

Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos totais e flavonoides a partir dos frutos de acerola (*Malpighia* sp.)

Optimization of ultrasound-assisted extraction of total phenolic compounds and flavonoids from acerola fruits (*Malpighia* sp.)

Blenda Saad Lima da Costa¹, Janne Lourrany Correia da Costa Vieira¹, Alessandra Marques Cardoso^{1,2}, Leonardo Luiz Borges^{1,3}

¹ Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás

² Faculdade da Polícia Militar – FPM

³ Universidade Estadual de Goiás – UEG

Resumo

A acerola (*Malpighia* sp.) é originária das Antilhas, pertence à família botânica Malpighiaceae, dentre aos seus constituintes pode-se citar a vitamina C, carotenoides, ácidos fenólicos, furanos, ácido clorogênico, galato de epigallocatequina, epicatequina, procianidina, carboidratos, proteínas, fósforo, cálcio, ferro, riboflavina, fibra, lipídios, tiamina, piridoxina, flavonoides (flavanonas, flavonóis, rutina e antocianinas) e compostos voláteis, os quais podem estar relacionados com suas atividades antifúngica, antibacteriana, antianêmica, adstringente e também nutricional. Dentre as técnicas de extração de compostos bioativos, destaca-se a extração assistida por ultrassom, por ser uma técnica rápida, de baixo custo e ambientalmente viável. Uma importante estratégia para obtenção de melhores condições de extração para extratos hidroalcoólicos é a otimização que utiliza a metodologia de superfície de resposta (MSR). Neste estudo, utilizou-se o planejamento fatorial Box-Benken para avaliar os possíveis efeitos de tempo, graduação alcoólica (etoh) e proporção sólido: líquido (PSL) sobre a concentração de fenóis totais (FT) e flavonoides (Fv) extraídos da espécie *Malpighia* sp. O extrato líquido de *Malpighia* sp otimizado foi utilizado em testes antimicrobianos pela técnica de difusão em disco adaptada, sendo testado contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Os resultados da otimização do extrato de acerola obtiveram-se um $r^2_{adj}=0,9908$ para doseamento de fenóis totais e $R^2_{adj}=0,6110$ para flavonoides. Em relação aos testes antibacterianos, o extrato líquido de acerola apresentou atividade frente as 3 cepas de bactérias testadas. Obteve-se o extrato de acerola otimizado, o qual apresentou ação antimicrobiana, com isso percebe-se a necessidade de futuros estudos para identificação de quais compostos são responsáveis por desenvolver tal resultado, podendo contribuir com o desenvolvimento farmacêutico.

Palavras-Chave: Box-Behnken, Extrato líquido padronizado, Frutos do cerrado, Atividade antimicrobiana.

Abstract

Acerola is originally from the Antilles, belonging to the Malpighiaceae botanical family. Vitamin C, carotenoids, phenolics, furans, chlorogenic acid, epigallocatechin gallate, epicatechin, procyanidins, carbohydrates, substances, phosphorus, alcohol, iron include its constituents, riboflavin, fiber, lipids, thiamine, pyridoxine, flavonoids (flavanones, flavonols, rutin, and anthocyanins) and volatile compounds, which may be related to their antifungal, antibacterial, anti-anemic, astringent and also nutritional activities. Among the bioactive compound extraction techniques, including ultrasound-assisted extraction, it is a fast, low cost and environmentally viable technique. An important strategy for the best extraction conditions is the optimization that uses the response surface methodology (RSM). In this

Contato para correspondência:

Leonardo Luiz Borges

E-mail:

leonardo.cbb@pucgoias.edu.br

Conflito de interesse: Não

Financiamento: Recursos próprios

Recebido: 21/03/2020

Aprovado: 13/04/2020



study, use or plan the Box-Benken factorial to evaluate the possible effects of time, alcohol content (etoh) and solid: liquid density (SLD) on the concentration of total phenols (TP) and flavonoids (Fv) extracted from area Malpighia sp. Malpighia sp optimized liquid extract was used in antimicrobial tests by the adapted disc diffusion technique and was tested against Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli strains. The results of the optimization of the acerola extractor obtain an $r_{2adj} = 0.9908$ for the complete phenol assay and $R2 adj = 0.6110$ for flavonoids. Concerning the antibiotics tested, the acerola liquid extract has activity front as 3 strains of bacteria tested. Therefore, using the optimized acerola extractor or exhibiting antimicrobial action, will realize the need for future studies to identify which are the main components responsible for developing the result, use the investment with pharmaceutical development.

