, adding 2.5°C per minute, for 20 minutes. Run time was 88 minutes. The injector temperature was maintained at 250°C and the detector at 260°C. Rates of 5 µL of esterified extract were injected into gun type Split/Splitless (1:50). The chromatograms were recorded on Galaxie Chromatography Data System software. The fatty acids were identified by comparing the retention times of the methyl esters of the samples with a standard Supelco ME19-Kit (Fatty Acid Methyl Esters C6-C22). The fatty acids were expressed in area percentage.

2.4 Statistical analysis

Means from four replications were submitted to analysis of variance (ANOVA) and principal components analyses (PCA), using SAS/STAT 9.3 software. Tukey's ($P < 0.05$) test was applied to determine the significant difference between fennel seed types. Hierarchical cluster analysis (HCA) and a color map were performed based on JMP® 10.0.0 software.

3. Results and Discussion

3.1 Amino acids, proteins, enzyme activities, and electrophoresis profile

The sum of the total amino acids was higher in fennel seeds attacked by aphids, while the sum of free amino acids was higher in non-attacked seeds (Table 1). In human health, amino acid intake acts on the biosynthesis of proteins, collagen formation, and helps in mineral metabolism, in addition to participating in growth, antioxidant activity, DNA and RNA stabilizing, regulating nutrients and hormone metabolism, and as secondary messengers (Guo et al., 2015).

The total amino acid profile showed that the essential amino acid arginine presented the highest content, while the glutamic acid was found to be among the most abundant non-essential, in both types of fennel seeds evaluated. In plants, arginine plays a signaling function during development processes and is involved in the response of abiotic and biotic stress such as pathogens. Glutamic acid produces γ -butyric acid (GABA), which operates in the signal transduction chain in plants (Häusler et al., 2014).

For the profile of free amino acids, arginine was the predominant essential amino acid in the non-attacked seeds, and threonine in the attacked fennel seeds. Proline and glutamic acid were the non-essential amino acids found in larger contents in seeds non-attacked and attacked by aphids, respectively. For total amino acids, significantly higher content of arginine was found in non-attacked fennel seeds, while larger content of leucine, lysine, phenylalanine, threonine, alanine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, serine, and tyrosine were found in seeds attacked by aphids. For the free amino acids, arginine, methionine, alanine, glycine, and proline were identified in higher content in fennel seeds that were not

attacked by aphids. In turn, lysine, threonine, valine, aspartic acid, glutamic acid, and serine contents were higher in attacked seeds.

The amino acids serine, threonine, tyrosine, and histidine were present in higher content in the attacked seeds, and are involved in the transfer of phosphate groups in the reactions of phosphorylation and dephosphorylation by kinase enzymes (Nelson & Cox, 2014), indicating intensifying the metabolism and, therefore, enhanced recycling of the nucleotide triphosphates in the attacked seeds. Serine also acts as a signaling molecule in rapidly growing tissues such as meristems (Häusler et al., 2014). Methionine, found in higher levels in attacked seeds, plays an important role in the production of the volatile compounds estragole and trans-anethole in fennel, and participates in the biosynthesis pathway of plant growth regulators, such as auxin and cytokinin (El-Awad & Hassan, 2010).

The aromatic amino acids phenylalanine and tyrosine, found at higher levels in attacked seeds, are products of the shikimic acid pathway and precursors of several secondary metabolites, including compounds with hormonal and signaling functions (Häusler et al., 2014).

The content of total protein did not differ between fennel seeds attacked or non-attacked by aphids, with a mean of 22 g.100g^{-1} (Table 2), indicating a dynamic process of protein recycling in seeds. Ehsanipour, Razmjoo & Zeinali (2012), in fennel crop found between 17.6 and $18.2 \text{ g.100 g}^{-1}$ of total protein in seeds. For soluble protein, a higher content in non-attacked seeds was found with 6.57 mg.mL^{-1} .

The peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) activities were higher in non-attacked fennel seeds (Table 2). POD activity is widely present in plants, especially in the cytosol, chloroplasts, vacuole, and cell wall, acting on the oxidative system (Sonkar et al., 2015). The increased activity of this enzyme in the non-attacked seeds may likely be due to a higher lignification. POD is an antioxidant enzyme that acts to remove hydrogen peroxide

(H₂O₂), participates in the detoxification of ROS, and cooperates in the biosynthesis of metabolites such as phytoalexins and other phenols to form lignin, which strengthens the immune system of plants (Berger et al., 2016).

In turn, the PPO is involved in the oxidation of polyphenol quinones, acting in the protection against the attack of pests in plants and oxygen regulation (Pinto, Siqueira, Oliveira & Fernandes, 2008). Herein, the increased synergistic activity of PPO and POD in non-attacked seeds must be due to the generation of H₂O₂ during the oxidation of phenolic compounds in the reactions catalyzed by PPO (Ndiaye, Xu, & Wang, 2009).

On the other hand, the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and inhibition of protease was far higher in attacked seeds, indicating the activation of secondary metabolism in these seeds (Table 2). The biosynthesis of secondary metabolites, such as phenolic compounds, can increase with increased plant stress caused by nutrient deficiency, light, or attack by pests or diseases, by increasing the transcription of mRNA that encodes PAL, which increases its expression and subsequent activity (Ullah & Honermeier, 2013). Moreover, PAL is considered a key enzyme in phenylpropanoid biosynthesis, which is a precursor of various secondary metabolites such as flavonoids, anthocyanins, plant hormones, lignin, phytoalexins, and benzoic acid derivatives (Zhang & Liu, 2015).

Inhibition of trypsin protease (Table 2) showed much greater activity in seeds attacked with 45.08 UI and only 17.51 UI in non-attacked seeds, thus indicating an anti-nutritional factor in seeds attacked by *H. foeniculum* aphids. Protein quality is affected, among other factors, by trypsin inhibitors, phenols, hemagglutinin, which can interact with the intestinal tract and digestive enzymes, thereby reducing the digestibility of protein and amino acid uptake (Padul et al., 2012).

Figure 1 shows the separation of proteins whose expression was highest for non-attacked fennel seeds, therefore clearly showing the influence of an aphid attack on the

expression suppression of proteins. The increases in expression were evident in non-attacked seeds for molecular weight bands of approximately 60 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 35 kDa, and 19 kDa.

The molecular weights of 35 and 40 kDa are suggested for the POD enzyme, which Krainer et al. (2014), reported that the hyperglycosylated-POD in denaturing gel presented a molecular weight of about 65 kDa, instead of its weight in non-glycosylated form of 35 kDa, making a purification by column chromatography necessary. Most likely, the indication of bands with molecular weights between 50 and 60 kD involves the presence of PPO after denaturation by SDS-PAGE. This enzyme has different isoforms, and in general, the molecular weights will vary according to the plant source, mostly between 52-62 kDa under denaturing conditions; however, molecular weights between 32 and 200 kDa have been reported (Pinto et al., 2008).

Purification by chromatography of eggplant (*Solanum melongena*) classified the PPO as a homodímera enzyme of 112 kDa, which after the SDS-PAGE showed a single band of about 56 kDa (Mishra, Gautam & Sharma, 2012). The expression of PPO by purification followed by SDS-PAGE indicate different molecular weights for different plants, such bean seeds (*Vigna unguiculata*), between 58, 73 and 220 kDa (Pinto et al., 2008).

The PAL was not indicated at any molecular weight by electrophoresis in any denaturing condition used (Figure 1), as bands were more evident in non-attacked seeds, and in contrast, PAL activity was much higher in attacked seeds. PAL is responsible for triggering the secondary metabolism of plants, which in vivo is found in heterotetramers form, occurring in different isoforms and molecular weights, with a total weight ranging between 275 and 300 kDa (Hsieh, Ma, Yang, & Lee, 2010; Zhang & Liu, 2015). In *Bambusa oldhamii*, PAL has been demonstrated by purification as a tetrameric enzyme with a molecular weight of 275

kDa by native-PAGE and 76 kDa by SDS-PAGE, which indicates its tetrameric subunits (Hsieh et al., 2010).

3.2 Bioactive compounds and antioxidant activity

The total extractable polyphenols content (TEP) and yellow flavonoids were higher in fennel seeds that were non-attacked by aphids, which may be explained by the accumulation and widespread use of these compounds in attacked seeds and its conversion into other secondary metabolic products (Table 3). Phenolic compounds are secondary metabolites from the shikimate pathway from L-phenylalanine or L-tyrosine, which may be important in the human diet mainly for its antioxidant capacity (Heleno et al., 2015).

The total antioxidant activity (TAA) was higher for non-attacked seeds both for the capture of DPPH[•] (107.74 g seed DPPH[•] g⁻¹), and the ABTS^{•+} (89.61 uM Trolox g seed⁻¹) radicals, which may be due to the higher TEP content present in non-attacked seeds (Table 3).

Salama et al. (2015), applied biofertilizer to two varieties of fennel and reported results between 403 and 614 mg.100g⁻¹ of TEP, 200 and 489 mg.100g⁻¹ of total flavonoid, and between 10.07 and 64.57 µg/mL fennel seeds for DPPH (EC 50), as compared with the control, thus proving that culture conditions strongly affect the content of antioxidants. Flavonoids may have several biological functions due to their antioxidant properties, preventing heart disease, brain strokes and stomach cancer (Flores, Moreno, Blanch, & Castillo, 2014).

Table 3 shows the profile of phenolic compounds, with 11 phenolic acids and 5 types of flavonoids, in which non-attacked seeds had higher content for all phenolic compounds, with the exception of the naringenin flavonoid, which did not differ between the types of seeds evaluated. Phenolic acids in larger content in non-attacked and attacked seeds were

ferulic acid, with 163.00 mg.100g seed⁻¹, and p- salicylic acid with 42.00 mg.100g seed⁻¹, respectively. Rutin was the flavonoid found in the highest content in non-attacked seeds with 152.35 mg.100g seed⁻¹, while myricetin, with 7.30 mg.100g seed⁻¹, was the flavonoid identified in higher amounts in attacked seeds. Caleja et al. (2015), in evaluating fennel extracts, also identified p-salicylic acid, caffeic acid, p-coumaric acid and quercetin. In general, the profile and content of phenolic compounds may be influenced by biotic and abiotic stimuli (Christopoulos & Tsantili, 2015). The increase herein of salicylic acid in attacked seeds was probably due to its conversion from t-cinnamic acid that, in turn, was synthesized by PAL from the amino acid phenylalanine (Wada et al., 2014).

The PAL enzyme is involved in the biosynthesis of salicylic acid, which is recognized as a signal molecule needed in the establishment of systemic resistance of plants (Hsieh et al., 2010). Salicylic acid has analgesic, anti-inflammatory and antiseptic properties. In turn, protocatechuic, caffeic and ferulic acid have been associated with antimicrobial activity against fungi and bacteria. P-coumaric acid showed antitumor capacity, while vanillic acid was able to suppress hepatic fibrosis in chronic lesion (Heleno et al., 2015). Naringenin is biosynthesized by cinnamic acid conversion, through the non-oxidative deamination of phenylalanine by PAL and is involved with the capture of ROS (Flores et al., 2014).

The total lipid content did not differ between the types of fennel seeds and the fatty acid profile identified 21 components of saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA), and highlighted the highest content of oleic acid (71.44 and 72.21 %) and linoleic acid (11.78 and 12.28 %), for non-attacked and attacked seeds, respectively. The most content was identified for MUFA (72.58 and 73.32%), followed by SFA (14.98 and 08.14%), and lastly PUFA (12.44 and 12.60%) for non-attacked and attacked seeds, respectively, which in turn showed no significant differences. Most of the identified fatty acids did not differ between the two types of seeds, except for caprylic acid

(C8:0) and alpha-linolenic acid (C18:3 n3). Caprylic acid was found in the highest content in attacked seeds, with 0.52%, and in non-attacked seeds with 0.21% of relative area. However, the content of alpha-linolenic acid was higher in non-attacked seed with 0.62%, and in attacked seeds with 0.29% (Table 4).

In plants, fatty acids are a part of the glycerol lipids that are a source of energy reserve, in addition to being essential components of cell membranes. Fatty acids with 18 carbons such as the SFA stearic acid (C18:0), MUFA oleic acid (C18:1 n9cis), PUFAs linoleic acid (C18:2 n6cis) and alpha-linolenic acid (C18:3 n3) act in plant defense signaling against insects. Linoleic acid induces the protein kinase C in the activation of NADPH oxidase in the membrane, resulting in ROS production (Kachroo & Kachroo, 2009).

Barros et al. (2010), in evaluating roots, leaves, inflorescence, and stems from fennel plants, found much lower content of lipids, ranging between 0.45 and 1.28 g.100g⁻¹ and identified twenty-one fatty acids, the same identified herein, showing the differences in composition depending on the plant part, especially PUFA. Vardavas, Majchrzak, Wagner, Elmadfa, & Kafatos (2006), reported that MUFA are the main fatty acid in fennel, as also shown herein.

