

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

NAIRA CARNIEL

**EXTRAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS DE PHYSALIS E APLICAÇÃO EM
NANOEMULSÕES PARA A SANITIZAÇÃO DE PEPINOS FRESCOS**

ERECHIM-RS

2018

NAIRA CARNIEL

**EXTRAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS DE PHYSALIS E APLICAÇÃO EM
NANOEMULSÕES PARA A SANITIZAÇÃO DE PEPINOS FRESCOS**

**Tese apresenta como quesito parcial à
obtenção do grau de Doutor, pelo curso de
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos
da Universidade Regional Integrada do Alto
Uruguai e das Missões – Campus Erechim.**

Orientadores

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago

Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo

ERECHIM-RS

2018

NAIRA CARNIEL

**EXTRAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS DE PHYSALIS E APLICAÇÃO EM
NANOEMULSÕES PARA A SANITIZAÇÃO DE PEPINOS FRESCOS**

**Tese apresentada como quesito parcial à
obtenção do grau de Doutor, pelo curso de
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos
da Universidade Regional Integrada do Alto
Uruguai e das Missões – Campus Erechim.**

Erechim/RS, agosto de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago - URI - Campus de Erechim (Orientador)

Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo – IFRS - Campus de Erechim (co-orientador)

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian - URI - Campus de Erechim

Dra. Ilizandra Fernandes - URI - Campus de Erechim

Prof. Dra. Priscilla Pereira dos Santos – IFRS - Campus de Erechim

Prof. Dr. João Paulo Bender – Universidade Federal da Fronteira Sul

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir mais esta conquista.

A minha família pelo suporte.

A minha pequena Valentina que chegou para dar mais felicidades e razão para viver!

Aos meus pais.

Aos orientadores, Prof. Rogerio M. Dallago e Prof. Wagner Luiz Priamo pela ajuda e discussão ao longo da tese.

À Letícia Urnau por estar sempre junto comigo e pela amizade;

À Maiara e Anne pela amizade e companhia;

À URI – Campus de Erechim e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos pelo oportunidade e suporte em todas as etapas deste trabalho.

À Universidade Tiradentes – UNIT e em especial ao Prof. Claudio Dariva por permitir a execução de experimentos de extração com micro-ondas nas instalações do NUESC.

Ao IFRS – Campus Sertão pela cedência dos frutos de physalis e auxílio da caracterização dos extratos.

À *Wayne State University* em especial ao Prof. Dr. Sandro da Rocha pela oportunidade concedida em realizar doutorado sanduiche em seu laboratório e toda a sua família (Liziane, Giulia, Caroline e Luiza) pela amizade, meu muito obrigado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de doutorado e doutorado-sanduiche.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

(John F. Kennedy)

RESUMO

A fração polifenólica obtida de extratos naturais pode apresentar inúmeras propriedades benéficas e potenciais de aplicação em diversos segmentos. A técnica de extração empregada para esta finalidade é fundamental para a determinação da qualidade dos extratos. A extração assistida por ultrassom vem ganhando destaque nos últimos anos por proporcionar o aumento do rendimento e diminuição do consumo de solvente. Igualmente, o emprego de micro-ondas também se credencia como uma técnica promissora para obtenção de compostos naturais principalmente devido à drástica diminuição do tempo e manutenção e/ou incremento dos compostos obtidos em relação às técnicas convencionais (maceração, hidrodestilação, dentre outras). *Physalis*, uma fruta originária dos Andes e da Amazônia, está em crescente consumo em diversas regiões do Brasil, principalmente por apresentar características decorativas atraentes. Entretanto, estudos preliminares sugerem também um alto teor de polifenóis totais, incluindo flavonoides e ácidos fenólicos, os quais são promissores no combate à diversos patógenos microbianos. Em relação à segurança alimentar, principalmente ao consumo de alimentos frescos, um dos obstáculos tecnológicos atuais é o desenvolvimento de produtos sanitizantes naturais que possam ser utilizados diretamente nas superfícies dos alimentos em substituição aqueles químicos que necessitam de etapas posteriores para completa remoção antes do consumo. Neste sentido, o uso de nanoemulsões contendo extratos naturais pode melhorar a eficácia e promover maior estabilidade aos polifenóis os quais são susceptíveis à degradação pela presença de luz, oxigênio quando em estado livre. Assim, esta tese de doutorado estudou o processo de extração de compostos fenólicos presentes em *Physalis angulata*, produziu e caracterizou nanoemulsões, avaliando, posteriormente, o seu potencial contra microrganismos causadores de contaminação bacteriana em pepinos *in natura*. Para a extração assistida por ultrassom foi adotado um delineamento composto central rotacional e um modelo matemático foi usado para estabelecer as condições ótimas de extração juntamente com as respectivas superfícies de resposta. Os resultados experimentais indicaram um teor máximo de polifenóis totais de 1,039mg de ácido gálico equivalente/g de extrato e, os valores máximos de ácido gálico, ácido caféico, ácido elágico, rutina, mangiferina e kaempferol foram de 104.88mg.L⁻¹, 4.04 mg.L⁻¹, 8.37mg.L⁻¹, 58.28mg.L⁻¹, 13.26mg.L⁻¹ e 1.87mg.L⁻¹, respectivamente. Na extração assistida por micro-ondas,

os efeitos da concentração de etanol, potência de irradiação, tempo de extração e razão de líquido para sólido foram avaliados através de um projeto experimental (Box-Behnken) e os resultados indicaram valores máximos de 3,74 mg de ácido gálico equivalente/g de extrato (polifenóis totais), 7,77 mg.L⁻¹ (ácido gálico), 0,55 mg.L⁻¹ (ácido elágico), 0,26 mg.L⁻¹ (ácido cafeico), 0,86 mg.L⁻¹ (rutina) e 2,43 mg.L⁻¹ (mangiferina). A condição experimental que proporcionou o maior rendimento de ácido gálico na extração-assistida por ultrassom foi utilizada para a obtenção de um extrato a ser incorporado em nanoemulsões visando a aplicabilidade desta contra espécies microbianas patogênicas comumente encontradas em pepinos *in natura*. Os resultados indicaram que as nanoemulsões apresentaram um diâmetro hidrodinâmico (HD) de 121nm e potencial zeta (ζ) de -30mV. Seu potencial antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* foi testado em pepinos frescos pós-colheita e a concentração inibitória mínima (CIM) das nanoemulsões em relação aos mesmos microrganismos foi de 20 mg.mL⁻¹. O tratamento com nanoemulsão contendo ácido gálico (NGA) foi mais efetivo que a nanoemulsão contendo extrato (NE) contra *Listeria monocytogenes*, com redução máxima de células em torno de 99,23% e 95,75%, respectivamente. Para *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* observou-se um efeito inverso da ação das nanoemulsões em relação à redução celular, ou seja, os tratamentos com NE foram mais eficientes do que aqueles conduzidos com NGA, com reduções de até 95%.