Keywords: Box-Behnken, Standardized liquid extract, Cerrado fruits, Antimicrobial activity.

Introdução

A acerola (*Malpighia* sp.) pertence à família botânica Malpighiaceae, é originária das Antilhas, na América Central, e presente também na América do Sul. Devido a sua fácil adaptação em climas tropicais, o Brasil tornou-se um dos maiores exportadores de acerola do mundo¹, sendo encontrada principalmente na região nordeste, e em menor concentração nas outras regiões do país².

A acerola possui em sua composição substâncias como vitamina C, carotenoides, ácidos fenólicos, furanos, ácido clorogênico, galato de epigallocatequina, epicatequina, procianidina, carboidratos, proteínas, fósforo, cálcio, ferro, riboflavina, fibra, lipídios, tiamina, piridoxina, flavonoides (flavanonas, flavonóis, rutina e antocianinas) e compostos voláteis que fornecem o aroma natural do fruto. Possui importância econômica e pode ser empregado como matéria-prima para a produção de geleias, sucos, chás, gomas, polpas e nutracêuticos³⁻⁵.

Estudos relatam que o estágio de maturação do fruto e a composição do solo em que se encontra a *Malpighia* sp podem influenciar na constituição do fruto de acerola e consequentemente em suas diversas atividades biológicas como antifúngica, antibacteriana, antianêmica, adstringente e nutricional. Outros efeitos como a atividade quimioprotetora, ação contra arteriosclerose, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e também capacidade de retardar o envelhecimento podem ser influenciados com a alteração qualitativa e quantitativa dos metabólitos secundários presentes neste fruto⁵.

A extração de compostos bioativos de espécies vegetais depende de vários fatores, como a técnica empregada, as matérias-primas utilizadas e o tipo de solvente. Dentre as técnicas convencionais, que empregam solventes orgânicos, temperatura e agitação, podemos citar maceração, hidrodese-

tilação, infusão, percolação, decocção e extração contínua a quente. Já as técnicas não convencionais as quais demandam maior tecnologia encontra-se extração em contracorrente, extração assistida por microondas, ultrassom, fluido supercrítico e turbólise^{6,7}. A extração assistida por ultrassom (US) consiste no emprego de ondas mecânicas de alta frequência⁸. Esse método extrativo ocorre por meio de um fenômeno de cavitação, em que os efeitos causados pelas ondas ultrassônicas criam um ciclo de bolhas e cavidades no líquido solvente que são responsáveis pelo cisalhamento do material vegetal, propiciando a extração de compostos bioativos^{9,10}.

As técnicas de otimização de processos, como a metodologia de superfície de resposta (MSR) representam importante estratégia para a obtenção de melhores condições em diversos processos, como em métodos extrativos de metabólitos secundários a partir de espécies vegetais. Essas ferramentas podem ser aplicadas em diversas etapas de obtenção de produtos nas áreas farmacêutica e alimentícia¹¹.

Após obtenção de extratos ricos em compostos bioativos, experimentos biológicos podem permitir a investigação de propriedades que beneficiam os seres humanos e/ou animais, sendo a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato líquido um caminho a ser pesquisado¹².

A investigação de novos compostos com atividade antimicrobiana faz-se necessário devido ao aumento de microrganismos resistentes às substâncias convencionais utilizadas. Diversos ensaios são realizados em plantas medicinais para avaliarem seu potencial antimicrobiano, os quais podemos citar método de difusão em ágar por poço, disco-difusão e métodos de macrodiluição e microdiluição¹³. Tais técnicas auxiliam na descoberta de novas substâncias com propriedades antimicrobianas que podem ser usadas no desenvolvimento de novos produtos eficazes e mais seguras¹².

O presente estudo teve como objetivo obter o extrato

líquido padronizado em compostos fenólicos dos frutos de *Malpighia* sp. L e avaliar a atividade antimicrobiana do extrato otimizado.

Métodos

Coleta e processamento

Os frutos foram coletados no município de Goiânia - GO (16° 40' 13.1" S 49° 19' 22.7" W) e no povoado de Luiz Alves - GO (Latitude -13,2155; Longitude -50,5779). Após coleta dos frutos lavou-se os mesmos com água corrente e armazenou-se em temperatura - 18°C. Conforme o necessário retirou-se os frutos congelados para trituração e posterior liofilização.