3.3 Analysis of principal components (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA), and color map

The PCA showed decisive differences between the two types of fennel seeds, which were related to: the profile of free and total amino acids; total soluble protein content; POD, PPO and PAL activities; protease inhibition; phenolic compound and fatty acid profiles; lipid, TEP, and yellow flavonoid content; and TAA (Figure 2A).

Figure 2A shows the eigenvectors of two principal components that explain the variability between the two types of seeds, with 85.76% of the accumulated variance. The correlation of most variables was observed for PC1, with 71.36%, while for PC2 the percentage was 14.40%. The variables that significantly influenced the PC1 were soluble protein, inhibition protease, POD, PPO and PAL activities, TEP and yellow flavonoid content, TAA (DPPH and ABTS), the sum of free amino acids, the sum of the total amino acids, in addition to the isolated contents of the amino acid aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, arginine, threonine, alanine, proline, methionine, isoleucine, phenylalanine and lysine (free); aspartic acid glutamic acid, serine, glycine, histidine, arginine, threonine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine and lysine (totals), phenolic compounds (caffeic acid, ellagic acid, ferulic acid, hydroquinonecarboxylic acid, p-coumaric acid, protocatechuic acid, p-salicylic acid, salicylic acid, sinapic acid, syringic acid, vanillic acid, catechin, myricetin, quercetin, naringenin, rutin, capric acid, pentadecanoic acid, heptadecanoic acid and α -linolenic acid).

However, for the formation of PC2, the variables that had the most influence were valine (free amino acid), caprylic acid, undecanoic acid, lauric acid, arachidic acid, behenic acid, tricosanoic acid, myristoleic acid and palmitoleic acid (fatty acids), SFA, MUFA, and lipids. The variables that were not associated in the formation of PC1 and PC2, and thus did not contribute to the variability were: total protein; the amino acids histidine, tyrosine, cystine, leucine (free), cystine (total); the fatty acids caproic acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid, lignoceric acid, myristoleic acid, vaccenic acid, linoleic acid, and eicosatrienoic acid; and PUFA (Figure 2A).

In the biplot (Figure 2A), there is a clear distinction between the two groups corresponding to the two types of fennel seeds. Thus, the variables that contribute to the formation of the non-attacked seed group were the amino acids alanine, proline, methionine,

isoleucine, arginine and glycine (free), arginine (total), phenolic compounds (caffeic acid, ellagic acid, ferulic acid, hydroquinonecarboxylic acid, p-coumaric acid, protocatechuic acid, p-salicylic acid, salicylic acid, sinapic acid, syringic acid, vanillic acid, catechin, myricetin, quercetin, and rutin), fatty acids (capric acid, pentadecanoic acid, heptadecanoic acid, and α -linolenic acid), yellow flavonoids, TEP, TAA (ABTS), PPO and POD activities, and soluble proteins. Phenolic compounds are produced by the phenylpropanoid pathway that could be subsequently oxidized by PPO (Hsieh et al., 2010). The activation of PPO may also possibly be associated to the presence of fatty acids, since there are indications that linolenic acid would be a natural activator of this enzyme in avocado (George & Christoffersen, 2016). The activity of POD and total antioxidant activity were also related to the availability of phenolic acids and flavonoids. POD catalyzes oxidation of several phenolic substrates, by converting H_2O_2 into H_2O , acting in removing cytotoxic radicals and oxygenated by-products, thus making its antioxidant role through biodegradation and biosynthetic activity of these compounds (Sonkar et al., 2015). In turn, the PPO activity may promote POD activity through the H_2O_2 production during oxidation of phenolic compounds (Christopoulos & Tsantili, 2015).

In turn, the variables that were correlated to the formation of the group for the attacked seeds were: the sum of the total amino acids; the amino acids isoleucine, tyrosine, leucine, glycine, serine, phenylalanine, lysine, methionine, histidine, threonine, aspartic acid, glutamic acid, and alanine (total); serine, phenylalanine, lysine, threonine, aspartic acid and glutamic acid (free); in addition to a higher content of naringenin, higher rate of protease inhibitor, lower TAA (DPPH), and increased activity of PAL (Figure 2A).

The amino acid phenylalanine is the substrate of PAL. Therefore, an increase in PAL activity in the tissue acts as a signaling of defense against insect attack, due to its action as a key enzyme in the biosynthesis of phenolic compounds, which may be induced by various

stress conditions (Cheng et al., 2015). Christopoulos & Tsantili (2015) linked PAL activity with the biosynthesis of the phenolic acids p-salicylic, vanillic, and syringic, which are synthesized from p-cumaric, ferulic, and sinapic acids. The lower antioxidant activity was correlated with the lowest content of phenolic compounds and fatty acids with antioxidant functions. The inhibition of protease is mainly activated when the plant is subjected to a stress condition. Taking into account that the attacked seeds suffered stress from the action of the aphids, secondary metabolism was activated as a plant defense mechanism, resulting in higher rates of protease inhibition.

The correlation shown in HCA and the color map (Figure 2B) confirms the difference between the two type of seeds, where TAA was strongly correlated with the presence of higher TEP content and yellow flavonoids, such as caffeic acid, hydroquinonecarboxylic acid and rutin, in non-attacked fennel seeds. However, attacked seeds were strongly associated with protease inhibitors and PAL activity as a result of the larger availability of its substrate, phenylalanine.

4. Conclusions

The present study demonstrated that the non-attacked fennel seeds have a higher content of soluble protein, free amino acids, phenolic compounds, yellow flavonoids, and antioxidant activity. Peroxidase activity and polyphenol was higher in non-attacked seeds. In the attacked seeds, PAL activity, protease inhibition, and the phenylalanine content were higher. Overall, the aphid attack triggers the secondary metabolism in fennel plants, compromising the nutritional quality of the seeds for food use.

Acknowledgement

The authors thank the Brazilian CNPq, grant numbers 484850/2013-0 and 403847/2013-3, for financial supporting.

References

- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (2010). *Official Methods of Analysis*. Gaithersburg, MD, USA.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C.F.R. (2010). The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 814-818.
- Berger, L. R. R., Stamford, N. P., Willadino, L. G., Laranjeira, D., Lima, M. A. B., Malheiros, S. M. M., Oliveira, W. J., & Stamford, T. C. M. (2016). Cowpea resistance induced against *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* by crustaceous chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*. *Biological Control*, 92, 45-54.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Ciric, A., Soković, M., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. *Journal of Functional Foods*, 12, 428-438.
- Cheng, Y., Liu, L., Zhao, G., Shen, C., Yan, H., Guan, J., & Yang, K. (2015). The effects of modified atmosphere packaging on core browning and the expression patterns of PPO and PAL genes in ‘Yali’ pears during cold storage. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 1243-1248.
- Christopoulos, M. V., & Tsantili, E. (2015). Participation of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in increased phenolic compounds in fresh cold stressed walnut (*Juglans regia* L.) kernels. *Postharvest Biology and Technology*, 104, 17-25.
- Ehsanipour, A., Razmjoo, J., & Zeinali, H. (2012). Effect of nitrogen rates on yield and quality of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) accessions. *Industrial Crops and Products*, 35, 121-125.
- El-Awad, M. E., & Hassan, E. A. (2010). Physiological Responses of Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill) Plants to Some Growth Substances. The Effect of Certain Amino Acids and a Pyrimidine Derivative. *Journal of American Science*, 6, 120-125.
- Flores, G., Moreno, F. P., Blanch, G. P., & Del Castillo, M. L. R. (2014). Phenylalanine ammonia-lyase, flavanone 3 β -hydroxylase and flavonol synthase enzyme activity by a new in vitro assay method in berry fruits. *Food Chemistry*, 153, 130-133.
- Folch, J., Less, M., & Stanley, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- George, H. L., & Christoffersen, R. E. (2016). Differential latency toward (-)-epicatechin and catechol mediated by avocado mesocarp polyphenol oxidase (PPO). *Postharvest Biology and Technology*, 112, 31-38.

- Guo, M., Shi, T., Duan, Y., Zhu, J., Li, J., & Cao, Y. (2015). Investigation of amino acids in wolfberry fruit (*Lycium barbarum*) by solid-phase extraction and liquid chromatography with precolumn derivatization. *Journal of Food Composition and Analysis*, xxx, xxx-xxx.
- Hartmann, L., & Lago, R. C. A. (1973). *Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids*. Laboratory Practices, 22, 475–477.
- Häusler, R. E., Ludewig, F., & Krueger, S. (2014). Plant Science Amino acids – A life between metabolism and signaling. *Plant Science*, 229, 225-237.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501-513.
- Hsieh, L. S., Ma, G. J., Yang, C. C., & Lee, P. D. (2010). Cloning, expression, site-directed mutagenesis and immunolocalization of phenylalanine ammonia-lyase in *Bambusa oldhamii*. *Phytochemistry*, 71, 1999-2009.
- Kachroo, A., & Kachroo, P. Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense. (2009). *Annual Review of Phytopathology*, 47 (1), 153-176.
- Krainer, F. W., Pletzenauer, R., Rossetti, L., Herwig, C., Glieder, A., & Spadiut, O. (2014). Purification and basic biochemical characterization of 19 recombinant plant peroxidase isoenzymes produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 95, 104-112.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t4. *Nature*, 227, 680-685.
- Matsuno, H., & Uritani, I. (1972). Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. *Plant and Cell Physiology*, 13, 1091-1101.
- Nagendra, K. P., Bao, Y., Shaoyu Y., Yulong, C., Mouming, Z., Muhammad, A., & Yueming, J. (2009). Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis*Sonn.) seeds. *Food Chemistry*, 116, 1–7.
- Ndiaye, C., Xu, S. Y., & Wang, Z. (2009). Steam blanching effect on polyphenoloxidase, peroxidase and colour of mango (*Mangifera indica* L.) slices. *Food Chemistry*, 113, 92-95.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 6, 1328 p.
- Padul, M. V., Tak, R. D., & Kachole, M. S. (2012). Protease inhibitor (PI) mediated defense in leaves and flowers of pigeonpea (protease inhibitor mediated defense in pigeonpea). *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 77-82.
- Pinto, M. S. T., Siqueira, F. P., Oliveira, A. E. A., & Fernandes, K. V. S. (2008). A wounding-induced PPO from cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *Phytochemistry*, 69, 2297-2302.
- Ramvalho, F. S., Malaquias, J. B., Brito, B. D. S., Fernandes, F. S., & Zanuncio, J. C. (2015). Assessment of the attack of *Hyadaphis foeniculi* (Passerini) (Hemiptera: Aphididae) on biomass, seed and oil in fennel intercropped with cotton with colored fibers. *Industrial Crops and Products*, 77, 511–515.
- Rhodes, M. J. C., & Woollorton, L. S. C. (1971). The effect of ethylene on the respiration and on the activity of phenylalanine ammonia-lyase in swede and parsnip root tissue. *Phytochemistry*, 10, 1989-1997.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996–1002.

- Salama, Z. A., El Baz, F. K., Gaafar, A. A., & Zaki, M. F. (2015). Antioxidant activities of phenolics, flavonoids and vitamin C in two cultivars of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) in responses to organic and bio-organic fertilizers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14, 91-99.
- Sonkar, K. S., Pachauri, M., Kumar, A., Shukla, A., Patel, M., & Jagannadham, M. V. (2015). Heme-peroxidase from medicinal plant *Artocarpus lakoocha*: Purification, characterization and wound healing studies. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 180-190.
- Ullah, H., & Honermeier, B. (2013). Fruit yield, essential oil concentration and composition of three anise cultivars (*Pimpinella anisum* L.) in relation to sowing date, sowing rate and locations. *Industrial Crops and Products*, 42, 489-499.
- Vardavas, C. I., Majchrzak, D., Wagner, K. H., Elmadfa, I., & Kafatos, A. (2006). Lipid concentrations of wild edible greens in Crete. *Food Chemistry*, 99, 822–834.
- Wada, K. C., Mizuuchi, K., Koshio, A., Kaneko, K., Mitsui, T., & Takeno, K. (2014). Stress enhances the gene expression and enzyme activity of phenylalanine ammonia-lyase and the endogenous content of salicylic acid to induce flowering in pharbitis. *Journal of Plant Physiology*. 171, 895-902.
- White, J. A., Hart, R. J., & Fry, J. C. (1986). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, 8, 170-177.
- Wissemann, K. W., & Lee, C. Y. (1980). Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production. *American Journal of Enology and Viticulture*, 3, 206-211.
- Xavier-Filho, J., Campos, F. A. P., Ary, M. B., Silva, C. P., Carvalho, M. M. M., Macedo, M. L. R., Lemos, F. J. A., & Grant, G. (1989). Poor Correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 1.139-1.143.
- Zhang, X., & Liu, C. (2015). Multifaceted Regulations of Gateway Enzyme Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Biosynthesis of Phenylpropanoids. *Molecular Plant*, 8, 17-27.
- Zucker, M. (1968). Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase and lyase-inactivating system in potato tuber Diks. *Plant Physiology*, 43, 365-374.

