

# **Caracterização química, nutricional e bioativa da canela orgânica, obtida a partir de *Cinnamomum verum* J. Presl**

**Katri Gasparin**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná*

Orientado por

**Doutora Lillian Barros**

**Doutora Eliana Pereira**

**Professora Doutora Fernanda Vitória Leimann**

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

**Bragança  
2021**

Este trabalho foi financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto GreenHealth - Estratégias digitais baseadas em ativos biológicos para melhorar o bem-estar e promover a saúde verde, Norte-01-0145-FEDER-000042; e realizado ao abrigo do Projeto “Bioma – Soluções integradas de BIOeconomia para a Mobilização da Cadeia Agroalimentar” (POCI-01-0247-FEDER-046112), pelo Consórcio “BIOMA”, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Sistema de Incentivos à Investigação e Desenvolvimento Tecnológico, no âmbito do Programa Operacional para a Competitividade e Internacionalização do Portugal2020. Foi também realizado no âmbito do programa Interreg Espanha-Portugal, através do projeto 0612\_TRANS\_CO\_LAB\_2\_P.

*Cofinanciado por:*



*“Climb the mountain not to plant your flag, but to embrace the challenge, enjoy the air and behold the view. Climb it so you can see the world, not so the world can see you.”*

*David McCullough Jr.*

## Agradecimentos

Ao finalizar esta tese, penso o quanto sou privilegiada por ter tido essa oportunidade. Quantos anos de estudo e dedicação foram necessários para estar aqui hoje realizando esse sonho, que teve início lá em 2010. Sabendo que não caminhei sozinha, não poderia deixar de agradecer às pessoas que me ajudaram nessa conquista.

Primeiramente gostaria de agradecer à Doutora Lillian Barros pela orientação e pelas valiosas contribuições dadas durante todo o processo.

Agradeço à Doutora Eliana Pereira pela orientação, esclarecimentos, ensinamentos e pelo tempo dedicado que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Doutora Fernanda Vitória Leimann pela colaboração e por sempre estar disposta à ajudar no que for preciso.

À Filipa Mandim pela dedicação, agilidade e prontidão que foram essenciais durante o processo analítico deste trabalho.

Agradeço ao meu querido esposo Sebastian de Jesús Manrique Machado pela confiança, pelo esforço, pelo incentivo e por ser a pessoa que mais acredita no meu potencial.  
*¡Contigo tengo la fuerza para afrontar cualquier reto!*

Aos meus pais, Maria do Carmo de Souza e Sérgio Luiz Gasparin, pelo apoio emocional e financeiro, e por tudo que fizeram e ainda fazem por mim até hoje. O meu caráter, os meus valores e toda a minha força de vontade devo à vocês!

À minha cunhada Sara Palacio por ter assumido meu lugar enquanto eu não podia estar.  
*¡Gracias por tu apoyo, morrita!*

Às minhas grandes amigas Geiane Fernanda dos Santos, Ana Lydia Aguiar e Carolina Saori Yamashita que, apesar da distância, sempre estiveram do meu lado me enchendo de palavras motivadoras. A vida é muito melhor quando compartilhada com quem nos entende!

Ao Eleomar Júnior, à Vanessa Paula e à Doutora Paula Rodrigues pela disponibilidade e pelos ensinamentos enriquecedores.

Aos meus professores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Campo Mourão, em especial ao Doutor Alberto Cavalcanti Vitorio e à Doutora Angela Maria Gozzo, pelas conversas e pelos conhecimentos compartilhados ao longo de todos esses anos.

Por último, não poderia deixar de agradecer ao Centro de Investigação de Montanha, ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná que me proporcionaram essa oportunidade de desenvolver este trabalho.

A minha eterna gratidão a quem me ajudou a evoluir pessoalmente e profissionalmente.

---

**Abreviaturas e Símbolos**

AAPH	2,2'-Azobis(2-metilpropionamida) di-hidroclorido
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Ca	Cálcio
CE	Comissão europeia
CMB	Concentração mínima bactericida
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima inibitória
Cu	Cobre
DAD	Detetor de díodos
d.i.	Diâmetro interno
DMEM	Meio de cultura Dulbecco Modified Eagle
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC <sub>50</sub>	Concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante
ECACC	<i>European Collection of Animal Cell Culture</i>
EDTA	Ácido etilenediaminatetra acético
ESI	Ionização por electrospray
FAME	Éster metílico de ácidos gordos
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
FBS	Soro fetal bovino
Fe	Ferro
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato de ferro
FID	Detetor de ionização de chama

---

<i>g</i>	Força <i>g</i> (unidade de rotação)
GC	Cromatografia gasosa
GC-FID	Cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama
GI <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
HBSS	Solução salina equilibrada de Hank
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD-ESI/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de arranjo de díodos e a um espectrómetro de massa com uma fonte de ionização de electrospray
HPLC-RI	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
IR	Infravermelho
K	Potássio
kV	Quilovolt
LPS	Lipopolissacarídeos
MA	Ágar malte
MDA	Malodialdeído
Mg	Magnésio
MS	Espetrometria de massa
<i>ms</i>	Massa seca
MS <sup>2</sup>	Fragmentação do ião molecular
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
Na	Sódio
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
NED	Hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina

---

NO	Óxido nítrico
OxHLIA	Inibição da hemólise oxidativa
PBS	Tampão fosfato-salino
P	Porcentagem da população de eritrócitos
P	Potássio
PAC	Proantocianidinas
<i>p/v</i>	Peso/volume
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlação
RI	Índice de refração
<i>rpm</i>	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
Se	Selênio
SRB	Sulforrodamina B
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Inibição da formação de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
ton	Toneladas
Tr	Tempo de retenção
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSB	Caldo triptico de soja
UE	União europeia
UFC	Unidade formadora de colônia
UFLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UFLC-DAD	Cromatografia líquida de ultra rápida acoplada a um detetor de díodos
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV-Vis	Radiação ultravioleta-visível

---

v/v	Volume/volume
V	Volt
Zn	Zinco
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda de absorção máxima

---

**Índice**

<b>Abreviaturas e Símbolos .....</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de Equações .....</b>	<b>xiv</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>xv</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>xvii</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Alimentos biológicos e sua certificação.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. <i>Cinnamomum verum</i> J. Presl – canela .....</b>	<b>6</b>
1.2.1. Caracterização botânica, origem e produção .....	6
1.2.2. Composição nutricional e química .....	8
1.2.3. Aplicações e benefícios .....	10
<b>1.3. Compostos fenólicos como moléculas promissoras para o desenvolvimento de ingredientes funcionais.....</b>	<b>12</b>
1.3.1. Flavonoides.....	12
1.3.2. Ácidos fenólicos .....	14
1.3.3. Propriedades e benefícios .....	14
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Metodologia.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Amostra .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Padrões e reagentes .....</b>	<b>19</b>
3.2.1. Para a análise química e nutricional .....	19
3.2.2. Para o estudo das bioatividades .....	20
<b>3.3. Determinação do valor nutricional e composição química da canela.....</b>	<b>21</b>
3.3.1. Valor nutricional.....	21
3.3.2. Composição química .....	23
3.3.2.1. Açúcares livres .....	23
3.3.2.2. Ácidos orgânicos .....	23
3.3.2.3. Ácidos gordos .....	24
3.3.2.4. Compostos fenólicos .....	25
<b>3.4. Avaliação das propriedades bioativas.....</b>	<b>27</b>
3.4.1. Preparação do extrato hidroetanólico de canela .....	27

---

3.4.2. Atividade antioxidante.....	27
3.4.2.1. Inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	27
3.4.2.2. Inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA).....	29
3.4.3. Atividade antimicrobiana .....	30
3.4.3.1. Atividade antibacteriana .....	30
3.4.3.2. Atividade antifúngica .....	31
3.4.4. Avaliação da citotoxicidade em linhas celulares tumorais.....	32
3.4.5. Avaliação da citotoxicidade numa linha celular não-tumoral e numa cultura de células primária.....	34
3.4.6. Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	34
<b>4. Resultados e Discussão .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1. Caracterização nutricional da canela orgânica em pó.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2. Composição química da canela orgânica em pó .....</b>	<b>39</b>
4.2.1. Perfil em açúcares, ácidos orgânicos e ácidos gordos.....	39
4.2.2. Perfil em compostos fenólicos.....	43
<b>4.3. Potencial bioativo da canela orgânica em pó: atividade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória .....</b>	<b>47</b>
<b>5. Considerações Finais .....</b>	<b>53</b>
<b>5.1. Considerações finais e perspectivas futuras.....</b>	<b>54</b>
<b>6. Referências bibliográficas .....</b>	<b>56</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Crescimento de terras agrícolas biológicas e participação biológica do total de terras a nível global de 1999 a 2019 .....	2
<b>Figura 2:</b> Distribuição, por continente, de terras agrícolas e produtores biológicos, no ano de 2019 .....	4
<b>Figura 3:</b> Crescimento do consumo de alimentos biológicos na União Europeia (EU) e na Europa, em euros por pessoa, de 2009 a 2019 .....	4
<b>Figura 4:</b> Versão principal do logotipo biológico da União Europeia .....	6
<b>Figura 5:</b> <i>Cinnamomum verum</i> J. Presl. (A) Folhas, (B) Flores e frutos, e (C) Cascas ..	7
<b>Figura 6:</b> Produção mundial de canela, em toneladas, de 2000 a 2019.....	7
<b>Figura 7:</b> Mapa geográfico de produção média de canela, entre os anos de 2000 e 2019. ....	8
<b>Figura 8:</b> Estruturas dos principais constituintes identificados na casca de <i>C. verum</i> J. Presl. (A) Trans-cinamaldeído; (B) Ácido <i>p</i> -cumárico; (C) Ácido pirogálico; (D) Ácido cinâmico; (E) Ácido ferúlico .....	10
<b>Figura 9:</b> Estruturas químicas de flavonoides. (A) Flavonóis; (B) Flavonas; (C) Flavan-3-óis; (D) Flavononas; (E) Antocianinas; (F) Isoflavonas .....	13
<b>Figura 10:</b> Estruturas químicas de dímeros de procianidinas. (A) Ligações tipo A e (B) Ligações tipo B .....	13
<b>Figura 11:</b> Estruturas químicas base dos derivados de ácido hidroxibenzoico (A) e ácido hidroxicinâmico (B).....	14
<b>Figura 12:</b> Amostras de canela orgânica em pó. Frente (A) e verso (B) da embalagem. ....	19
<b>Figura 13:</b> Etapas do processo de análise do teor em proteínas. Amostra com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (A), digestão da amostra (B) e destilação e titulação da amostra (C) .....	21
<b>Figura 14:</b> Extração de lípidos por Soxhlet.....	22
<b>Figura 15:</b> Determinação do teor em cinzas. Mufla e exsiccador (A) e cadinhos (B)....	22
<b>Figura 16:</b> Etapas do processo de extração. Agitação (A), filtração (B), evaporação (C) e extrato liofilizado (D) .....	25
<b>Figura 17:</b> HPLC-DAD-ESI/MS.....	27
<b>Figura 18:</b> Ensaio de avaliação da atividade antioxidante através do método de TBARS .....	28
<b>Figura 19:</b> Formação do cromógeno MDA-TBA.....	29

---

<b>Figura 20:</b> Ensaio de avaliação da atividade antioxidante pelo método de OxHLIA. ...	30
<b>Figura 21:</b> Avaliação citotóxica em linha celular tumoral. ....	33
<b>Figura 22:</b> Avaliação da atividade anti-inflamatória. ....	35
<b>Figura 23:</b> Reações químicas entre $\text{NO}_2^-$ , sulfanilamida e hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED). ....	36
<b>Figura 24:</b> Perfil em açúcares livres do extrato hidroetanólico da canela orgânica em pó, obtida a partir de <i>C. verum</i> J. Presl. 1- Frutose; 2- Glucose; 3- Sacarose; 4- Trealose; 5- Melezitose. ....	42

**Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1:</b> Composição nutricional de pau de canela e canela em pó. ....	9
<b>Tabela 2:</b> Constituintes identificados em extratos da casca de <i>C. verum</i> J. Presl. ....	10
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros nutricionais da canela orgânica em pó (média ± desvio padrão).38	
<b>Tabela 4:</b> Composição química da canela orgânica em pó (média±desvio padrão).....	42
<b>Tabela 5:</b> Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região visível ( $\lambda_{max}$ ), dados de massa espectral, tentativa de identificação e quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos encontrados no extrato hidroetanólico de canela orgânica em pó, obtida a partir de <i>C. verum</i> J. Presl (média ± DP). ....	46
<b>Tabela 6:</b> Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da canela orgânica em pó, obtida a partir de <i>C. verum</i> J. Presl (média±desvio padrão).....	48
<b>Tabela 7:</b> Atividade antibacteriana (CMI e CMB, mg/mL) e antifúngica (CMI e CMF, mg/mL) do extrato hidroetanólico da canela orgânica em pó, obtida a partir de <i>C. verum</i> J. Presl.....	50
<b>Tabela 8:</b> Atividade citotóxica (em linhas celulares tumorais e não-tumorais e numa cultura de células primária) e anti-inflamatória do extrato hidroetanólico da canela orgânica em pó, obtida a partir de <i>C. verum</i> J. Presl. ....	52

## Índice de Equações

<b>Equação 1:</b> Energia total em quilocalorias (kcal).....	22
<b>Equação 2:</b> Energia total em quilojoules (kJ).....	22
<b>Equação 3:</b> Equação da determinação da taxa de inibição em ensaio TBARS.....	28
<b>Equação 4:</b> Percentagem da população de eritrócitos (P) no ensaio OxHLIA.....	29

## Resumo

A procura por uma alimentação mais saudável e segura tem gerado um aumento na escolha de alimentos biológicos, devido à não utilização de produtos tóxicos no processo de cultivo. Assim, neste setor são vários os alimentos que podem ser produzidos de modo biológico, como é o caso da canela.

A canela é uma especiaria amplamente utilizada na medicina tradicional, na culinária e em produtos industriais, devido ao seu aroma e sabor muito apreciados e às suas propriedades funcionais. Contém um vasto leque de compostos fenólicos com função antioxidante, com potencial aplicação como ingrediente conservante em alimentos.

Desta forma, o presente trabalho de investigação pretendeu valorizar a canela em pó, obtida de *Cinnamomum verum* J. Presl, conseguida através do método de cultivo biológico, fazendo a sua caracterização nutricional, química e bioativa.

A avaliação do perfil nutricional da canela (proteínas, cinzas, lípidos, hidratos de carbono e energia) foi realizada através de métodos oficiais de análise (AOAC). A caracterização química da canela foi feita através da determinação do perfil em açúcares livres por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), ácidos orgânicos por cromatografia líquida de ultra rápida acoplada a um detetor de díodos (UFLC-DAD), ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID) e compostos fenólicos por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de arranjo de díodos e a um espectrómetro de massa com uma fonte de ionização de electrospray (HPLC-DAD-ESI/MS). O potencial bioativo desta especiaria foi determinado através de ensaios *in vitro* de atividade antioxidante, antimicrobiana, citotoxicidade em linhas celulares tumorais humanas e não-tumorais, e anti-inflamatória.

Os resultados revelaram que a canela orgânica apresentou os hidratos de carbono como o macronutriente maioritário, seguido do teor em proteínas e lípidos, assim como a presença de várias moléculas de interesse, nomeadamente açúcares livres (frutose, glucose, sacarose e trealose), ácidos orgânicos (oxálico, málico, shiquímico, cítrico e fumárico) e dez moléculas de ácidos gordos, destacando-se o ácido palmítico (C16:0) como maioritário.

Na avaliação do perfil fenólico foram detetadas dez moléculas, identificadas como proantocianidinas, destacando os tetrámeros de (epi)catequina do tipo- $\beta$  como os mais abundantes.

Relativamente ao potencial bioativo, o extrato hidroetanólico apresentou potenciais antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório promissores. O mesmo ocorreu com a atividade antimicrobiana, onde foram demonstrados os potenciais antibactericida e antifúngico contra todas as espécies utilizadas. Para além disso, também foi constatado o potencial inibitório em todas as linhas celulares tumorais e ausência de toxicidade nas células não-tumorais testadas.

Desta forma, este estudo permitiu mostrar que a canela orgânica em pó apresentou um excelente valor nutricional e químico, e a presença de compostos bioativos, que a tornam uma boa opção para uma dieta mais saudável. Para além disso, também pode gerar grande interesse para aplicação como conservante no setor industrial, devido ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano.

**Palavras-chave:** *Cinnamomum verum* J. Presl; extrato hidroetanólico; valor nutricional; composição química; potencial bioativo.

**Abstract**

The search for a healthier and safe diet has generated an increase in the choice of organic foods, due to the non-use of toxic products in the cultivation process. So, in this sector there are several foods that can be produced organically, such as cinnamon.

Cinnamon is a spice widely used in traditional medicine, cooking and industrial products, due to its highly appreciated aroma and flavor, and its functional properties. It contains a wide range of phenolic compounds with antioxidant function, which have potential application as a preservative ingredient in foods.

Thus, the present research work intended to value the powdered cinnamon, obtained from *Cinnamomum verum* J. Presl, produced through the organic cultivation method, making its nutritional, chemical and bioactive characterization.

The evaluation of the nutritional profile of cinnamon (proteins, ash, fats, carbohydrates and energy) was conducted through official methods of analysis (AOAC). The chemical characterization of cinnamon was carried out by determining the profile in free sugars by high-performance liquid chromatography coupled with refractive index detector (HPLC-RI), organic acids by ultra fast liquid chromatography coupled with diode-array detector (UFLC-DAD), fatty acids by gas chromatography coupled with flame-ionization detector (GC-FID) and phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector and electrospray ionization mass spectrometric (HPLC-DAD-ESI/MS). The bioactive potential of this spice was determined through *in vitro* assays for antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity in human tumor and non-tumor cell lines, and anti-inflammatory activity.

The results revealed that organic cinnamon had carbohydrates as the major macronutrient, followed by protein and lipid content, as well as the presence of several molecules of interest, namely free sugars (fructose, glucose, sucrose and trehalose), organic acids (oxalic, malic, shikimic, citric and fumaric) and ten fatty acid molecules, with palmitic acid (C16:0) as the majority.

In the evaluation of the phenolic profile, ten molecules were detected, identified as proanthocyanidins, highlighting the  $\beta$ -type (epi)catechin tetramers as the most abundant.

Regarding to the bioactive potential, the hydroethanolic extract showed promising antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory potential. The same happened with the antimicrobial activity, where the antibacterial and antifungal potentials against all species

used were demonstrated. Furthermore, inhibitory potential in all tumor cell lines and absence of toxicity in non-tumor lines tested was also observed.

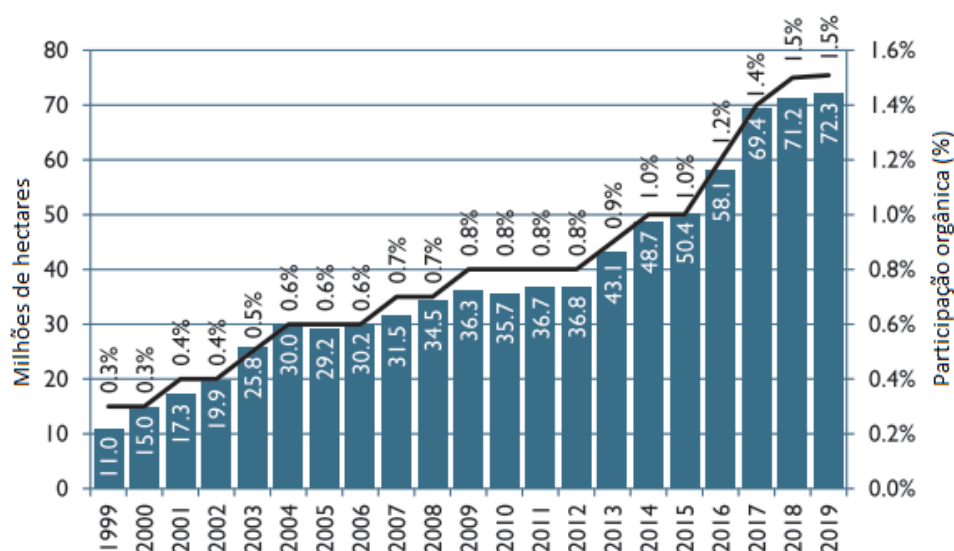
Therefore, this study allowed to show that organic cinnamon powder, obtained from *C. verum* J. Presl, showed an excellent nutritional and chemical value, and the presence of bioactive compounds, which make it a good option for a healthier diet. In addition, it can also generate great interest for application as a preservative in the industrial sector, due to its antioxidant and antimicrobial potential.

**Keywords:** *Cinnamomum verum* J. Presl; hydroethanolic extract; nutritional value; chemical composition; bioactive potential.