Palavras-chave: *Physalis angulata*; Ultrassom; Micro-ondas; Nanoemulsão; Compostos fenólicos.

ABSTRACT

Polyphenol fraction obtained from natural extracts may present numerous beneficial and potential properties in several segments. Extraction techniques employed for this purpose is fundamental to determine the final quality of the products. Ultrasound-assisted extraction (UAE) has been highlights in recent years by providing increased yield and decreased solvent consumption. Besides, the use of microwaves (MAE) is also used due to the drastic reduction of the time and maintenance and/or increase of the compounds obtained in relation to conventional techniques (maceration, hydrodistillation, among others). *Physalis*, a fruit from Andes and Amazon, presents attractive decorative features, however, preliminary studies also reveal the high content of total polyphenols, including flavonoids and phenolic acids, which are promising in combating various microbial pathogens. In relation to food safety, especially fresh foods, one of the current technological obstacles is the development of natural sanitizing products that may be used directly on food surfaces, replacing those chemicals that require further steps to remove its excess amount. In this sense, the use of nanoemulsions containing natural extracts may improve the effectiveness and promote greater stability to the polyphenols which are susceptible to degradation by the presence of light, oxygen when in the free state. The current Doctoral Thesis studied the extraction process of phenolic compounds present in *Physalis angulata*, produced and characterized nanoemulsions, and then evaluated its potential against microorganisms causing bacterial contamination in fresh cucumbers. For Ultrasound-assisted extraction (UAE), a Central Composite Rotational Design was adopted, and a mathematical model was used to establish the optimal extraction conditions and its respective response surfaces. Experimental results indicated a maximum total polyphenol content of 1.039mg of gallic acid equivalent GAE/g of extract and, the maximum values of gallic acid, caffeic acid, ellagic acid, rutin, mangiferin and kaempferol were 104.88mg.L⁻¹, 4.04mg.L⁻¹, 8.37mg.L⁻¹, 58.28mg.L⁻¹, 13.26mg.L⁻¹ and 1.87mg.L⁻¹, respectively. In the microwave-assisted extraction (MAE), the effects of ethanol concentration, irradiation power, extraction time and liquid to solid ratio were evaluated through an experimental design (Box-Behnken) and, the results indicated maximum values of 3.74 mg of gallic acid equivalente/g of extract (total polyphenols), 7.77mg.L⁻¹ (gallic acid), 0.55 mg.L⁻¹ (ellagic acid), 0.26 mg.L⁻¹ caffeic acid), 0.86 mg.L⁻¹ (rutin) and 2.43 mg.L⁻¹ (mangiferin). Experimental condition that provided the highest

gallic acid yield in the UAE approach was used to obtain an extract to be incorporated in the nanoemulsions, aiming to verify its applicability against pathogenic microbial species found fresh cucumbers. The results indicated that the nanoemulsions presented a hydrodynamic diameter (HD) of 121nm and zeta potential (ζ) of -30mV. The potential of the nanoemulsions was tested in fresh cucumbers against containing *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* and, the minimum inhibitory concentration (MIC) in relation to the same microorganisms was 20mg.mL⁻¹. The treatment with nanoemulsion containing gallic acid (NGA) was more effective than the treatment with nanoemulsion containing extract (NE) against *Listeria monocytogenes*, with maximum cell reduction around 99.23% and 95.75%, respectively. For *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli*, an inverse effect of cell reduction was observed, i.e., NE was more efficient than those conducted with NGA, with reductions of up to 95%.

Keywords: *Physalis angulata*; Ultrasound-assisted extraction; Microwave-assisted extraction; Nanoemulsion; Phenolic compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Aspecto <i>Physalis angulata</i> ; fruto envolto por um cálice fruto; com as sementes.....	17
Figura 2 - Estrutura química dos ácidos fenólicos.....	22
Figura 3- Espectro eletromagnético.....	24
Figura 4 - Estrutura de uma nanoemulsão óleo/água (O/A).....	32
Figura 5- Relação entre polaridade e EHL de emulsionantes.....	33
Figura 6 - Gráfico de Pareto dos efeitos, médias observadas e limites de confiança para as variáveis independentes sobre a quantidade de polifenóis totais (TPC).....	42
Figura 7- Gráfico de Pareto dos efeitos, médias observadas e limites de confiança para as variáveis independentes sobre a quantidade de ácido gálico.....	44
Figura 8 - Gráfico de Pareto dos efeitos, médias observadas e limites de confiança para as variáveis independentes sobre a quantidade de ácido elágico.....	45
Figura 9 - Gráfico de Pareto dos efeitos, médias observadas e limites de confiança para as variáveis independentes sobre a quantidade de ácido caféico.....	46
Figura 10 - Gráfico de Pareto dos efeitos, médias observadas e limites de confiança para as variáveis independentes sobre a quantidade de rutina.....	47
Figura 11 - Gráfico de Pareto dos efeitos, médias observadas e limites de confiança para as variáveis independentes sobre a quantidade de rutina.....	48
Figura 12 - Gráfico de Pareto dos efeitos estimados de variáveis testadas no planejamento experimental sobre o composto fenólico total (TPC).....	54
Figura 13 - Superfície de resposta de TPC em função de: A) temperatura versus razão sólido-líquido e B) concentração de etanol versus razão sólido-líquido.....	56
Figura 14 - Redução de células (UFC/mL) de <i>Listeria monocytogenes</i> na superfície do pepino: A) tratamento com NE; B) tratamento NGA.....	63
Figura 15 - Redução de células (UFC/mL) de <i>Salmonella Typhimurium</i> na superfície do pepino: A) tratamento com NE; B) tratamento NGA.....	64
Figura 16 - Redução de células (UFC/mL) de <i>Escherichia coli</i> na superfície do pepino: A) tratamento com NE; B) tratamento NGA.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela- 1 Estrutura dos compostos fenólicos.....	20
Tabela 2 - Utilização de solventes e ultrassom na extração de compostos bioativos.....	24
Tabela 3 - Constante dielétrica, fator de perda dielétrica e fator de dissipação de algumas substâncias.....	25
Tabela 4- Estudo de casos relatados na literatura utilizando extrato de plantas e compostos fenólicos como antimicrobiano.....	27
Tabela 5 - Variáveis e níveis investigados na etapa de extração.....	38
Tabela 6 - Matriz experimental, valores codificados (reais) e resposta do conteúdo total de polifenóis e compostos fenólicos individuais.....	40
Tabela 7 - Matriz do DCCR 2 ³ (valores reais e codificados) e respectiva resposta em termos de teor total de polifenóis e compostos individuais pelo método de ultrassom.....	53