Table 1. Free and total amino acids in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid.

Amino acid (g AA.100g ⁻¹ seed)	Total		Free	
	Non-attacked seeds	Attacked seeds	Non-attacked seeds	Attacked seeds
<i>Essential</i>				
Arginine	1.36 ± 0.00 ^A	1.26 ± 0.00 ^B	0.129 ± 0.00 ^a	0.018 ± 0.00 ^b
Histidine	0.36 ± 0.00 ^A	0.39 ± 0.00 ^A	0.009 ± 0.00 ^a	0.009 ± 0.00 ^a
Isoleucine	0.71 ± 0.00 ^A	0.74 ± 0.00 ^A	0.009 ± 0.00 ^a	0.006 ± 0.00 ^a
Leucine	1.05 ± 0.00 ^B	1.14 ± 0.00 ^A	0.007 ± 0.00 ^a	0.007 ± 0.00 ^a
Lysine	0.88 ± 0.00 ^B	0.95 ± 0.00 ^A	0.003 ± 0.00 ^b	0.012 ± 0.00 ^a
Methionine	0.26 ± 0.00 ^A	0.29 ± 0.00 ^A	0.016 ± 0.00 ^a	0.002 ± 0.00 ^b
Phenylalanine	0.81 ± 0.00 ^B	0.90 ± 0.00 ^A	0.003 ± 0.00 ^a	0.004 ± 0.00 ^a
Threonine	0.68 ± 0.00 ^B	0.78 ± 0.00 ^A	0.013 ± 0.00 ^b	0.065 ± 0.00 ^a
Valine	0.97 ± 0.00 ^A	0.98 ± 0.00 ^A	0.021 ± 0.00 ^b	0.043 ± 0.00 ^a
<i>Non-essential</i>				
Alanine	0.79 ± 0.00 ^B	0.85 ± 0.00 ^A	0.020 ± 0.00 ^a	0.010 ± 0.00 ^b
Aspartic acid	1.75 ± 0.00 ^B	1.86 ± 0.00 ^A	0.006 ± 0.00 ^b	0.012 ± 0.00 ^a
Cystine	0.04 ± 0.00 ^A	0.04 ± 0.00 ^A	0.003 ± 0.00 ^a	0.003 ± 0.00 ^a
Glutamic acid	3.14 ± 0.00 ^B	3.42 ± 0.00 ^A	0.021 ± 0.00 ^b	0.054 ± 0.00 ^a
Glycine	1.02 ± 0.00 ^B	1.16 ± 0.00 ^A	0.011 ± 0.00 ^a	0.005 ± 0.00 ^b
Proline	0.99 ± 0.00 ^A	0.96 ± 0.00 ^A	0.082 ± 0.00 ^a	0.008 ± 0.00 ^b
Serine	0.83 ± 0.00 ^B	0.93 ± 0.00 ^A	0.014 ± 0.00 ^b	0.045 ± 0.00 ^a
Tyrosine	0.49 ± 0.00 ^B	0.54 ± 0.00 ^A	0.005 ± 0.00 ^a	0.006 ± 0.00 ^a
Total	16.12 ± 0.03 ^B	17.21 ± 0.03 ^A	0.37 ± 0.00 ^a	0.31 ± 0.05 ^b

Values are means ± standard error; Different capital letters, for total amino acids, and lowercase letters, for free amino acids in the same column are significantly different by the Tukey test (P<0.05). n= 4

Table 2. Total protein, soluble protein, peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and protease inhibitor in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid.

Variable	Non-attacked seeds	Attacked seeds
Total protein (g.100g ⁻¹)	22.53 ± 0.25 ^a	22.03 ± 0.6 ^a
Soluble protein (mg.mL ⁻¹)	6.57 ± 0.35 ^a	4.66 ± 0.19 ^b
POD (U.g ⁻¹ .min ⁻¹)	213.11 ± 4.44 ^a	156.22 ± 5.39 ^b
PPO (U.g ⁻¹ .min ⁻¹)	1148.89 ± 8.89 ^a	462.22 ± 1.11 ^b
PAL (U.g ⁻¹ .min ⁻¹)	71.11 ± 23.4 ^b	306.67 ± 20.0 ^a
Protease Inhibitor (UI)	17.51 ± 0.12 ^b	45.08 ± 2.85 ^a

Values are means ± standard error, which followed by the same letter in the line do not differ

by the Tukey's test (P<0.05). n=4

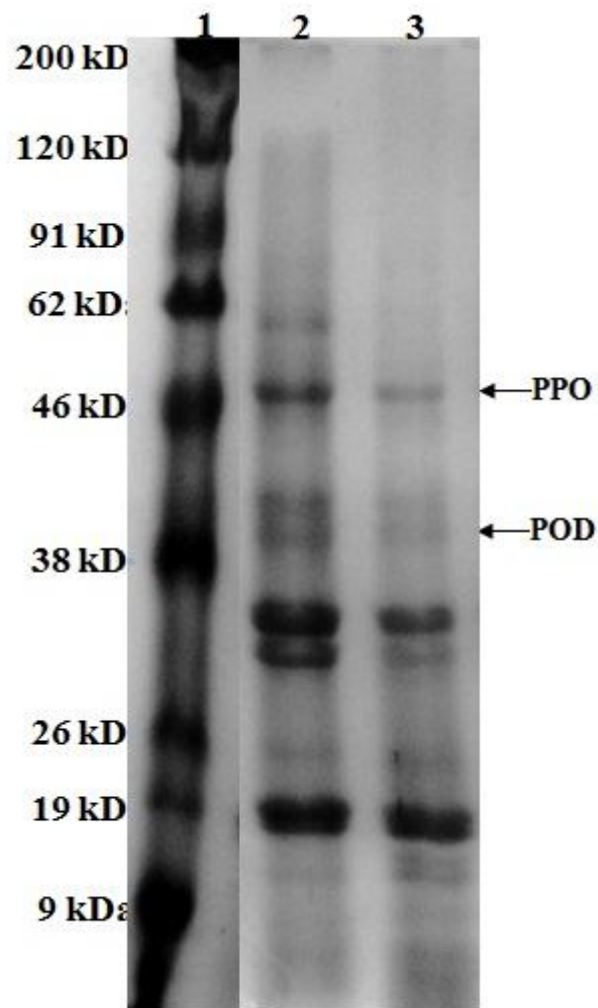


Figure 1. SDS-PAGE in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid. **1-** Molecular Markers (Myosin, 200 kDa; β -galactosidase, 120 kDa; Bovine Serum, 91 kDa; Glutamin, 62 kDa; Albumin, 46 kDa; Carbonic anhydrase, 38 kDa; Myoglobin, 26 kDa; Lysozyme, 19 kDa; Aprotinin, 9 kDa); **2-** Seed non- attacked; **3** Seed Attacked.

Table 3. Total extractable polyphenols, yellow flavonoids, total antioxidant activity and profile phenolic compounds in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid.

Phenolic compounds and Antioxidant activity	Non-attacked	Attacked
Total extractable polyphenols (mg.100g ⁻¹)	1064.5±57.38 ^a	220.15±5.97 ^b
Yellow flavonoids (mg.100g ⁻¹)	10.21 ± 0.26 ^a	2.34 ± 0.05 ^b
EC50 (g seed DPPH [•] g ⁻¹)	107.74±11.31 ^b	791.29±7.92 ^a
ABTS ^{•+} (uM Trolox g seed ⁻¹)	89.61 ±11.52 ^a	25.04 ±3.96 ^b
Phenolic acids		
<i>Caffeic acid</i> (<i>(E)</i> -3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoic acid)	30.82±0.00 ^a	11.50±0.00 ^b
<i>Ellagic acid</i> (4,4',5,5',6,6'-Hexahydroxydiphenic acid2,6,2',6'-dilactone)	23.07±0.00 ^a	1.54±0.00 ^b
<i>Ferulic acid</i> (<i>(E)</i> -3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid)	163.00±0.00 ^a	1.51±0.00 ^b
<i>Hydroquinonecarboxylic acid</i> (2,5 dihydroxybenzoic acid)	40.01±0.00 ^a	1.30±0.00 ^b
<i>p-Coumaric acid</i> (<i>(E)</i> -3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid)	10.83±0.00 ^a	1.49±0.00 ^b
<i>Protocatechuic acid</i> (3,4-dihydroxybenzoic acid)	12.45±0.00 ^a	1.30± 0.00 ^b
<i>p-Salicylic acid</i> (4-hydroxybenzoic acid)	79.03±0.00 ^a	42.00±0.00 ^b
<i>Salicylic acid</i> (2-hydroxybenzoic acid)	21.27±0.00 ^a	7.30±0.00 ^b
<i>Sinapic acid</i> (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid)	47.10±0.00 ^a	3.48±0.00 ^b
<i>Syringic acid</i> (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid)	16.56±0.00 ^a	1.25±0.00 ^b
<i>Vanillic acid</i> (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid)	16.56±0.00 ^a	1.25±0.00 ^b
Flavonols		
<i>Myricetin</i> (3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chromen-4-one)	20.50±0.00 ^a	7.30±0.00 ^b
<i>Quercetin</i> (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one)	5.43±0.00 ^a	3.87±0.00 ^b
<i>Rutin</i> (Quercetin 3-rutinoside)	152.35±0.00 ^a	4.40±0.00 ^b
Flavanol		
<i>Catechin</i> (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -chromene-3,5,7-triol)	30.48±0.00 ^a	3.37±0.00 ^b
Flavanone		
<i>Naringenin</i> (5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) -2,3-dihydrochromen-4-one)	0.38±0.00 ^a	0.70±0.00 ^a

Values are means ± standard error, which followed by the same letter in the line do not differ by the Tukey's test (P<0.05). n= 4

Table 4. Fatty acids and lipids in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid.

Fatty acids (%)	Non-attacked seeds	Attacked seeds
<i>Short Chain</i>		
Caproic acid (C6:0)	0.10 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.03 ^a
Caprylic acid (C8:0)	0.24 ± 0.04 ^b	0.52 ± 0.13 ^a
Capric acid (C10:0)	0.02 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a
Undecanoic acid (C11:0)	3.00 ± 0.40 ^a	3.01 ± 0.50 ^a
<i>Medium Chain</i>		
Lauric acid (C12:0)	0.93 ± 0.03 ^a	1.23 ± 0.11 ^a
Myristic acid (C14:0)	0.25 ± 0.04 ^a	0.16 ± 0.02 ^a
Myristoleic acid (C14:1)	0.18 ± 0.02 ^a	0.24 ± 0.03 ^a
Pentadecanoic acid (C15:0)	0.11 ± 0.02 ^a	0.07 ± 0.01 ^a
Palmitic acid (C16:0)	5.52 ± 0.44 ^a	4.92 ± 0.3 ^a
Palmitoleic acid (C16:1)	0.43 ± 0.02 ^a	0.44 ± 0.01 ^a
<i>Long Chain</i>		
Heptadecanoic acid (C17:0)	0.07 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.01 ^a
Stearic acid (C18:0)	1.53 ± 0.09 ^a	1.46 ± 0.10 ^a
Oleic acid (C18:1 n9cis)	71.44 ± 0.83 ^a	72.21 ± 1.90 ^a
Vaccenic acid (C18:1 n11)	0.54 ± 0.08 ^a	0.43 ± 0.03 ^a
Linoleic acid (C18:2 n6cis)	11.78 ± 0.35 ^a	12.28 ± 0.30 ^a
Alpha-linolenic acid (C18:3 n3)	0.62 ± 0.06 ^a	0.29 ± 0.02 ^b
Arachidic acid (C20:0)	0.41 ± 0.05 ^a	0.41 ± 0.05 ^a
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid (C20:3n3)	0.04 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a
Behenic acid (C22:0)	0.16 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.04 ^a
Tricosanoic acid (C23:0)	0.11 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.02 ^a
Lignoceric acid (C24:0)	2.52 ± 0.68 ^a	1.84 ± 0.39 ^a
Total SFA	14.98 ± 1.28 ^a	14.08 ± 1.02 ^a
Total MUFA	72.58 ± 0.94 ^a	73.32 ± 1.81 ^a
Total PUFA	12.44 ± 0.36 ^a	12.60 ± 0.32 ^a
Total lipids (g. 100 g ⁻¹)	5.64 ± 1.69 ^a	5.70 ± 1.41 ^a

Values are means ± standard error, which followed by the same letter in the line do not differ by the Tukey's test (P<0.05). n=4. SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.