# 1. Introdução

## 1.1. Alimentos biológicos e sua certificação

Ao longo dos anos, com o aumento da consciencialização dos consumidores em relação à saúde, à problemática do impacto ambiental e às contaminações dos alimentos provocados pela utilização de químicos agrícolas têm gerado uma maior demanda por alimentos mais saudáveis, assim como por práticas agrícolas mais seguras e sustentáveis (Sadiq, Paul, & Bharti, 2020). Nesse contexto, os alimentos provenientes da agricultura biológica tornaram-se uma alternativa interessante aos alimentos produzidos de modo convencional. Desta forma, nos últimos anos, o aumento desta preferência tem gerado um crescimento do cultivo com práticas biológicas, como demonstra a **Figura 1**.



**Figura 1:** Crescimento de terras agrícolas biológicas e participação biológica do total de terras a nível global de 1999 a 2019. (Fonte: Willer et al., 2021).

O cultivo biológico é fundamentado na igualdade e respeito da diversidade do ecossistema e no ciclo natural do ambiente, na saúde e bem estar dos seres vivos e no cuidado para com as gerações futuras (IFOAM, 2020). A produção biológica é caracterizada por um vasto leque de regras e normas que a distinguem do modo de cultivo convencional. Assim, diferencia-se pelo uso responsável de energia e dos recursos naturais, pelo melhoramento da fertilidade natural do solo, pelo aproveitamento de materiais renováveis a fim de diminuir o consumo de insumos, pela proibição do uso de organismos geneticamente modificados, aditivos alimentares e radiações ionizantes, e pela restrição da utilização de fertilizantes minerais e pesticidas sintéticos (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2018).

As pragas e doenças que surgem são controladas mediante prevenção através da rotação de culturas, agentes biológicos naturais e por técnicas, como biofumigação. Apenas, em último caso, são aplicadas substâncias autorizadas pelos Regulamentos (Comissão Europeia) nº 1107/2009 e (União Europeia) nº 2018/848, nomeadamente produtos fitofarmacêuticos compostos por substâncias ativas (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2018, 2009).

A saúde e fertilidade do solo pode conseguir-se pela aplicação de estrume animal ou de matéria orgânica, oriundos da produção biológica e preferencialmente compostados. Contudo, a utilização de corretivos, nutrientes e fertilizantes químicos e minerais não azotados podem ser autorizados, quando não é possível satisfazer as necessidades nutricionais dos vegetais através das medidas citadas (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2018).

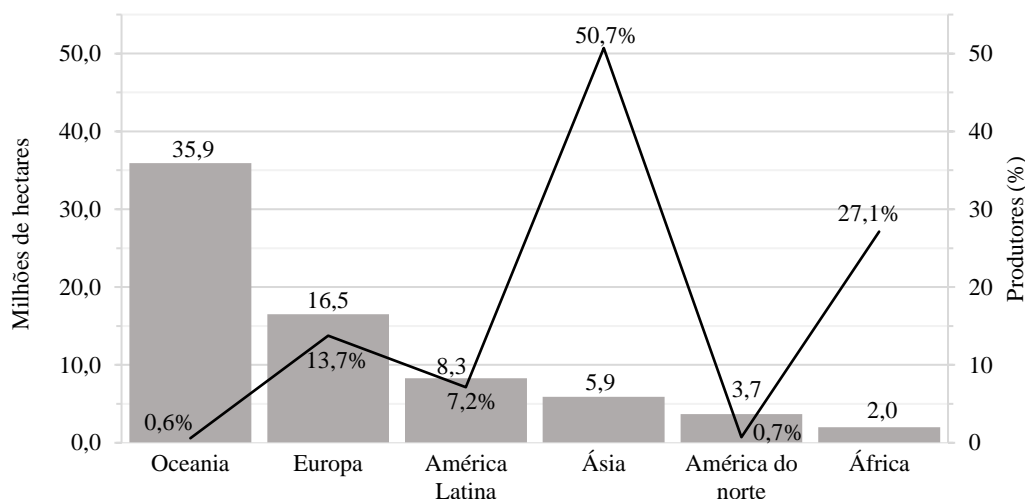
A não utilização de fertilizantes minerais diminui a disponibilidade de nutrientes e a ausência de pesticidas sintéticos expõe as plantas à situações stressantes, como ataque de insetos e ervas daninhas, permitindo que sejam produzidos mais metabolitos secundários e substâncias de defesa natural, como os compostos fenólicos (Faller & Fialho, 2009; Mie et al., 2016; Popa et al., 2019).

Alguns estudos recentes têm demonstrado que os alimentos biológicos, como framboesas (Ponder & Hallmann, 2019), beterraba (Carrillo et al., 2019), jujuba (Reche et al., 2019), damasco (Hallmann et al., 2019), uvas (Zahedipour et al., 2019), cenoura (Bender et al., 2020) e frutas secas (Srednicka-Tober et al., 2020), apresentam maior síntese de flavonoides, carotenóides e vitamina C, comparativamente aos alimentos cultivados em condições convencionais.

Ainda que outras pesquisas não tenham demonstrado diferenças significativas no valor nutricional entre biológicos e convencionais, a quantidade e a qualidade desses compostos não somente está relacionado ao tipo de cultivo, mas também a variedade da cultura, a composição do solo, ao estágio de maturação e as condições climáticas (Halagarda et al., 2020; Heimler et al., 2017; Mie et al., 2016).

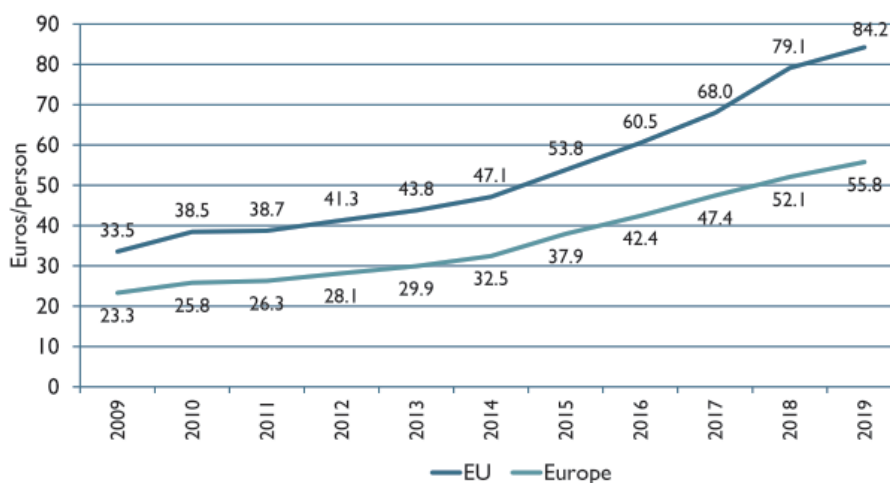
Dados referentes ao ano de 2019, do Instituto de Pesquisa para Agricultura Biológica (FiBL) e da Federação Internacional dos Movimentos da Agricultura Biológica (IFOAM) (Willer et al., 2021), demonstraram que a região com maior quantidade de área de produção biológica é Oceania, com 35,6 milhões de hectares, seguido da Europa e América Latina, com 16,5 e 8,3 milhões de hectares, respetivamente. Na Europa, os países com a maior área orgânica são Espanha (14%), França (14%), Itália (12%) e Alemanha

(10%), percentagens relativas ao total de terras orgânicas do continente. Tendo em conta os produtores biológicos, no ano de 2019 havia um total de 3,1 milhões, sendo que 91,5% estavam na Ásia, África e Europa. A **Figura 2** demonstra a distribuição de terras agrícolas e produtores biológicos por continente, em 2019.



**Figura 2:** Distribuição, por continente, de terras agrícolas e produtores biológicos, no ano de 2019. (Fonte: Willer et al., 2021).

Os maiores mercados de alimentos biológicos, em 2019, foram América do Norte e Europa, com 48,2 e 45,0 bilhões de euros de vendas a retalho, respetivamente, o que representa 87,9% do total vendido no mundo. Na União Europeia e na Europa, houve um crescimento progressivo no consumo de alimentos biológicos de 2009 a 2019, como se observa na **Figura 3**. Em 2019, Dinamarca e Suíça foram os países com maior consumo per capita (344 e 338 euros, respetivamente) (Willer et al., 2021).



**Figura 3:** Crescimento do consumo de alimentos biológicos na União Europeia (EU) e na Europa, em euros por pessoa, de 2009 a 2019. (Fonte: Willer et al., 2021).

Apesar da ascensão, o mercado de biológicos ainda é muito pequeno. Diversos autores indicam que a maior barreira na compra de alimentos biológicos que impede o seu incremento são os preços elevados dos produtos resultantes, seguido de outros fatores, como perecibilidade, desconfiança no rótulo e na certificação por falta de informação, marketing insuficiente, pouca disponibilidade devido ao desequilíbrio entre a demanda e a oferta, difícil acessibilidade e aparência menos atrativa (Akaichi, Glenk, & Revoredo-Giha, 2019; Chiciudean et al., 2019; Hansmann et al., 2020; Melovic et al., 2020).

Em relação aos produtores, foram mencionados os obstáculos de conversão para o sistema biológico, a percepção de demanda extra de trabalho, riscos e custos de transição e menores rendimentos das colheitas, devido a alguns fatores, como menor disponibilidade de nutrientes comparado à produção convencional, variações meteorológicas, localidade e tipo de solo (Bender et al., 2020; Berg, Maneas, & Engström, 2018; Borsato et al., 2020; Delbridge & King, 2016; Home et al., 2018; Kniss, Savage, & Jabbour, 2016; Teasdale & Cavigelli, 2017).

Com o objetivo de aumentar a confiança dos consumidores e assegurar um mercado justo, a União Europeia tem estabelecido regras para que produtores possam adquirir a certificação biológica. O certificado é dado aos produtores que cumpram com as condições estabelecidas de produção, recolha, armazenamento, transformação, rotulagem e distribuição de alimentos. A certificação é normalizada pelo Regulamento (CE) n° 834/2007, que será revogado e substituído pelo novo Regulamento (UE) n° 2018/848, de 30 de maio de 2018 (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2018), a partir de 1 de janeiro de 2022 (Comissão Europeia, 2020).

Os produtores que optarem pela mudança da produção convencional para a produção biológica deverão contratar um organismo de controlo acreditado para verificação do cumprimento das regras e notificar às autoridades competentes sobre o início da atividade de conversão. Os controlos são regidos pelo Regulamento (UE) n° 2017/625, de 15 de março de 2017, do Parlamento Europeu e do Conselho (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2017).

Durante o período de conversão, os produtores devem cumprir com as normas de produção biológica e manter registos de todas as atividades realizadas para garantir a verificação das conformidades. Não obstante, até o fim desta fase, não é permitido que os produtos sejam vendidos como biológicos. Este período de transição pode ser de até três anos, dependendo da cultura vegetal ou da produção animal, como definido no Anexo II

do Regulamento nº 2018/848. Posteriormente a esse período, e atestando o cumprimento das normas, os organismos de controlo acreditados emitem um certificado autorizando a comercialização dos produtos como biológicos (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2018).

Os produtos pré-embalados que contenham pelo menos 95% em peso de ingredientes biológicos devem aplicar o logotipo biológico da União Europeia (**Figura 4**). Para além disso, o logotipo pode ser usado voluntariamente em produtos originados na União Europeia que sejam embalados na presença do consumidor final e em produtos importados de países terceiros (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2018, 2011).



**Figura 4:** Versão principal do logotipo biológico da União Europeia. (Fonte: Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2018).

O logotipo permite credibilidade aos produtores e identificação e confiabilidade aos consumidores. O seu uso é estabelecido pelo Regulamento (CE) nº 889/2008, no artigo 57º e anexo XI, sendo inserido em 24 de março de 2010 pelo Regulamento (UE) nº 271/2010 (Comissão Europeia, 2008).

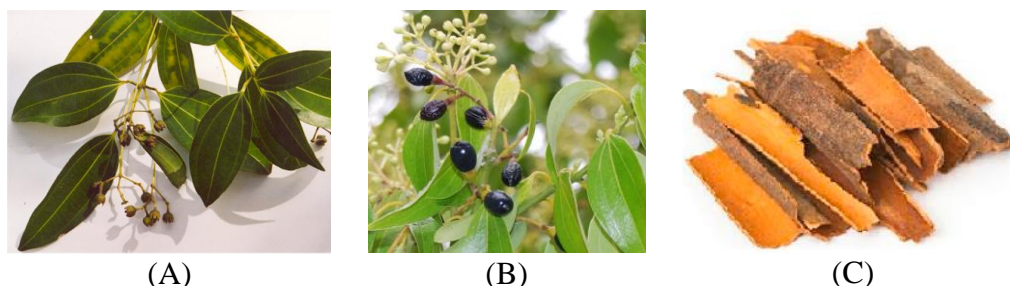
Um dos alimentos produzidos em modo biológico é a canela, uma especiaria amplamente apreciada para uso culinário e medicinal, obtida pela secagem da parte interna da casca de árvores de *Cinnamomum verum* J. Presl (Singh et al., 2021).

## 1.2. *Cinnamomum verum* J. Presl – canela

### 1.2.1. Caracterização botânica, origem e produção

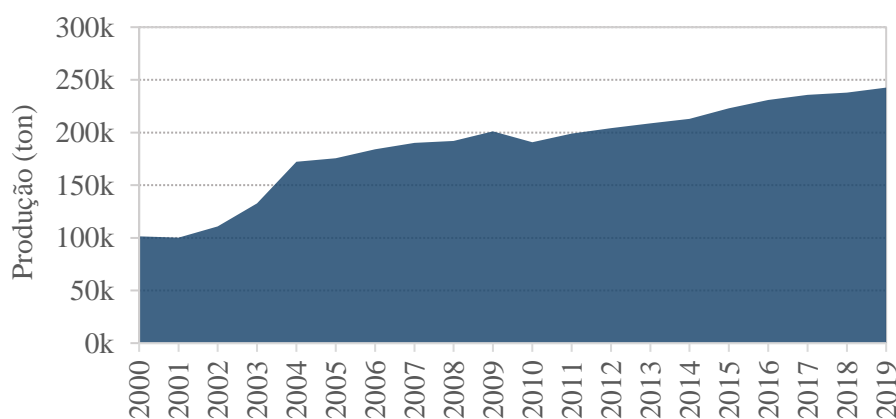
Originárias do Sri Lanka e do sul da Índia, as *Cinnamomum verum* são árvores perenes que crescem em locais quentes e húmidos, podendo atingir de 7 a 15 metros de altura. Estas possuem folhas de cor verde escuras e pontiagudas que podem medir até 18 centímetros de comprimento, flores pequenas amareladas e frutos pequenos de cor roxa. A parte interna da casca, depois de seca, chamada de canela, é utilizada como especiaria, e pode ser colhida após três anos de cultivo (Ribeiro-Santos et al., 2017; Singh et al., 2021).

De acordo com Avula et al. (2015), muitas espécies são comercializadas como canela, porém a de *Cinnamomum verum* J. Presl, da família Lauraceae, chamada também de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, foi considerada a verdadeira. A **Figura 5** apresenta as folhas, flores, frutos e cascas de *Cinnamomum verum* J. Presl.



**Figura 5:** *Cinnamomum verum* J. Presl. (A) Folhas, (B) Flores e frutos, e (C) Cascas. (Fonte: Adeel et al., 2020; Singh et al., 2021).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2021), a produção mundial de canela aumentou mais de 57% de 2000 a 2019, passando de 101.470 toneladas (ton) para 242.635 ton (**Figura 6**).



**Figura 6:** Produção mundial de canela, em toneladas, de 2000 a 2019. (Fonte: FAO, 2021).

A **Figura 7** mostra o mapa geográfico de produção média mundial de canela entre 2000-2019. Neste mesmo período, os maiores produtores de canela foram a Indonésia, com média de 85.667,15 ton, seguido de China (61.076,25 ton), Vietnã (21.429,70 ton), Sri Lanka (16.519,55 ton) e Madagáscar (2.227,15 ton). Em 2019, a China continental foi a maior exportadora de canela, com cerca de 70,03% do total produzido vendido para outros países (FAO, 2021).

Em 2019, os Estados Unidos da América foram o maior importador de canela, com mais de 28.286 ton importadas, das quais aproximadamente 69% foi oriunda da



**Tabela 1:** Composição nutricional de pau de canela e canela em pó.

Componente	Unidade	Pau de canela	Canela em pó	
Valor energético	kcal/100 g	246	364	253
Água	g/100 g	10,0	9,40	10,0
Lípidos	g/100 g	1,20	3,50	3,20
Proteínas totais	g/100 g	4,0	3,60	3,90
Hidratos de carbono*	g/100 g	81,2	79,6	55,5
Fibras	g/100 g	-	-	24,4
Cinzas	g/100 g	3,60	3,90	-
Ácidos graxos				
Saturados	g/100 g	0,564	0,96	0,65
Monoinsaturados	g/100 g	0,410	0,70	0,48
Poliinsaturados	g/100 g	0,018	0,16	0,53
Vitaminas				
Vitamina A	RE	9,33	1,00	-
Vitamina B1	mg	0,022	0,08	0,08
Vitamina B2	mg	0,041	0,14	0,14
Vitamina B3	mg	1,33	1,30	1,30
Vitamina B6	mg	0,158	-	0,25
Vitamina B9	µg	6,0	-	-
Vitamina C	mg	3,8	-	28,0
Vitamina E	mg	2,32	-	0,01
Beta-caroteno	µg	112	-	156
Minerais e elementos inorgânicos				
Na	mg/100 g	10,0	23,0	26,0
K	mg/100 g	431	550	500
Ca	mg/100 g	1000	1200	1228
Mg	mg/100 g	-	87,0	-
P	mg/100 g	64,0	50,0	61,0
Fe	mg/100 g	8,32	7,10	38,1
Cu	mg/100 g	0,339	0,49	-
Zn	mg/100 g	1,83	0,90	2,00
Se	µg/100 g	3,10	3,00	-
Referências		(DTU, 2020)	(MEXT, 2015)	(BDA, 2015)

\*Hidratos de carbono obtidos por diferença; Na: Sódio; K: Potássio; Ca: Cálcio; Mg: Magnésio; P: Potássio; Fe: Ferro; Cu: Cobre; Zn: Zinco; Se: Selênio; DTU - *Technical University of Denmark-Danish Food Composition*; MEXT - *Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology*; BDA - *Banca Dati di Composizione degli Alimenti per Studi Epidemiologici in Italia*; RE: Equivalente de retinol.

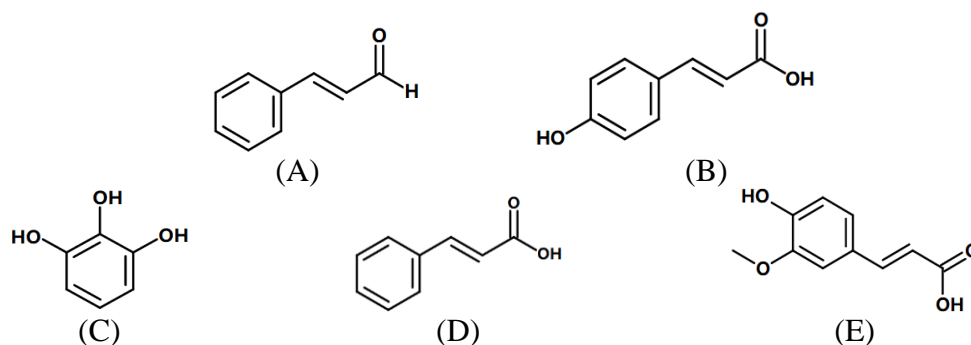
*C. verum* J. Presl apresenta uma variedade de componentes bioativos que têm sido isolados e quantificados ao longo dos anos. Cinamaldeído é o principal componente bioativo presente na casca, sendo responsável pela cor amarela e pelo aroma e sabor doces característicos da canela (Isaac-Renton, Li, & Parsons, 2015; Ribeiro-Santos et al., 2017). Daemi et al. (2019) realizou um estudo sobre a eficácia de uma pomada preparada com extrato hidroetanólico de *C. verum* para cicatrização de feridas em ratos diabéticos, e relatou uma concentração de cinamaldeído de 11.260 µg/g de extrato.

A **Tabela 2** apresenta os constituintes identificados em extratos obtidos da casca de *C. verum* J. Presl. Outros componentes que se destacam na canela são ácido *p*-cumárico (291 µg/g), ácido pirogálico (264 µg/g), ácido cinâmico (236 µg/g) e ácido ferúlico

(225 µg/g) (Gulcin et al., 2019; Klejdus & Kováčik, 2016). As estruturas químicas desses compostos são apresentadas na **Figura 8**.