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	13
2 - OBJETIVOS	16
2.1 – Geral.....	16
2.2 – Específicos	16
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 - Physalis	17
3.2 - Compostos fenólicos	18
3.2.1 - Ácidos Orgânicos/ Ácidos Fenólicos/Ácido Gálico	20
3.3 - Métodos de Extração	22
3.3.1 – Extração-assistida por ultrassom.....	22
3.3.2 – Extração assistida por micro-ondas.....	23
3.4 - Atividade antimicrobiana dos extratos naturais	25
3.4.1 - Mecanismo de ação de compostos fenólicos.....	26
3.4.2 - Doenças transmitidas por alimentos (DTA's) e sanitização	28
3.5 – Nanoemulsões.....	30
3.5.1 Óleo	31
3.5.2 Surfactante/co-surfactante.....	31
3.5.3 - Formação de nanoemulsão utilizando ultrassom	32
3.6 - Referencias bibliográficas	34
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 – “Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids from <i>Physalis angulata</i> ”	43
4.2 – “The effects of ultrasound-assisted extraction on polyphenolics compounds obtained from <i>Physalis angulata</i> using response surface approach”	57
4.3 – “GRAS nanoemulsion from Goldenberry to the control of foodborne bacteria on fresh cucumber”	66
5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	75

1 - INTRODUÇÃO

Physalis angulata é uma fruta nativa da América do Sul e do Brasil (MUNIZ et al., 2011). Na diversidade desse gênero encontram-se uma extensa presença de constituintes químicos (TOMASSINI et al., 2000) e a caracterização do fruto é de extrema importância tanto para o produtor quanto para o consumidor, uma vez que a mesma é fonte de vitaminas, açúcares, antioxidantes, ácidos, aromas e sabores que aguardam sua identificação para posterior exploração pela indústria com o intuito de elaborar produtos novos competitivos no mercado (CHAVES et al, 2005).

Dentre os compostos encontrados no fruto, em especial, pode ser constatada a presença de compostos fenólicos. Estas substâncias apresentam elevada capacidade de sequestrar espécies reativas, agindo como potente antioxidante (XYNOS et al, 2012). Entretanto, para que se possa utilizar compostos bioativos de plantas é necessário o uso de um processo extrativo e para isto, os processos convencionais (como a maceração, soxhlet e a percloração) e os não-convencionais (como o uso de ultrassom, micro-ondas, fluido supercrítico e líquidos pressurizados) podem ser empregados. A escolha adequada do solvente para a extração de compostos fenólicos é importante para que não ocorra um rendimento ineficiente, uso em excesso ou até mesmo a degradação dos compostos. Num estudo que define solventes "verdes" foi demonstrado que os álcoois simples (etanol, metanol) são mais favoráveis ambientalmente pois minimizam o impacto ambiental resultante do uso de solventes na produção química (CAPELLO et al., 2007). Há de se ressaltar também que o grande interesse na obtenção da fração polifenólica oriunda de espécies vegetais está associada ao efeito antibacteriano de alguns extratos. De fato, o seu uso na medicina popular demonstrou a inibição do crescimento de diferentes microrganismos causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) as quais podem ser causadas por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados (NEWELL et al, 2012; LANDETE, 2012).

Tal constatação é de fundamental relevância em se tratando da sanitização de alimentos, a qual objetiva a redução dos surtos de DTA's principalmente no consumo de alimentos in natura. O uso de extratos naturais como sanitizantes na superfície de alimentos consumidos in natura ainda é incipiente na literatura e na indústria, porém estudos indicam ser uma alternativa viável aos produtos químicos usualmente aplicados para essa finalidade. Além disso, o uso de substâncias naturais pode

também minimizar etapas de lavagem e descasque dos produtos antes do consumo. Dentre os alimentos consumidos in natura, o pepino é um dos mais suscetíveis ao ataque de patógenos e, em julho de 2015, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (EUA) relatou 418 casos em 31 estados causados pela *Salmonella* após a ingestão de pepinos.

Embora o uso de extratos naturais como agentes antibacterianos apresente-se como uma promissora alternativa, deve-se ressaltar que estes, na sua forma livre, apresentam eficácia limitada devido à sua sensibilidade ao calor, oxigênio e a luz. Uma das alternativas para promover a proteção dos extratos naturais e, conseqüentemente dos seus principais compostos ativos é através do nanoencapsulamento em fase líquida (CHEONG et al., 2008). Neste caso, as nanoemulsões, normalmente óleo em água (O/A) e com tamanho das gotas de óleo da fase dispersa muito pequenas (300 nanômetros ou menos), são cineticamente estáveis e tem separação de fases dificultada pelo alto movimento *Browniano* do sistema que supera a taxa de segregação induzida pela gravidade (ANTON e VANDAMME, 2011; GALVÃO, 2015). De uma forma geral, esses sistemas nanoestruturados compreendem matrizes sofisticadas de encapsulamento que fornecem estabilidade física máxima, protegem os ingredientes de degradação química e permitem o controle da liberação dos componentes encapsulados (GALVÃO, 2015).