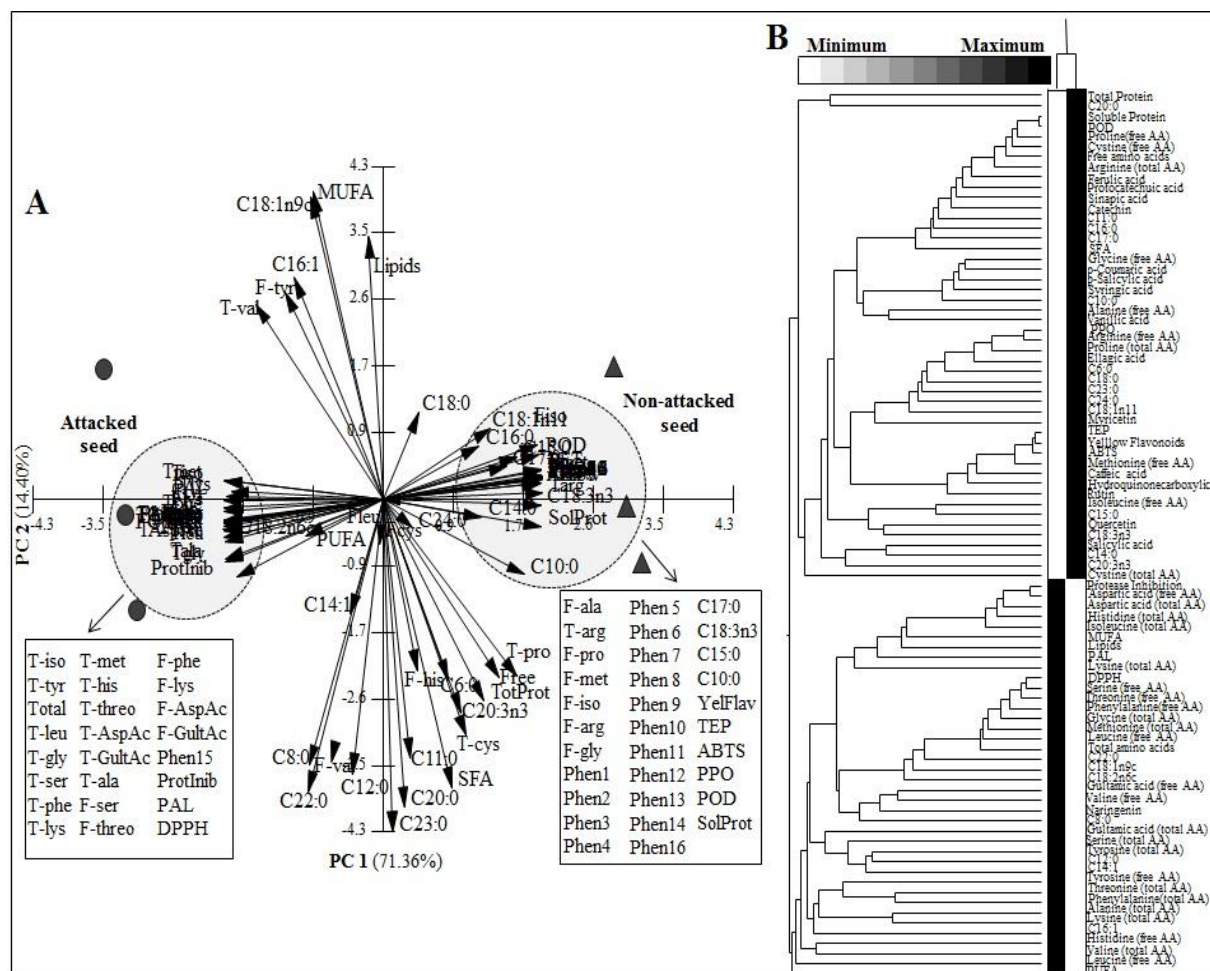


Figure 2. **A**-PCA: Biplot of the loadings and scores of PC1 and PC2 of amino acids (AA) profile, total protein, soluble protein, POD, PPO, PAL, protease inhibitor, phenolic compounds profile, fatty acids profile, total lipids, TEP, yellow flavonoids, and TAA in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid; T (AA total), F (AA free), iso (isoleucine), tyr (tyrosine), Total (total amino acids), leu (leucine), gly (glycine), ser (serine), phe (phenylalanine), lys (lysine), met (methionine), his (histidine), threo (threonine), AspAc (aspartic acid), GlutAc (glutamic acid), ala (alanine), arg (arginine), pro (proline), ProtInib (protease inhibitor), YelFlav (yellow flavonoids), SolProt (soluble protein), Phen 1 (caffeic acid), Phen 2 (ellagic acid), Phen 3 (ferulic acid), Phen 4 (hydroquinonecarboxylic acid), Phen 5 (p-coumaric acid), Phen 6 (protocatechuic acid), Phen 7 (p-salicylic acid), Phen 8 (salicylic acid), Phen 9 (sinapic acid), Phen 10 (syringic acid), Phen 11 (vanillic acid), Phen 12 (catechin), Phen 13 (myricetin), Phen 14 (quercetin), Phen 15 (naringenin), Phen 15 (rutin). **B**: HCA and color map in amino acids profile, total protein, soluble protein, POD, PPO, PAL, protease inhibitor, phenolic compounds profile, fatty acids, lipids, TEP, yellow flavonoids, and TAA in fennel seeds non-attacked and attacked by aphid.

ARTIGO 2: Inhibitory effects of coatings containing jackfruit starch and essential oil from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds on postharvest anthracnose in ‘Palmer’ mango fruit

ABSTRACT

Inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* was evaluated in ‘Palmer’ mango coated with jackfruit starch and two types of essential oils from fennel seeds non-attacked and attacked by aphids *Hyadaphis foeniculi*. GC-MS analyses showed twenty four compounds in each essential oil, including terpenes, phenylpropanoids and esters. The major compound identified was *trans*-anethole, which was higher in essential oil from attacked seeds. The minimal inhibitory concentration (MIC) for both essential oils was 0.5%. ‘Palmer’ mango protection assay was performed with the application of jackfruit seed starch-based coating and each of the essential oils at MIC. Mango fruit coated with the starch-essential oil showed lower anthracnose lesion diameter than uncoated fruit, which was reduced by about half in coated fruits in which essential oil from attacked seeds was added. Therefore, the addition of essential oil from attacked seeds to jackfruit starch-based coating can be an alternative for the control of *C. gloeosporioides* in mango.

Keywords: Edible coatings, *Artocarpus heterophyllus*, fruit quality, essential oil, *Colletotrichum*, antifungal activity.

1. Introduction

Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) is a biennial and aromatic plant belonging to the Apiacea family (Caleja et al., 2015; Diao, Hu, Zhang, & Xu, 2014). It is an important economic crop, which has been traded worldwide for centuries due to its therapeutic and alimentary properties (Rather, Dar, Sofi, Bhat, & Qurishi, 2012). *F. vulgare* species is known by its characteristic sweetish seed, which produce an essential oil mainly composed of derivatives from phenylpropanoids and terpenes, including *trans*-anethole, estragole, limonene, fenchone, α -phellandrene and α -pinene (Senatore et al., 2013).

Fennel seeds essential oil has been used as a flavoring agent in culinary preparations, confectionery, cordials and liqueurs (Napoli, Curcuruto, & Ruberto, 2010; Samojlik, Mijatović, Petković, Skrbić, & Božin, 2012), as well as in the cosmetic and pharmaceutical industry as an ingredient for balsamic, cardi tonic and digestive products (Hashmi et al., 2012). This essential oil has showed strong antioxidant (Roby, Sarhan, Selim, & Khalel, 2013; Salama, El Baz, Gaafar, & Zaki, 2015; Senatore et al., 2013), antimicrobial (Diao et al., 2014), and insecticide (Napoli et al., 2010; Zoubiri, Baaliouamer, & Chamouni, 2014), anti-inflammatory (Zoubiri & Baaliouamer, 2011) and analgesic properties (Samojlik et al., 2012; Telci, Demirtas, & Sahin, 2009).

However, fennel crops in Brazil have a common insect pest; the aphid *Hyadaphis foeniculi* (Passerini) (Hemiptera: Aphididae), which mainly attacks the inflorescence of the plant, causing serious damage from continually sucking the sap. This results in the wilting and dehydration of flowers, fruit and leaves, decreasing the size, quantity and quality of seeds, in addition to decrease the yield and probably the essential oil composition (Malaquias et al., 2014; Ramalho, Malaquias, Brito, Fernandes, & Zanuncio, 2015).

In some studies, the use of the fennel essential oil has already been confirmed as an alternative to maintain quality (Azerêdo, Silva, Lima, Dantas, & Pereira, 2016; Lima, Silva, Rocha, Nascimento, & Ramalho, 2012) and inhibit mycelial growth and spore germination of *Aspergillus flavus* and *A. niger* (Caleja et al., 2015; Passone, Girardi, Ferrand, & Etcheverry, 2012; Roby et al., 2013). Another pathogenic fungus that could be controlled by fennel essential oil is *Colletotrichum gloeosporioides*, the causative-agent of anthracnose, a common disease in mango fruit. This disease impairs the quality of fruit and usually restricts the production of mango fruit in tropical and subtropical regions around the world (Mattiuz et al., 2015).

The control of *C. gloeosporioides* is normally performed by chemical fungicides. However, investigations have been seeking alternatives for controlling postharvest disease in fruit (Hu et al., 2014), including the use of edible coatings containing essential oils (Azerêdo et al., 2016), mainly for reducing the metabolic process and decreasing mycelial fungal growth (Guerreiro, Gago, Faleiro, Miguel, & Antunes, 2015; Jouki, Yazdi, Mortazavi, & Koocheki, 2014; Salvia-Trujillo, Rojas-Graü, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2015). For instance, starch-based coatings have showed capability to provide a physical barrier that minimizes the diffusion of gases and maintains the aroma (Kraśniewska et al., 2014). One such type of starch is obtained from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds, which are generally discarded as waste. This starch presents good chemical and morphological characteristics, with suitable properties for gelatinization (Madruga et al., 2014), featuring as a promising material to form-coating dispersion on fruit.

In Brazil, the North-American monoembryonic ‘Palmer’ mango, is a major exported fruit, which presents purple and red skin when ripe and superior characteristics for fresh consumption. The pulp is yellow, firm, has a good taste, with little or no fiber, and has consolidated markets in the United States and Europe (Pinto, Pinheiro Neto, & Guimarães,

2011; Santos, Lima Neto, Rodrigues, & Costa, 2008; Trindade, Lima, & Assis, 2015). However, this fruit features high perishability and is susceptible to pathogen attacks such as *C. gloeosporioides* (Trindade et al., 2015).

The use of essential oil to assess the resistance of pathogens is a strategy to control the growth of fungi due to the action of secondary metabolites (Roby et al., 2013), and could be an alternative to minimize the use of synthetic fungicides. Based on this, the nano-association of essential oil in the polymeric starch-based matrix of an edible coating can provide an effective means for controlling postharvest diseases. Therefore, the objective of this study was to identify the volatile compounds of essential oils extracted from seeds attacked and non-attacked by aphids [*Hyadaphis foeniculi* (Passerini) (Hemiptera: Aphididae)], to investigate the *in vitro* antifungal effects of these essential oils against the pathogen *C. gloeosporioides*, and also to evaluate the prevention of anthracnose in mango fruit through the application of coating comprising jackfruit seed starch and the tested essential oils.

2. Materials and methods

2.1 Materials

2.1.1 Essential oils

Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) essential oil was extracted by hydrodistillation using the Clevenger apparatus, from seeds harvested from plants that had and had not been attacked by aphids *Hyadaphis foeniculi* (Passerini) (Hemiptera:Aphididae) (Ramalho et al., 2015). The attacked and non-attacked seeds were gently supplied by Embrapa Algodão Experimental Station (634 m, S 7°10'5" W 35°51'13"; Campina Grande, Paraíba, Brasil).