**Tabela 2:** Constituintes identificados em extratos da casca de *C. verum* J. Presl.

Compostos	Referência	Compostos	Referência	
Ácido cafeico	Gulcin et al. (2019)	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzaldeído	Klejdus & Kováčik (2016)	
Ácido ferúlico		Ácido protocatecuico		
Ácido siríngico		3,4-Dihidroxibenzaldeído		
Ácido elágico		Ácido salicílico		
Quercetina		Ácido vanílico		
Catecol		Ácido clorogênico		
Ácido pirogálico		Ácido cinâmico		
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico				
Vanilina		Eugenol		Daemi et al. (2019)
Ácido <i>p</i> -cumárico		2-Hidroxicinamaldeído		
Ácido gálico		Álcool cinamílico		
Cinamaldeído	Wang et al. (2020)	Ácido rosmarínico	Vallverdú-Queralt et al. (2014)	
Proantocianidinas		Catequina		
Procianidina tipo A e B				
Epicatequina				
Cumarina				
2-Metoxicinamaldeído				



**Figura 8:** Estruturas dos principais constituintes identificados na casca de *C. verum* J. Presl. (A) Trans-cinamaldeído; (B) Ácido *p*-cumárico; (C) Ácido pirogálico; (D) Ácido cinâmico; (E) Ácido ferúlico. Desenhadas com eMolecules (<https://www.emolecules.com/>).

### 1.2.3. Aplicações e benefícios

O uso da canela data de tempos ancestrais. Em 3000 a.C., os egípcios utilizavam esta especiaria para preservar cadáveres. Os romanos a utilizavam em funerais para mascarar o odor de decomposição, mas também para tratar doenças dos sistemas digestivo e respiratório. Atualmente, todas as partes da árvore possuem aplicações, sendo utilizadas em fitoterápicos, cosméticos, fragrâncias, pesticidas e em alimentos (Ribeiro-Santos et al., 2017).

Na culinária tradicional, a planta é muito utilizada para aromatizar e realçar o sabor em carnes, peixes, molhos, produtos de panificação, confeitaria e bebidas, sendo tradicionalmente aplicada na cultura asiática (Gong et al., 2020; Ribeiro-Santos et al., 2017; Singh et al., 2021). Em países do Golfo Pérsico, a canela é tradicionalmente adicionada em bebidas açucaradas, em pratos salgados com arroz, carne e vegetais, e em sobremesas (Al-Khusaibi, Al-Habsi, & Rahman, 2019; Muhammad & Dewettinck, 2017).

A indústria alimentar de vários países aplica frequentemente a canela como aromatizante em diversos produtos, tais como preparados em pó para sobremesas, iogurtes, cereais, chás, refrigerantes, pães, biscoitos, chocolates, gomas e chicletes, congelados, entre outros (Joshi, 2019; Singh et al., 2021).

Muito utilizada como fitoterápico em diversos países do mundo e tradicionalmente empregada na medicina chinesa, indiana e persa (ANVISA, 2021; Hajimonfarednejad et al., 2019; Muhammad & Dewettinck, 2017), os efeitos terapêuticos associados à planta são as propriedades antioxidante, antidiabética (Gulcin et al., 2019; Zare et al., 2019), anti-inflamatória (Schink et al., 2018; Zhu et al., 2020), antimicrobiana, anticancerígena (Husain et al., 2018; Kubatka et al., 2020; Sivakami et al., 2020), antiviral (Fauvelle et al., 2017), e na prevenção do Alzheimer (Tepe & Ozaslan, 2020) e Parkinson (Ramazani et al., 2020).

Para além disso, alguns autores demonstraram que a canela de *C. verum* J. Presl pode ser aplicada com função terapêutica em lesões hepáticas e renais agudas (Hussain et al., 2019), para inibir a formação de cálculos renais (Zaki et al., 2019), para reduzir a gravidade dos sintomas de rinite alérgica sazonal (Steels et al., 2019), tem efeito cardioprotetor contra arritmias (Sedighi et al., 2018) e pode diminuir o peso corporal e gordura visceral (Tuzcu et al., 2017). Um estudo realizado por Borzoei et al. (2018) demonstra que a suplementação de 1,5 g de canela durante 12 semanas melhora o nível sérico de lipídios e reduz a exposição à distúrbios endócrinos e metabólicos em mulheres com síndrome de ovário poliquístico.

As propriedades bioativas e os benefícios do uso da canela têm sido associados, por diversos investigadores, à sua composição em compostos fenólicos.

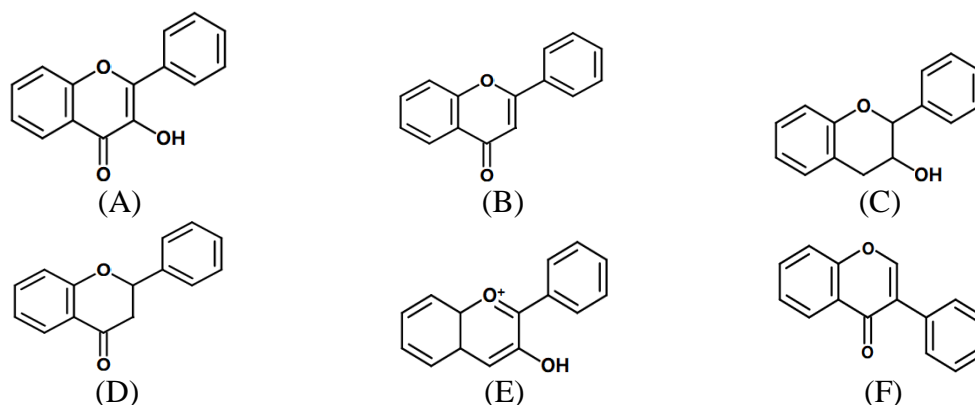
### 1.3. Compostos fenólicos como moléculas promissoras para o desenvolvimento de ingredientes funcionais

Os compostos fenólicos ou polifenóis são metabolitos secundários produzidos naturalmente pelas plantas, em condições normais e de stresse. Nas plantas, estes compostos apresentam diversas funções, tais como regulação do crescimento, proteção contra vírus, bactérias, insetos, predadores, stresse oxidativo e radiação ultravioleta, assim como também interferem na atração de polinizadores e animais para dispersão de sementes. Nos alimentos, estes compostos contribuem para as características sensoriais, como cor, aroma, sabor e adstringência (Araújo et al., 2021; Farha et al., 2020; Kumar & Goel, 2019; Rodríguez-Pérez, Segura-Carretero, & Contreras, 2019; Wen, Alseikh, & Fernie, 2020).

Os compostos fenólicos são constituídos por, pelo menos, um anel aromático hidroxilado (Rodríguez-Pérez, Segura-Carretero, & Contreras, 2019) e podem apresentar-se na forma simples ou ligados com açúcares, ácidos orgânicos e outras moléculas solúveis ou não em água. Os compostos fenólicos podem ser divididos principalmente em flavonoides e ácidos fenólicos (Araújo et al., 2021).

#### 1.3.1. Flavonoides

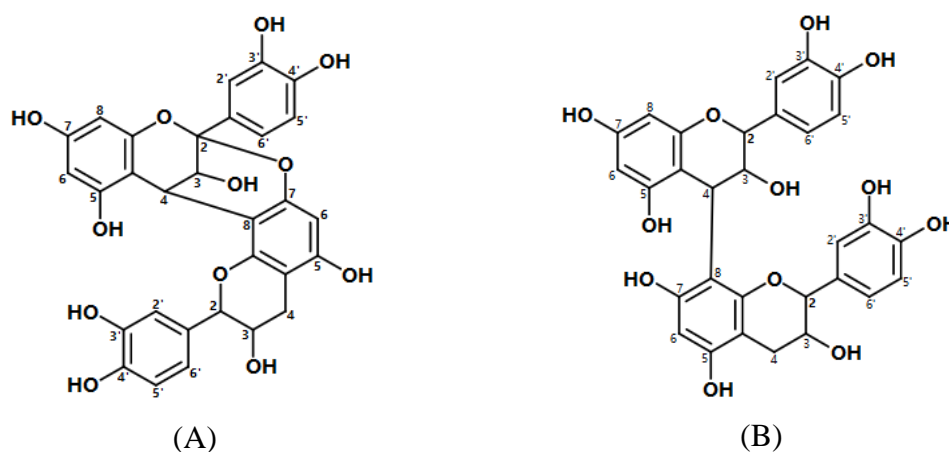
Os flavonoides são a maior classe de polifenóis, comumente encontrados em frutas, legumes, vegetais, nozes, chás, chocolate amargo, vinho tinto, leguminosas e especiarias, como a canela. Apresentam uma estrutura básica C6-C3-C6, composta por dois anéis benzenos ligados a uma cadeia com três carbonos e, pelo menos, um oxigênio. São divididos nomeadamente em flavonóis, flavonas, flavan-3-óis, flavononas, antocianinas e isoflavonas (**Figura 9**) (Maleki, Crespo, & Cabanillas, 2019; Wen et al., 2020). Os flavan-3-óis são compostos que se apresentam na forma de monômeros, como catequina e epicatequina, ou polímeros (proantocianidinas) (Pei, Liu, & Bolling, 2020).



**Figura 9:** Estruturas químicas de flavonoides. (A) Flavonóis; (B) Flavonas; (C) Flavan-3-óis; (D) Flavononas; (E) Antocianinas; (F) Isoflavonas.

Desenhadas com eMolecules (<https://www.emolecules.com/>).

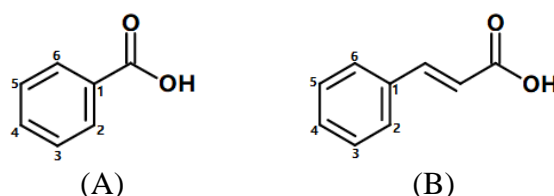
As proantocianidinas são taninos condensados de alto peso molecular, formados por monômeros de catequina e (epi)catequina, na forma de polímeros e oligômeros (procianidinas). Com grau de polimerização variando entre 2 a 11 monômeros, as procianidinas podem ser divididas em tipo-A e tipo-B, de acordo com a natureza das ligações. O tipo-A apresenta ligações monoméricas C4-C8 e C2-O7, e o tipo-B ligações C4-C8 ou C4-C6 (**Figura 10**). As proantocianidinas estão amplamente distribuídas em diversas plantas, fazendo parte da composição de folhas, flores, sementes, nozes, frutos e cascas, presentes em cacau, uvas, maçãs, mirtilos, cranberry, avelãs, nozes, chás e na canela (Araújo et al., 2021; Cremonini et al., 2020; Farha et al., 2020; Holkem & Favaro-Trindade, 2020; Rauf et al., 2019; Wang et al., 2020).



**Figura 10:** Estruturas químicas de dímeros de procianidinas. (A) Ligações tipo A e (B) Ligações tipo B. Desenhadas com eMolecules (<https://www.emolecules.com/>).

### 1.3.2. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos dividem-se principalmente em duas classes e os seus respetivos derivados: ácido benzóico (ácidos gálico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico, salicílico, vanílico e sirínico) e ácido cinâmico (ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico e clorogênico), constituídos por estruturas de C6-C1 e C6-C3, respetivamente (Kumar & Goel, 2019; Marchiosi et al., 2020). A diferença entre os derivados deve-se principalmente à variação de grupos nas posições R1 a R5 (**Figura 11**) (Zhang et al., 2019).



**Figura 11:** Estruturas químicas base dos derivados de ácido hidroxibenzóico (A) e ácido hidroxicinâmico (B). Desenhadas com eMolecules (<https://www.emolecules.com/>).

As fontes de ácidos fenólicos são frutas, vegetais, grãos, bebidas e especiarias, como canela (Gulcin et al., 2019; Rashmi & Negi, 2020). Zhang et al. (2019) encontraram ácidos fenólicos em 44 alimentos diferentes, usualmente consumidos na China, e obtiveram concentrações mais abundantes em flores, como couve-flor e bróculos, seguido de raízes, como cenoura, folhas, caules, leguminosas e, por último, em frutas.

### 1.3.3. Propriedades e benefícios

As propriedades bioativas dos compostos fenólicos têm sido associadas aos potenciais anti-inflamatório (Maleki et al., 2019; Margină et al., 2020), antiviral (Levy et al., 2020), antitumoral (Carvalho et al., 2020; Zabaleta et al., 2020), antioxidante (Silva & Pogacnik, 2020) e antimicrobiano (Olszewska, Gędas, & Simões, 2020).

A ingestão de alimentos ricos em compostos fenólicos tem sido amplamente relacionada a diversos benefícios, como efeitos imunorreguladores (Carvalho et al., 2020) e prebiótico, favorecendo a composição e abundância da microbiota intestinal e a produção de metabolitos significativos à saúde, com potencial de desinflamação intestinal (Alves-Santos et al., 2020; Pei, Liu & Boling, 2020). Para além disso, influencia na prevenção de distúrbios metabólicos, tais como obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Neri-Numa et al., 2020); propriedades terapêuticas de

doenças neurodegenerativas (Silva & Pogacnik, 2020) e celíaca (Dias et al., 2021); mitigação da aterosclerose (Cullen et al., 2020); e foi comprovado também o potencial no combate à infecção por SARS-CoV-2 (Levy et al., 2020).

Considerando o potencial antioxidante, diferentes extratos ricos em compostos fenólicos têm apresentado inibição de reações oxidativas comparáveis ou superiores aos sintéticos, quando incorporados em frutos do mar (Baptista, Horita, & Sant'Ana, 2020), frutas (Yu & Shi, 2021), vinhos (Marchante et al., 2019), carnes e produtos cárneos (Alirezalu et al., 2021; Munekata et al., 2020).

Dessa forma, os compostos fenólicos apresentam potencial para serem aplicados com função conservante na indústria alimentar, tornando-se numa alternativa aos conservantes sintéticos amplamente utilizados comercialmente.

## **2. Objetivos**

Considerando o potencial bioativo da canela e a preferência do consumidor por produtos obtidos de forma mais saudável, o presente estudo teve como objetivo a caracterização nutricional, química e bioativa da canela orgânica em pó, obtida de *Cinnamomum verum* J. Presl, assim como a obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos.

Dessa forma, os objetivos específicos foram a:

1. Determinação do valor nutricional de canela orgânica em pó, através da aplicação de metodologias oficiais de análise (AOAC);
2. Determinação da composição química da canela orgânica em pó, recorrendo a técnicas cromatográficas para avaliação do perfil em açúcares livres, ácidos orgânicos, ácidos gordos e composição fenólica; e
3. Determinação das propriedades bioativas do extrato hidroetanólico, obtido a partir da canela orgânica em pó, analisando o potencial antioxidante, antimicrobiano (antifúngico e antibacteriano), citotóxico (em linhas celulares tumorais e não-tumorais) e anti-inflamatório.

## **3. Metodologia**

### 3.1. Amostra

As amostras de canela orgânica em pó foram obtidas embaladas (**Figura 12**) num estabelecimento comercial - loja online Naturitas (2020).



**Figura 12:** Amostras de canela orgânica em pó. Frente (A) e verso (B) da embalagem.

### 3.2. Padrões e reagentes

#### 3.2.1. Para a análise química e nutricional

O acetonitrilo (99,9%), *n*-hexano (95%), etanol absoluto (99,9%) e acetato de etilo (99,8%), todos de grau HPLC, ácido sulfúrico (3,6 mM), ácido sulfúrico (0,1 M) e ácido sulfúrico concentrado foram adquiridos na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). Por outro lado, a mistura padrão de referência de éster metílico de ácidos gordos (FAME) 37 (padrão 47885-U) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), bem como os isómeros dos ácidos gordos individuais, açúcares (D(-)-frutose, D(+)-sacarose, D(+)-glucose, D(+)-trealose, D(+)-rafinose penta-hidrato e D(+)-melezitose) e padrões de ácidos orgânicos (L(+)-ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido shiquímico, ácido succínico, ácido fumárico e ácido quínico). O tocol racêmico, 50 µg/mL, foi comprado na Matreya (Pleasant Gap, PA, USA) e a água foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA). Relativamente ao padrão do composto fenólico utilizado (catequina) foi adquirido na Extrasyntheses (Genay Cedex, França). O tratamento da água foi feito através de um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA).

### 3.2.2. Para o estudo das bioatividades

*Atividade antioxidante:* Tampão Tris-HCl, ácido ascórbico, FeSO<sub>4</sub>, ácido tricloroacético e ácido tiobarbitúrico foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O padrão trolox (ácido 6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico) e 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) di-hidroclorido foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

*Atividades antibacteriana e antifúngica:* Ágar malte foi obtido do *Institute of Immunology and Virology*, Torlak (Belgrade, Serbia). O corante Cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio foi adquirido da Panreac Applichem (Barcelona, Espanha).

*Atividade anti-inflamatória:* Os macrófagos RAW 264.7 de rato foram obtidos da ECACC (*European Collection of Animal Cell Culture*) (Salisbury, UK), o meio DMEM da Hyclone (Logan, Utah, USA), os lipopolissacarídeos bacterianos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e o kit de reagentes Griess da empresa Promega (Madison, WI, USA).

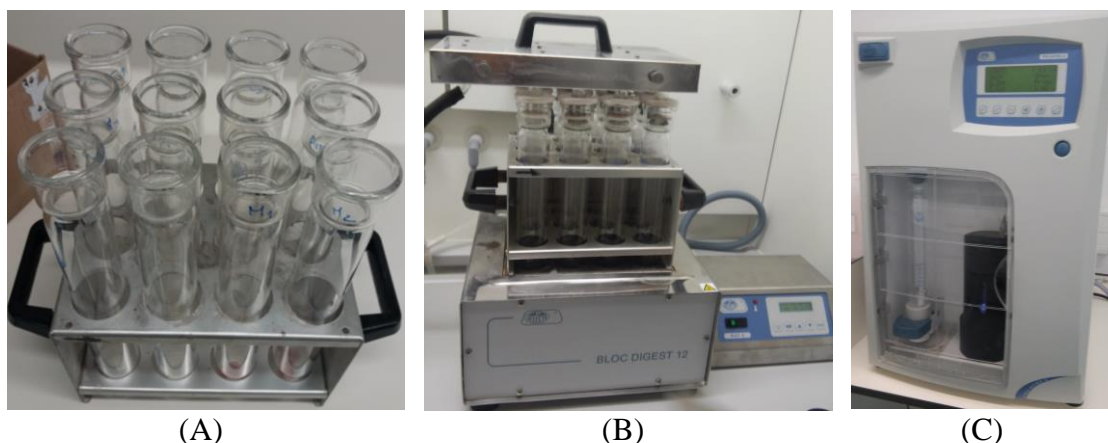
*Potencial citotóxico:* As linhas celulares tumorais humanas adenocarcinoma intestinal (CaCo-2), adenocarcinoma mamário (MCF-7) e carcinoma pulmonar (NCI-H460) foram obtidas no Instituto Leibniz - DSMZ (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH*, Braunschweig, Alemanha). A linha celular tumoral humana adenocarcinoma gástrico (AGS) e uma cultura celular não tumoral de rim de macaco (VERO-B4) foram obtidas da ECACC (Salisbury, UK). O soro fetal bovino (FBS) inativado termicamente, a L-glutamina, a solução salina equilibrada de Hank, a tripsina-EDTA (ácido etilenediaminatetra acético), a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL), o meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) e o meio DMEM para células animais (Dulbecco Modified Eagle) foram fornecidos pela empresa Hyclone (Logan, UT, USA). O ácido acético, ácido fórmico, elipticina, sulforrodamina B, azul de Tripán e Tris foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A água foi tratada como referido anteriormente na *secção 3.2.1.*

### 3.3. Determinação do valor nutricional e composição química da canela

#### 3.3.1. Valor nutricional

A composição nutricional da canela orgânica em pó foi realizada através de metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC, 2016).

O teor em proteínas ( $N \times 6,25$ ) foi determinado pelo método macro-Kjeldahl (AOAC 978.04), baseando-se na quantidade de azoto presente na amostra. Para tal, foi adicionado ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) à amostra (0,5 g) (**Figura 13A**), proporcionando a destruição de toda a matéria orgânica e, conseqüente, a formação de um sal inorgânico, o sulfato de amónio  $[(NH_4)_2SO_4]$ , no qual é retido o azoto (**Figura 13B**). De seguida, foi alcalinizada a solução por adição de hidróxido de sódio (NaOH), que potencia a libertação de azoto na forma de amoníaco ( $NH_3$ ). O amoníaco é, de seguida, destilado e recolhido numa solução de ácido sulfúrico (0,1 M). Por fim, é feita uma titulação com NaOH (0,1 M), utilizando um indicador vermelho de metilo, que permite quantificar o azoto presente na amostra (**Figura 13C**).



**Figura 13:** Etapas do processo de análise do teor em proteínas. Amostra com  $H_2SO_4$  (A), digestão da amostra (B) e destilação e titulação da amostra (C). (Fonte: Eliana Pereira; CIMO).

O teor em lípidos foi determinado pela extração de uma massa conhecida da amostra (3,0 g) com éter de petróleo, a  $120\text{ }^\circ\text{C}$ , durante cerca de 7 horas, usando um aparelho de Soxhlet (**Figura 14**). Posteriormente, a fração volátil foi evaporada e o extrato resultante colocado numa estufa até peso constante, de forma a determinar o teor em lípidos (AOAC 920.85).



**Figura 14:** Extração de lípidos por Soxhlet.

O teor em cinzas foi determinado por incineração numa mufla a  $600 \pm 15 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 5 horas (AOAC 923.03) (**Figura 15**).