Diante do exposto acredita-se que esta tese de doutorado está contribuindo e atuando em três vertentes do conhecimento: *i)* incremento da produção de physalis em regiões ainda inexploradas; *ii)* geração de novos conhecimentos acerca do comportamento de extração e composição dos extratos oriundos desta fruta e *iii)* potencial de aplicação de um sanitizante natural para a indústria de alimentos visando a inocuidade de produtos in natura.

Esta Tese de Doutorado está estruturada em Capítulos da seguinte forma:

- Capítulo 1: é apresentada a introdução do trabalho.
- Capítulo 2: apresentam-se os objetivos, geral e específicos, norteadores das atividades realizadas.
- Capítulo 3: apresenta-se a revisão bibliográfica a respeito da matéria-prima estudada neste trabalho bem como, os métodos de extração para obtenção da fração polifenólica e o potencial antimicrobiano dos compostos nela contidos.

- Capítulo 4: são apresentados e discutidos os resultados obtidos na forma de artigos científicos, a saber:
 - Artigo 1: “*Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids from Physalis angulata*”, publicado junto ao periódico *Journal of Food Process Engineering*, 40 (3), 2017.
 - Artigo 2: “*The effects of ultrasound-assisted extraction on polyphenolics compounds obtained from Physalis angulata using response surface approach*”, publicado junto ao periódico *Acta Scientiarum Technology*, 40 (4), 2018.
 - Artigo 3: “*GRAS nanoemulsion from Goldenberry to the control of foodborne bacteria on fresh cucumber*”, em processo de submissão.
- Capítulo 5: apresentam-se as conclusões desta Tese de Doutorado e as sugestões para trabalhos futuros.

2 - OBJETIVOS

2.1 – Geral

Estudar o processo de extração de compostos fenólicos presentes em *Physalis angulata*, produzir e caracterizar nanoemulsões, avaliando, posteriormente, o seu potencial contra microrganismos causadores de contaminação bacteriana em pepinos *in natura*.

2.2 – Específicos

Os objetivos específicos desta tese estão assim dispostos:

- Estudar o processo de extração-assistida por ultrassom na recuperação de polifenóis totais;
 - Avaliar, através de um delineamento composto central rotacional o efeito da temperatura, razão massa de fruta:volume de solvente e porcentagem de etanol sobre o teor de polifenóis totais, ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico e ácido caféico) e flavonoides (rutina, mangiferina, kaempferol e quercetina);
- Estudar o processo de extração assistida por micro-ondas na recuperação de polifenóis totais;
 - Avaliar, através de um planejamento Box-Behnken, o efeito da potência de irradiação, tempo, razão massa de fruta:volume de solvente e porcentagem de etanol sobre o teor de polifenóis totais, ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico e ácido caféico) e flavonoides (rutina, mangiferina, kaempferol e quercetina);
- Preparar nanoemulsões do tipo óleo em água e caracterizá-las em função do tamanho de partícula e potencial zeta;
- Avaliar o potencial de aplicação de nanoemulsões na superfície de pepinos *in natura*, com o intuito de diminuir a carga microbiana de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thyphimurium* e *Escherichia coli*.

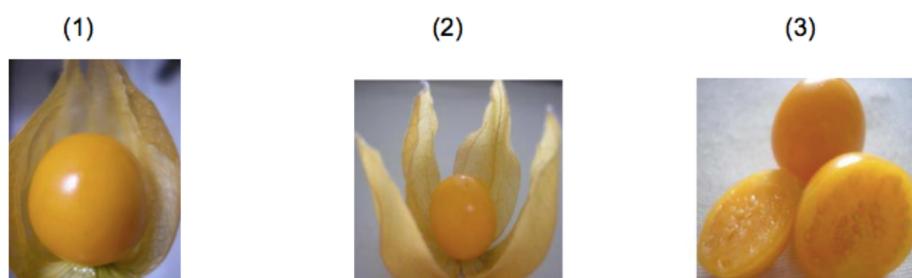
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada a revisão bibliográfica sobre o fruto de physalis, tecnologias de extração e mecanismos de ação de compostos fenólicos bem como, a utilização de nanoemulsões como potencial agente de inibição de microrganismos.

3.1 - Physalis

A physalis é uma fruta exótica da família Solanaceae, originária da Amazônia e dos Andes, possuindo variedades cultivadas na América, Europa e Ásia. No Brasil, a physalis é popular no Norte e Nordeste e popularmente conhecida como camapú, balãozinho, juá- de-capote, bucho-de-rã, camambu, mata-fome, bate-testa e Balão-rajado (MUNIZ et al., 2011). É encontrada nos supermercados, entretanto grande parte é importada da Colômbia a preços elevados, visto que a produção no Brasil ainda é pequena (ROCKENBACK et al., 2008). Os frutos podem apresentar entre 150 a 300 sementes, 12,5 a 25,0 mm de diâmetro e 4 a 10 g por unidade, envoltos parcial ou completamente por um involúcro foliar (Figura 1) em forma de um balão conhecido por cálice (ÁVILA et al., 2006).

Figura 1 – Aspecto da *Physalis angulata*: (1 e 2) fruto envolto por um cálice; (3) fruto com as sementes.



Fonte: A autora (2014).

O consumo desse fruto ocorre principalmente na forma in natura, sendo ainda pouco exploradas as informações a respeito de sua composição química. A caracterização do fruto é de grande importância tanto para o produtor quanto para o consumidor, uma vez que é fonte de vitaminas, açúcares, antioxidantes, ácidos, aromas e sabores que aguardam sua identificação para posterior exploração pela

indústria com o intuito de elaborar produtos novos e competitivos no mercado (CHAVES et al., 2005). Igualmente, a *Physalis* é amplamente utilizada na medicina popular como anti-coagulante, anti-leucêmica, anti-mutagênicas, anti-inflamatória, anti-espasmódica, anti-séptico, analgésicos e no tratamento da diabetes (LIN et al., 1992). Ainda, é conhecida principalmente pela quantidade expressiva de flavonoides, que tem a capacidade de neutralizar os efeitos prejudiciais das espécies reativas nos tecidos e, portanto, acreditam-se que protegem contra os danos oxidativos (BANDYOPADHYAY et al., 2007).