2.1.2 Pathogen isolation

Colletotrichum gloeosporioides strains were isolated from mango fruit with symptoms of anthracnose and identified through taxonomic-keys as described elsewhere (Menezes & Assis, 2004). For complete purification, 5.0 mm diameter mycelial-plugs were consecutively re-isolated from a 8-day old culture cultivated in potato dextrose agar (PDA) at 25 °C under a photoperiod of 12 h. The test strain was verified for their ability to cause characteristic symptoms of anthracnose in mango fruit, including watersoaked, sunken, circular spots quickly covered by necrotic lesions of a circular shape and dark brown color, and in advanced stages of the disease, the fungus produced acervuli, and abundant orange to salmon pink masses of conidia appeared on the lesions (Kamle et al., 2013). Before assays, the strain was inoculated in fruit, and after anthracnose development the strain was re-isolated and identified with taxonomical keys

2.1.3 Fruit

‘Palmer’ mango fruit were harvested at stage ‘3’ commercial maturity, characterized by the yellowish-green skin color, yellowish pulp and mean soluble solids content of 6.5 % (EMEX, 1998), from a commercial farm orchard (09°19'53"S, 40°41'29"W) located in the city of Petrolina (Pernambuco, Brazil). Fruit were selected for maturity, absence of physical injuries and/or visible infection signs. Prior assays, fruit were washed with tap water, sanitized with 150 ppm sodium hypochlorite for 5 min and air-dried at room temperature.

2.2 Analysis of essential oil volatile compounds

Extraction of the volatile compounds was performed by diluting 35 μL of the essential oil to 1000 μL of n-Hexane (HPLC grade). The separation was performed using a Varian gas chromatograph (model Saturn 2000R 3900) with a split/splitless injector, coupled to a mass spectrometer with an ion trap analyzer (Varian Saturn 2100 T). The volatile compounds were dissolved over 5 min at 270 $^{\circ}\text{C}$ in the injection system, in the split mode 1:100. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. The analytical capillary column used was non-polar stationary phase Methylpolysiloxane-5% Phenyl, HP-5, Varian (60 m x 0.25 mm x 0.25 μm). The oven temperature was initially 60 $^{\circ}\text{C}$ for 4 min, and then elevated to 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 250 $^{\circ}\text{C}$, with total run time of 63.33 min. The mass spectrum and the total ion chromatograms (TIC) were registered in the positive impact of electrons (EI^+) on the band of 29-400 m/z (5.8 Hz frequency scanning), with 70 eV of electron energy applied. The data acquisition and control system were obtained with the MS Data Review Workstation Toolbar software, Version 6.9.1 (Varian). Linear retention index (LRI) was calculated to identify volatile compounds, based on the retention times of a series of n-alkanes (C9–C26) under the same analytical conditions. Confirmation of the volatile compounds was performed by comparing the LRI and mass spectra of the sample compounds with the standard using the NIST database (National Institute of Standards & Technology) or the Adams database (2007). Essential oil components were reported as a relative percent of the total oil content by the peak area.

2.3 Assays of mycelial growth assay inhibition

The inhibitory effect of the essential oils on the fungal mycelial growth was evaluated using an agar diffusion assay (Guerreiro et al., 2015), using six essential oil concentrations

(0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, and 0.5 % v/v), in six replicates, which were mixed with PDA, pH 5.6, and autoclaved at 121°C for 15 min (cooled to 40 °C). The PDA agar containing the essential oils at the assayed concentrations were poured into 90 mm diameter Petri dishes for inoculation of 6 mm-diameter mycelial-plugs of *C. gloeosporioides*, taken from the edge of an active growing 8-days old colony , followed for incubation at 25 °C under a photoperiod of 12 h. At every 3 days-incubation period interval, the diameter of the colonies was measured, until the colony with the highest growth rate reached the edge of the dish (9 days). The experiment was repeated twice to confirm the results. The fungal mycelial growth inhibition was calculated using the following equation:

$$\text{Inhibition of mycelial growth (\%)} = [(C-T/C) \times 100]$$

Where, C and T represent the average of the six replicates of the mycelial growth (mm) in the control and treated dishes, respectively (Elsherbiny, Amin, & Baka, 2016).

The minimum inhibitory concentration (MIC) was considered as the lowest concentration of each essential oil needed to inhibit the mycelial growth of the inoculated fungus (Siroli et al., 2015).

2.4 Assays of “Palmer” mango fruit protection against anthracnose

For anthracnose prevention assay in ‘Palmer’ mango fruit, each of the tested essential oil (MIC; 0.5% v/v) was incorporated by sonication (Missonix ultrasonic liquid processors - S4000) for 3 minutes into a 3% jackfruit seed starch gelling solution containing 1% glycerin and 0.5% Tween 20®; final temperature of 60 °C needed for jackfruit starch gelation.. Therefore, four mango fruit groups were set: control (without coating), coated with jackfruit seed starch solution at 3% (JS), coated with a dispersion containing jackfruit seed starch and essential oil from non-attacked seeds (EON), and coated with a dispersion containing jackfruit

seed starch and essential oil from attacked seeds (EOA). Starch was extracted by grinding with distilled water jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed peeled followed by filtration and 12 hours of decantation and then lyophilized so that the final moisture content reached 10%. Regarding the coating application, the fruit were immersed for 1 min in the different dispersions. After air-drying, each fruit was pierced in two opposite directions, using a sterile metal handle, to allow the insertion of 6 mm diameter *C. gloeosporioides*-plugs. Next, fruit were incubated at room temperature (25 ± 2 °C) in the dark during 24 h under high humidity. Each fruit group was composed of nine replicates of four fruit each and disease severity was assessed by measuring the mean lesion diameter in millimeters every 2 days-incubation intervals during 10 days. Fruit forming the uncoated control group were assessed similarly.

2.5 Evaluation of physicochemical quality of ‘Palmer’ mango fruit

The fruit were assessed for some physicochemical quality characteristics at the same incubation time intervals used in assays of anthracnose protection. Firmness was measured (Newtons) using a manual penetrometer (Magness Taylor Pressure Tester), with an insertion region of 2/8 inch diameter, and two readings in the equatorial region of the opposite sides of the fruit. Titratable acidity (TA g of citric acid/100g) was determined by titration with 0.1M sodium hydroxide solution using 1% phenolphthalein as an indicator; soluble solids (SS - in %) was performed using a bench refractometer (ATAGO) at 20 °C; from these results the SS/TA ratio was calculated . pH was measured using a digital potentiometer (AOAC, 2010). Each coating was composed of 3 replicates of five mangos for each evaluation period.

2.6 Statistical analysis

Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) using SAS/STAT 9.3 software (SAS, 2011). Tukey's test was applied to determine the significance among treatments ($P < 0.05$). A hierarchical cluster analysis (HCA) and a color map was performed based on quantitative changes of the compounds using JMP® 10.0.0 software in order to evaluate the effects of the volatile compounds of essential oils on the percentage of mycelial growth inhibition and mango protection assay against anthracnose.

3. Results and discussion

3.1 Essential oil volatile compounds

The profile of fennel essential oil volatile compounds from attacked and non-attacked seeds identified twenty-four volatile compounds, which are divided into monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, phenylpropanoids, esters and sesquiterpenes. Higher contents were found for *trans*-anethole, methyl chavicol, limonene and fenchone. The significant differences ($P < 0.05$) among the volatile compounds of the two types of fennel essential oils were identified for α -pinene, camphene, sabinene, α -phellandrene, limonene, β -ocimene, γ -terpinene, 1.8 cineole, bornyl acetate and aromadendrene, which were higher in the non-attacked essential oil. In turn, the *cis*-anethole, *p*-anisaldehyde and *trans*-anethole, belonging to the phenylpropanoids class, showed higher contents in essential oil from attacked seeds (Table 1).

The characterization of essential oil volatile compounds from different parts of the fennel plant has been studied because the wide use of this herb in different areas (Rodríguez-Solana, Salgado, Domínguez, & Cortés-Diéguez, 2014a; Zoubiri et al., 2014). The plants produce volatile compounds in response to light and temperature changes or other abiotic

stresses, such as flooding or drought, or biotic stresses such as pest attacks (Maffei, 2010). The content of volatile compounds in seeds depends on their phenological state and origin (Rodríguez-Solana, Salgado, Domínguez, & Cortés-Diéguez, 2014b; Ullah & Honermeier, 2013) and can often reveal the freshness, processing or storage history of a product (Maikhunthod & Marriott, 2013).

The variations in the chemical composition of essential oil might be attributed to the varied ecological conditions, genetics, maturity stage, or adaptive metabolism of plants (Roby et al., 2013; Senatore et al., 2013). Changes in the volatile fraction can be influenced by interaction with other secondary metabolites, influencing the distribution percentage of chemical classes, as well as the total amount of volatiles (Tschiggerl & Buscar, 2012).

The volatile profile of fennel essential oil found herein confirms the data reported by an early study (Diao et al., 2014), which identified twenty eight compounds in essential oil from fennel seeds, and found *trans*-anethole and estragole (methyl chavicol) as major components, followed by limonene and fenchone. The compounds *trans*-anethole and estragole are isomers, whose only difference is the double bond position of the propenyl chain (Zoubiri & Baaliouamer, 2011). Telci et al. (2009) described similar values to *trans*-anethole (81.63 to 85.96%), limonene (3.44 to 3.44%), and fenchone (2.00 to 2.40%) in fennel mature fruit. The content of methyl chavicol was similar (13.11%) to the Egyptian fennel seeds essential oils (Viuda-Martos et al., 2011). Due to genotoxic and carcinogenic potential of estragole (Maffei, Gertsch, & Appendino, 2011), studies suggest breeding technologies for the production of tea reducing the content of this compound (Raffo, Nicoli, & Leclercq, 2011), which has a limit established by the European Pharmacopeia for this essential oil as less than 5% (Napoli et al., 2010; Ullah & Honermeier, 2013). However, Napoli et al. (2010), describe estragole as the main compound of wild fennel seeds, with variations between 34 and 89%.

Trans-anethole, methyl chavicol and fenchone are associated with the sweetish characteristic of fennel seeds, as the α -phellandrene is related to bitter taste (Rodríguez-Solana et al., 2014b). Maikhunthod & Marriott (2013) identified the volatiles of fennel seeds, for which the major compounds responsible for aroma perception were limonene, 1,8-cineole, terpinen-4-ol, estragole and *trans*-anethole, and with the latter two having sweetish characteristics. The monoterpenes that represent 'freshness' are β -pinene and β -myrcene. Sesquiterpenes and sesquiterpene oxides are suggested as an aging index, while *p*-anisaldehyde is characterized for floral odor. Fenchone and camphor are also impact-odorants. Therefore, the action of essential oils is not due to a single compound, but is usually derived from interactions and a synergistic effect of different constituents present in the oil. In this direction, γ -terpinene and *p*-cymene, can play key roles in the process of flavoring and as a precursor of oxygenated compounds (Farzaneh, Kiani, Sharifi, Reisi, & Hadian, 2015).

The content of the compounds present in fennel essential oil studied herein is in agreement with the results reported by other studies for α -pinene (1.22%, Zoubiri et al., 2014), camphene (0.02%, Samojlik et al., 2012), sabiene (0.5%, Napoli et al., 2010), β -pinene (0.10%, Zoubiri & Baaliouamer, 2011), myrcene (0.3%, Napoli et al., 2010), α -phellandrene (0.12%, Diao et al., 2014), γ -terpinene (1.4%, Roby et al., 2013), camphor (0.17%, Viuda-Martos et al., 2011) and *cis*-anethole (0.13%, Ullah & Honermeier, 2013).

3.2 Mycelial growth assay

The *in vitro* assays for measurement of the antifungal effects of fennel essential oils from seeds that were attacked and not attacked by aphids on showed significant ($P < 0.05$) mycelial growth inhibition toward *C. gloeosporioides*, where the MIC of both tested essential oils was 0.5%. There was no mycelial growth until the 9th day of incubation. The inhibitory

effects over the 9 days- incubation period was generally higher for the essential oil from attacked seeds, with the percentage of inhibition varying between 8.5 - 100%, at concentrations of 0.05 and 0.5%, respectively. For the essential oil from non-attacked seeds, the percentage of inhibition varied between 9.9 - 100% (Table 2).

According to Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar (2008), the cytotoxicity of essential oil toward microorganism depends on the state of cell growth and cell division, and is more effective on budding sites. The antifungal activity of essential oils can cause severe lesions of the membrane due to direct and metabolic impairment, leading to secondary membrane damage. Furthermore, other mechanisms affecting the functional integrity of mitochondria, inhibiting the synthesis of ATP in the mitochondria of fungi strains and accumulation of ROS after using essential oils are involved. This phenomenon is considered as one of the primary biochemical hallmarks of apoptosis promoting morphological changes, nuclear fragmentation, chromatin condensation, cellular swelling, and phosphatidylserine externalization (Farzaneh et al., 2015).

The fungicidal action of fennel essential oil and extract has been proven on pathogenic microorganisms, indicating this as a natural compound with proven benefits (Passone et al., 2012). The antimicrobial activity of fennel essential oil assessed by using minimum inhibitory concentration method was efficient against *Aspergillus flavus* between 10 to 15% concentration (Roby et al., 2013).