**Figura 15:** Determinação do teor em cinzas. Mufla e exsiccador (A) e cadinhos (B). (Fonte: Eliana Pereira; CIMO).

Os hidratos de carbono foram calculados por diferença e a energia total determinada de acordo com a **Equação 1** e a **Equação 2**:

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times (\text{g}_{\text{proteínas}} + \text{g}_{\text{hidratos de carbono}}) + 9 \times (\text{g}_{\text{lípidos}})$$

**Equação 1:** Energia total em quilocalorias (kcal).

$$\text{Energia (kJ)} = 4,1868 \times \text{energia (kcal)}.$$

**Equação 2:** Energia total em quilojoules (kJ).

### 3.3.2. Composição química

#### 3.3.2.1. Açúcares livres

O perfil em açúcares livres da canela foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), de acordo com o procedimento descrito previamente por Barros et al. (2013).

Adicionou-se à 1 g de amostra, 1 mL do padrão interno melezitose (25 mg/mL) e 40 mL de uma solução etanol/água (80:20 v/v). De seguida, a mistura foi colocada num banho a 80 °C durante 90 minutos (min), a fim de se proceder à extração dos compostos. A mistura foi agitada a cada 15 min. Seguidamente, fez-se a centrifugação da suspensão (centrífuga refrigerada: Centurion K24OR, West Sussex, Reino Unido) a 15.000g durante 10 min, e o sobrenadante foi filtrado através de um filtro Whatman N° 4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para um balão de vidro de fundo redondo para evaporar o etanol (rotary evaporator Büchi R-210, Flawil, Switzerland) a 40 °C sob pressão reduzida. A fração aquosa foi lavada três vezes com 10 mL de éter etílico. De seguida, à fração foi adicionada água até um volume final de 5 mL, e filtrada através de filtro Whatman de 0,2 µm para um vial âmbar, para posterior análise cromatográfica.

O equipamento de HPLC é num sistema integrado com uma bomba (Knauer, sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), um mostrador automático (AS-2057 Jasco, Easton, MD, EUA), um detetor RI (Knauer Smartline 2300) e uma coluna Eurospher 100-5 NH<sub>2</sub> (4,6 x 250 mm, 5 µm, Knauer), operando a 35 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel usada foi acetonitrilo/água desionizada a 70:30 (v/v), a um caudal de 1 mL/min e o volume de injeção foi de 10 µL.

A identificação dos açúcares livres foi feita através da comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra com padrões obtidos comercialmente. A análise de dados foi feita através de software Clarity 2.4 (DataApex) e a quantificação foi efetuada aplicando o método do padrão interno. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca (*ms*).

#### 3.3.2.2. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos das amostras de canela orgânica em pó foram determinados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos

(UFLC-DAD), de acordo com o procedimento descrito anteriormente por Barros et al. (2013).

Aproximadamente 1 g de amostra foi extraída com 25 mL de ácido metafosfórico a 4,5% à temperatura ambiente (cerca de 25 °C), sob agitação a 150 *rpm*, durante 20 min. A mistura foi então filtrada através de filtro Whatman de 0,2 µm, e novamente filtrada através de um filtro de nylon 0,22 µm para um vial, para posterior análise cromatográfica.

A análise foi efetuada usando um sistema UFLC Shimadzu 20A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A separação dos ácidos orgânicos foi feita através de uma coluna C<sub>18</sub> de fase reversa SphereClone (250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno (d.i.), 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) termostaticada a 35 °C e a eluição foi efetuada com ácido sulfúrico (3,6 mM), usando um caudal de 0,8 mL/min, e um volume de injeção de 20 µL.

A detecção dos ácidos orgânicos realizou-se através de um DAD nos comprimentos de onda 215 nm e 245 nm. A quantificação efetuou-se através de comparação da área dos picos registados, com curvas de calibração obtidas a partir dos padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em g por 100 g de *ms*.

### 3.3.2.3. Ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos foi determinado através de um sistema de cromatografia gasosa acoplado a um detetor de ionização de chama (GC-FID), seguindo um procedimento descrito por Barros et al. (2013).

A massa obtida por extração em Soxhlet (descrita anteriormente na **secção 3.3.1.**) foi misturada com 5 mL de metanol: ácido sulfúrico: tolueno 2:1:1 (*v/v/v*), e mantida sob agitação a 160 *rpm*, durante aproximadamente 12 horas, num banho (Julabo, SW22; Seelbach, Germany) a 50 °C. Posteriormente, adicionaram-se 3 mL de água desionizada, agitou-se em vórtex e, para a recuperação dos FAMES, adicionaram-se 3 mL de éter etílico, agitando-se novamente. Após aguardar a separação de fases, o sobrenadante foi transferido para um vial de 1,5 mL, contendo sulfato de sódio anidro, a fim de eliminar a água. Por último, filtrou-se a amostra com um filtro de nylon 0,2 µm (Whatman) para outro vial para serem analisados cromatograficamente.

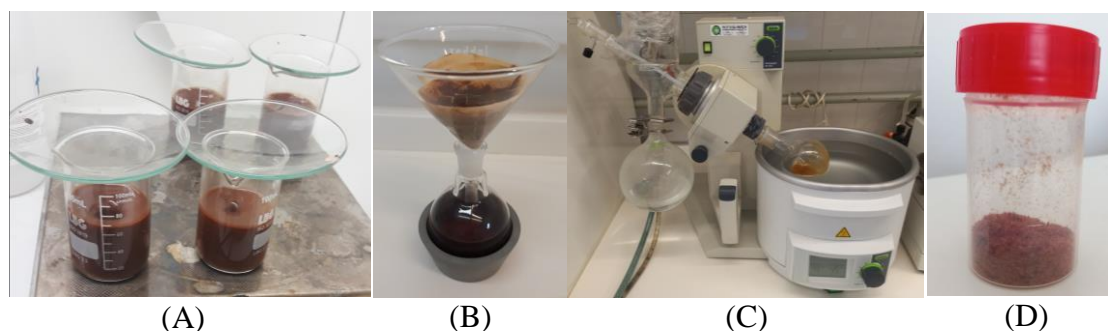
Os ácidos gordos foram estudados através de um sistema de GC (DANI 1000) equipado com um injetor split/splitless, FID e uma coluna Macherey Nagel (30 m x 0,32 mm d.i. x 0,25 µm df). O programa da temperatura do forno aplicado foi:

temperatura inicial da coluna de 50 °C, mantida por 2 min, depois uma subida de 30 °C/min a 125 °C, 5 °C/min de subida para 160 °C, 20 °C/min de subida para 180 °C, 3°C/min subida até 200 °C, 20 °C/min subida até 220 °C e mantido por 15 min. O gás de arraste utilizado foi hidrogénio, com um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção de split (1:40) foi realizada a 250 °C, onde 0,1 µL da amostra foi injetado.

A identificação dos ácidos gordos realizou-se comparando os tempos de retenção relativos dos picos FAME das amostras com os padrões. Os resultados foram registados e processados usando o Software CSW 1.7 (DataApex 1.7, Praga, República Tcheca) e expressos em percentagem relativa (%) de cada ácido gordo detetado.

#### 3.3.2.4. Compostos fenólicos

**Processo de extração:** Foi adicionada à amostra (2 g) uma solução de etanol/água (80:20 v/v; 50 mL), e submetida à agitação durante 1 hora a temperatura ambiente (**Figura 16A**). Após esse período, o sobrenadante foi filtrado através de filtro Whatman N° 4 (**Figura 16B**) e o resíduo resultante submetido novamente à extração com 50 mL da mesma solução hidroetanólica. A fração etanólica do extrato foi evaporada em evaporador rotativo a 40 °C e pressão reduzida (**Figura 16C**), e a fração aquosa resultante foi congelada e liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA). Por fim, o extrato liofilizado (10 mg) (**Figura 16D**) foi redissolvido em 2 mL de etanol/água (20:80 v/v), filtrado sob pressão reduzida através de um filtro Whatman N° 541, com auxílio de um funil de Büchner, e mais uma vez filtrado através de um filtro nylon 0,22 µm para um vial, para posterior análise cromatográfica (Fernandes et al., 2019).



**Figura 16:** Etapas do processo de extração. Agitação (A), filtração (B), evaporação (C) e extrato liofilizado (D).

**Método analítico:** A análise dos compostos fenólicos foi realizada usando um sistema Dionex Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (5 °C), um desgaseificador e um

---

compartimento de coluna com termostato automatizado. A detecção dos compostos foi efetuada com um DAD, usando os comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm, e com um detetor de espectrometria de massa (MS) (**Figura 17**).

A separação dos compostos foi feita numa coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3  $\mu$ m, 4,6 mm  $\times$  150 mm, Waters, Milford, MA, USA), a 35 °C. A fase móvel foi 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e a coluna foi reequilibrada (10 min), empregando um fluxo de 0,5 mL/min.

A detecção de MS foi feita utilizando um espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), equipado com uma fonte de ionização electrospray (ESI). O gás de arraste usado foi o azoto (50 psi); a voltagem de spray utilizada foi de 5 kV, com temperatura inicial de 325 °C e tensão capilar de -20 V. A voltagem do *tube lens offset* foi mantida a -66 V. Os espectros foram gravados em modo de ião negativo entre 100 e 1500 *m/z*. A energia de colisão aplicada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados usando o programa Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA).

A identificação dos compostos foi feita por comparação dos parâmetros obtidos (tempos de retenção e espectros UV-Vis e massa) com compostos padrões, quando disponíveis, ou através da literatura. Para a quantificação, foi obtida uma curva de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas: catequina ( $y = 84,950x - 23,200$ ;  $R^2 = 0,999$ ); baseadas nos sinais UV-Vis e utilizando o comprimento de onda máximo de absorção de cada composto padrão. Nos casos de indisponibilidade de padrões comerciais, a quantificação foi realizada através de curvas de calibração de compostos do mesmo grupo fenólico (Fernandes et al., 2019). Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.



Figura 17: HPLC-DAD-ESI/MS. (Fonte: Eliana Pereira; CIMO).

### 3.4. Avaliação das propriedades bioativas

#### 3.4.1. Preparação do extrato hidroetanólico de canela

A extração foi realizada de acordo com o descrito anteriormente na *secção 3.3.2.4.* O extrato liofilizado foi re-dissolvido numa concentração de 20 mg/mL em etanol/água 80:20 (v/v) para os ensaios atividade antioxidante (*secção 3.4.2.*), em meio de cultura (10 mg/mL) para a análise da atividade antimicrobiana (*secção 3.4.3.*), e em água destilada numa concentração de 8 mg/mL para avaliação da atividade citotóxica (em linhas celulares tumorais e não-tumorais) (*secção 3.4.4.* e *3.4.5.*) e anti-inflamatória (*secção 3.4.6.*). Posteriormente, estas soluções foram diluídas sucessivamente de forma a obter as concentrações de trabalho.

#### 3.4.2. Atividade antioxidante

##### 3.4.2.1. Inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação da peroxidação lipídica seguiu o procedimento descrito por (Barros et al., 2013). Cérebros de porco, obtidos num matadouro local, foram dissecados e homogeneizados com tampão Tris-HCl gelado (20 mM, pH 7,4), a fim de produzir um homogenato de tecido cerebral numa proporção de 1:2 (p/v); de seguida, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min.

Uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante foi incubada a 37,5 °C por 60 min com as diferentes concentrações da solução (0,2 mL), na presença de FeSO<sub>4</sub> (10 µM; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 mL). Como controlo foi utilizado a solução etanol/água 80:20 (v/v). Após esse período, adicionou-se à mistura ácido tricloroacético (28% p/v, 0,5 mL), a fim de interromper a reação. Seguidamente, foi adicionado ácido tiobarbitúrico (TBA, 2% p/v, 0,38 mL) e a mistura foi submetida ao aquecimento a 80 °C durante 20 min. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos para remover a proteína precipitada. A intensidade da cor do complexo MDA-TBA no sobrenadante foi medida num espectrofotómetro a 532 nm (**Figura 18**). A taxa de inibição (%) foi calculada usando a **Equação 3**.

$$\text{Taxa de inibição (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

**Equação 3:** Equação da determinação da taxa de inibição em ensaio TBARS.

Onde:

A: absorbância do controlo;

B: absorbância da solução do composto.



**Figura 18:** Ensaio de avaliação da atividade antioxidante através do método de TBARS. (Fonte: José Pinela; CIMO).

### **Fundamento teórico**

Este ensaio tem por base a medição de produtos da oxidação lipídica, nomeadamente o malondialdeído (MDA), um composto que reage com duas moléculas de TBA, na presença de íões H<sup>+</sup> e alta temperatura, produzindo um cromógeno (MDA-TBA) (**Figura 19**) de cor rosa, que é absorvido a 532-535 nm. A oxidação é realizada numa matriz rica em lípidos, como o cérebro de porco, e induzida pela adição de um ião metálico, tais como ferro e cobre. A inibição da oxidação ocorre pela capacidade dos compostos antioxidantes, presentes na amostra, de parar o processo. Dessa forma, quanto maior for a capacidade antioxidante, menor será a formação de cromógeno (menos



(concentração de extrato necessário para proteger 50% da população de RBC da hemólise por 60 min).



**Figura 20:** Ensaio de avaliação da atividade antioxidante pelo método de OxHLIA. (Fonte: José Pinela; CIMO).

### **Fundamento teórico**

O ensaio de OxHLIA avalia a capacidade de antioxidantes de retardar a hemólise dos eritrócitos de ovelha. A hemólise ocorre pela ação de dois tipos de radicais, os hidrofílicos e os lipofílicos. Os radicais hidrofílicos, que são formados durante a decomposição térmica do AAPH (pro-oxidante), oxidam as membranas dos eritrócitos e, dessa oxidação, são formados os radicais lipofílicos. O momento em que ocorrerá a hemólise pode ser retardado pela ação dos antioxidantes, que agem capturando esses radicais (tempo de atraso da hemólise) (Prieto & Vázquez, 2014).

#### ***3.4.3. Atividade antimicrobiana***

##### ***3.4.3.1. Atividade antibacteriana***

A avaliação da atividade antibacteriana seguiu a metodologia descrita por Soković et al. (2010). Utilizaram-se bactérias Gram-negativas, tais como *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030) e *Salmonella Typhimurium* (ATCC 13311), bem como bactérias Gram-positivas, tais como *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), *Bacillus cereus* (isolado de alimento) *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973). Estes microrganismos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” da Universidade de Belgrado na Sérvia. As concentrações mínimas inibitória (CMI) e bactericida (CMB) foram determinadas usando o método de microdiluição.

As culturas bacterianas foram ajustadas, através de espectrofotômetro a 625 nm, com solução salina estéril, até uma concentração aproximada de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL. Previamente, os inóculos foram cultivados em meio sólido para verificar a sua validade e a ausência de contaminação. De seguida, as diferentes diluições do extrato hidroetanólico foram pipetadas para os poços de uma microplaca e adicionados 100  $\mu$ L de caldo tríptico de soja (TSB) e 10  $\mu$ L de inóculo. A microplaca foi incubada a 37 °C durante 24 horas. Após o período de incubação, adicionou-se a cada poço 40  $\mu$ L de corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT; 0,2 mg/mL) e incubou-se novamente a 37 °C durante 30 min.

As menores concentrações que produziram uma inibição significativa do crescimento bacteriano (em torno de 50%) em comparação ao controlo positivo, ou seja, as CMI, foram determinadas por um ensaio colorimétrico de viabilidade microbiana baseado na alteração da cor amarela para rosa.

As CMBs foram determinadas por subcultura em série, adicionando 10  $\mu$ L de cada poço, que não apresentou mudança de coloração, à 100  $\mu$ L de TSB, seguido de incubação a 37 °C por 24 horas. A menor concentração sem crescimento visível foi considerada como a CMB. Os aditivos conservantes de alimentos sulfito de sódio (E221) e metabissulfito de potássio (E224) foram utilizados como controlos positivos. Os resultados de CMI e CMB foram expressos em mg por mL.

#### 3.4.3.2. Atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica seguiu o procedimento descrito anteriormente por Soković & van Griensven (2006). Os micromicetos utilizados foram *Aspergillus fumigatus* (ATCC 9197), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium aurantiogriseum* (isolado de alimento) e *Trichoderma viride* (IAM 5061). Estes microrganismos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” na Universidade de Belgrado, Sérvia. As concentrações mínimas inibitória (CMI) e fungicida (CMF) foram determinadas usando o método de microdiluição.

Os fungos foram mantidos em ágar malte (MA), armazenados a 4 °C e subcultivados uma vez por mês. Os esporos fúngicos foram lavados da superfície do ágar com solução salina estéril (0,85%) suplementado com Tween 80 (0,1% v/v). A suspensão de esporos foi ajustada com uma solução salina estéril para uma concentração de,

aproximadamente,  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL, e inoculadas em MA a fim de verificar a sua validade e a ausência de contaminação.

A CMI foi determinada adicionando o extrato hidroetanólico aos poços com caldo extrato de malte e inóculo fúngico, seguido de incubação a 28 °C durante 72 horas. As concentrações mais baixas, sem crescimento visível (usando um microscópio binocular), foram definidas como CMI.

As concentrações mínimas fungidas (CMFs) foram determinadas por subcultura em série de 2 µL de cada poço, que não apresentou crescimento, em microplaca contendo 100 µL de caldo extrato de malte por poço, seguido de incubação a 28 °C durante 72 horas. A menor concentração sem crescimento visível foi definida como CMF, indicando 99,5% de morte do inóculo original. Os aditivos conservantes de alimentos E221 e E224 foram utilizados como controlos positivos. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg por mL.

#### ***3.4.4. Avaliação da citotoxicidade em linhas celulares tumorais***

O potencial citotóxico do extrato hidroetanólico foi avaliado através do método da sulforrodamina B (SRB) (**Figura 21**), descrito previamente por Barros et al. (2013). Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico e em câmara de fluxo laminar (TLStar, AV-30/70), a fim de evitar contaminações.

Uma cultura celular não tumoral de rim de macaco (VERO-B4), e quatro linhas celulares tumorais humanas, adenocarcinoma intestinal (CaCo-2), adenocarcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma gástrico (AGS) e carcinoma de pulmão (NCI-H460), foram mantidas a 37,5 °C (ar humidificado, 5% CO<sub>2</sub>), em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de FBS. As células apenas foram utilizadas quando apresentavam entre 70% e 80% de confluência.

O meio de cultura de cada caixa que continha as linhas celulares foi retirado e adicionado 2 mL de HBSS para lavagem. De seguida, uma enzima proteolítica tripsina (1,5 mL) foi adicionada, e a caixa novamente incubada por 3 minutos, a fim de descolar as células. Após esse período, adicionou-se meio de cultura (3 mL) para inativar a tripsina e evitar que ocorra destruição celular. Então, a suspensão celular obtida foi transferida para um tubo Falcon estéril, centrifugada (1200 rpm, 5 min, 10 °C) e, após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado em meio de cultura (5 mL). Desta suspensão,

retirou-se uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$ , à qual se adicionou 50  $\mu\text{L}$  de solução de azul tripano e homogeneizou-se para a contagem do número de células numa câmara de Neubauer.

O extrato hidroetanólico foi diluído com água até as concentrações a testar (0,125 - 8 mg/mL), transferido (10  $\mu\text{L}$ ) para cada poço de uma microplaca e, de seguida, adicionadas as suspensões celulares (190  $\mu\text{L}$ ) numa densidade apropriada ( $5,0 \times 10^4$  células/poço), de acordo com os cálculos efetuados. As concentrações finais obtidas de extrato hidroetanólico foram de 6,25 - 400  $\mu\text{g/mL}$ . A microplaca foi selada e incubada a 37,5 °C durante 48 horas (ar humidificado, 5%  $\text{CO}_2$ ).

Após o período de incubação, a cada poço foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético frio (TCA, 10%), e a microplaca incubada a 4 °C durante 60 min para a fixação das células. Seguidamente, a microplaca foi lavada com água desionizada e, após secagem, adicionado 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de SRB (0,1% em 1% de ácido acético), seguido de repouso durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, a microplaca foi lavada três vezes com ácido acético (1%), para remover a SRB não aderida, e colocada a secar. Por fim, a SRB aderida foi solubilizada com 200  $\mu\text{L}$  de Tris (10 mM; pH 7,4), num agitador de microplacas (Stat Fax-2100), e a absorvância medida a 540 nm. Utilizou-se a elipticina como controlo positivo. Os resultados foram expressos em valores de  $\text{GI}_{50}$  (concentração de extrato hidroetanólico que inibe 50% de crescimento celular), em unidades de  $\mu\text{g}$  por mL.