O processo de liofilização foi realizado em liofilizador LS3000, no qual os frutos triturados de acerola congelados foram colocados em potes de vidros e levados para o liofilizador por sete dias. Após esse período, retirou-se os potes, os mesmos foram lacrados e armazenados em freezer.

Análises quantitativas

Os experimentos executados em cada etapa das análises foram realizados em duplicatas para confirmação dos resultados.

Doseamento de fenóis totais (FT)

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada de acordo com o método de Hagerman e Buttler adaptado¹⁴.

Para o processo extrativo de fenóis totais nas amostras, pesaram-se as massas de 0,375, 0,5 e 0,625 g do material vegetal pulverizado dos frutos liofilizados de acerola e transferiu-se para um balão de fundo chato de 50 mL e completou com solução hidroalcolica (60, 70 e 80%). A amostra foi obtida por extração assistida por ultrassom (25, 30 e 35 minutos). A solução foi filtrada em papel de filtro.

Adicionou-se em um tubo de ensaio, 2 mL de solução de Lauril Sulfato de Sódio/Trietanolamina (LSS), 1 mL de solução cromogênica de Cloreto férrico (FeCl₃) e 1 mL da amostra de extrato previamente filtrada. Após 15 min realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 510 nm. Preparou-se o branco com 2 mL de solução de Lauril Sulfato de Sódio/Trietanolamina, 1 mL de solução cromogênica de cloreto férrico e 1 mL de água destilada.

Para a construção da curva padrão pesou-se 100 mg de ácido tânico, transferindo-o para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com 40 mL de metanol 50% e o restante com água destilada. Pipetou-se alíquotas de 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 e 0,5 mL da solução padrão, transferiu-as para tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de LSS/Trietanolamina e 1 mL de solução cromogênica de FeCl₃.

Completou-se o volume para 4,0 mL com água destilada e os tubos foram deixados em repouso por 15 min antes de realizar a leitura em espectrofotômetro a 510 nm. Construiu-se a curva de calibração padrão (Absorbância x Concentração) de acordo com os dados obtidos.

Para calcular a porcentagem de fenóis totais presentes nas amostras analisadas utilizou-se as seguintes fórmulas:

$$C = \frac{\text{Absorbância} - A}{B}$$

$$\% \text{Fenóis totais} = c \times \frac{250}{m(g)} \times 10^{-3} \times 100$$

Em que:

C = concentração de ácido tânico em mg/mL

A = coeficiente linear da equação da reta

B = coeficiente angular da equação da reta

Doseamento de flavonoides

A determinação dos teores de flavonoides totais como equivalentes de rutina foi realizada segundo o método descrito modificado. Para extração dos flavonoides, pesou-se 0,375, 0,5 e 0,625 g da amostra, transferiu-se para um balão de fundo chato de 50 mL e completou com solução hidroalcolica (60, 70 e 80%). Colocou-se em ultrassom (25, 30 e 35 minutos) e posteriormente filtrou-se em papel filtro¹⁵.

Pipetou-se 3 mL do filtrado em um tubo de ensaio e realizou-se leitura direta em espectrofotômetro a 361 nm, utilizando-se como branco, solução hidroalcolica 70%. Essas leituras foram realizadas em triplicatas.

Para a construção da curva padrão, preparou-se uma solução de rutina a 100 µg/mL em metanol: ácido acético 0,02 M (99:1). Os pontos feitos foram de 10 a 30 µg/mL, de forma que pipetou-se alíquotas de 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 e 0,6 mL da solução padrão e completou-se com a mistura de metanol: ácido acético 0,02 M (99:1) para 2 mL num tubo de ensaio. Realizou-se a homogeneização, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 361 nm e construiu-se a curva de calibração padrão (Absorbância x Concentração).

Para calcular a porcentagem de flavonoides presentes nas amostras utilizou-se as seguintes fórmulas:

$$C = \frac{\text{Absorbância} - A}{B}$$

$$\% \text{Flavonoides} = C \times \frac{500}{m(g)} \times 10^{-3} \times 100$$

Em que:

C = concentração de rutina em mg/mL

A = coeficiente linear da equação da reta

B = coeficiente angular da equação da reta

Planejamento fatorial aplicado ao processo extrativo de fenóis totais e flavonoides a partir dos frutos de *Malpighia sp.*

O processo de otimização do método extrativo por ultrassom foi conduzido por meio de um planejamento experimental Box-Behnken com 3 fatores sendo três pontos centrais (15 experimentos). Foram avaliadas a influência do tempo de extração - X1 (min), proporção sólido/solvente - X2 (g/50 mL) e teor alcoólico - X3 (% v/v), na quantificação de fenóis totais e flavonoides.