Na diversidade desse gênero encontram-se uma extensa presença de constituintes químicos, como os flavonoides simples ou glicosilados (kaempferol, quercetina, rutina, com uma, duas ou três unidades de açúcares), ácidos graxos de cadeia linear (C-6 ao C-24), hidroxilados, epoxilados; ácido ascórbico, carotenoides, alcaloides e terpenos (como os vitasteroides). Esses vitasteroides compreendem substâncias químicas que reproduzem o esqueleto do ergostano intacto ou modificado, com função lactônica (C-26) que fornece uma diversidade de estruturas que se classificam em vitanolidos, vitanolídeos “modificados”, vitafisalinas, acnistinas, ixocarpolactonas, perulactonas e fisalinas. Dentre os vários gêneros da família Solanaceae, a *physalis* apresenta a maior produção de vitanolídeo e fisalinas (TOMASSINI et al., 2000).

De acordo com a Fundação Oswaldo Cruz do Ceará a substância “physalina” atua no sistema imunológico humano evitando a rejeição de órgãos transplantados, além de apresentar propriedades medicinais já comprovadas como a redução do colesterol LDL (lipoproteínas de baixa densidade), diminuição da glicemia e ação diurética. Nas citações populares, mas que ainda necessitam de comprovação científica, acredita-se que essa planta apresenta ação no combate ao reumatismo, doenças de pele, rins, fígado, bexiga, malária e hepatite, além de purificar o sangue e fortificar os nervos ópticos e reduzir a incidência de cataratas (SANTTORUS, 2017; RUFATO et al., 2013).

3.2 - Compostos fenólicos

A crescente demanda por parte dos consumidores por alimentos mais saudáveis e mais seguros está conduzindo a indústria de alimentos para um novo caminho. Desde a implementação da melhoria do controle da qualidade dos alimentos

e prevenção de riscos de novas tecnologias de processamento, as propriedades naturais bioativas de determinados alimentos estão se tornando o foco de inovação e investigação (SOUSA et al., 2014). Neste contexto, os antioxidantes têm sido relatados como sequestradores de uma ampla gama de espécies reativas de oxigênio bem como inibidores da peroxidação lipídica (WILLIAMS et al., 2004). Esta propriedade é altamente desejável, pois há várias biomoléculas incluindo proteínas, lipídios, lipoproteínas e DNA que desencadeiam sequencialmente várias doenças humanas crônicas, como doenças cardiovasculares, reumatismo, diabetes mellitus e câncer (ROSS e KASUM 2002). Além disso, alguns polifenóis são considerados barreiras antimicrobianas em plantas em resposta à infecção microbiana e, portanto, não deve-se surpreender que os mesmos tenham demonstrado eficácia contra uma ampla gama de micro-organismos *in vitro* (LI et al., 2015).

Os compostos fenólicos (detectados mais de 8000 ocorrências) são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Podem ser considerados metabólitos secundários das plantas, sintetizados em resposta a condições de estresse, podendo agir como fitoalexinas (como atrativo para polinização, contribuindo para a pigmentação do vegetal) ou como antioxidantes (similarmente ao sistema imunológico humano, protegendo a planta de raios ultravioleta e patógenos) (DREOSTI, 2000). Nos alimentos são os principais compostos responsáveis pelas características sensoriais tais como adstringência, amargor e aroma, além da estabilidade oxidativa dos produtos derivados de vegetais. Por muito tempo, esses compostos foram associados negativamente à qualidade de alimentos vegetais pela ação anti-nutricional como por exemplo dos taninos, que complexam proteínas, diminuindo o valor nutricional e em alguns casos inibem a atividade de enzimas como tripsina e lipases (NACZK e SHAHIDI, 1995). No entanto, vários estudos têm demonstrado seus efeitos plurifarmacológicos (bactericida, antiviral, antialérgico, antitrombótico, anti-inflamatório, anti-carcinogênico, hepatoprotetor, vasodilatador) despertando grande interesse principalmente por sua alta prevalência nas dietas já que são compostos onipresentes nos vegetais (NACZK e SHAHIDI 1995; CHEYNIER, 2005 e SOOBATTEE et al., 2005).

O grupo dos compostos fenólicos inclui os ácidos fenólicos (constituídos pelos ácidos hidroxibenzóicos (por ex. ácido gálico), ácidos hidroxicinâmicos (por ex. ácido cafeico), estilbenos (resveratrol), flavonoides (quercetina, cianidina e catequina) e

compostos altamente polimerizados (lenhinas, melaninas e taninos) (SILVA et al., 2007). A Tabela 1 apresenta as categorias destes compostos de acordo com a diversidade estrutural dos polifenóis. Pode-se observar que dentre estas classes destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos por serem largamente distribuídos na natureza e os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (SOARES, 2002).

Tabela 1 - Estrutura dos compostos fenólicos.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6–C1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C6–C2
Ácidos hidroxicinâmicos, Fenilpropanóides	C6–C3
Nafitoquinonas	C6–C4
Xantonas	C6–C1–C6
Estilbenos, antoquinonas	C6–C2–C6
Flavonóides	C6–C3–C6
Lignanas, neolignanas	(C6–C3) ₂
Ligninas	(C6–C3) _n
Taninos condensados	(C6–C3–C6) _n

Fonte: (ANGELO e JORGE, 2007).