The larger *in vitro* antifungal effects showed by the essential oil from seeds that were attacked by aphids can be associated to the relative concentrations of specific bioactive compounds, such as *cis*-anethole, *p*-anisaldehyde and *trans*-anethole, which presented strong inhibitory effects in earlier studies (Diao et al., 2014; Senatore et al., 2013). Phenylpropanoids, such as *p*-anisaldehyde, tested at 98.4 $\mu\text{L.L}^{-1}$, showed efficiency to provoke mycelial growth inhibition of 85.4 % of the fungus *Neofabrea alba* (Neri, Mari,

Brigati, & Bertolini, 2009). Antimicrobial effects of various extracts and fennel seeds essential oil has been also attributed to anethole (Samojlik et al., 2012); still, the presence of *trans*-anethole as the main compound has associated with the larvicide capacity of fennel seed essential oil to control the *Culex pipiens* mosquito (Zoubiri et al., 2014). Others compounds, such as limonene and methyl chavicol, are also related as possessing antimicrobial properties (Senatore et al., 2013). Monoterpene or sesquiterpene hydrocarbons and their oxygenated derivatives (which are the major components of essential oils), exhibit potential antimicrobial activities, and this is related to the break through in the permeability of the associated cell membrane, resulting in cell death (Diao et al., 2014).

3.3 Mango protection assay

The lesion diameter caused by *C. gloeosporioides* in ‘Palmer’ mango fruit coated with jackfruit starch was similar to the control. However, fruit that were coated with jackfruit seed starch and the essential oils (0.5%) showed a smaller lesion diameter on the 5th and 10th day of storage. Interestingly, fruit coated with jackfruit seed starch and essential oil from attacked seeds showed smaller lesion diameter than fruit coated with jackfruit seed starch and essential oil from non-attacked seeds from the 5th day of storage onward (Table 3).

Coatings containing essential oils has shown to be effective in controlling pathogens in fruit, such as *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Rhizopus stolonifer* (Guerra et al., 2015). The growth of *R. stolonifer* and *A. niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.) was inhibited by application of a coating composed of chitosan and oregano essential oil (Santos et al., 2012). A coating composed of quince seed mucilage and oregano essential oil showed *in vitro* inhibition against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*,

Lactobacillus plantarum, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, and *Shewanella putrefaciens* (Jouki et al., 2014). The edible coatings of sodium alginate added to the nanoemulsion-based on lemongrass essential oil exhibited faster and greater inactivation of *Escherichia coli* and the natural microflora compared with conventional emulsions in fresh-cut Fuji apples during two weeks storage (Salvia-Trujillo et al., 2015).

Bosquez-Molina, Jesús, Bautista-Baños, Verde-Calvo, & Morales-López (2010), verified *in vitro* and *in vivo* growth inhibition of *C. gloeosporioides* and *R. stolonifer* treated with thyme and Mexican lime essential oils in stored papaya fruit through the application of the essential oils alone or incorporated into a mesquite gum-based coating. The combination of coatings comprised of *Aloe vera* and chitosan with thyme essential oil also revealed great potential in reducing the anthracnose incidence in avocado fruit (Bill, Sivakumar, Korsten, & Thompson, 2014). For our knowledge, there is no information on the influence of the combination of coatings comprised of jackfruit-starch and fennel seed essential oil on the control of anthracnose in mangoes.

The *in vitro* growth of *C. gloeosporioides* was inhibited with extracts of the triterpenes and fatty acids from the pericarp of *A. catechu* L. which was effective in controlling postharvest anthracnose in mangos at doses of 100 and 200 mg.L⁻¹ (Yenjit, Issarakraisila, Intana, & Chantrapromma, 2010).

3.4 Physicochemical quality in ‘Palmer’ mango fruit

The ‘Palmer’ mango fruit coated with jackfruit seed starch and fennel seed essential oils following 10 days of storage showed the highest firmness (18.93 N), mainly for fruit coated with essential oil from seeds attacked by aphids. The lower firmness was observed for fruit whose coating contained the essential oil from non-attacked seeds, with 10.53N. Fruit

softening, one of the most important quality deterioration features during postharvest storage, is generally caused by the hydrolysis of starch to sugar and mainly the degradation of pectin in the fruit cell wall associated with fruit ripening. Herein, the values of firmness in ‘Palmer’ mango decreased throughout storage, but coatings added of fennel seeds essential oils from attacked seeds helped to maintain firmness as compared to control or even to fruit coated only with jackfruit starch. The benefit of adding essential oils from attacked seeds to coatings on firmness retention in mangos, as compared to other coatings applied herein, may be attributed to lower microbial development resulting of adding this oil to jackfruit starch coating.

The highest titratable acidity (TA) was observed in mango fruit coated with jackfruit seed starch and essential oil from attacked seeds, followed by fruit coated with jackfruit seed starch and essential oil from non-attacked fennel seed, at the end of 10 days of storage. The soluble solids (SS) was found in greater content (14.92%) for fruit coated with jackfruit seed starch and essential oil from attacked seed, followed by fruit coated with only jackfruit seed starch and uncoated fruit; the least content (11.92%) was found in fruit coated with jackfruit seed starch and essential oil from attacked seed at 10 days of storage. From the above it appears that adding essential oils from attacked seeds to coatings was the most efficient in maintaining soluble solids for 10 days at room conditions, which can indicate lower sugar metabolism and, thus, a delay in ripening.

The SS/TA ratio was higher for fruit coated with jackfruit seed starch without the association of essential oil, because of the lowest titratable acidity, and less for fruits coated with added essential oil from non-attacked fennel seed at 10 days of storage. The pH following 10 days of storage did not differ among coatings applied to ‘Palmer’ mango fruit.

‘Tommy Atkins’ mangos harvested at stage 3 maturity and coated with cassava starch with added fennel essential oil and stored at 10°C maintained the quality and purchase intention for 15 days (Lima et al., 2012). Azêredo et al. (2016) reported the maintenance of

quality and absence of decay for ‘Tommy Atkins’ mangos coated with cassava starch with added fennel essential oil following the transference from cold storage at 10°C to room conditions after 20 days.

3.5 Hierarchical cluster analysis (HCA) and color map

The comparative quantitative changes in the volatile compounds profile and percentage of mycelial growth inhibition are shown in the HCA and color map (Fig. 1). The percentage of mycelial growth inhibition was little influenced by the concentration of essential oil, up to 0.05% for the two seed types. However, concentrations between 0.1% to 0.5% influenced the inhibition of mycelial growth. The content of the volatile compounds δ -3-carene and terpinolene were not affected by the type of tested essential oil. In turn, the volatile compounds p-cymene, camphor, terpinen-4-ol, *cis*-anethole, p-anisaldehyde, β -phellandrene and *trans*-anethole showed high correlation with the essential oil from attacked seeds. For the essential oil from non-attacked seeds, the compounds that showed high correlation were α -pinene, camphene, limonene, fenchyl acetate <exo>, bornyl acetate, aromadendrene, 1,8-cineole, sabinene, β -pinene, myrcene, α -phellandrene, β -ocimene, γ -terpinene, fenchone and methyl chavicol.

The HCA and color map with volatile compounds profile and the mango fruit protection assay against anthracnose are shown in Figure 2. The jackfruit seed-based coatings containing essential oil from non-attacked seeds showed the greatest correlation with lesion diameter of ‘Palmer’ mango fruit. In turn, the amount of volatile compounds responsible for the mycelial growth inhibition was lower for essential oils from non-attacked seeds (Table 1). Based on the color map, the δ -3-carene and terpinolene compounds seemed to have little influence on the two types of coatings applied to fruit. However, p-cymene, terpinen-4-ol, *cis*-

anethole, p-anisaldehyde, *trans*-anethole, β -phellandrene and camphor volatile compounds were highly correlated with the coating containing essential oils from attacked seeds, and that probably influenced the smaller lesion diameter observed since these compounds are associated with the inhibition of mycelial growth (Zoubiri et al., 2014). The compounds related to coatings containing essential oil from non-attacked seeds were α -pinene, sabinene, α -phellandrene, β -ocimene, camphene, myrcene, limonene, fenchyl acetate <exo>, bornyl acetate, β -pinene, 1.8 cineole, fenchone, γ -terpinene, methyl chavicol and aromadendrene. In turn, the behavior was similar for the two types of coatings applied to 'Palmer' mango fruit for the characteristics of acidity (TA), soluble solids (SS), ratio SS/TA, pH, and firmness.

Overall, the addition of essential oil from attacked fennel seeds to jackfruit starch-based coating can be an alternative for the control of *C. gloeosporioides* in 'Palmer' mango, with a positive effect on maintaining the quality and market value. The seeds attacked by the aphid had differentiated characteristics in the composition of essential oil, which represent a possible higher inhibition capacity of anthracnose. Thus, the fennel attacked seeds could be used for extraction of essential oil to be used in postharvest adding value to this crop, as well as providing allocation of the seed attacked by aphid that have low commercial value.

4. Conclusions

The two types of essential oils studied differed in terms of chemical composition and antifungal activity. The terpenic compound *trans*-anethole, which is the main volatile compound in fennel, was found in higher content in the essential oil of attacked seeds.

The fennel seeds essential oil from non-attacked or attacked plants have significant antifungal potential toward *C. gloeosporioides*. However, the essential oil from attacked seeds had a greater inhibition index of mycelial growth, which may be associated to the larger

contents of *trans*-anethole. The mango protection assay, through the application of coatings containing jackfruit seed starch and the essential oils, showed that the coating containing the essential oil extracted from attacked seeds was more effective in reducing the anthracnose lesion severity in ‘Palmer’ mango fruit.

Therefore, the incorporation of fennel seeds essential oil into jackfruit starch-based coatings may be a practical application to inhibit the incidence and severity of anthracnose in mango fruit, and become an alternative to the use of synthetic pesticides.

Acknowledgement

The authors acknowledge the Brazilian CNPq, grant numbers 484850/2013-0 and 401515/2014-1, for financial support.

References

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation. USA. 805 p.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (2010). *Official Methods of Analysis*. Gaithersburg, MD, USA.
- Azerêdo, L. P. M., Silva, S. M., Lima, M. A. C., Dantas, R. L., & Pereira, W. E. (2016). Qualidade de manga ‘Tommy Atkins’ da produção integrada recoberta com fécula de mandioca associada a óleos essenciais e quitosana. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38, xxx-xxx (in press).
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.

- Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L., & Thompson, A. K. (2014). The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64, 159-167.
- Bosquez-Molina, E., Jesús, E. R., Bautista-Baños, S., Verde-Calvo, J. R., & Morales-López, J. (2010). Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 57, 132-137.
- Caleja, C., Barros, L., Amílcar, A. L., Ciric, A., Soković, Oliveira, M. B. P.P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C.F.R. (2015). *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. *Journal of Functional Foods*, 12, 428-438.
- Diao, W., Hu, Q., Zhang, H., & Xu, J. (2014). Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control*, 35, 109-116.
- EMEX, A.C., 1998. *Norma de calidad para mango fresco de exportación*. México: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, 4 p.
- Farzaneh, M., Kiani, H., Sharifi, R., Reisi, M., & Hadian, J. (2015). Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 109, 145-151.
- Guerra, I. C. D., Oliveira, P. D. L. O., Pontes, A. L. S., Lúcio, A. S. S. C., Tavares, J. F., Barbosa-Filho, J. M., Madruga, M. S., & Souza, E. L. (2015). Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha × villosa* Huds essential oils to prevent

- common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 168-178.
- Guerreiro, A. C., Gago, C. M.L., Faleiro, M. L., Miguel, M. G.C., & Antunes, M. D.C. (2015). The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 226-233.
- Hashmi, N., Khan, M. M. A., Idrees, M., Khan, Z. H., Ali, A., & Varshney, L. (2012). Depolymerized carrageenan ameliorates growth, physiological attributes, essential oil yield and active constituents of *Foeniculum vulgare* Mill. *Carbohydrate Polymers*, 90, 407– 412.
- Hu, M., Yang, D., Huber, D. J., Jiang, Y., Li, M., Gao, Z., & Zhang, Z. (2014). Reduction of postharvest anthracnose and enhancement of disease resistance in ripening mango fruit by nitric oxide treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 97, 115-122.
- Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Koocheki, A. (2014). Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 36, 9-19.
- Kamle, M., Kumar, P., Gupta, V. K., Tiwari, A. K., Misra, A. K., & Pandey, B. K. (2013). Identification and phylogenetic correlation among *Colletotrichum gloeosporioides* pathogen of anthracnose for mango. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2, 285-287.
- Kraśniewska, K., Gniewosz, M., Synowiec, A., Przybył, J. L., Baczek, K., & Weglarz, Z. (2014). The use of pullulan coating enriched with plant extracts from *Satureja hortensis* L. to maintain pepper and apple quality and safety. *Postharvest Biology and Technology*, 90, 63-72.