Tabela 1. Fatores e respectivos níveis utilizados no processo de otimização da extração assistida por ultrassom do material liofilizado dos frutos de *Malpighia sp.*

Fator	Nível 1	
	-1	1
Tempo(min)	25	35
PSL (g/50 ml)	0,375	0,625
EtOH (%)	60	80

Legenda: PSL: proporção sólido líquido; EtOH: etanol.

Análise antibacteriana do extrato líquido obtido de *Malpighia sp*

Para a obtenção do extrato líquido concentrado empregado no ensaio de atividade antimicrobiana, a melhor condição do planejamento *Box-Behnken* foi reproduzida e o extrato concentrado em rotaevaporador a pressão reduzida e em banho de 40°C.

Preparo do inóculo

Cepas padrão das bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25923) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) foram reativadas em ágar *MacConkey*, e no ágar manitol sal o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), posteriormente foram incubadas por 24 horas, a 37± 1°C. Após crescimento, as colônias bacterianas foram transferidas para solução fisiológica a 0,85% (p.v) até obter turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de *McFarland*, que corresponde aproximadamente a 1,5 x 10⁸ UFC/mL. Posteriormente, semeou-se a suspensão bacteriana em placas de Petri em meio ágar *Mueller-Hinton*, com auxílio de *swab*.

Teste de Difusão

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato líquido acerola foi realizada pela técnica da difusão em ágar. Após semeadura da suspensão bacteriana, procedeu-se a abertura de sete orifícios no meio de cultura, com auxílio de um tubo de ensaio estéril 10 mL, formando poços, sendo estes preenchidos com 10, 25, 50, 100, 150, 200 e 300 µl do extrato com auxílio de pipetas semiautomáticas.

As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica a 37 ± 1°C. Transcorrido o tempo de incubação (48 horas), procedeu-se a leitura dos diâmetros dos halos de inibição.

Resultados e Discussão

A partir dos 15 experimentos executados conforme o planejamento fatorial *Box-Behnken*, obteve-se os resultados referentes as concentrações de fenóis totais e flavonoides, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Planejamento fatorial realizado em 15 experimentos desenvolvido pelo *Box-Behnken* para obtenção do extrato líquido dos frutos de acerola e suas respectivas absorvâncias de flavonoides e fenóis totais.

EtOH (%)	PSL (g)	Tempo (min)	FT	Fv
60	0,5	35	35	35
35	0,283	0,088	35	35
80	0,5	35	0,284	0,108
70	0,375	35	0,199	0,088
70	0,625	35	0,333	0,152
60	0,375	30	0,192	0,063
80	0,375	30	0,183	0,088
60	0,625	30	0,309	0,082
80	0,625	30	0,301	0,135
70	0,5	30	0,273	0,087
70	0,5	30	0,265	0,089
70	0,5	30	0,262	0,08
60	0,5	25	0,303	0,094
80	0,5	25	0,243	0,118
70	0,375	25	0,211	0,092
70	0,625	25	0,199	0,073

Legenda: FT: fenóis totais; FV: flavonoides; PSL:proporção sólido líquido; EtOH: etanol.

A partir da leitura das absorvâncias dos fenóis totais do extrato líquido, o mesmo deve-se ser analisado. Portanto utiliza-se um software que permite desenvolver um modelo quadrático da extração de fenóis, sendo este a análise de variância (ANOVA).

Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) referente ao modelo quadrático da extração de fenóis totais assistida por ultrassom a partir dos frutos liofilizados de acerola.

Fonte	Soma de quadrados	gl	F	Prob > F	p
Modelo	0,033	11	2,996E-003	137,40	0,0009
A-EtOH	8,619E-004	1	8,619E-004	39,52	0,0081
B-PSL	3,721E-003	1	3,721E-003	170,63	0,0010
C-Tempo	3,721E-003	1	3,721E-003	170,63	0,0010
AB	2,500E-007	1	2,500E-007	0,011	0,9215
AC	9,389E-004	1	9,389E-004	43,06	0,0072
BC	5,329E-003	1	5,329E-003	244,37	0,0006
A ²	4,632E-004	1	4,632E-004	21,24	0,0192
B ²	3,722E-003	1	3,722E-003	170,66	0,0010
A ² B	1,596E-003	1	1,596E-003	73,19	0,0034
A ² C	1,268E-003	1	1,268E-003	58,14	0,0047
AB ²	2,175E-004	1	2,175E-004	9,98	0,0509
Resíduo	6,542E-005	3	2,181E-005		
Falta de ajuste	7,549E-007	1	7,549E-007	0,023	0,8926
Erro puro	6,467E-005	2	3,233E-005		
Cor total	0,033	14			

Legenda: gl: grau de liberdade; FV: flavonoides; PSL: proporção sólido líquido; EtOH: etanol.