3.2.1 - Ácidos Orgânicos/ Ácidos Fenólicos/Ácido Gálico

Os ácidos orgânicos foram descritos como potentes agentes antimicrobianos contra microrganismos psicrófilos e mesófilos em frutas e produtos hortícolas frescos (BARI et al., 2005). A ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos é devida à redução do pH no ambiente, à interrupção do transporte e/ou permeabilidade da membrana, à acumulação de ânion ou a uma redução do pH celular interno pela dissociação dos íons de hidrogênio do ácido (BANACH et al., 2015). Dada a complexidade metabólica da célula microbiana, quer sejam procariotas (bactérias) ou eucariotas (leveduras e bolores), é muito improvável que um composto químico afete um único local de ação. Assim, os ácidos orgânicos são suscetíveis de afetar uma série de sistemas no organismo alvo. O efeito sobre cada ponto de ação dependerá, por sua vez, de

variáveis como tipo de ácido e concentração, condições de uso, pH, temperatura e natureza do microrganismo. Os possíveis mecanismos de ação dos ácidos orgânicos incluem: redução direta do pH do substrato ou meio de crescimento devido a um aumento na concentração de prótons, depressão do pH celular interno por ionização da molécula de ácido não dissociada ou interrupção do substrato transporte por alteração da permeabilidade da membrana celular. Além de inibir o transporte de substrato, os ácidos orgânicos também podem inibir a oxidação de NADH, eliminando assim o fornecimento de agentes redutores a sistemas de transporte de elétrons (DAVIDSON e MATTHEW TAYLOR, 2007).

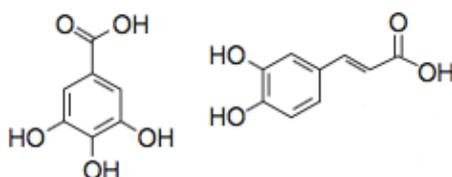
A posição dos grupos hidroxilas na estrutura fenólica pode influenciar significativamente as atividades antimicrobianas (TAGURI et al., 2004). Os ácidos fenólicos podem causar alterações irreversíveis da membrana através da alteração da hidrofobicidade e da ruptura local ou formação de poros nas membranas celulares, resultando em vazamentos de constituintes intracelulares. Outrossim, o mecanismo bacteriostático dos flavonoides pode ser explicado pela sua capacidade de formar complexos com a parede celular bacteriana para inibir o crescimento das bactérias (BORGES et al., 2013).

Alguns exemplos da ação de ácidos orgânicos foram descritos na literatura para diversas finalidades. Por exemplo, o ácido cítrico e o ácido ascórbico foram utilizados para reduzir as populações microbianas em vegetais (SHAPIRO e HOLDER 1960). O ácido ascórbico, seus vários sais e outros derivados têm sido os principais antioxidantes GRAS (*Generally Recognized as Safe*) aplicados em frutas, legumes e em sucos de frutas, para a prevenção de reações oxidativas (BAUERNFEIND e PINKERT, 1970). O ácido ascórbico também atua como um eliminador de oxigênio em reações de polifenol oxidase, possivelmente devido à redução de o-quinonas formadas enzimaticamente em seus difenóis precursores (RICO et al., 2007). Igualmente, o ácido gálico (AG), derivado do ácido chiquímico (GRUNDHOFER et al., 2001), é um composto fenólico naturalmente presente em matrizes alimentares tais como vegetais e folhas (NARUMI et al., 2014). Apresenta-se como um composto reconhecido como seguro (GRAS) (FDA, 2015) e sua aplicação bem sucedida pode resolver um desafio crítico de contaminação (DÍAZ-GÓMEZ et al., 2014).

Os antimicrobianos naturais podem ser considerados uma solução potencialmente interessante para o tratamento e prevenção da formação de biofilmes na superfície de alimentos e superfícies de processamento, particularmente a

produção de extratos de tecidos de plantas comestíveis porque esses extratos são pensados para serem não tóxicos (NIEMETZ e GROSS, 2005). Várias atividades biológicas do ácido gálico têm sido relatadas, incluindo anticorpos e anti-bacterianas (KANG et al., 2008). Igualmente, o ácido gálico mostrou ter atividade antimicrobiana contra *Salmonella Typhimurium* (NOHYNEK et al., 2006), *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (CHANWITHEESUK et al., 2007) e *Campylobacter jejuni* (ALKAN et al., 2011). A Figura 2 apresenta a estrutura química dos ácidos fenólicos.

Figura 2 - Estrutura química dos ácidos fenólicos.



Fonte: (Daglia 2012).

3.3 - Métodos de Extração

3.3.1 – Extração-assistida por ultrassom

A seleção de um método para extrair componentes ativos com rendimento máximo e pureza mais elevada depende principalmente da natureza dos compostos, estabilidade térmica e da natureza da matéria-prima a ser processada. Técnicas de extração convencionais são muitas vezes limitadas pela resistência à transferência de massa devido ao envolvimento de mais de uma fase no sistema (ADJÉ et al., 2010), longos tempo e elevado consumo de energia (LIANFU e ZELONG 2008). No caso de compostos ativos sensíveis ao calor, a extração realizada em temperaturas mais elevadas pode diminuir a qualidade do extrato. Em certos casos, as moléculas ativas podem ser danificadas devido ao uso de pressão e temperatura inadequada (DA PORTO e DECORTI, 2009; ADJÉ et al., 2010).

Uma forma de minimizar possíveis desvantagens das técnicas convencionais é através do emprego de metodologias alternativas. Neste sentido, o ultrassom é um processo que utiliza energia das ondas ultrassônicas que são transmitidas em frequência superior à capacidade auditiva humana (acima de 20 kHz). As ondas de ultrassom se propagam na matéria, criando meios de compressão e expansão,

fazendo com que as moléculas se afastam e se aproximem diversas vezes (LUQUE-GARCÍA e LUQUE DE CASTRO, 2003). O ultrassom pode ser utilizado para melhorar efetivamente a taxa de extração, aumentando as taxas de transferência de massa e possível ruptura da parede celular devido a formação de micro cavidades levando a maiores rendimentos com tempo e consumo de solventes reduzidos (SHIRSATH et al., 2012).

No caso da extração de produtos naturais, apenas com base na cavitação gerada pelo ultrassom, têm sido relatados trabalhos com resultados relevantes. Como exemplos podem-se citar a extração de baunilha, óleos de amêndoas, extratos de ervas (funcho, lúpulo, calêndula, hortelã), proteína de soja, polifenóis, aminoácidos e cafeína a partir de chá verde, entre outros (ADJÉ et al., 2010; ROUHANI et al., 2009). Khan et al. (2010) observaram um aumento significativo na recuperação de compostos fenólicos totais obtidos da casca de laranja (*Citrus sinensis* L.) quando utilizada a extração-assistida por ultrassom durante 15 minutos, em relação a extração convencional (60 min). A tecnologia empregando ultrassom também tem sido utilizada para a extração de compostos fenólicos presentes em morangos e os resultados de rendimento demonstraram superioridade em relação a outros métodos convencionais em termos de recuperação mais rápida e menor degradação do analito (HERRERA e DE CASTRO 2005). Na sequência, a Tabela 2 apresenta alguns trabalhos realizados utilizando ultrassom para extração de compostos bioativos.