- Lima, A. B., Silva, S. M., Rocha, A., Nascimento, L. C., & Ramalho, F. S. (2012). Conservação pós-colheita de manga 'Tommy Atkins' orgânica sob recobrimentos bio-orgânicos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34, 704-710.
- Madruga, M. S., Albuquerque, F. S. M., Silva, I. R. A., Amaral, D. S., Magnani, M., & Queiroga Neto, V. (2014). Chemical, morphological and functional properties of Brazilian jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) seeds starch. *Food Chemistry*, 143, 440-445.
- Maffei, M. E. (2010). Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, 76, 612-631.
- Maffei, M. E., Gertsch, J., & Appendino, G. (2011). Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Natural Products Reports*, 28, 1359-80.
- Maikhunthod, B., & Marriott, P. J. (2013). Aroma-impact compounds in dried spice as a quality index using solid phase microextraction with olfactometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Food Chemistry*, 141, 4324-32.
- Malaquias, J. B., Ramalho, F. S., Lira, A. C. S., Oliveira, F. Q., Fernandes, F. S., Zanuncio, J. C., & Godoy, W. A. C. (2014). Estimating the development of the fennel aphid, *Hyadaphis foeniculi* (Passerini) (Hemiptera: Aphididae), using non-linear models. *Pest Management Science*, 71, 744-751.
- Mattiuz, B., Ducamp-Collin, M., Mattiuz, C. F. M., Vigneault, C., Marques, K. M., Sagoua, W., & Montet, D. (2015). Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of 'Kent' mango. *Scientia Horticulturae*, 184, 160-168.
- Menezes, M., & Assis, S. M. P. (2004). *Guia prático para fungos fitopatogênicos*. (2th ed.). Recife: UFRPE. 183 p.

- Napoli, E. M., Curcuruto, G., & Ruberto, G. (2010). Screening the essential oil composition of wild Sicilian fennel. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 213-223.
- Neri, F., Mari, M., Brigati, S., & Bertolini, P. (2009). Control of *Neofabraea alba* by plant volatile compounds and hot water. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 425-430.
- Passone, M., Girardi, N. S., Ferrand, C., & Etcheverry, M. (2012). *In vitro* evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* contamination. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 70, 82-88.
- Pinto, A. C. Q., Pinheiro Neto, F., & Guimarães, T. G. (2011). Estratégias do melhoramento genético da manga a visando atender a dinâmica de mercado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 64-72.
- Raffo, A., Nicoli, S., & Leclercq, C. (2011). Quantification of estragole in fennel herbal teas: implications on the assessment of dietary exposure to estragole. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 370–375.
- Ramvalho, F. S., Malaquias, J. B., Brito, B. D. S., Fernandes, F. S., & Zanuncio, J. C. (2015). Assessment of the attack of *Hyadaphis foeniculi* (Passerini) (Hemiptera: Aphididae) on biomass, seed and oil in fennel intercropped with cotton with colored fibers. *Industrial Crops and Products*, 77, 511-515.
- Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., & Qurishi, M. A. (2012). *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*, 1-10.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A., & Khalel, K. I. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, 44, 437– 445.

- Rodríguez-Solana, R., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., & Cortés-Diéguez, S. (2014a). Characterization of fennel extracts and quantification of estragole: Optimization and comparison of accelerated solvent extraction and Soxhlet techniques. *Industrial Crops and Products*, 52, 528-536.
- Rodríguez-Solana, R., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., & Cortés-Diéguez, S. (2014b). Estragole quantity optimization from fennel seeds by supercritical fluid extraction (carbon dioxide–methanol) using a Box–Behnken design. Characterization of fennel extracts. *Industrial Crops and Products*, 50, 186-192.
- Salama, Z. A., El Baz, F. K., Gaafar, A. A., & Zaki, M. F. (2015). Antioxidant activities of phenolics, flavonoids and vitamin C in two cultivars of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) in responses to organic and bio-organic fertilizers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14, 91-99.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2015). Use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: Impact on safety and quality attributes of fresh-cut Fuji apples. *Postharvest Biology and Technology*, 105, 8-16.
- SAS. SAS/STAT 9.3 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2011, 8621 p.
- Samojlik, I., Mijatović, V., Petković, S., Skrbić, B., & Božin, B. (2012). The influence of essential oil of aniseed (*Pimpinella anisum*, L.) on drug effects on the central nervous system. *Fitoterapia*, 83, 1466-73.
- Santos, C. A. F., Lima Neto, F. P., Rodrigues, M. A., & Costa, J. G. (2008). Similaridade genética de acessos de mangueira de diferentes origens geográficas avaliadas por marcadores AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 736-740.
- Santos, N. S. T., Aguiar, A. J. A. A., Oliveira, C. E. V., Sales, C. V., Silva, S. M., Silva, R. S., Stamford, T. C. M., & Souza, E. L. (2012). Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus*

- stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology*, 32, 345-353.
- Senatore, F., Oliviero, F., Scandolera, E., Taglialatela-Scafati, O., Roscigno, G., Zaccardelli, M., & De Falco, E. (2013). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell]. *Fitoterapia*, 90, 214-219.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. I., Tappi, S., Rocculi, P., Gardini, F., & Lanciotti, R. (2015). Natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed lamb's lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, 103, 35-44.
- Telci, I., Demirtas, I., & Sahin, A. (2009). Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Industrial Crops and Products*, 30, 126-130.
- Trindade, D. C. G., Lima, M. A. C., & Assis, J. S. (2015). Ação do 1-metilciclopropeno na conservação pós-colheita de manga 'Palmer' em diferentes estádios de maturação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50, 753-762.
- Tschiggerl, C., & Bucar, F. (2012). The volatile fraction of herbal teas. *Phytochemistry Reviews*, 11, 245-254.
- Ullah, H., & Honermeier, B. (2013). Fruit yield, essential oil concentration and composition of three anise cultivars (*Pimpinella anisum* L.) in relation to sowing date, sowing rate and locations. *Industrial Crops and Products*, 42, 489-499.
- Viuda-Martos, M., Mohamady, M. A., Fernández-López, J., Abd ElRazik, K.A., Omer, E.A., Pérez-Alvarez, J.A., & Sendra, E. (2011). *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, 22, 1715-1722.
- Yenjit, P., Issarakraisila, M., Intana, W., & Chantrapromma, K. (2010). Fungicidal activity of compounds extracted from the pericarp of Areca catechu against *Colletotrichum*

gloeosporioides in vitro and in mango fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 55, 129-132.

Zoubiri, S., & Baaliouamer, A. (2011). Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria. *Food Chemistry*, 129, 179-182.

Zoubiri, S., Baaliouamer, A., Seba, N., & Chamouni, N. (2014). Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil. *Arabian Journal of Chemistry*, 7, 480-485.

Table 1. Volatiles compounds fennel essential oils from seeds non-attacked and attacked with aphid.

Compound (%)	LRI Calc	LRI Lit	Non-attacked seed	Attacked Seed	Id
<i>Monoterpene hydrocarbons</i>					
α -Pinene**	928	932	1.34 ± 0.06	0.49 ± 0.05	MS+LRI
Camphene**	943	946	0.09 ± 0.02	0.03 ± 0.01	ms+lri
Sabinene*	967	969	0.25 ± 0.01	0.19 ± 0.03	ms+lri
β -Pinene	971	974	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.01	MS+LRI
Myrcene	985	985	0.33 ± 0.03	0.26 ± 0.04	MS+LRI
α -Phellandrene**	1001	1002	0.49 ± 0.05	0.16 ± 0.04	ms+lri
δ -3-Carene	1007	1008	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	ms+lri
p-Cymene	1019	1020	0.13 ± 0.03	0.17 ± 0.04	MS+LRI
Limonene**	1023	1024	3.80 ± 0.26	2.05 ± 0.09	ms+lri
β -Phellandrene	1025	1025	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	ms+lri
β -Ocimene*	1031	1032	0.24 ± 0.03	0.16 ± 0.03	ms+lri
γ -Terpinene*	1052	1054	0.87 ± 0.03	0.58 ± 0.16	MS+LRI
Terpinolene	1083	1086	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	ms+lri
Total**			7.77 ± 0.44	4.30 ± 0.36	
<i>Oxygenated monoterpenes</i>					
1.8 Cineole**	1026	1031	0.54 ± 0.05	0.30 ± 0.05	ms+lri
Fenchone	1083	1083	2.81 ± 0.07	2.44 ± 0.34	ms+lri
Camphor	1138	1141	0.20 ± 0.11	0.22 ± 0.01	ms+lri
Terpinen-4-ol	1172	1174	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	ms+lri
Total			3.57 ± 0.17	2.99 ± 0.35	
<i>Phenylpropanoids</i>					
Methyl chavicol	1193	1195	12.57 ± 0.40	12.36 ± 0.49	ms+lri
cis-Anethole**	1246	1249	0.13 ± 0.02	0.31 ± 0.01	ms+lri
p-Anisaldehyde**	1245	1247	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.01	ms+lri
trans-Anethole**	1282	1282	75.85 ± 0.79	79.93 ± 0.13	ms+lri
Total**			88.60 ± 0.54	92.69 ± 0.62	
<i>Esters</i>					
Fenchyl acetate <exo>	1225	1229	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00	ms+lri
Bornyl acetate**	1284	1287	0.01 ± 0.00	0.001 ± 0.00	ms+lri
Total			0.04 ± 0.00	0.011 ± 0.00	
<i>Sesquiterpene</i>					
Aromadendrene**	1435	1439	0.01 ± 0.00	0.004 ± 0.00	ms+lri
Total**			0.01 ± 0.00	0.004 ± 0.00	

LRI calc: Linear Retention Index calculated from the standard of alkanes (C6-C21)

LRI Lit: Linear Retention Index according to Adams (2007).

MS + LRI: mass spectra and LRI according with an authentic compound (standard) in similar conditions and DB5 column.

ms + lri: mass spectra identified using the NIST database and mass spectra and LRI in accordance with literature values (ADAMS, 2007).

** Least significant difference ($P \leq 0.01$)

* Least significant difference ($P \leq 0.05$).

n= 4.

Table 2. Inhibition percentage (%) of *Colletotrichum gloeosporioides* treated with fennel essential oil from seeds of fennel attacked and non-attacked by *Hyadaphis foeniculi*.

Essential oil Concentration (%)		Day of incubation					
		3		6		9	
		Seed					
	Non-Attacked	Attacked	Non-Attacked	Attacked	Non-Attacked	Attacked	
0	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	
0.05	40.0±10.6 ^b	55.7±16.1 ^a	19.8±4.5 ^a	26.9±7.0 ^a	8.5±3.1 ^a	9.9±4.4 ^a	
0.1	98.1±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	71.6±8.0 ^b	84.0±11.1 ^a	42.6±11.4 ^a	45.7 ±12.6 ^a	
0.2	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	83.1±13.0 ^a	85.5±12.0 ^a	
0.3	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	99.4±1.3 ^a	99.4±0.9 ^a	
0.5	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	

Means in the line followed by different letters are significantly different at each evaluation day, according to the Tukey's test at P<0.05. n= 6

Table.3. Lesion diameter (mm) in ‘Palmer’ mango coated with jack fruit (JS) starch at 3% added of fennel essential oil (EO) from seeds harvested from plants attacked and non-attacked by *Hyadaphis foeniculi*, and inoculated with *C. gloeosporioides*.

Treatments	Days		
	0	5	10
Control	6.00±0.0 ^a	29.6±3.9 ^a	54.6±8.2 ^a
JS Coating	6.00±0.0 ^a	28.45±4.0 ^a	49.69±4.6 ^b
JS Coating + EO Non-Attacked Seed	6.00±0.0 ^a	18.56±4.3 ^b	26.67±4.2 ^c
JS Coating + EO Attacked Seed	6.00±0.0 ^a	13.44±5.0 ^c	21.72±3.3 ^d

Means followed by different letters in the column are significantly different, according to the Tukey’s test (P<0.05). n=9.

Table.4. Physicochemical quality in ‘Palmer’ mango coated with jack fruit (JS) starch at 3% added of fennel essential oil (EO) from seeds harvested from plants attacked and non-attacked by *Hyadaphis foeniculi*, during ten days of storage at room conditions.