Pode-se observar a partir da Tabela 3, que o modelo obtido para FT foi significativo (p=0,009), apresentou falta de ajuste não significativo (p=0,8926). Além disso, o valor de R2adj=0,9908 revela que o modelo em questão consegue explicar 99,08% do comportamento extrativo dos dados de fenóis totais em função dos fatores Tempo, PSL e EtOH. Assim, a partir da análise de variância (ANOVA) deste modelo, é possível considerá-lo adequado para a predição das melhores condições de extração dentro dos níveis avaliados.

A ANOVA gera uma equação que possui todas as variáveis possíveis demonstrada pelo modelo quadrático, pois através

desta equação, pode-se calcular quando houver condições de extrações diferentes desse experimento. A seguir, tem-se a equação 1 para o modelo de análise de fenóis totais.

Equação 1:

$$FT = +0.27 - 0.015 \times A + 0.030 \times B + 0.031 \times C + 2.500E-004 \times A \times B + 0.015 \times A \times C + 0.036 \times B \times C + 0.011 \times A^2 - 0.032 \times B^2 + 0.028 \times A^2 \times B - 0.025 \times A^2 \times C + 0.010 \times A \times B^2$$

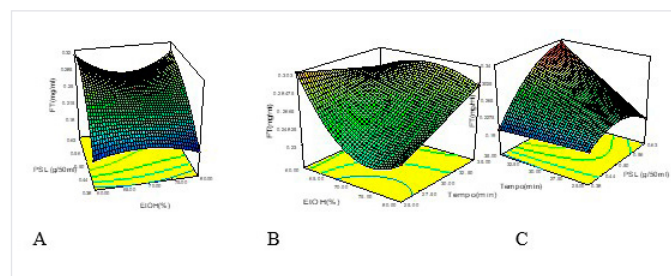


Figura 1. Gráficos de superfície de resposta representando a variação de FT em função de PSL e EtOH (A); EtOH e Tempo (B) e Tempo e PSL (C).

Legenda: FT: fenóis totais; PSL: proporção sólido líquido; EtOH: etanol.

A partir da Equação 1, obteve-se o gráficos de superfície de resposta, representados na Figura 1. A melhor condição extrativa de fenóis totais ocorreu nas condições que se teve proporção sólido líquido (PSL) aproximadamente de 0,63 g/50mL e EtOH 60% obtendo-se uma concentração de FT de aproximadamente 0,32 mg/mL (figura 1A). Na Figura 1B, pode-se observar que a graduação alécolica e tempo de extração responsáveis pelas maiores concentrações de FT (0,303 mg/ml), foram 60% e 25 min respectivamente. Já a figura 1C as variáveis consideradas foram tempo (min) e PSL (g/50mL), em que o tempo foi 35 min e PSL 0,63 g/50mL. Estas condições levaram a extrair 0,34 mg/mL de FT.

O método assistido por ultrassom para extrair compostos fenólicos de resíduos de alcachofra, no qual obtiveram maiores rendimentos dos compostos fenólicos, comprovando a eficácia da técnica de extração¹⁶.

O ultrassom para extrair polissacarídeos com atividade antioxidante das frutas de amoreira preta, de acordo esses estudos obtiveram rendimento máximo de 3,13%, mostrando que a técnica de ultrassom desempenhou uma extração eficaz¹⁷.

A extração assistida por ultrassom atualmente vem se destacando como uma excelente técnica para a obtenção de compostos bioativos, pois é possível adquirir elevada concentração dos compostos em estudos, devido método não

ser destrutível, e capaz de extrair os compostos da amostra, em menor tempo e temperatura, dependendo da análise em questão, além de reduzir o gasto de solventes que muitas técnicas convencionais ocasionam.

A análise de variância (ANOVA) abaixo, foi feita a partir das concentrações do extrato líquido dos frutos de acerola presentes na Tabela 2, semelhante a Tabela 3.