Tabela 2 - Utilização de solventes e ultrassom na extração de compostos bioativos.

Composto	Solvente	Referências
Compostos fenólicos	Metanol-água	ADJÉ et al., (2010)
Compostos fenólicos	Etanol, Metanol e Acetona	WANG et al., (2008)
Carotenoides e Clorofila	N, N-dimetilformamida, Metanol	MACIAS-SANCHEZ et al., (2009)

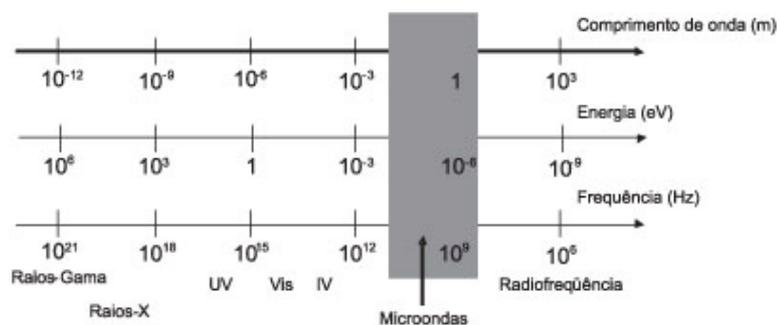
Fonte: Adaptado por SHIRSATH et al., (2012).

3.3.2 – Extração assistida por micro-ondas

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas que consistem dos componentes de campo elétrico e magnético. A irradiação de micro-ondas trabalha na faixa de frequência entre 0,3 a 300GHz e comprimento de onda variando entre 1mm e 1m. Na Figura 3 observam-se as bandas de frequência das micro-ondas no espectro

eletromagnético, onde sua região está localizada entre o infravermelho e as ondas de rádio (KAPPE et al., 2009).

Figura 3 - Espectro eletromagnético.



Fonte: (KAPPE et al., 2009).

A radiação micro-ondas é capaz de interagir diretamente no material promovendo um rápido aquecimento. O calor resultante desta interação é devido principalmente a dois efeitos diferentes: a rotação molecular e a migração iônica gerada devido aos dipolos permanentes ou induzidos das moléculas e dos íons, respectivamente (CHAN e CHEN, 2002; FORTUNY et al., 2008).

No aquecimento convencional todo o material que está no interior da câmara sofre aquecimento, enquanto que no micro-ondas o aquecimento dependerá do tipo de material presente no seu interior (constante dielétrica e frequência de relaxação do material). Assim, é comum observar que partes do recipiente que contém o produto recém aquecido por micro-ondas, mas que não estão em contato direto com o mesmo, continuam na temperatura próxima ao ambiente. O aquecimento dielétrico, chamado também de aquecimento por micro-ondas, é dependente da capacidade do material específico para absorver a energia de micro-ondas e converter em calor (por exemplo, solvente ou reagente) (AL-MAYMAN e AL-ZAHRANI, 2003; KAPPE et al., 2009).

A quantidade de calor produzida pelos materiais depende da constante dielétrica, do tamanho da molécula, da viscosidade e da temperatura do meio, mas principalmente, da frequência de micro-ondas utilizada. Quanto maior a frequência da radiação micro-ondas, maior é a taxa de aquecimento, porém menor é a penetração da radiação eletromagnética no material (BARBOZA et al., 2001). Portanto, a capacidade do material para absorver a energia varia durante o processo (THOSTENSON e CHOU 1999). As características de aquecer o material particularmente a partir da condição de irradiação por micro-ondas são dependentes

das propriedades dielétricas do material. Os solventes podem ser classificados com alta, média e baixa absorção de micro-ondas. Em geral, substâncias polares absorvem bem micro-ondas (como água e etanol), enquanto que substâncias menos polares (hidrocarbonetos alifáticos ou aromáticos) ou substâncias com momento de dipolo nulo absorvem micro-ondas fracamente (SANSEVERINO, 2002). A Tabela 3 apresenta informações sobre algumas substâncias no que concerne a reações utilizando micro-ondas.

Tabela 3 - Constante dielétrica, fator de perda dielétrica e fator de dissipação de algumas substâncias (20°C e 2,45 GHz).

Solventes	Alto $\delta > 0,5$	Solventes	Médio $\delta > 0,1 - 0,5$	Solventes	Baixo $\delta < 0,1$
Etilenoglicol	1,350	2-butanol	0,447	Clorofórmio	0,091
Etanol	0,941	1,2-Diclorobenzeno	0,280	Acetonitrila	0,062
Dimetilsulfóxido	0,825	1-Metil-2pirrolidona	0,275	Acetato de Etila	0,059
2-Propanol	0,799	Ácido Acético	0,174	Acetona	0,054
Ácido Fórmico	0,722	N-N-Dimetilformamida	0,161	Tetrahidrofurano	0,047
Metanol	0,659	1,2- Dicloroetano	0,127	Diclorometano	0,042
Nitrobenzeno	0,589	Água	0,123	Tolueno	0,040
1-Butanol	0,571	Clorobenzeno	0,101	Hexano	0,020

Fonte: (KAPPE et al., 2009).

Pan et al. (2003) utilizaram as micro-ondas para extrair polifenóis e cafeína de folhas de chá verde obtendo o máximo de extração em apenas 4 minutos, enquanto que em processos convencionais o tempo gasto para obter o mesmo rendimento foi de 20 horas. Shu et al. (2003) também reduziram de 10 horas para 15 minutos o tempo de extração de ginsenosídeos a partir de raízes de ginseng. Finalmente, Chiremba et al., (2012) também observaram uma diminuição no tempo de extração de diferentes biocompostos utilizando o processo assistido por micro-ondas.