**Figura 21:** Avaliação citotóxica em linha celular tumoral. (Fonte: Filipa Mandim; CIMO).

### **3.4.5. Avaliação da citotoxicidade numa linha celular não-tumoral e numa cultura de células primária**

O ensaio em células não tumorais seguiu o procedimento descrito por Barros et al. (2013). Neste ensaio, utilizou-se fígado de porco, obtido num matadouro local, de forma a obter uma cultura celular não tumoral designada por PLP2 (cultura primária de células de fígado de porco). O tecido foi lavado com HBSS, contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e dividido em explantes de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Os explantes foram colocados em frascos de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM suplementado com FBS (10%), aminoácidos não essenciais (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Os frascos foram incubados a 37,5 °C sob atmosfera humidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi substituído a cada dois dias de incubação e o crescimento celular foi monitorizado por observação em microscópio de contraste de fase.

Seguidamente, as células foram transferidas (190 µL) para uma microplaca, de forma a obter uma densidade de 1,0 x 10<sup>4</sup> células/poço, juntamente com 10 µL das diferentes diluições do extrato hidroetanólico com água (400 a 6,25 µg/mL). A microplaca foi incubada a 37,5 °C por 48 horas. Em seguida, efetuou-se o ensaio SRB, descrito anteriormente (*secção 3.4.4.*). A elipticina foi utilizada como controlo positivo. Os resultados foram expressos em GI<sub>50</sub> (concentração de extrato que inibe 50% de crescimento celular em cultura de células PLP2), em unidades de µg por mL.

### **3.4.6. Avaliação da atividade anti-inflamatória**

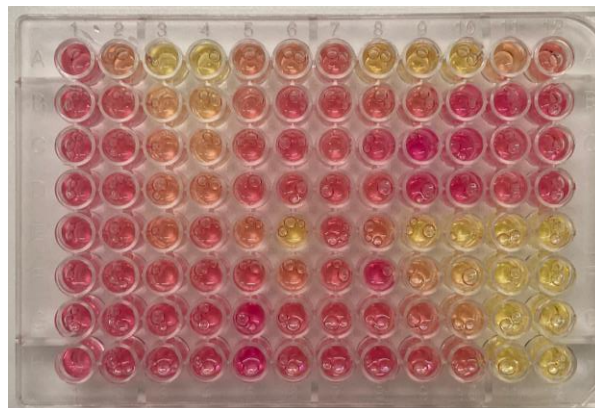
A atividade anti-inflamatória (**Figura 22**) foi testada em macrófagos RAW 264.7 de rato, de acordo com o procedimento descrito por Jabeur et al. (2016). As culturas celulares foram feitas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino, inativado termicamente, e L-glutamina, e incubadas a 37,5 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e ar húmido (HF 151, Heal Force).

As células com crescimento ativo foram soltas com um raspador celular. A densidade experimental das células foi estabelecida em 5,0 x 10<sup>5</sup> células/mL. A proporção de células mortas foi inferior a 1%, de acordo com o teste de exclusão de Azul de Tripán. Seguidamente, as células (190 µL) foram distribuídas em cada poço de uma microplaca e incubadas durante a noite (37,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, ar húmido).

Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato hidroetanólico (10 µL, 0,125 – 8 mg/mL) e incubadas durante 1 hora sob as mesmas condições citadas anteriormente. As concentrações finais de extrato obtidas foram de 6,25 – 400 µg/mL. De seguida, foram adicionados aos poços lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos (1 µg/mL) e a microplaca novamente incubada por um período de 24 horas, a fim de estimular as células a secretarem óxido nítrico (NO). Controlos sem a adição de LPS foram preparados para observar se estes induziam alterações nos níveis basais de NO.

A quantificação de NO foi determinada utilizando um kit de reagentes Griess que contém sulfanilamida e hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED). O sobrenadante das células (100 µL) foi transferido para outra microplaca e misturado aos reagentes, 5 a 10 minutos cada, a temperatura ambiente. A produção de NO foi determinada medindo a absorbância a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek, Inc; Winooski, EUA), e a leitura comparada com a curva de calibração.

Os resultados foram calculados através da representação gráfica da percentagem de inibição da produção de óxido nítrico *versus* a concentração de amostra, e expressos relativamente à concentração de cada um dos extratos que provoca a inibição em 50% da produção de óxido nítrico (EC<sub>50</sub>), em unidades de µg por mL.

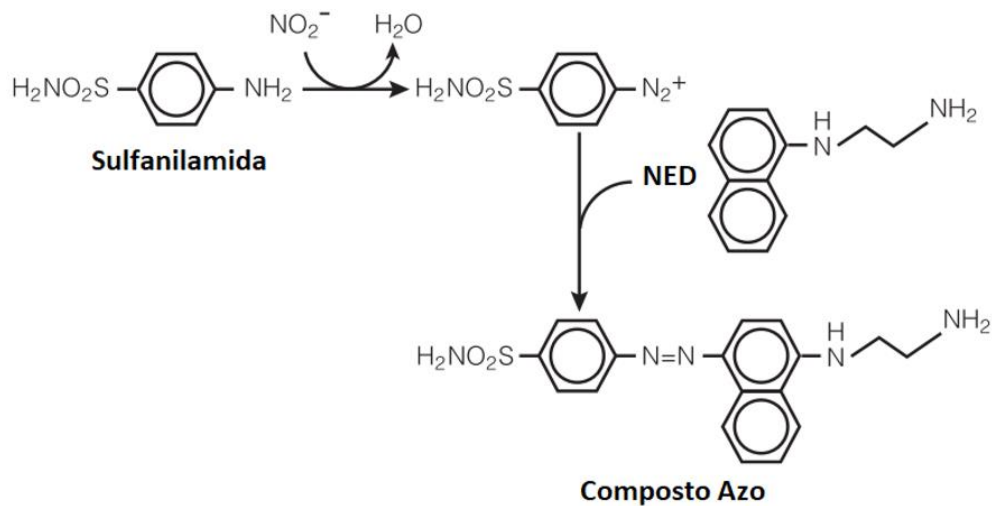


**Figura 22:** Avaliação da atividade anti-inflamatória. (Fonte: Filipa Mandim; CIMO).

### **Fundamento teórico**

O ensaio de atividade anti-inflamatória avalia a capacidade de antioxidantes de reduzir a produção de NO. Os macrófagos após serem expostos aos imunoestimulantes, como o LPS (componente da parede celular de bactérias Gram negativas), secretam mediadores inflamatórios, tal como o NO. O NO é um radical livre sintetizado pela enzima iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), que exerce função anti-inflamatória bem

como a morte microbiana, porém também está envolvido em muitas doenças patológicas no organismo. A produção de NO é medida através de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), um produto da degradação do NO. O nitrito reage com sulfanilamida e depois com NED, formando um composto azo estável de cor vermelha (**Figura 23**), que apresenta absorvância em 540 nm (Taofiq et al., 2016).



**Figura 23:** Reações químicas entre  $\text{NO}_2^-$ , sulfanilamida e hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED). (Fonte: Promega, 2009).

## **4. Resultados e Discussão**

#### 4.1. Caracterização nutricional da canela orgânica em pó

Os resultados da composição nutricional da canela orgânica em pó estão apresentados na **Tabela 3**. Entre os macronutrientes avaliados, os hidratos de carbono foram os mais abundantes, com  $89,0 \pm 0,2$  g/100 g *ms*, seguido das proteínas ( $4,9 \pm 0,1$  g/100 g *ms*), cinzas ( $3,7 \pm 0,1$  g/100 g *ms*) e lípidos ( $2,43 \pm 0,03$  g/100 g *ms*). Em relação ao valor energético, a cada 100 g de canela consumida são fornecidos 397,2 kcal ou 1663 kJ.

**Tabela 3:** Parâmetros nutricionais da canela orgânica em pó (média  $\pm$  desvio padrão).

Parâmetro nutricional	Valor
Proteínas (g/100 g <i>ms</i> )	$4,9 \pm 0,1$
Lípidos (g/100 g <i>ms</i> )	$2,43 \pm 0,03$
Hidratos de carbono (g/100 g <i>ms</i> )	$89,0 \pm 0,2$
Cinzas (g/100 g <i>ms</i> )	$3,7 \pm 0,1$
Energia (kcal/100 g <i>ms</i> )	$397,2 \pm 0,3$
Energia (kJ/100 g <i>ms</i> )	$1663 \pm 1$

*ms* - massa seca.

São vários os estudos disponíveis na literatura referentes à canela de *C. verum*, obtida pelo modo de produção convencional, no entanto não há estudos científicos que abordem a composição nutricional de canela orgânica, ou seja, canela obtida através do modo de produção biológico.

Os valores nutricionais da canela orgânica em pó apresentaram concentrações mais elevadas comparativamente com os valores da canela produzida no modo convencional, disponíveis em bases de dados na literatura (BDA, 2015; DTU, 2020; MEXT, 2015), nomeadamente proteínas (3,60-4,00 g/100 g), hidratos de carbono (55,5-81,2 g/100 g) e energia (246-364 kcal/100 g). Apenas o teor em cinzas (3,60-3,90 g/100 g) e lípidos (1,20-3,50 g/100 g) foram semelhantes aos valores disponíveis.

Qaid et al. (2021) estudaram o valor nutricional de canela convencional, obtida de *C. verum*, através das metodologias de análise da AOAC, e obtiveram um teor em hidratos de carbono de 88,36 g/100 g, de proteínas de 4,43 g/100 g e cinzas de 3,18 g/100 g, valores semelhantes aos obtidos para canela orgânica em pó. No entanto, o conteúdo em lípidos (4,03 g/100 g) divergiu do resultado apresentado no presente estudo.

Saber (2019) também avaliou a composição nutricional da canela em pó comercial, obtida a partir de *C. verum*, por métodos oficiais da AOAC. Os resultados obtidos revelaram um conteúdo de hidratos de carbono de  $50,89 \pm 0,24$  %, teor em lípidos

de  $3,44 \pm 0,43$  %, teor em proteínas de  $3,22 \pm 0,14$  % e teor em cinzas de  $2,20 \pm 0,43$  %, valores estes que divergem com os resultados apresentados no presente estudo.

Segundo Ribeiro-Santos et al. (2017), as diferenças encontradas entre os diversos estudos podem ser devido ao tipo de cultivo, à composição do solo, à fase de maturação, às condições climáticas e ambientais e aos parâmetros geográficos.

## 4.2. Composição química da canela orgânica em pó

### 4.2.1. Perfil em açúcares, ácidos orgânicos e ácidos gordos

Os resultados do perfil em açúcares livres, ácidos orgânicos e ácidos gordos da canela orgânica em pó estão presentes na **Tabela 4**.

Relativamente ao perfil em açúcares, a canela orgânica em pó revelou a presença de quatro moléculas, dois monossacáridos (glucose e frutose) e dois dissacáridos (sacarose e trealose) (**Figura 24**). A frutose foi o principal açúcar livre detetado ( $0,62$  g/100 g *ms*), seguido pela glucose ( $0,51$  g/100 g *ms*), trealose ( $0,19$  g/100 g *ms*) e sacarose ( $0,04$  g/100 g *ms*). A concentração total de açúcares livres foi de  $1,35$  g/100 g *ms*.

Na literatura não foram encontrados estudos que avaliam a composição em açúcares da canela obtida a partir de *C. verum* J. Presl. No entanto, segundo a base de dados do *United States Department of Agriculture* (USDA, 2019), a canela obtida de *C. cassia*, uma espécie mais comum originada na China, produzida no modo convencional, apresenta uma concentração de glucose maior ( $1,04$  g/100 g) e um conteúdo de frutose ( $0,02$  g/100 g) e de sacarose ( $0,02$  g/100 g) menores do que os valores obtidos no presente estudo.

Considerando uma escala de poder de doçura em que a sacarose é 100, a frutose e a glucose equivaleriam a 150-170 e 70-80, respetivamente, ou seja, a frutose apresenta um potencial de doçura maior que a sacarose e a glucose um potencial menor (Helstad, 2019). Dessa forma, a canela orgânica obtida a partir de *C. verum* J. Presl apresenta uma doçura levemente maior do que a canela de *C. cassia*, o que também foi observado por Kawatra & Rajagopalan (2015).

No que concerne aos ácidos orgânicos presentes na canela orgânica em pó, os resultados revelaram a presença de cinco moléculas de elevado interesse: ácido oxálico, málico, shiquímico, cítrico e fumárico (**Tabela 4**). O ácido oxálico foi o composto mais

abundante ( $0,99 \pm 0,03$  g/100 g *ms*), seguido do ácido cítrico ( $0,457 \pm 0,003$  g/100 g *ms*), ácido málico ( $0,33 \pm 0,01$  g/100 g *ms*), shiquímico ( $0,03 \pm 0,001$  g/100 g *ms*) e, por último, o ácido fumárico ( $0,0078 \pm 0,0003$  g/100 g *ms*), que apresentou uma concentração consideravelmente mais baixa. A concentração total de ácidos orgânicos foi de  $1,82 \pm 0,05$  g/100 g *ms*.

Os ácidos orgânicos mais abundantes na canela têm sido associados a diversas funções bioquímicas em alimentos. A nível industrial, o ácido oxálico tem demonstrado melhorias na qualidade e prolongamento da vida útil de frutas e vegetais, através do retardamento do amadurecimento durante o período de armazenamento, aumento da integridade da membrana e diminuição do aparecimento de danos ocasionados pelo armazenamento a frio. Para além disso, interfere no controlo de doenças pós-colheita (Huang et al., 2013; Li et al., 2016; Zheng et al., 2019), redução do escurecimento enzimático da superfície após o corte e menor contagem de mesófilos totais (Ali et al., 2020) e na melhoria da qualidade nutricional pós-colheita e do potencial antioxidante de frutas (Razavi & Hajilou, 2016).

Relativamente ao ácido cítrico, vários estudos recentes têm demonstrado o seu efeito antimicrobiano, quando utilizado de forma sinérgica ou separadamente, nomeadamente contra *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium), *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, em vários alimentos, tais como vegetais (Al-Rousan et al., 2018; Cho & Ha, 2021; Jeon & Ha, 2020), melão (Tantratian & Balmuang, 2021), raíz de lótus (Gouda et al., 2021), queijo (Seok & Ha, 2021) e salmão (Dogruyol, Mol, & Cosansu, 2020). Para além disso, o ácido cítrico também promoveu diminuição do crescimento de *L. monocytogenes* em ambientes de processamento de alimentos (Boucher et al., 2021); revelou um efeito bactericida sinérgico em biofilmes de *E. coli* O157:H7 (Kang, Lee, & Kang, 2021); e demonstrou ser efetivo na redução da contagem de coliformes totais durante a fermentação da silagem (Lv et al., 2020). Para além disso, o ácido cítrico apresenta propriedades medicinais, sendo uma boa alternativa para o tratamento de feridas na pele provocadas por várias bactérias, como *S. aureus*, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (Nagoba et al., 2012 e 2017).

O ácido málico é uma substância que tem sido aplicada na indústria alimentar de vários países, como agente aromatizante, conservante e como regulador de acidez. Para além disso, apresenta propriedades antibacteriana, antioxidante, texturizante e quelante

de ferro e cálcio, o qual evita a precipitação de sais de ferro/cálcio em bebidas enriquecidas (González-Fandos & Herrera, 2013; Marques et al., 2020).

Wariyapperuma et al. (2020) avaliaram a composição química de extratos de canela, obtida a partir de *C. zeylanicum*, produzida no modo convencional e disponível comercialmente no Sri Lanka. Neste estudo também foi identificado o ácido oxálico, num extrato obtido através de destilação a vapor, contudo numa concentração menor (0,21%) comparativamente com o presente estudo.

Relativamente à composição em ácidos gordos, os resultados foram apresentados na **Tabela 4**. A amostra de canela orgânica em pó revelou a presença de dez moléculas, destacando-se o ácido palmítico (C16:0) como o ácido gordo maioritário ( $53,4 \pm 0,1$  %). Outras moléculas que apresentaram concentrações significativas foram ácido oleico (C18:1n9;  $9,0 \pm 0,1$  %), esteárico (C18:0;  $8,0 \pm 0,2$  %), miristoléico (C14:1;  $5,0 \pm 0,1$  %), linoleico (C18:2n6;  $5,0 \pm 0,1$  %) e lignocérico (C24:0;  $6,5 \pm 0,1$  %). Os restantes ácidos gordos identificados apresentaram concentrações inferiores a 5%.

Abdeen et al. (2019) estudaram os compostos fitoquímicos do extrato metanólico da canela de *C. zeylanicum*, obtida no Egito, e identificaram e quantificaram sete compostos, entre eles o ácido palmitoleico (C16:1; 2,65%), o qual não foi identificado no presente estudo, e o ácido oleico numa concentração de 8%, valor menor do que o obtido na canela orgânica deste trabalho.

Na avaliação de extrato etanólico de canela comercial obtida a partir de *C. zeylanicum*, oriunda do Sri Lanka, Wariyapperuma et al. (2020) detetaram os ácidos linoleico (0,13%) e palmítico (0,28%) em concentrações muito inferiores, comparativamente ao extrato hidroetanólico da canela orgânica do presente estudo.

O ácido palmítico é o ácido gordo saturado mais comum encontrado em plantas, animais e microrganismos (Librán-Pérez et al., 2019). Está relacionado com várias funções biológicas e encontra-se presente no corpo humano de 20 a 30% do total de ácidos gordos, podendo ser obtido através da ingestão ou sintetizado endogenamente (Carta et al., 2017). Para além disso, estudos têm relacionado o seu consumo com propriedades terapêuticas, tais como antimicrobiana (Padmini et al., 2020), antiviral (Librán-Pérez et al., 2019) e anti-inflamatória (Prasath et al., 2021).

A elevada presença de ácido palmítico faz com que os ácidos gordos saturados (SFA;  $80,9 \pm 0,1$  %) sejam o principal grupo presente na amostra de canela, seguido dos ácidos gordos monoinsaturados (MUFA;  $14,04 \pm 0,02$  %) e dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA;  $5,0 \pm 0,1$  %).

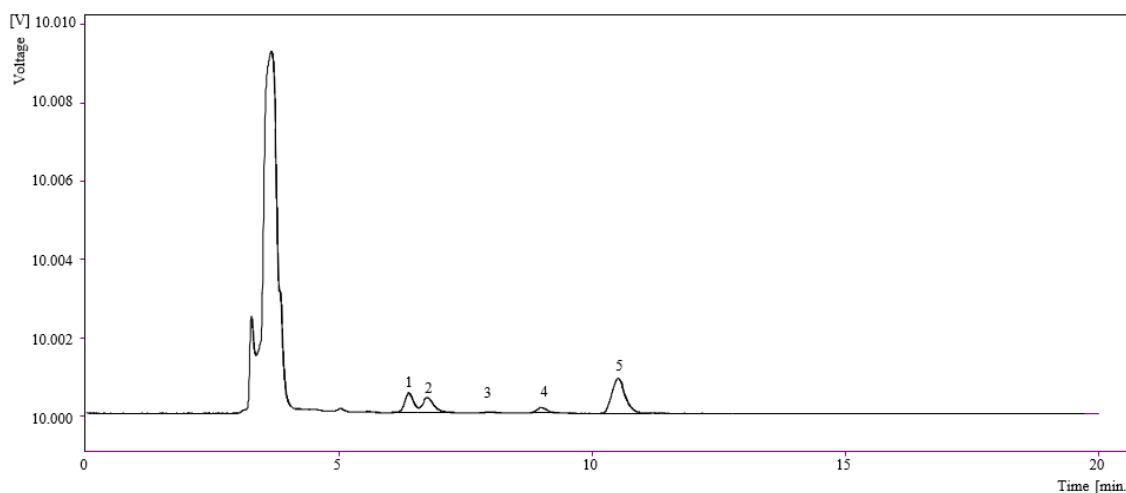
Na canela da espécie *C. cassia*, segundo a base de dados do USDA (2019), o grupo de ácidos gordos maioritário também é SFA (52,35%), seguido por MUFA (37,33%) e PUFA (10,32%), revelando concentrações diferentes das encontradas para a canela orgânica obtida de *C. verum* J. Presl.

Tal como descrito anteriormente, também a oscilação de concentrações que se verificou na composição química pode ser explicada devido ao método de cultivo utilizado, ao tipo de fertilização aplicada, ao estágio de maturação da planta, aos fatores ambientais, entre outros (Heimler et al., 2017; Ribeiro-Santos et al., 2017).

**Tabela 4:** Composição química da canela orgânica em pó (média±desvio padrão).

Teor em açúcares (g/100 g <i>ms</i> )		Ácidos gordos (%)	
Frutose	0,62 ± 0,02	C14:0	4,8 ± 0,1
Glucose	0,51 ± 0,01	C14:1	5,0 ± 0,1
Sacarose	0,040 ± 0,001	C15:0	2,8 ± 0,1
Trealose	0,19 ± 0,01	C16:0	53,4 ± 0,1
Total	1,35 ± 0,04	C18:0	8,0 ± 0,2
Teor em ácidos orgânicos (g/100 g <i>ms</i> )		C18:1n9	9,0 ± 0,1
Ácido oxálico	0,99 ± 0,03	C18:2n6	5,0 ± 0,1
Ácido málico	0,33 ± 0,01	C22:0	4,14 ± 0,03
Ácido shiquímico	0,03 ± 0,001	C23:0	1,26 ± 0,05
Ácido cítrico	0,457 ± 0,003	C24:0	6,5 ± 0,1
Ácido fumárico	0,0078 ± 0,0003	<b>SFA</b>	<b>80,9 ± 0,1</b>
Total	1,82 ± 0,05	<b>MUFA</b>	<b>14,04 ± 0,02</b>
		<b>PUFA</b>	<b>5,0 ± 0,1</b>

*ms* – massa seca; ácido mirístico (C14:0); Ácido miristoléico (C14:1); Ácido zóico (C15:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9); Ácido linoleico (C18:2n6c); Ácido beénico (C22:0); Ácido tricosanóico (C23:0); Ácido lignocérico (C24:0). SFA – Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA - Ácidos gordos polinsaturados.