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) referente ao modelo quadrático da extração de flavonoides assistida por ultrassom a partir dos frutos liofilizados de acerola.

Fonte	Soma de quadrados	gl	F	Prob > F	p
Modelo	5,558E-003	4	1,390E-003	6,50	0,0076
A-EtOH	1,860E-003	1	1,860E-003	8,70	0,0145
B-PSL	1,540E-003	1	1,540E-003	7,20	0,0229
C-Tempo	4,351E-004	1	4,351E-004	2,03	0,1842
BC	1,722E-003	1	1,722E-003	8,05	0,0176
Resíduo	2,138E-003	10	2,138E-004		
Falta de ajuste	2,094E-003	8	2,617E-004	11,72	0,0810
Erro puro	4,467E-005	2	2,233E-005		
Cor total	7,696E-003	14			

Legenda: FT: fenóis totais; FV: flavonoides; PSL: proporção sólido líquido; EtOH: etanol.

Neste modelo apenas os fatores EtOH, PSL, Tempo e PSL x Tempo apresentaram efeito significativo sobre a extração de flavonoides, sendo os R² adj = 0,6110, comparando com o valor de extração de FT, podemos dizer que foi inferior, pois o esperado é próximo de 1. Porém o R² adj = 0,6110 revela que o modelo para flavonoides apresenta uma explicabilidade do sistema de 61,10 %.

Assim como a equação 1, o mesmo acontece com a equação 2, a qual também é gerada pela ANOVA, e está representada abaixo, com as condições de extração de flavonoides no extrato líquido dos frutos de acerola, as quais podem ser alteradas quando houver necessidade de mudança dos valores das variáveis em questão.

Equação 2:

$$Fv = +0.096 + 0.015 \times A + 0.014 \times B + 7.375E-003 \times C + 0.021 \times B \times C$$

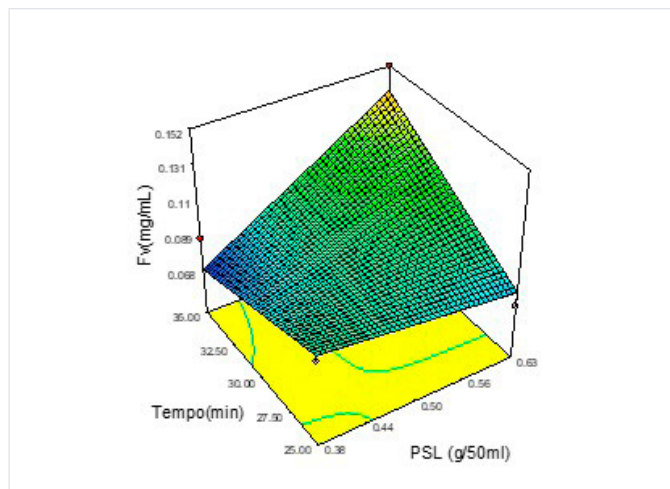


Figura 2: Gráficos de superfície de resposta representando a variação de Fv em função de PSL e Tempo.

Na Figura 2 pode-se observar as melhores condições de extração de FV, sendo o tempo de 35 min e 0,63 g/50 mL de PSL, obtendo aproximadamente 0,140 mg/mL de FV.

Segundo um estudo, o fruto analisado (ameixa) obteve melhores concentrações de flavonoides com extração a temperatura aproximadamente 60°C. Porém neste estudo o objetivo foi analisar condições intermediárias, que seriam capazes de extrair maiores concentrações de compostos fenolicos e flavonoides, diminuindo o gastos de solventes e otimizando o tempo¹⁸. Isso pode ser observado através da função de desejabilidade em que se encontrou valor de 1 (valor máximo que se pode obter nessa função), obtendo concentrações de FT (0,355826 mg/mL) e flavonoides (0,1520 mg/mL) em tempo de aproximadamente 35 minutos, PSL 0.62 g/50 mL e solução hidroalcolica de 80%.

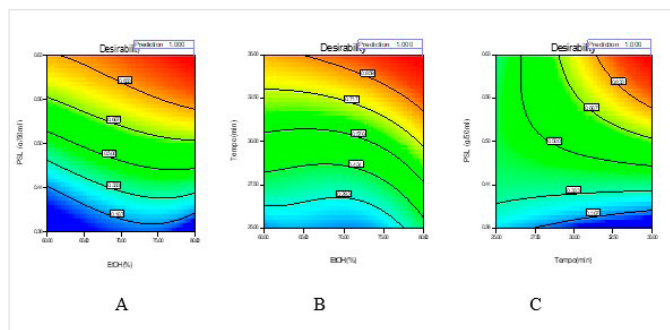


Figura 3: Gráficos obtidos com base na função de desejabilidade demonstrando as melhores condições de PSL, EtOH e tempo para extração de flavonoides e fenóis totais.