Treatments	Days		
	0	5	10
<i>Firmness (N)</i>			
Control	153.55±4.84 ^a	23.08±4.57 ^c	12.53±3.14 ^b
JS Coating	153.55±4.84 ^a	59.67±16.30 ^a	13.45±3.29 ^b
JS Coating + EO Non-Attacked Seed	153.55±4.84 ^a	17.35±5.72 ^d	10.53±1.24 ^c
JS Coating + EO Attacked Seed	153.55±4.84 ^a	45.49±15.83 ^b	18.93±10.8 ^a
<i>Titrateable acidity – TA (g.100g⁻¹)</i>			
Control	0.95±0.01 ^a	0.60±0.16 ^a	0.17±0.05 ^a
JS Coating	0.95±0.01 ^a	0.52±0.07 ^b	0.12±0.02 ^c
JS Coating + EO Non-Attacked Seed	0.95±0.01 ^a	0.43±0.14 ^c	0.15±0.03 ^b
JS Coating + EO Attacked Seed	0.95±0.01 ^a	0.53±0.08 ^b	0.17±0.03 ^a
<i>Soluble solids – SS (%)</i>			
Control	6.58±0.24 ^a	14.08±2.24 ^b	14.67±1.31 ^a
JS Coating	6.58±0.24 ^a	14.08±1.23 ^b	13.83±2.74 ^a
JS Coating + EO Non-Attacked Seed	6.58±0.24 ^a	12.75±0.41 ^c	11.92±2.08 ^b
JS Coating + EO Attacked Seed	6.58±0.24 ^a	16.00±0.20 ^a	14.92±3.37 ^a
<i>SS/TA</i>			
Control	6.92±0.18 ^a	26.10±10.33 ^c	95.59±27.47 ^b
JS Coating	6.92±0.18 ^a	27.09±1.46 ^c	116.10±37.46 ^a
JS Coating + EO Non-Attacked Seed	6.92±0.18 ^a	33.07±11.57 ^a	79.45±14.27 ^c
JS Coating + EO Attacked Seed	6.92±0.18 ^a	31.08±5.64 ^b	91.46±30.36 ^b
<i>pH</i>			
Control	3.20±0.05 ^a	3.84±0.29 ^a	5.18±0.31 ^a
JS Coating	3.20±0.05 ^a	3.86±0.19 ^a	5.74±0.35 ^a
JS Coating + EO Non-Attacked Seed	3.20±0.05 ^a	4.38±0.37 ^a	5.44±0.02 ^a
JS Coating + EO Attacked Seed	3.20±0.05 ^a	4.20±0.09 ^a	5.43±0.27 ^a

Means with different letters in the column are significantly different according to Tukey's test

P<0.05. n=4.

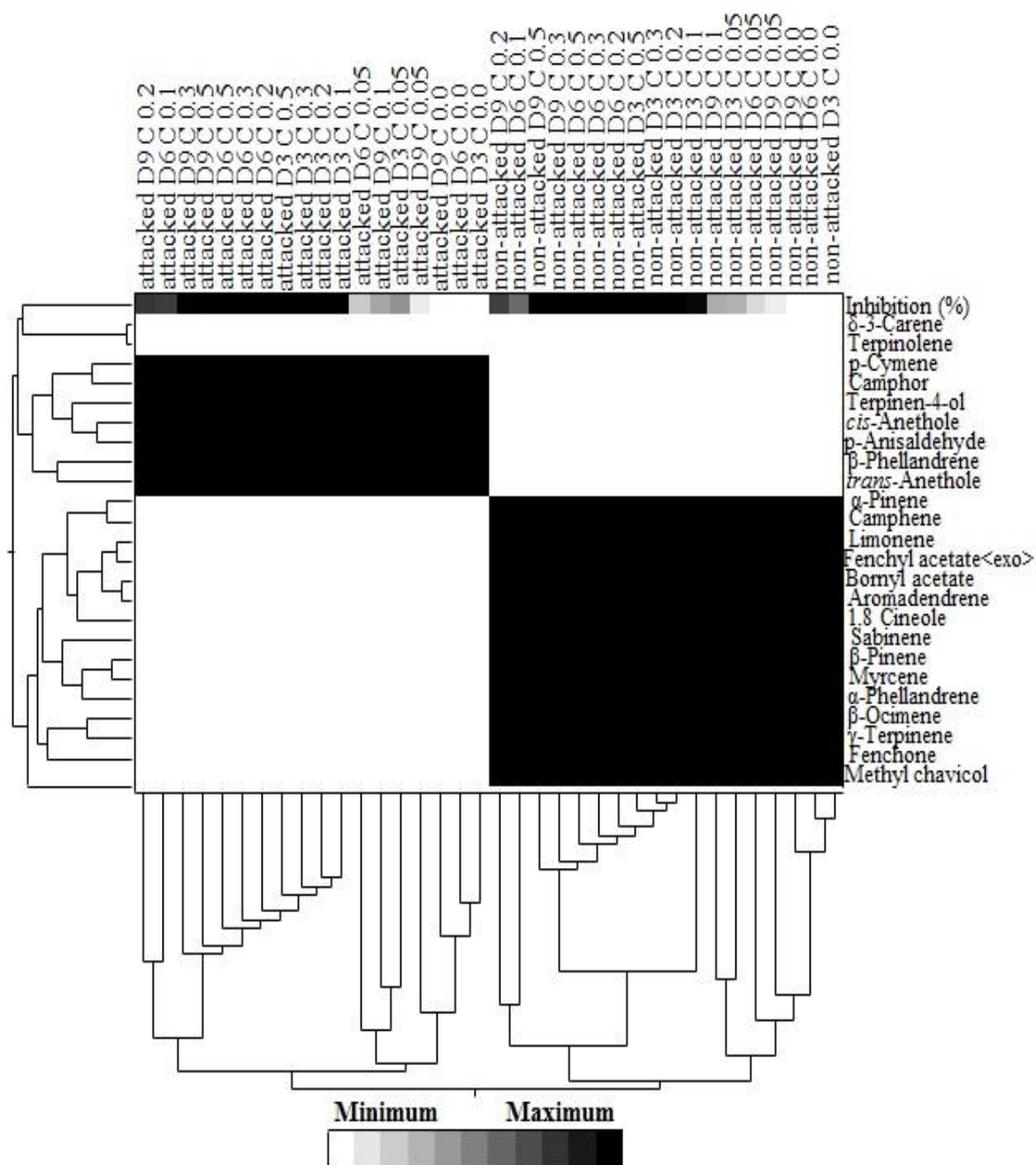


Figure 1. Hierarchical cluster analysis and color map, showing quantitative changes in volatile compounds and inhibition percentage (%) of *C. gloeosporioides* treated with fennel essential oil from seeds of fennel attacked and non-attacked by *Hyadaphis foeniculi*. D- day; C- concentration.

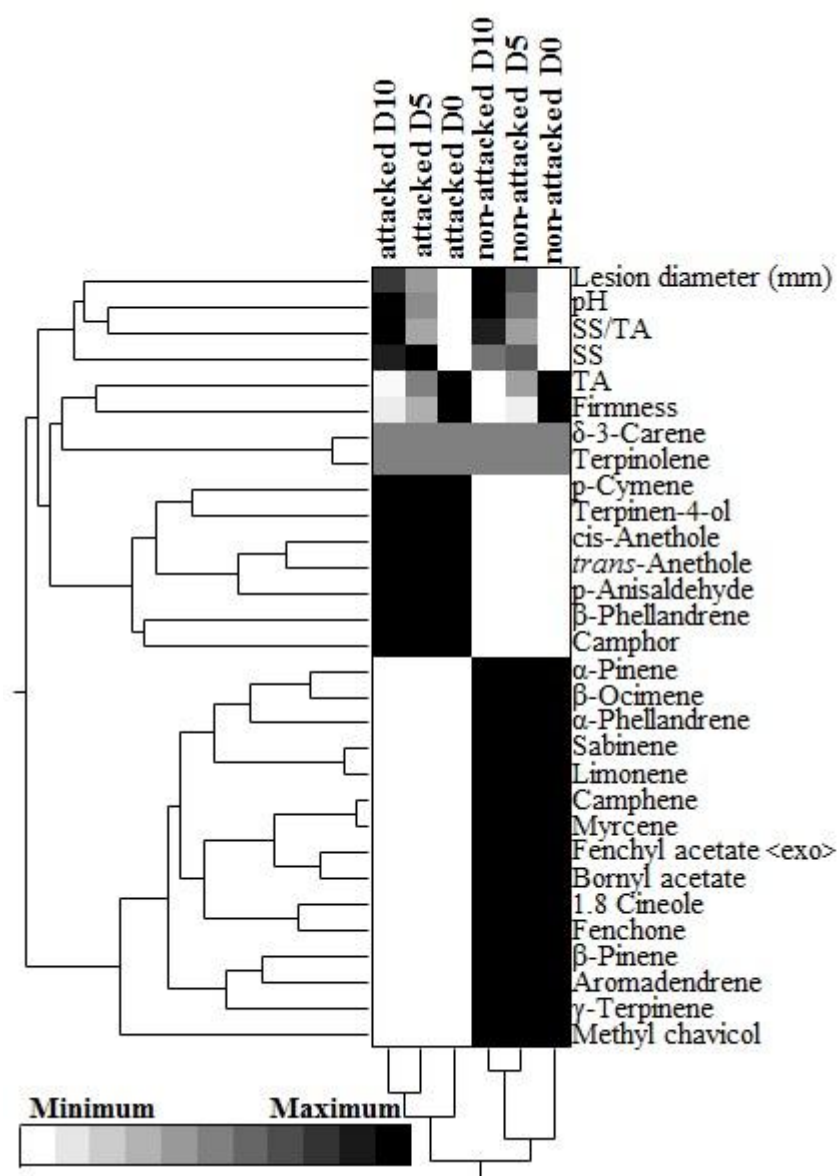


Figure 2. Hierarchical cluster analysis and color map, showing quantitative changes in volatile compounds and lesion diameter of *C. gloeosporioides* and physicochemical quality in 'Palmer' mango coated added of fennel essential oil (EO) from seeds from plants attacked and non-attacked by *Hyadaphis foeniculi*. D- day.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A avaliação dos impactos nutricionais causados na semente de erva-doce através do ataque pelo pulgão *Hyadaphis foeniculi*, fornece informações a respeito do acionamento do metabolismo secundário em resposta a defesa da planta quando submetida ao estresse causado por insetos.

A atividade de inibidor de protease e da enzima fenilalanina amônia liase, assim como o aminoácido fenilalanina foram superiores nas sementes de erva-doce atacadas pelo pulgão. No entanto, as quantidades de aminoácidos livres, proteínas solúveis, atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, polifenóis extraíveis totais, flavonoides amarelos, atividade antioxidante total através da captura do radical livre DPPH[•] e através da captura do radical ABTS^{•+}, foram superiores em sementes não atacadas pelo pulgão.

As sementes de erva-doce e os óleos essenciais provenientes de sementes atacadas e não atacadas pelo pulgão *H. foeniculi* são uma boa fonte de compostos bioativos. O ataque do pulgão em sementes de erva-doce afeta o perfil de aminoácidos, perfil eletroforético de proteínas e o perfil de compostos fenólicos, entretanto o perfil de ácidos graxos não foi afetado.

O ataque do pulgão em semente de erva-doce influencia o perfil de compostos voláteis nos óleos essenciais, apresentando maior quantidade de compostos responsáveis pela ação antifúngica. Este é um mecanismo metabólico em resposta a defesa da planta quando submetida ao estresse causado por insetos, observado, principalmente, através do aumento dos fenilpropanóides.

A atividade antifúngica *in vitro* para *Colletotrichum gloeosporioides*, foi efetiva para os dois tipos de óleos essenciais provenientes de sementes de erva-doce atacadas e não atacadas pelo pulgão, com concentração mínima inibitória definida em 0,5%.

As características de qualidade como firmeza, acidez titulável (AT), sólidos solúveis (SS), relação SS/AT e pH em mangas ‘Palmer’, não foram afetadas pela aplicação de recobrimentos a base de amido de semente de jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.) associados aos óleos essenciais de sementes de erva-doce atacadas e não atacadas pelo pulgão.

Em relação à prevenção da antracnose, a associação do recobrimento a base de amido de semente de jaca com óleo essencial de semente de erva-doce atacada pelo pulgão, foi mais efetiva na redução da gravidade da lesão, relacionada a uma maior quantidade dos fenilpropanóides, que são compostos apontados com alta atividade antimicrobiana, demonstrando assim uma alternativa de utilização para a semente que sofreu ataque do

pulgão, com um efeito positivo na manutenção da qualidade e agregação de valor de mercado à manga.

Assim, o ataque do pulgão em erva-doce, compromete a qualidade nutricional das sementes para uso alimentar, porém, o óleo essencial desta semente pode ser utilizado em pós-colheita para a cultura da manga, como alternativa para inibição da incidência e severidade da antracnose, constituindo uma possibilidade para a utilização de sementes de erva-doce atacadas pelo pulgão, que têm baixo valor comercial, e tornar-se uma alternativa ao uso de pesticidas sintéticos.