**Figura 24:** Perfil em açúcares livres do extrato hidroetanólico da canela orgânica em pó, obtida a partir de *C. verum* J. Presl. 1- Frutose; 2- Glucose; 3- Sacarose; 4- Trealose; 5- Melezitose.

#### 4.2.2. Perfil em compostos fenólicos

Os tempos de retenção na zona do visível ( $\lambda_{\max}$ ), o íon molecular, nomeadamente fragmentos do íon molecular ( $MS^2$ ), a tentativa de identificação e quantificação, obtidos por análise em HPLC-DAD-MS no extrato hidroetanólico de canela orgânica, obtida a partir de *C. verum* J. Presl, são apresentados na **Tabela 5**. Todos os picos foram identificados como proantocianidinas (PAC), baseado na sua análise pseudomolecular e nos padrões de fragmentação  $MS^2$ . Três íões característicos foram observados:  $m/z$  451, 425 e 407, atribuídos às fissões do anel heterocíclico, retro-Diels-Alder, e a perda adicional de uma unidade de água da unidade (epi)catequina ( $m/z$  289 e 287, unidade de (epi)catequina inferior e superior, respetivamente). As análises realizadas nos fragmentos produzidos permitiram apenas inferir o tipo de unidades elementares e a posição relativa no oligomero de PAC. Entretanto, os dados cromatográficos obtidos no espectrometro de massa não permitiram estabelecer a posição entre as unidades de flavan-3-óis e diferenciar entre as catequinas isoméricas. Como tal, foi feita a tentativa de identificação dos picos de acordo com o número de unidades de (epi)catequina ligadas como dímeros (picos **1** e **2**,  $[M-H]^-$  a  $m/z$  577), trímeros (picos **3**, **4** e **5**,  $[M-H]^-$  a  $m/z$  863), tetrámeros (picos **6**, **7** e **8**,  $[M-H]^-$  a  $m/z$  1153) e pentámeros (picos **9** e **10**,  $[M-H]^-$  a  $m/z$  1441).

As PAC são compostos bioativos que têm sido amplamente relacionados com vários efeitos terapêuticos, tais como: anti-inflamatório, antidiabético, anticancerígeno, cardioprotetor, neuroprotetor e imunomodulador, assim como potencial vermífida (Rauf et al., 2019; Ribeiro-Santos et al., 2017; Tulini et al., 2017; Williams et al., 2015). Para além disso, essas moléculas apresentam potencial para serem incorporadas em alimentos funcionais devido às suas propriedades: antioxidante, antibacteriana e antifúngica (Ostroschi et al., 2018; Tulini et al., 2017).

A identificação realizada na amostra estudada está de acordo com o descrito previamente por Mateos-Martín et al. (2012) em extrato de canela, obtida a partir de *C. zeylanicum* L., extraído com uma solução de acetona/água/ácido acético na proporção de 7:2.5:0.5 (v/v/v).

Outros estudos foram, também, realizados a fim de avaliar o perfil individual de compostos fenólicos de espécies de canela, entre as quais a de *C. verum* J. Presl.

Gulcin et al. (2019) realizaram um estudo da composição fenólica dos extratos etanólico e aquoso da canela, obtida de *C. verum*, através de um sistema LC-MS/MS. Os resultados permitiram a deteção de 13 ácidos fenólicos, entre os quais ácido *p*-

hidroxibenzóico (0,321 mg/g), ácido *p*-cumárico (0,291 mg/g) e pirogalol (0,142 mg/g) como os compostos mais abundantes encontrados no extrato etanólico, e pirogalol (0,264 mg/g), ácido ferúlico (0,225 mg/g) e ácido *p*-cumárico (0,170 mg/g) os principais compostos encontrados no extrato aquoso.

No estudo do perfil de ácidos fenólicos dos extratos de duas espécies distintas de canela, *C. zeylanicum* e *C. cassia*, também utilizando um sistema LC-MS/MS, Klejduš & Kováčik (2016) constataram que no extrato da canela de *C. zeylanicum* houve uma maior abundância do ácido cinâmico (0,236 mg/g), seguido do ácido protocatecuico (0,083 mg/g). Os mesmos ácidos fenólicos também se apresentaram como os principais no extrato da canela de *C. cassia*, porém em concentrações mais elevadas (0,605 mg/g e 0,281 mg/g, respectivamente). Para além disso, os resultados demonstraram que a canela da espécie *C. cassia* apresentou um maior conteúdo de ácidos fenólicos totais (0,929 mg/g) do que a canela da espécie *C. zeylanicum* (0,356 mg/g).

Gunawardena et al. (2015) também realizou um estudo comparativo entre a composição fenólica das canelas obtidas de *C. zeylanicum* e de *C. cassia*, num sistema UPLC-PDA/MS, aplicando distintos solventes para extração. Os resultados demonstraram que o extrato metanólico e aquoso do extrato de *C. zeylanicum* apresentaram um conteúdo de ácido cinâmico de 0,14 e 0,48 mg/g, respectivamente, e no extrato de *C. cassia* concentrações de 0,68 e 0,43 mg/g, respectivamente. O mesmo ácido fenólico também foi detetado por Daemi et al. (2019), na concentração de 0,27 mg/g, durante a avaliação do extrato hidroetanólico da casca de *C. verum* J. Presl, obtida na Índia, através de HPLC-PAD.

Vallverdú-Queralt et al. (2014), durante a avaliação do perfil fenólico de ervas e especiarias amplamente utilizadas na culinária, identificaram e quantificaram 11 compostos fenólicos no extrato hidroetanólico da canela obtida de *C. zeylanicum*, com destaque para o flavonóide catequina, com 0,016 mg/g de peso seco, e o ácido fenólico protocatecuico, com 0,01 mg/g.

As diferenças do perfil fenólico identificado na canela orgânica em pó, em comparação com os estudos citados anteriormente por outros autores, podem estar relacionadas com vários fatores, nomeadamente a diferença nas técnicas de cultivo, variedades utilizadas, composição nutricional do solo, fatores climáticos (tais como poluição, exposição à temperaturas extremas, períodos com pouca chuva, alta incidência solar), entre outros (Bartwal et al., 2012; Heimler et al., 2017; Ribeiro-Santos et al., 2017). Para além disso, os diferentes métodos e solventes utilizados no processo de extração dos

compostos também podem influenciar a extratabilidade dos mesmos (Ervina, Nawu, & Esar, 2016).

**Tabela 5:** Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região visível ( $\lambda_{\max}$ ), dados de massa espectral, tentativa de identificação e quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos encontrados no extrato hidroetanólico de canela orgânica em pó, obtida a partir de *C. verum* J. Presl (média  $\pm$  DP).

Pico	Tr (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g de extrato)
1	6,41	280	577	577(50),575(35),425(12),407(9),289(8),287(12)	Dímero de (epi)catequina tipo- $\beta$	4,18 $\pm$ 0,1
2	9,23	278	577	577(70),575(41),425(15),407(10),289(7),287(15)	Dímero de (epi)catequina tipo- $\beta$	2,7 $\pm$ 0,1
3	9,77	279	863	739(94),713(61),695(100),577(67),575(35),425(10),407(10),289(7),287(13)	Trímero de (epi)catequina tipo- $\beta$	4,0 $\pm$ 0,2
4	12,45	280	863	739(82),713(59),695(100),577(54),575(56),425(17),407(11),289(5),287(17)	Trímero de (epi)catequina tipo- $\beta$	3,49 $\pm$ 0,02
5	13,84	283	863	739(89),713(63),695(100),577(69),575(39),425(13),407(9),289(6),287(17)	Trímero de (epi)catequina tipo- $\beta$	3,4 $\pm$ 0,1
6	15,44	280	1153	865(78),713(22),695(5),577(23),575(44),425(5),407(6),289(7),287(12)	Tetrámero de (epi)catequina tipo- $\beta$	4,0 $\pm$ 0,1
7	21,59	280	1153	865(59),713(22),695(4),577(28),575(46),425(3),407(3),289(5),287(10)	Tetrámero de (epi)catequina tipo- $\beta$	3,97 $\pm$ 0,2
8	22,93	279	1153	865(71),713(18),695(2),577(23),575(43),425(5),407(5),289(7),287(13)	Tetrámero de (epi)catequina tipo- $\beta$	55,9 $\pm$ 0,5
9	24	280	1441	865(68),713(23),695(6),577(17),575(38),425(4),407(5),289(6),287(9)	Pentámero de (epi)catequina tipo- $\beta$	14,9 $\pm$ 0,2
10	25,9	277	1441	865(45),713(22),695(4),577(32),575(41),425(5),407(5),289(5),287(10)	Pentámero de (epi)catequina tipo- $\beta$	12,2 $\pm$ 0,5
<b>Compostos fenólicos totais</b>						<b>108,62<math>\pm</math>0,26</b>

Curva de calibração usada: catequina ( $y = 84,950x - 23,200$ ;  $R^2 = 0,999$ ; LOD = 0,17  $\mu\text{g/mL}$ ; LOQ = 0,68  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 4.3. Potencial bioativo da canela orgânica em pó: atividade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória

Para avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da canela orgânica em pó, obtida a partir de *C. verum* J. Presl, foram aplicados dois métodos colorimétricos *in vitro* (inibição da peroxidação lipídica – TBARS e inibição da hemólise oxidativa - OxHLIA). Os resultados obtidos estão presentes na **Tabela 6**.

Relativamente aos valores de EC<sub>50</sub> obtidos, o extrato revelou um potencial antioxidante promissor em todos os ensaios realizados, contudo os valores mais baixos de EC<sub>50</sub> (melhor atividade antioxidante) foram obtidos no ensaio de TBARS (42,6 ± 0,4 µg/mL).

A ação antioxidante da canela tem sido investigada pela comunidade científica através de vários ensaios *in vitro*, nomeadamente utilizando os métodos DPPH e ABTS, que avaliam a capacidade captadora de radicais DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina] 6-ácido sulfônico) gerados.

Num estudo realizado por Gulcin et al. (2019), foi avaliado a capacidade antioxidante do extrato etanólico evaporado (EEC) e do extrato aquoso liofilizado (WEC) de canela, obtida de *C. verum*. No ensaio DPPH, os valores de EC<sub>50</sub> obtidos foram de 21,25 µg/mL para EEC e 15,71 µg/mL para WEC, enquanto no ensaio ABTS os valores obtidos foram de 6,52 µg/mL e 5,79 µg/mL, respetivamente, o que demonstra que a canela evidencia, claramente, ação antioxidante, sendo as diferenças dos valores de EC<sub>50</sub> influenciadas pelo método de extração aplicado (Ervina et al., 2016).

Sudan et al. (2013), por exemplo, avaliaram extratos de canela de *C. verum*, extraídas com três diferentes solventes, quanto ao seu potencial antioxidante, usando também o ensaio DPPH. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato metanólico apresentou alta atividade de eliminação de radicais DPPH· (111,5 ± 0,62 µg/mL), seguido pelo extrato aquoso (122 ± 0,5 µg/mL) e pelo extrato clorofórmico (289,5 ± 0,4 µg/mL). Para além disso, foi demonstrada a existência de uma correlação significativa entre o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade captadora dos radicais.

Santiago-Adame et al. (2015), durante o estudo da microencapsulação de canela de *C. zeylanicum*, obtida no México, através de *spray-drying*, avaliaram a atividade captadora de radicais pelo método de DPPH da infusão da canela em pó, e obteram um valor de EC<sub>50</sub> de 290 µg/mL. Este valor foi próximo do encontrado por Saber (2019), na

avaliação da canela de *C. verum*, obtida num mercado local em Alexandria (DPPH, EC<sub>50</sub> = 208 µg/mL).

Por fim, Im et al. (2014) estudaram o potencial antioxidante de extratos aquosos de canela obtida de árvores de *C. verum*, cultivadas naturalmente no Sri Lanka, sem o uso de pesticidas e produtos químicos. Os extratos continham teor em polifenóis de 15%, 45% e 75% equivalentes de ácido gálico (GAE), e os resultados demonstraram uma boa atividade antioxidante do extrato com a menor concentração de polifenóis, com um valor de EC<sub>50</sub> de 42 ± 4,4 µg/mL, através do ensaio DPPH, e 20 ± 2,2 µg/mL no ensaio ABTS, porém ainda significativamente menores do que os valores obtidos para os extratos ricos em compostos fenólicos. Dessa forma, os autores concluíram que, quanto maior o conteúdo de compostos fenólicos, maior é a atividade antioxidante demonstrada.

**Tabela 6:** Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da canela orgânica em pó, obtida a partir de *C. verum* J. Presl (média±desvio padrão).

Atividade antioxidante	Concentração (µg/mL)
TBARS (valores EC <sub>50</sub> , µg/mL)	42,6 ± 0,4
OxHLIA (Δt = 60 min) (valores EC <sub>50</sub> , µg/mL)	88 ± 2

Valores de EC<sub>50</sub> values: concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante. Trolox (controlo positivo) EC<sub>50</sub> = 23 µg/mL (inibição de TBARS) e 19,7 µg/mL (OxHLIA).

Na **Tabela 7**, estão apresentados os resultados obtidos da atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico da canela orgânica, obtida de *C. verum* J. Presl, testado contra um painel de bactérias patogénicas (Gram-positivas e negativas) e fungos patogénicos e deteriorantes de alimentos. Os resultados demonstraram capacidade antimicrobiana frente às culturas bacterianas estudadas, destacando-se as menores concentrações para a espécie *B. cereus*, com valores de CMI de 1,0 mg/mL e de CMB de 2 mg/mL, os quais evidenciam o potencial bacteriostático e bactericida do extrato frente a esta espécie.

Na avaliação da atividade antifúngica, o extrato hidroetanólico revelou resultados ainda melhores frente aos fungos testados, com efeito fungicida em todos os casos. *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma viride* foram as espécies mais suscetíveis ao extrato, com valores de CMI e CMF de 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL, respetivamente.

Segundo Raimundo et al. (2018), os fungos do gênero *Trichoderma* spp. são responsáveis pela contaminação e perdas na produção de cogumelos; e os fungos do gênero *Penicillium* spp. são responsáveis por intoxicações e infecções alimentares e pela deterioração de alimentos, tal como podridão na polpa de abacaxi (Fournier et al., 2015).

Comparando os resultados obtidos pelo extrato hidroetanólico da canela orgânica com os resultados dos controles positivos, na maioria das bactérias testadas, os valores de CMI e CMB foram maiores, representando uma menor atividade antibacteriana do extrato em comparação com os aditivos E221 e E224 amplamente utilizados em vários produtos alimentares. Relativamente à atividade antifúngica, o extrato revelou resultados menores ou iguais aos resultados do controle positivo E221, o que demonstra a sua atividade antifúngica igual ou melhor que este aditivo alimentar. Apesar dos controles positivos evidenciarem melhor atividade, a amostra estudada neste trabalho também apresentou valores que podem ser considerados bastante promissores.

Saber (2019) estudou os efeitos do extrato etanólico de canela de *C. verum*, obtida num mercado local em Alexandria, frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e aos fungos *Rhizopus* spp. e *Aspergillus niger*, através do método de difusão em ágar, utilizando cavidades adicionadas de extrato (500 µg/mL). Os resultados revelaram formação de halo de inibição para todas as estirpes testadas, sendo evidente o seu potencial antimicrobiano. Também neste estudo, *A. niger* foi a espécie mais sensível ao extrato. Para além disso, também foi avaliado o potencial conservante do extrato, quando aplicado em várias concentrações em produtos de pastelaria, tais como bolo, pão e biscoitos, durante períodos de armazenamento definidos. A avaliação demonstrou que a multiplicação microbiana permaneceu inibida durante 7 dias de armazenamento do bolo e do pão, e 30 dias de armazenamento dos biscoitos, quando aditivados com 2% de extrato.

Tayel et al. (2012) avaliaram a atividade antibacteriana de nove extratos vegetais contra duas bactérias patogénicas resistentes à antibióticos, através do método de microdiluição. O extrato etanólico da canela de *C. verum* revelou ser um efetivo agente antibactericida quando comparado aos outros extratos, com valores de CMI de 0,35 mg/mL e 0,325 mg/mL, frente às estirpes *Salmonella* Typhimurium e *S. aureus*, respetivamente. De seguida, foi avaliado a capacidade dos extratos em descontaminar a superfície de bifes de carne inoculadas propositalmente. Novamente, o extrato etanólico da canela apresentou ótimo potencial antibacteriano, com inibição completa da multiplicação bacteriana após um dia da inoculação, e redução das contagens durante os

7 dias de armazenamento a 4 °C, sendo que a bactéria mais sensível ao extrato foi *Salmonella* Typhimurium.

No estudo do potencial antibacteriano do extrato etanólico da canela de *C. zeylanicum*, obtida na Índia, pelo método de difusão em ágar, Usha, Ragini & S.M.A (2012) observaram que o extrato apresentou uma alta atividade contra bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos, com CMI de 0,064 mg/mL contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus* e *E. coli*, e 0,032 mg/mL contra *Pseudomonas* sp., valores estes que sugerem que o extrato pode ser aplicado na conservação de alimentos cozidos.

Kim & Park (2017) avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato etanólico da canela, obtida de *C. zeylanicum*, frente às bactérias patogênicas Gram-positivas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*, causadoras de cáries, através do ensaio de microdiluição. Os resultados demonstraram que o extrato obteve uma CMI de 4 mg/mL contra as culturas testadas, o que indica o seu potencial de ser aplicado como agente antibacteriano natural contra patógenos orais.

Por fim, na avaliação da eficácia antifúngica do extrato metanólico de *C. verum* J. Presl contra *Malassezia* spp., levedura que causa infecção de pele, tais como caspa, dermatite seborreica e micose, Mariappan et al. (2013) obteram uma CMI do extrato entre 0,5 e 2,0 mg/mL.

**Tabela 7:** Atividade antibacteriana (CMI e CMB, mg/mL) e antifúngica (CMI e CMF, mg/mL) do extrato hidroetanólico da canela orgânica em pó, obtida a partir de *C. verum* J. Presl.

		Atividade antibacteriana					
		<i>B.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>L.m.</i>	<i>E.c.</i>	<i>En.cl.</i>	<i>S.T.</i>
Extrato hidroetanólico	<b>CMI</b>	1	2	4	2	2	4
	<b>CMB</b>	2	4	8	4	4	4
E221	<b>CMI</b>	0,5	4	1	1	2	1
	<b>CMB</b>	0,5	4	2	2	4	2
E224	<b>CMI</b>	2	1	0,50	0,5	0,5	1
	<b>CMB</b>	4	1	1	1	0,5	1
		Atividade antifúngica					
		<i>A.fum.</i>	<i>A.v.</i>	<i>A.n.</i>	<i>P.f.</i>	<i>P.a.</i>	<i>T.v.</i>
Extrato hidroetanólico	<b>CMI</b>	1	2	1	0,5	1	0,5
	<b>CMF</b>	2	4	2	1	2	1
E221	<b>CMI</b>	1	2	1	1	2	1
	<b>CMF</b>	2	2	2	2	4	2
E224	<b>CMI</b>	1	1	1	0,5	1	0,5
	<b>CMF</b>	1	1	1	0,5	1	0,5

*B.c.*: *Bacillus cereus*; *S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *L.m.*: *Listeria monocytogenes*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *En.cl.*: *Enterobacter cloacae*; *S.T.*: *Salmonella* Typhimurium; *A.fum.*: *Aspergillus fumigatus*; *A.v.*: *Aspergillus versicolor*; *A.n.*: *Aspergillus niger*; *P.f.*: *Penicillium funiculosum*; *P.a.*: *Penicillium aurantiogriseum*; *T.v.*: *Trichoderma viride*; E221: Sulfito de sódio; E224: Metabissulfito de potássio; CMI: Concentração mínima inibitória; CMB: Concentração mínima bactericida; CMF: Concentração mínima fungicida.

Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade em linhas celulares tumorais e não-tumorais e numa cultura de células primária (**Tabela 8**) evidenciaram que o extrato hidroetanólico da canela, obtido a partir de *C. verum* J. Presl, demonstraram atividade citotóxica para todas as linhas celulares tumorais utilizadas. No que concerne à atividade citotóxica em células não-tumorais, o extrato também revelou capacidade inibitória da proliferação das células; no entanto, as concentrações obtidas são mais elevadas, comparativamente com as linhas celulares tumorais e com o controlo positivo, o que afasta a possibilidade de este extrato ter toxicidade.