Legenda: FT: fenóis totais; FV: flavonoides; PSL: proporção sólido líquido; EtOH: etanol.

Os gráficos de contorno avaliam a variação da desejabilidade (referente a concentração de FT e Fv) em função dos fatores investigados (tempo, PSL e EtOH).

Em relação a avaliação de desejabilidade em que se tem extração de fenóis totais e flavonoides nas maiores concentrações, considerando as variáveis de tempo, EtOH e PSL obteve-se a função de desejabilidade mostrando o melhor de cada fator interferente e a concentração desejável de fenóis totais e flavonoides. Essa relação também pode ser visualizada na figura 3, no qual tem-se a figura 3A comparando a variável de PSL e EtOH, sendo que teve-se uma melhor extração com etanol 80 % e PSL de aproximadamente 0,63 g/50 mL. Já a figura 3B mostra a relação de tempo e etanol, no qual a melhor extração ocorreu com etanol 80% e tempo de 35 minutos. E na figura 3C tem-se a relação da melhor condição entre tempo (35 minutos) e PSL (0,63 g/50 mL).

No intuito de investigar o potencial antimicrobiano do extrato líquido dos frutos de acerola otimizado, realizou-se a avaliação de sua atividade frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), avaliando a formação de halos de inibição de crescimento bacteriana. A seguir, tem-se a Tabela 5 com as respectivas concentrações de inibidas e diâmetros dos halos de inibição.

Tabela 5: Medidas dos halos de inibição do crescimento bacteriano encontrados na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato dos frutos de acerola por meio do método de difusão em disco adaptado.

Bactérias	10 µl	25 µl	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	300 µl
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	18 mm	23 mm	20 mm	22 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	19 mm	17 mm	21 mm
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	18 mm	18 mm	20 mm

Conforme a Tabela 5 verifica-se que os maiores halos formados foram obtidos com os volumes de extrato de 150 µl, 200 µl e 300 µl. Contudo obteve-se inibição com volumes menores do extrato, tendo uma pequena formação de halo. Os testes foram repetidos após uma semana, sendo que o extrato em estudo ficou armazenado em geladeira durante tal período.

O extrato dos frutos de acerola otimizado mostrou-se eficaz ao inibir a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, que de acordo com estudos, a cepa possui uma resistência antimicrobiana vasta, de aproximadamente 95% dos antimicrobianos encontrados

no mercado farmacêutico, esta bactéria possui mecanismos próprios para inibir ação dos antimicrobianos produzindo a enzima beta-lactamases^{19,20}.

De acordo com um estudo, *E. coli* possui resistência aos antimicrobianos variável, em 17 cepas de *E. coli* testadas pelo autor somente dois antibióticos inibiram as 17 cepas, a Tobramicina (TO) e Gentamicina (GE). O extrato dos frutos de acerola otimizado foi capaz de inibir *E. coli* (ATCC 25923) em três volumes 150 µl, 200 µl e 300 µl, mostrando alto potencial antibacteriano frente a cepa em estudo²¹.

Por outro lado, um estudo realizado testando extratos brutos de cajueiro, barbatimão, aroeira, favela, fedegoso e quixaba não inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*²². E como observado na tabela 3, o extrato dos frutos de acerola foi capaz de desenvolver atividade frente a esses microrganismos. Com isso, percebe-se a necessidade de outros estudos para analisar os principais compostos do fruto da *Malpighia* sp que desenvolvem tal atividade, além de testar a otimização do mesmo em outras condições que poderão aumentar a ação antimicrobiana²².

Olaley testou o extrato alcoólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. como um agente antibacteriano frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marsecences*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescense*, tal extrato apresentou atividade antimicrobiana, sendo até mesmo comparado com a ação da estreptomomicina, só que o antibiótico não inibe a *E. coli* ao contrário do extrato de *Hibiscus sabdariffa* L²³.

Conclusão

Os resultados obtidos no processo otimização do extrato líquido da acerola demonstrou que os flavonoides e fenóis presentes no fruto podem ser extraídos em condições semelhantes, obtendo teores significantes. O extrato líquido da acerola otimizado apresentou atividade antibacteriana avaliada pelo método de difusão contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25923) em diferentes concentrações. Portanto estudos deverão ser desenvolvidos para identificar quais compostos ativos que oferecem ação antimicrobiana ao extrato líquido. Posteriormente estabelecer condições de controle de qualidade para o material vegetal, pois a partir da geração de informações deste extrato líquido, pode-se estabelecer quais aplicações possíveis de desenvolver com extrato líquido do fruto acerola.

Referências

1. Firmo WDCA, Menezes VAM, Passos CEDC, Dias CN, Alves LPL, Dias ICL, et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cad. Pesq.* 2011;18(n.º esp.): 90-95.
2. Malpighia in Flora do Brasil 2018 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro [acesso em 18 out 2018]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB596781>.
3. Freitas CAS, Maia GA, Costa JMC, Figueiredo RW, Sousa PHM. Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. *R. Bras. Agrociência.* 2006;12(4):395-400.
4. Castro ASB. Atividade farmacológica de extratos de abacate (*Persea americana miller*), acerola (*Malpighia emarginata d.c.*) e do flavonóide naringina no tratamento da dislipidemia. Minas Gerais. Dissertação [Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola] – Universidade Federal de Viçosa; 2012.
5. Reis IAO, Santos SB, Pereira FDS, Sobral CRS, Freire MG, Freitas LS, et al. Extraction and Recovery of Rutin from Acerola Waste using Alcohol-Salt-Based Aqueous Two-Phase Systems. *Sep Sci Technol.* 2014;49(5): 656–63.
6. Oliveira VB, Zuchetto M, Oliveira CF, Paula CS, Duarte AFS, Miguel MD, et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doses totais e no perfil por CLAE-DAD de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2016;18(1), Suppl. 1:230-239.
7. Soquetta MB, Terra L de M, Bastos CP. Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CYTA - J Food.* 2018;16(1):400–12.
8. Chemat, F, Khan, MK. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry.* 2011;18(4):813-835.
9. Vardanega R, Santos DT, Meireles MA. Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. *Pharmacognosy reviews.* 2014; 8(16):88-95.
10. Patist A, Bates D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2008; 9:147-154.
11. De Brito ES, Pinto GAS, Bruno LM, De Azeredo HMC. A metodologia de superfície de resposta (MSR) na otimização de processos biológicos: a determinação dos valores de pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática. VI Reunião Regional Da SBBQ Nordeste. 2002; 1-4.
12. Duarte MCT. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. *Revista Multiciência.* 2006; (7):1-13.
13. De Bona EAM, Silva Pinto FGS, Fruet TK, Jorge TCM, De Moura AC. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arq. Inst. Biol., São Paulo.* 2014; 81(3): 218-225.
14. Waterman PG, Mole AS. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I: techniques for chemically defining tannins. *Oecologia.* 1987;72:137-147.
15. Rolim A, Maciel COM, Kaneko TM, Consiglieri VO, Salgado-Santos IMN, Velasco MVR. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss. (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) Commercial Extract. *Journal of AOAC International.* 2005;88:1015-1019.
16. Rabelo RS, Machado MT, Martínez J, Hubinger MD. Ultrasound assisted extraction and nanofiltration of phenolic compounds from artichoke solid wastes. *Journal of Food Engineering.* 2016; 178:170–180.
17. Chen C, You LJ, Abbasi AM, Fu X, Liu RH. Optimization for ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry fruits with antioxidant and hyperglycemic activity in vitro. *Carbohydrate Polymers.* 2015;130:122–132.
18. Ghitescu RE, Volf, L, Carausu C, Bühlmann AM, Gilca IA, Popa VI. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrason Sonochem.* 2015; 22:535–541.
19. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Rev. Clin Microbiol.* 2001;14(4):933-951.
20. Spanu T, et al. Italian ESBL Study Group. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(1):196-202.
21. Franco RM, Mantilla SPSM, Gouvêa R, Oliveira LAT. Resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de carne e dejetos suínos. *Acta Veterinaria Brasilica.* 2010;4(1):31-36.
22. Eller SCWS, Feitosa VA, Arruda TA, Antunes RMP, Catão RMR. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica in vitro. *Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2015;36(1): 131-136.
23. Olaleye MT. Cytotoxicity and antibacterial activity of Methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *J. Med. Plant. Res.* 2007;1(1):9-13.