Wahab & Adzmi (2017) avaliaram o efeito citotóxico de extrato de *C. zeylanicum* extraído em Soxhlet, utilizando metanol, através do ensaio colorimétrico com o corante MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio). Para tal, utilizaram a linha celular de cancro de mama (MCF-7), e o resultado demonstrou o potencial citotóxico com valor GI<sub>50</sub> de 140 µg/mL.

No estudo realizado por Husain et al. (2018), foi avaliada a citotoxicidade do extrato etanólico de *C. zeylanicum* também em células de cancro de mama (MDA) e as células epiteliais de rim de macaco verde africano (Vero), pelo método com MTT. Considerando os resultados obtidos, observou-se que o extrato apresentou um potente efeito citotóxico sobre as células MDA, com um valor de GI<sub>50</sub> de 25 µg/mL, e nenhum efeito significativo sobre as células não-tumorais Vero, apresentando uma concentração de 100 µg/mL.

Relativamente às restantes linhas celulares usadas no presente estudo, não foram encontrados na literatura estudos relativos ao potencial citotóxico em células tumorais e não-tumorais da canela obtida de *C. verum*. No entanto, Sudan et al. (2013) avaliaram a atividade anti-proliferativa de extrato metanólico de *C. verum* em linhas celulares de cancro de próstata e de glioblastoma, através do método da SRB, e obtiveram, respetivamente, 90% e 78% de inibição do crescimento celular, na concentração de 100 µg/mL.

Relativamente ao potencial anti-inflamatório (**Tabela 8**), o extrato revelou uma capacidade de inibir a produção de NO numa linha celular de macrófagos de rato (RAW 264.7) num valor GI<sub>50</sub> de  $76 \pm 1$  µg/mL.

Gunawardena et al. (2015) estudaram a atividade anti-inflamatória de extratos de várias canelas produzidas de modo convencional, obtidas de *C. zeylanicum* e *C. cassia*, utilizando células macrófagas RAW 264.7, e obtiveram resultados semelhantes para as duas espécies. Para a canela obtida de *C. zeylanicum*, os valores GI<sub>50</sub> obtidos para o

extrato etanólico e para o extrato aquoso foram de  $122 \pm 21 \mu\text{g/mL}$  e de  $245 \pm 12 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, e para a canela da espécie *C. cassia* de  $157 \pm 39 \mu\text{g/mL}$  e  $180 \pm 56 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Perante esses resultados, os autores concluíram que a canela pode ser promissora em tratamentos que tenham como finalidade melhorar as condições inflamatórias relacionadas com a idade.

**Tabela 8:** Atividade citotóxica (em linhas celulares tumorais e não-tumorais e numa cultura de células primária) e anti-inflamatória do extrato hidroetanólico da canela orgânica em pó, obtida a partir de *C. verum* J. Presl (média±desvio padrão).

<b>Atividade citotóxica</b>	<b>GI<sub>50</sub> (μg/mL)</b>
MCF-7 (adenocarcinoma mamário)	209 ± 18
NCI-H460 (carcinoma pulmonar)	318 ± 31
AGS (adenocarcinoma gástrico)	183 ± 4
CaCo-2 (adenocarcinoma intestinal)	226 ± 1
PLP2 (cultura primária de células de fígado de porco)	375 ± 23
VERO-B4 (cultura celular não-tumoral de rim de macaco)	392 ± 3
<b>Atividade anti-inflamatória</b>	
RAW 264.7	76 ± 1

GI<sub>50</sub> – concentração que inibiu 50% do crescimento celular. Valores GI<sub>50</sub> de Elipticina (controle positivo): 1,02 μg/mL (MCF-7), 1,01 μg/mL (NCI-H460), 1,23 μg/mL (AGS), 1,21 μg/mL (CaCo-2), 1,4 μg/mL (PLP2) e 1,4 μg/mL (VERO-B4). Valor GI<sub>50</sub> de Dexametasona (controle positivo): 6,3 μg/mL (RAW 264.7).

## **5. Considerações Finais**

## 5.1. Considerações finais e perspectivas futuras

O presente estudo levou a cabo a caracterização da canela orgânica em pó obtida de *C. verum* J. Presl, avaliando os parâmetros nutricionais, químicos e bioativos através dos ensaios *in vitro* de atividade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória.

Na avaliação da composição nutricional, a canela orgânica apresentou um maior teor em proteínas e hidratos de carbono, e menor conteúdo de lípidos quando comparado à maioria dos dados disponíveis na literatura. Relativamente à composição química, avaliada através do estudo do perfil de açúcares livres, ácidos orgânicos e ácidos gordos, foi possível detetar quatro moléculas de açúcar, destacando-se a frutose e a glucose como as maioritárias; enquanto que, os ácidos orgânicos revelaram a presença de cinco moléculas, estando o ácido oxálico presente em maior concentração. Para além disso, foram detetadas dez moléculas de ácidos gordos, nomeadamente o ácido palmítico e, consequentemente, os ácidos gordos saturados foram o principal grupo presente. A canela orgânica revelou maior quantidade de compostos de interesse, comparativamente com a canela cultivada pelo modo convencional, como maior conteúdo do ácido orgânico oxálico e dos ácidos gordos palmítico, oleico e linoleico.

A composição em compostos fenólicos do extrato hidroetanólico indicou a presença de dez moléculas, sendo todos identificados como proantocianidinas, com destaque aos tetrámeros de (epi)catequina do tipo- $\beta$  como os mais abundantes.

Quanto a avaliação das bioatividades, o extrato hidroetanólico revelou valores promissores que comprovam o potencial antioxidante e anti-inflamatório. Os ensaios antimicrobianos constataram a capacidade antimicrobiana frente às espécies estudadas, nomeadamente aos fungos *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma viride*. A avaliação citotóxica evidenciou potencial inibitório em todas as linhas celulares tumorais testadas e ausência de toxicidade nas linhas não-tumorais utilizadas. Esta ação bioativa do extrato hidroetanólico da canela orgânica pode estar relacionada com a presença dos compostos fenólicos e ácidos orgânicos, previamente identificados.

Desta forma, este estudo permitiu constatar que a canela orgânica em pó, obtida a partir de *C. verum* J. Presl, apresentou uma excelente composição nutricional e química e propriedades bioativas promissoras que tornam esse alimento uma excelente opção para uma dieta mais saudável. Para além disso, os seus potenciais antioxidante e

antimicrobiano tornam esta matriz promissora para aplicação como conservante na indústria alimentar e bioativa na indústria farmacêutica.

Relativamente às perspetivas futuras, pretende-se continuar o estudo com a avaliação do potencial conservante do extrato, através da aplicação direta e na forma de nanocápsulas em produtos de pastelaria. Para além disso, pretende-se, também, realizar estudos de estabilidade, através dos ensaios de composição nutricional e química ao longo do tempo de armazenamento. É esperado que os produtos de pastelaria revelem potencial conservante ao longo do tempo de armazenamento definido, nomeadamente os bolos adicionados de extrato nanoencapsulado. Não obstante, e porque a opinião do consumidor é crucial na aceitação de um produto alimentar, serão também realizadas análises sensoriais.

## **6. Referências bibliográficas**

- Abdeen, A., Abdelkader, A., Abdo, M., Wareth, G., Aboubakr, M., Aleya, L., & Abdel-Daim, M. (2019). Protective effect of cinnamon against acetaminophen-mediated cellular damage and apoptosis in renal tissue. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 240–249.
- Adeel, S., Habib, N., Arif, S., Rehman, F. ur, Azeem, M., Batool, F., & Amin, N. (2020). Microwave-assisted eco-dyeing of bio mordanted silk fabric using cinnamon bark (*Cinnamomum verum*) based yellow natural dye. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17, 100306.
- Akaichi, F., Glenk, K., & Revoredo-Giha, C. (2019). Could animal welfare claims and nutritional information boost the demand for organic meat? Evidence from non-hypothetical experimental auctions. *Journal of Cleaner Production*, 207, 961–970.
- Al-Khusaibi, M., Al-Habsi, N., & Rahman, M. S. (2019). *Traditional Foods: History, Preparation, Processing and Safety*. Cham, Suíça: Springer.
- Al-Rousan, W. M., Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Ajo, R. Y., & Holley, R. A. (2018). Use of acetic and citric acids to inhibit *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* in tabbouleh salad. *Food Microbiology*, 73, 61–66.
- Ali, S., Khan, A. S., Anjum, M. A., Nawaz, A., Naz, S., Ejaz, S., & Hussain, S. (2020). Effect of postharvest oxalic acid application on enzymatic browning and quality of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) root slices. *Food Chemistry*, 312, 126051.
- Alirezalu, K., Hesari, J., Yaghoubi, M., Khaneghah, A. M., Alirezalu, A., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M. (2021). Combined effects of  $\epsilon$ -polylysine and  $\epsilon$ -polylysine nanoparticles with plant extracts on the shelf life and quality characteristics of nitrite-free frankfurter-type sausages. *Meat Science*, 172, 108318.
- Alves-Santos, A. M., Sugizaki, C. S. A., Lima, G. C., & Naves, M. M. V. (2020). Prebiotic effect of dietary polyphenols: A systematic review. *Journal of Functional Foods*, 74, 104169.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). (2021). *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira* (2.<sup>a</sup> ed.). Brasília-DF.
- AOAC. (2016). Official Methods of Analysis, 20th. Em *AOAC International*. Rockville.
- Araújo, F. F. de, Farias, D. de P., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338, 127535.
- Assefa, A. D., Keum, Y. S., & Saini, R. K. (2018). A comprehensive study of polyphenols

- contents and antioxidant potential of 39 widely used spices and food condiments. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 1548–1555.
- Avula, B., Smillie, T. J., Wang, Y. H., Zweigenbaum, J., & Khan, I. A. (2015). Authentication of true cinnamon (*Cinnamon verum*) utilising direct analysis in real time (DART)-QToF-MS. *Food Additives and Contaminants - Part A*, 32(1), 1–8.
- Baptista, R. C., Horita, C. N., & Sant’Ana, A. S. (2020). Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: A review. *Food Research International*, 127, 108762.
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5, 1732–1740.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S. K., & Arora, S. (2012). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1), 216–232.
- Batiha, G. E.-S., Beshbishy, A. M., Guswanto, A., Nugraha, A., Munkhjargal, T., Abdel-Daim, M. M., ... Igarashi, I. (2020). Phytochemical characterization and chemotherapeutic potential of *Cinnamomum verum* extracts on the multiplication of protozoan parasites *in vitro* and *in vivo*. *Molecules*, 25, 996.
- BDA (Banca Dati di Composizione degli Alimenti per Studi Epidemiologici in Italia). (2015). Cinnamon *Cinnamomum verum* e *aromaticum*. Obtido 23 de Outubro de 2020, de BDA website: <https://url.gratis/uNivn>
- Bender, I., Edesi, L., Hiiesalu, I., Ingver, A., Kaart, T., Kaldmäe, H., ... Luik, A. (2020). Organic carrot (*Daucus carota* L.) production has an advantage over conventional in quantity as well as in quality. *Agronomy*, 10, 1420.
- Berg, H., Maneas, G., & Engström, A. S. (2018). A comparison between organic and conventional olive farming in Messenia, Greece. *Horticulturae*, 4, 15.
- Bernard, D., Kwabena, A., Osei, O., Daniel, G., Elom, S., & Sandra, A. (2014). The effect of different drying methods on the phytochemicals and radical scavenging activity of Ceylon cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) plant parts. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(11), 1324–1335.
- Borsato, E., Zucchinielli, M., D’Ammaro, D., Giubilato, E., Zabeo, A., Criscione, P., ... Marinello, F. (2020). Use of multiple indicators to compare sustainability performance of organic vs conventional vineyard management. *Science of the Total*

- Environment*, 711, 135081.
- Borzoei, A., Rafraf, M., Niromanesh, S., & Farzadi, L. (2018). Effects of cinnamon supplementation on antioxidant status and serum lipids in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 8, 128–133.
- Boucher, C., Waite-Cusic, J., Stone, D., & Kovacevic, J. (2021). Relative performance of commercial citric acid and quaternary ammonium sanitizers against *Listeria monocytogenes* under conditions relevant to food industry. *Food Microbiology*, 97, 103752.
- Carrillo, C., Wilches-Pérez, D., Hallmann, E., Kazimierczak, R., & Rembiałkowska, E. (2019). Organic versus conventional beetroot. Bioactive compounds and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 116, 108552.
- Carta, G., Murru, E., Banni, S., & Manca, C. (2017). Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. *Frontiers in Physiology*, 8, 1–14.
- Carvalho, J. T. G. de, Baldivia, D. da S., Castro, D. T. H. de, Santos, H. F. dos, Santos, C. M. dos, Oliveira, A. S., ... Santos, E. L. dos. (2020). The immunoregulatory function of polyphenols: implications in cancer immunity. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 85, 108428.
- Chiciudean, G. O., Harun, R., Ilea, M., Chiciudean, D. I., Arion, F. H., Ilies, G., & Muresan, I. C. (2019). Organic food consumers and purchase intention: A case study in Romania. *Agronomy*, 9(3), 145.
- Cho, G.-L., & Ha, J.-W. (2021). Synergistic effect of citric acid and xenon light for inactivating foodborne pathogens on spinach leaves. *Food Research International*, 142, 110210.
- Comissão Europeia. (2008). Regulamento (CE) n° 889/2008 de 5 de setembro de 2008. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Comissão Europeia. (2020). Pacto Ecológico Europeu: Comissão prepara novas iniciativas para impulsionar o setor da agricultura biológica. Obtido 10 de Outubro de 2020, de <https://url.gratis/2TQ3k>
- Cremonini, E., Iglesias, D. E., Kang, J., Lombardo, G. E., Mostofinejad, Z., Wang, Z., ... Oteiza, P. I. (2020). (–)-Epicatechin and the comorbidities of obesity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 690, 108505.
- Cullen, A. E., Centner, A. M., Deitado, R., Fernandez, J., & Salazar, G. (2020). The impact of dietary supplementation of whole foods and polyphenols on atherosclerosis. *Nutrients*, 12, 2069.

- Daemi, A., Lotfi, M., Farahpour, M. R., Oryan, A., Ghayour, J., & Sonboli, A. (2019). Topical application of *Cinnamomum* hydroethanolic extract improves wound healing by enhancing re-epithelialization and keratin biosynthesis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Pharmaceutical Biology*, *57*(1), 799–806.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2010). *Química de alimentos de Fennema* (4 ed.). Porto Alegre: Artmed.
- Dasgupta, A., & Klein, K. (2014). Methods for measuring oxidative stress in the laboratory. Em *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements* (pp. 19–40).
- Delbridge, T. A., & King, R. P. (2016). Transitioning to organic crop production: A dynamic programming approach. *Journal of Agricultural and Resource Economics*, *41*(3), 481–498.
- Dias, R., Pereira, C. B., Pérez-Gregorio, R., Mateus, N., & Freitas, V. (2021). Recent advances on dietary polyphenol's potential roles in Celiac Disease. *Trends in Food Science & Technology*, *107*, 213–225.
- Dogruiyol, H., Mol, S., & Cosansu, S. (2020). Increased thermal sensitivity of *Listeria monocytogenes* in sous-vide salmon by oregano essential oil and citric acid. *Food Microbiology*, *90*, 103496.
- DTU (Technical University of Denmark-Danish Food Composition). (2020). Cinnamon stick. Obtido 23 de Outubro de 2020, de DTU website: <https://frida.fooddata.dk/food/1096?lang=en>
- Ervina, M., Nawu, Y. E., & Esar, S. Y. (2016). Comparison of *in vitro* antioxidant activity of infusion, extract and fractions of Indonesian Cinnamon (*Cinnamomum burmannii*) bark. *International Food Research Journal*, *23*(3), 1346–1350.
- Faller, A. L. K., & Fialho, E. (2009). The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Research International*, *42*(1), 210–215.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2021). FAOSTAT. Obtido 25 de Janeiro de 2021, de FAO website: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
- Farha, A. K., Yang, Q. Q., Kim, G., Li, H. Bin, Zhu, F., Liu, H. Y., ... Corke, H. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, *38*, 100751.
- Fauvelle, C., Lambotin, M., Heydmann, L., Prakash, E., Bhaskaran, S., Vishwaraman, M., ... Moog, C. (2017). A cinnamon-derived procyanidin type A compound inhibits hepatitis C virus cell entry. *Hepatology International*, *11*, 440–445.

- Fernandes, F., Pereira, E., Prieto, M. A., Calhelha, R. C., Ćirić, A., Soković, M., ... Ferreira, I. C. F. R. (2019). Optimization of the extraction process to obtain a colorant ingredient from leaves of *Ocimum basilicum* var. *purpurascens*. *Molecules*, *24*, 686.
- Fournier, P., Benneveau, A., Hardy, C., Chillet, M., & Léchaudel, M. (2015). A predictive model based on a pluviothermic index for leathery pocket and fruitlet core rot of pineapple cv. 'Queen'. *European Journal of Plant Pathology*, *142*, 449–460.
- Ghani, M. A., Barril, C., Bedgood, D. R., & Prenzler, P. D. (2017). Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry*, *230*, 195–207.
- Gong, C., Lee, M. C., Godec, M., Zhang, Z., & Abbaspourrad, A. (2020). Ultrasonic encapsulation of cinnamon flavor to impart heat stability for baking applications. *Food Hydrocolloids*, *99*, 105316.
- González-Fandos, E., & Herrera, B. (2013). Efficacy of malic acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. *Poultry Science*, *92*, 1936–1941.
- Gouda, M. H. B., Zhang, C., Peng, S., Kong, X., Chen, Y., Li, H., ... Yu, L. (2021). Combination of sodium alginate-based coating with L-cysteine and citric acid extends the shelf-life of fresh-cut lotus root slices by inhibiting browning and microbial growth. *Postharvest Biology and Technology*, *175*, 111502.
- Gulcin, I., Kaya, R., Goren, A. C., Akincioglu, H., Topal, M., Bingol, Z., ... Alwasel, S. (2019). Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts: polyphenol contents analysis by LC-MS/MS. *International Journal of Food Properties*, *22*(1), 1511–1526.
- Gunawardena, D., Karunaweera, N., Lee, S., Van Der Kooy, F., Harman, D. G., Raju, R., ... Münch, G. (2015). Anti-inflammatory activity of cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts – identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds. *Food and Function*, *6*, 910–919.
- Hajimonfarednejad, M., Ostovar, M., Raei, M. J., Hashempur, M. H., Mayer, J. G., & Heydari, M. (2019). Cinnamon: A systematic review of adverse events. *Clinical Nutrition*, *38*(2), 594–602.
- Halagarda, M., Groth, S., Popek, S., Rohn, S., & Pedan, V. (2020). Antioxidant activity and phenolic profile of selected organic and conventional honeys from Poland.

- Antioxidants*, 9(1), 44.
- Hallmann, E., Rozpara, E., Słowianek, M., & Leszczyńska, J. (2019). The effect of organic and conventional farm management on the allergenic potency and bioactive compounds status of apricots (*Prunus armeniaca* L.). *Food Chemistry*, 279, 171–178.
- Hansmann, R., Baur, I., & Binder, C. R. (2020). Increasing organic food consumption: An integrating model of drivers and barriers. *Journal of Cleaner Production*, 275, 123058.
- Heimler, D., Romani, A., & Ieri, F. (2017). Plant polyphenol content, soil fertilization and agricultural management: a review. *European Food Research and Technology*, 243, 1107–1115.
- Helstad, S. (2019). Corn Sweeteners. Em *Corn: Chemistry and Technology* (3 ed., p. 575). Elsevier Inc.
- Holkem, A. T., & Favaro-Trindade, C. S. (2020). Potential of solid lipid microparticles covered by the protein-polysaccharide complex for protection of probiotics and proanthocyanidin-rich cinnamon extract. *Food Research International*, 136, 109520.
- Home, R., Indermuehle, A., Tschanz, A., Ries, E., & Stolze, M. (2018). Factors in the decision by Swiss farmers to convert to organic farming. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 1–11.
- Huang, H., Jing, G., Guo, L., Zhang, D., Yang, B., Duan, X., ... Jiang, Y. (2013). Effect of oxalic acid on ripening attributes of banana fruit during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 84, 22–27.
- Husain, I., Ahmad, R., Chandra, A., Raza, S. T., Shukla, Y., & Mahdi, F. (2018). Phytochemical characterization and biological activity evaluation of ethanolic extract of *Cinnamomum zeylanicum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 219, 110–116.
- Hussain, Z., Khan, J. A., Arshad, A., Asif, P., Rashid, H., & Arshad, M. I. (2019). Protective effects of *Cinnamomum zeylanicum* L. (Darchini) in acetaminophen-induced oxidative stress, hepatotoxicity and nephrotoxicity in mouse model. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109, 2285–2292.
- IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements). (2020). Principles of Organic Agriculture. Obtido 12 de Outubro de 2020, de IFOAM website: <https://www.ifoam.bio/principles-organic-agriculture-brochure>
- Im, K., Issac, A., Nm, J., Ninan, E., Maliakel, B., & Kuttan, R. (2014). Effects of the

- polyphenol content on the anti-diabetic activity of *Cinnamomum zeylanicum* extracts. *Food and Function*, 5(9), 2208.
- Isaac-Renton, M., Li, M. K., & Parsons, L. M. (2015). Cinnamon spice and everything not nice: many features of intraoral allergy to cinnamic aldehyde. *Dermatitis*, 26(3), 116–121.
- Jabeur, I., Tobaldini, F., Martins, N., Barros, L., Martins, I., Calhelha, R. C., ... Ferreira, I. C. F. R. (2016). Bioactive properties and functional constituents of *Hypericum androsaemum* L.: A focus on the phenolic profile. *Food Research International*, 89, 422–431.
- Jeon, M.-J., & Ha, J.-W. (2020). Synergistic bactericidal effect and mechanism of X-ray irradiation and citric acid combination against food-borne pathogens on spinach leaves. *Food Microbiology*, 91, 103543.
- Kang, J.-W., Lee, H.-Y., & Kang, D.-H. (2021). Synergistic bactericidal effect of hot water with citric acid against *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formed on stainless steel. *Food Microbiology*, 95, 103676.
- Kawatra, P., & Rajagopalan, R. (2015). Cinnamon: Mystic powers of a minute ingredient. *Pharmacognosy Research*, 7, S1–S6.
- Kim, H. Y., & Park, J. B. (2017). *In vitro* evaluation of anti-caries effect of cinnamon extracts on oral pathogens. *Biomedical Research*, 28(6), 2848–2853.
- Klejdus, B., & Kováčik, J. (2016). Quantification of phenols in cinnamon: A special focus on total phenols and phenolic acids including DESI-Orbitrap MS detection. *Industrial Crops and Products*, 83, 774–780.
- Kniss, A. R., Savage, S. D., & Jabbour, R. (2016). Commercial crop yields reveal strengths and weaknesses for organic agriculture in the United States. *PLoS ONE*, 11(8), e0161673.
- Kubatka, P., Kello, M., Kajo, K., Samec, M., Jasek, K., Vybohova, D., ... Mojzis, J. (2020). Chemopreventive and therapeutic efficacy of *Cinnamomum zeylanicum* L. bark in experimental breast carcinoma: mechanistic *in vivo* and *in vitro* analyses. *Molecules*, 25, 1399.
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370.
- Levy, E., Delvin, E., Marcil, V., & Spahis, S. (2020). Can phytotherapy with polyphenols serve as a powerful approach for the prevention and therapy tool of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19)? *American Journal of Physiology-*

- Endocrinology and Metabolism*, 319, E689–E708.
- Li, P., Yin, F., Song, L., & Zheng, X. (2016). Alleviation of chilling injury in tomato fruit by exogenous application of oxalic acid. *Food Chemistry*, 202, 125–132.
- Librán-Pérez, M., Pereiro, P., Figueras, A., & Novoa, B. (2019). Antiviral activity of palmitic acid via autophagic flux inhibition in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 95, 595–605.
- Lv, H., Pian, R., Xing, Y., Zhou, W., Yang, F., Chen, X., & Zhang, Q. (2020). Effects of citric acid on fermentation characteristics and bacterial diversity of *Amomum villosum* silage. *Bioresource Technology*, 307, 123290.
- Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 299, 125124.
- Marchante, L., Loarce, L., Izquierdo-Cañas, P. M., Alañón, M. E., García-Romero, E., Pérez-Coello, M. S., & Díaz-Maroto, M. C. (2019). Natural extracts from grape seed and stem by-products in combination with colloidal silver as alternative preservatives to SO<sub>2</sub> for white wines: Effects on chemical composition and sensorial properties. *Food Research International*, 125, 108594.
- Marchiosi, R., Santos, W. D. dos, Constantin, R. P., Lima, R. B. de, Soares, A. R., Finger-Teixeira, A., ... Ferrarese-Filho. (2020). Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochemistry Reviews*, 19, 865–906.
- Margină, D., Ungurianu, A., Purdel, C., Nițulescu, G. M., Tsoukalas, D., Sarandi, E., ... Tsatsakis, A. M. (2020). Analysis of the intricate effects of polyunsaturated fatty acids and polyphenols on inflammatory pathways in health and disease. *Food and Chemical Toxicology*, 143, 111558.
- Mariappan, P. M., Sabesan, G., Koilpillai, B., Janakiraman, S., & Sharma, N. K. (2013). Chemical characterisation and antifungal activity of methanolic extract of *Cinnamomum verum* J. Presl bark against *Malassezia* spp. *Pharmacognosy Journal*, 5, 197–204.
- Marques, C., Sotiles, A. R., Farias, F. O., Oliveira, G., Mitterer-Daltoé, M. L., & Masson, M. L. (2020). Full physicochemical characterization of malic acid: Emphasis in the potential as food ingredient and application in pectin gels. *Arabian Journal of Chemistry*, 13, 9118–9129.
- Mateos-Martín, M. L., Fuguet, E., Quero, C., Pérez-Jiménez, J., & Torres, J. L. (2012). New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical*

- Chemistry*, 402, 1327–1336.
- Melovic, B., Cirovic, D., Dudic, B., Vulic, T. B., & Gregus, M. (2020). The analysis of marketing factors influencing consumers' preferences and acceptance of organic food products—recommendations for the optimization of the offer in a developing market. *Foods*, 9, 259.
- MEXT (Ministry of Education; Culture; Sports; Science and Technology). (2015). Standards tables of food composition in Japan. Obtido 23 de Outubro de 2020, de MEXT website: <https://url.gratis/cvUqK>
- Mie, A., Kesse-Guyot, E., Kahl, J., Rembiałkowska, E., Andersen, H. R., Grandjean, P., & Gunnarsson, S. (2016). Human health implications of organic food and organic agriculture. Obtido 11 de Outubro de 2020, de European Parliamentary Research Services website: <https://url.gratis/NbWug>
- Muhammad, D. R. A., & Dewettinck, K. (2017). Cinnamon and its derivatives as potential ingredient in functional food—A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup2), 2237–2263.
- Munekata, P. E. S., Rocchetti, G., Pateiro, M., Lucini, L., Domínguez, R., & Lorenzo, J. M. (2020). Addition of plant extracts to meat and meat products to extend shelf-life and health-promoting attributes: an overview. *Current Opinion in Food Science*, 31, 81–87.
- Nagoba, B., Davane, M., Gandhi, R., Wadher, B., Suryawanshi, N., & Selkar, S. (2017). Treatment of skin and soft tissue infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*—A review of our experiences with citric acid over the past 20 years. *Wound Medicine*, 19, 5–9.
- Nagoba, B. S., Wadher, B. J., Rao, A., Selkar, S. P., & Gandhi, R. C. (2012). Treatment of lepromatous ulcers using citric acid as a sole antimicrobial agent. *International Wound Journal*, 9(5), 553–556.
- Naturitas. (2020). Canela orgânica em pó 150 g. Obtido 30 de Dezembro de 2020, de <https://www.naturitas.pt/p/alimentacao/superalimentos/canela-organica-em-po-150-g-de-po-naturitas>
- Neri-Numa, I. A., Cazarin, C. B. B., Ruiz, A. L. T. G., Paulino, B. N., Molina, G., & Pastore, G. M. (2020). Targeting flavonoids on modulation of metabolic syndrome. *Journal of Functional Foods*, 73, 104132.
- Olszewska, M. A., Gędas, A., & Simões, M. (2020). Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. *Food Research*

- International*, 134, 109214.
- Ostroschi, L. C., Souza, V. B. de, Echalar-Barrientos, M. A., Tulini, F. L., Comunian, T. A., Thomazini, M., ... Favaro-Trindade, C. S. (2018). Production of spray-dried proanthocyanidin-rich cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract as a potential functional ingredient: Improvement of stability, sensory aspects and technological properties. *Food Hydrocolloids*, 79, 343–351.
- Padmini, N., Rashiya, N., Sivakumar, N., Kannan, N. D., Manjuladevi, R., Rajasekar, P., ... Selvakumar, G. (2020). *In vitro* and *in vivo* efficacy of methyl oleate and palmitic acid against ESBL producing MDR *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 148, 104446.
- Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. (2009). Regulamento (CE) n° 1107/2009 de 21 de outubro de 2009. *Jornal Oficial da União Europeia*, p. 309.
- Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. (2011). Regulamento (UE) n° 1169/2011 de 25 de outubro de 2011. *Jornal Oficial da União Europeia*, p. 60.
- Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. (2017). Regulamento (UE) n° 2017/625 de 15 de março de 2017. *Jornal Oficial da União Europeia*, p. 163.
- Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. (2018). Regulamento (UE) n° 2018/848 de 30 de maio de 2018. *Jornal Oficial da União Europeia*, p. 92.
- Pei, R., Liu, X., & Bolling, B. (2020). Flavonoids and gut health. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 153–159.
- Ponder, A., & Hallmann, E. (2019). The effects of organic and conventional farm management and harvest time on the polyphenol content in different raspberry cultivars. *Food Chemistry*, 301, 125295.
- Popa, M. E., Mitelut, A. C., Popa, E. E., Stan, A., & Popa, V. I. (2019). Organic foods contribution to nutritional quality and value. *Trends in Food Science and Technology*, 84, 15–18.
- Prasath, K. G., Alexpandi, R., Parasuraman, R., Pavithra, M., Ravi, A. V., & Pandian, S. K. (2021). Anti-inflammatory potential of myristic acid and palmitic acid synergism against systemic candidiasis in *Danio rerio* (Zebrafish). *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 133, 111043.
- Prieto, M. A., & Vázquez, J. A. (2014). A time-dose model to quantify the antioxidant responses of the oxidative hemolysis inhibition assay (OxHLIA) and its extension to evaluate other hemolytic effectors. *BioMed Research International*, 2014, 1–15.
- Promega. (2009). Griess Reagent System: Instructions for use of product G2930. Obtido

- 4 de Fevereiro de 2021, de Technical Bulletin Griess website: <https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/oxidative-stress-assays/griess-reagent-system/?catNum=G2930#protocols>
- Qaid, M. M., Al-Mufarrej, S. I., Azzam, M. M., & Al-Garadi, M. A. (2021). Anticoccidial effectivity of a traditional medicinal plant, *Cinnamomum verum*, in broiler chickens infected with *Eimeria tenella*. *Poultry Science*, *100*(3), 100902.
- Raimundo, K. F., Bortolucci, W. de C., Glamočlija, J., Soković, M., Gonçalves, J. E., Linde, G. A., ... Gazim, Z. C. (2018). Antifungal activity of *Gallesia integrifolia* fruit essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49S*, 229–235.
- Ramazani, E., Yazdfazeli, M., Ahmad, S., Leila, E., Behjat, M., & Javad, J. (2020). Protective effects of *Cinnamomum verum*, *Cinnamomum cassia* and cinnamaldehyde against 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells. *Molecular Biology Reports*, *47*, 2437–2445.
- Rauf, A., Imran, M., Abu-izneid, T., Iahtisham-Ul-Haq, Patel, S., Pan, X., ... Suleria, H. A. R. (2019). Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *116*, 108999.
- Razavi, F., & Hajilou, J. (2016). Enhancement of postharvest nutritional quality and antioxidant capacity of peach fruits by preharvest oxalic acid treatment. *Scientia Horticulturae*, *200*, 95–101.
- Reche, J., Hernández, F., Almansa, M. S., Carbonell-Barrachina, A., Legua, P., & Amorós, A. (2019). Effects of organic and conventional farming on the physicochemical and functional properties of jujube fruit. *LWT - Food Science and Technology*, *99*, 438–444.
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Madella, D., Martinazzo, A. P., Moura, L. de A. G., Melo, N. R. de, & Sanches-Silva, A. (2017). Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon. *Trends in Food Science and Technology*, *62*, 154–169.
- Rodríguez-Pérez, C., Segura-Carretero, A., & Contreras, M. del M. (2019). Phenolic compounds as natural and multifunctional anti-obesity agents: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *59*(8), 1212–1229.
- Saber, J. I. (2019). Utilization of cinnamon in preparation and preservation of food products from microbial contamination. *Alexandria Science Exchange Journal*, *40*, 82–89.
- Sadiq, M., Paul, J., & Bharti, K. (2020). Dispositional traits and organic food

- consumption. *Journal of Cleaner Production*, 266, 121961.
- Santiago-Adame, R., Medina-Torres, L., Gallegos-Infante, J. A., Calderas, F., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., ... Bernad-Bernad, M. J. (2015). Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 571–577.
- Schink, A., Naumoska, K., Kitanovski, Z., Kampf, C. J., Fröhlich-Nowoisky, J., Thines, E., ... Lucas, K. (2018). Anti-inflammatory effects of cinnamon extract and identification of active compounds influencing the TLR2 and TLR4 signaling pathways. *Food and Function*, 9, 5950–5964.
- Sedighi, M., Nazari, A., Faghihi, M., Rafieian-Kopaei, M., Karimi, A., Moghimian, M., ... Rasoulzadeh, B. (2018). Protective effects of cinnamon bark extract against ischemia–reperfusion injury and arrhythmias in rat. *Phytotherapy Research*, 1–9.
- Seok, J.-H., & Ha, J.-W. (2021). Synergistic mechanism and enhanced inactivation exhibited by UVA irradiation combined with citric acid against pathogenic bacteria on sliced cheese. *Food Control*, 124, 107861.
- Silva de Sá, I., Peron, A. P., Leimann, F. V., Bressan, G. N., Krum, B. N., Fachineto, R., ... Ineu, R. P. (2019). *In vitro* and *in vivo* evaluation of enzymatic and antioxidant activity, cytotoxicity and genotoxicity of curcumin-loaded solid dispersions. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 29–37.
- Silva, R. F. M., & Pogacnik, L. (2020). Polyphenols from food and natural products: Neuroprotection and safety. *Antioxidants*, 9(1), 61.
- Singh, N., Rao, A. S., Nandal, A., Kumar, S., Yadav, S. S., Ganaie, S. A., & Narasimhan, B. (2021). Phytochemical and pharmacological review of *Cinnamomum verum* J. Presl - a versatile spice used in food and nutrition. *Food Chemistry*, 338, 127773.
- Sivakami, M., Devi, K. R., Renuka, R., & Thilagavathi, T. (2020). Green synthesis of magnetic nanoparticles via *Cinnamomum verum* bark extract for biological application. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104420.
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & van Griensven, L. J. L. D. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, 15, 7532–7546.
- Soković, M., & van Griensven, L. J. L. D. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, 116, 211–224.
- Srednicka-Tober, D., Kazimierczak, R., Ponder, A., & Hallmann, E. (2020). Biologically

- active compounds in selected organic and conventionally produced dried fruits. *Foods*, *9*, 1005.
- Steels, E., Steels, E., Deshpande, P., Thakurdesai, P., Dighe, S., & Collet, T. (2019). A randomized, double-blind placebo-controlled study of intranasal standardized cinnamon bark extract for seasonal allergic rhinitis. *Complementary Therapies in Medicine*, *47*, 102198.
- Sudan, R., Bhagat, M., Gupta, S., Chittrarakha, & Devi, T. (2013). Comparative analysis of cytotoxic and antioxidant potential of edible *Cinnamomum verum* (bark) and *Cinnamomum tamala* (Indian bay leaf). *Free Radicals and Antioxidants*, 1–4.
- Tantratian, S., & Balmuang, N. (2021). Enriched makiang (*Cleistocalyx nervosum* var. paniala) seed extract and citric acid to control pathogenic bacteria and color of fresh cut cantaloupe. *LWT - Food Science and Technology*, *138*, 110626.
- Taofiq, O., Martins, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites. *Trends in Food Science & Technology*, *50*, 193–210.
- Tayel, A. A., El-tras, W. F., Moussa, S. H., & El-sabbagh, S. M. (2012). Surface decontamination and quality enhancement in meat steaks using plant extracts as natural biopreservatives. *Foodborne pathogens and disease*, *9*(8), 755–761.
- Teasdale, J. R., & Cavigelli, M. A. (2017). Meteorological fluctuations define long-term crop yield patterns in conventional and organic production systems. *Scientific Reports*, *7*(688), 1–10.
- Tepe, A. S., & Ozaslan, M. (2020). Anti-alzheimer, anti-diabetic, skin-whitening, and antioxidant activities of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum*. *Industrial Crops and Products*, *145*, 112069.
- Tuzcu, Z., Orhan, C., Sahin, N., Juturu, V., & Sahin, K. (2017). Cinnamon polyphenol extract inhibits hyperlipidemia and inflammation by modulation of transcription factors in high-fat diet-fed rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- USDA (United States Department of Agriculture). (2019). FoodData Central. Obtido 3 de Junho de 2021, de USDA website: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171320/nutrients>
- Usha, M., Ragini, S., & S.M.A, N. (2012). Antibacterial activity of acetone and ethanol extracts of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and ajowan (*Trachyspermum ammi*) on four food spoilage bacteria. *International Research Journal of Biological Sciences*, *1*(4), 7–11.

- Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Martínez-Huélamo, M., Alvarenga, J. F. R., Leal, L. N., & Lamuela-Raventos, R. M. (2014). A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry*, *154*, 299–307.
- Wahab, W. A., & Adzmi, A. N. (2017). The investigation of cytotoxic effect of *Cinnamomum zeylanicum* extracts on human breast cancer cell line (MCF-7). *Science Heritage Journal*, *1*(2), 23–28.
- Wang, J., Su, B., Jiang, H., Cui, N., Yu, Z., Yang, Y., & Sun, Y. (2020). Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Cinnamomum* (Lauraceae): A review. *Fitoterapia*, *146*, 104675.
- Wang, Y., Harrington, P. D. B., & Chen, P. (2020). Metabolomic profiling and comparison of major cinnamon species using UHPLC – HRMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *412*, 7669–7681.
- Wariyapperuma, W. A. N. M., Kannangara, S., Wijayasinghe, Y. S., Subramaniam, S., & Jayawardena, B. (2020). *In vitro* anti-diabetic effects and phytochemical profiling of novel varieties of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) extracts. *PeerJ*, *8*.
- Wen, W., Alseekh, S., & Fernie, A. R. (2020). Conservation and diversification of flavonoid metabolism in the plant kingdom. *Current Opinion in Plant Biology*, *55*, 100–108.
- Willer, H., Trávníček, J., Meier, C., & Schlatter, B. (2021). The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends 2021. Em *Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick and IFOAM – Organics International*. Bonn, Germany.
- Williams, A. R., Ramsay, A., Hansen, T. V. A., Ropiak, H. M., Mejer, H., Nejsum, P., ... Thamsborg, S. M. (2015). Anthelmintic activity of trans - cinnamaldehyde and A- and B-type proanthocyanidins derived from cinnamon (*Cinnamomum verum*). *Nature Publishing Group*, *5*, 14791.
- Yu, L., & Shi, H. (2021). Effect of two mulberry (*Morus alba* L.) leaf polyphenols on improving the quality of fresh-cut cantaloupe during storage. *Food Control*, *121*, 107624.
- Zabaleta, M. E., Forbes-Hernández, T. Y., Simal-Gandara, J., Quiles, J. L., Cianciosi, D., Bullon, B., ... Battino, M. (2020). Effect of polyphenols on HER2-positive breast cancer and related miRNAs: Epigenomic regulation. *Food Research International*, *137*, 109623.
- Zahedipour, P., Asghari, M., Abdollahi, B., Alizadeh, M., & Danesh, Y. R. (2019). A

- comparative study on quality attributes and physiological responses of organic and conventionally grown table grapes during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 247, 86–95.
- Zaki, S., Jahan, N., Kalim, M., & Islam, G. (2019). *In vitro* antilithiatic activity of the hydro-alcoholic extract of *Cinnamomum zeylanicum* Blume bark on calcium oxalate crystallization. *Journal of Integrative Medicine*, 17, 273–281.
- Zare, R., Nadjarzadeh, A., Zarshenas, M. M., Shams, M., & Heydari, M. (2019). Efficacy of cinnamon in patients with type II diabetes mellitus: A randomized controlled clinical trial. *Clinical Nutrition*, 38, 549–556.
- Zhang, L., Li, Y., Liang, Y., Liang, K., Zhang, F., Xu, T., ... Lu, B. (2019). Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. *Food Chemistry*, 276, 538–546.
- Zheng, J., Li, S., Xu, Y., & Zheng, X. (2019). Effect of oxalic acid on edible quality of bamboo shoots (*Phyllostachys prominens*) without sheaths during cold storage. *LWT - Food Science and Technology*, 109, 194–200.
- Zhu, C., Yan, H., Zheng, Y., Santos, H. O., Macit, M. S., & Zhao, K. (2020). Impact of cinnamon supplementation on cardiometabolic biomarkers of inflammation and oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complementary Therapies in Medicine*, 53, 102517.