3.4 - Atividade antimicrobiana dos extratos naturais

Os flavonoides ocorrem naturalmente em plantas e encontram-se em grande parte em alimentos e bebidas, como frutas, verduras, cereais, chá, café e vinho tinto (TAVEIRA et al., 2010). A atividade antibacteriana atribuída aos polifenóis está sendo

cada vez mais documentada na literatura científica. Extratos brutos de plantas com uma história de uso em medicina popular foram selecionados para atividade antibacteriana por muitos grupos de pesquisa, demonstrando que os compostos fenólicos inibem o crescimento de diferentes microrganismos LANDETE (2012). A Tabela 4 apresenta alguns trabalhos realizados utilizando extrato de plantas e compostos fenólicos como antimicrobiano.

Tabela 4 - Estudo de casos relatados na literatura utilizando extrato de plantas e compostos fenólicos como antimicrobiano.

Extrato/ compostos fenólicos	Microrganismos	Referências
<i>Lythrum salicaria</i> L.; <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.; <i>Epilobium angustifolium</i> L.; <i>Rubus chamaemorus</i> L.; <i>Rubus idaeus</i> L.; <i>Betula pubescens</i> Ehrh.; <i>Pinus sylvestris</i> L.; <i>Solanum tuberosum</i> . L.	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	RAUHA et al. (2000)
Folhas de <i>Olea europaea</i>	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i>	LEE e LEE (2010)
Ácido clorogênico, curcumim, epicatequina, eugenol, miricetina, quercetina, rutina, timol, timoquinona, xantohumol	<i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, ATCC 43895 e <i>E. coli</i> O157:H7, ATCC 35150, <i>S. paratyphi</i> , UK Micro 29A (UKM 29A), <i>S. cholerasuis</i> subsp. <i>cholerasuis</i> , ATCC 10708 e <i>S. Enteritidis</i>	CETIN-KARACA e NEWMAN (2015)
Ácido gálico e Catequina	<i>Escherichia coli</i>	DÍAZ-GÓMEZ et al., (2014)
Ácido gálico e UV	<i>Escherichia coli</i>	COSSU et al. (2016)
Ácido gálico	<i>Staphylococcus aureus</i>	LIU et al. (2017)

3.4.1 - Mecanismo de ação de compostos fenólicos

Alguns trabalhos indicam a eficácia da utilização de extratos de plantas contra microrganismos, porém o mecanismo de ação dos compostos contidos ainda não está totalmente estabelecido. Em um estudo com precursores radioativos, MORI et al.

(1987) demonstraram que a síntese de DNA era fortemente inibida por flavonoides em *Proteus vulgaris*, enquanto a síntese de RNA foi mais afetada em *S. aureus*. Os flavonoides que exibiram esta atividade foram robinetina, miricetina e (-) epigallocatequina. A síntese protéica e lipídica também foi afetada, mas em menor grau. Os autores sugeriram que o anel β dos flavonoides pode desempenhar um papel na intercalação ou ligação de hidrogênio com o empilhamento de bases de ácido nucleico e que isso pode explicar a ação inibitória na síntese de DNA e RNA.

Ohemeng et al. (1993) selecionaram 14 flavonoides de estrutura variável para verificar sua atividade inibitória contra *Escherichia coli* e para atividade antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Os autores verificaram que a topoisomerase (DNA girasse) de *E. coli* foi inibida em diferentes graus por sete dos compostos, incluindo quercetina, apigenina e 3,6,7,3',4'-penta-hidroxi-flavona. Curiosamente, com exceção da 7,8-di-hidroxi-flavona, a inibição da enzima foi limitada aos compostos com hidroxilação do anel B. Os autores propuseram que a atividade antibacteriana observada dos sete flavonoides era devida, em parte, à sua inibição da DNA girase. Entretanto, como o nível de atividade antibacteriana e a inibição enzimática nem sempre se correlacionaram, também sugeriram que outros mecanismos estavam envolvidos. Haraguchi et al. (1998) realizaram uma investigação sobre o modo de ação antibacteriano de flavonoides das raízes de *Glycyrrhiza inflata* (Haraguchi, Tanimoto et al. 1998), apresentando atividade inibitória contra *S. aureus* e *Micrococcus luteus*, mas não contra *E. coli*. O grupo apresentou a hipótese de que o grupo de flavonoides identificado podem interferir no metabolismo energético de forma semelhante aos antibióticos inibidores da respiração, uma vez que a energia é necessária para a absorção ativa de vários metabólitos e para a biossíntese de macromoléculas.

Há de se ressaltar que do ponto de vista tecnológico, em um futuro não muito distante, a utilização destes compostos através de alteração estrutural pode permitir o desenvolvimento de um agente antimicrobiano ou grupo de agentes farmacologicamente aceitáveis. Além da alteração estrutural dos flavonoides antimicrobianos fracos e moderadamente ativos, a investigação dos mecanismos de ação desses compostos poderá ser uma área de constante pesquisa. Além disso, a caracterização da interação entre os flavonoides antimicrobianos e seus locais-alvo poderiam potencialmente permitir a concepção de inibidores de segunda geração

(CUSHNIE e LAMB, 2005).

3.4.2 - Doenças transmitidas por alimentos (DTA's) e sanitização

Esta tese de doutorado foi contemplada com um estudo experimental nos Estados Unidos da América (EUA) onde na oportunidade, a demanda apresentada foi o estudo de extratos naturais aplicado à alimentos causadores de doenças em virtude da contaminação microbiológica. O pepino é um dos alimentos susceptível ao ataque de patógenos, e em julho de 2015, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA relatou 418 casos em 31 estados, causados pela *Salmonella* após a ingestão de pepinos.

Doença gastrointestinal causada por *Listeria monocytogenes* é rara em comparação com outros agentes de doenças transmitidas por alimentos, mas pode ser muito grave e apresentar alta taxa de mortalidade. Cerca de 1600 casos por ano são registrados nos Estados Unidos em comparação com uma taxa estimada para a infecção por *Salmonella*. No entanto, o número anual estimado de mortes causadas pelos dois organismos é comparável: 255 e 378 para *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* respectivamente, correspondendo a uma taxa de letalidade de 15,9% para a infecção por *Listeria monocytogenes*. Outro fator potencialmente perigoso é a capacidade da *Listeria monocytogenes* sobreviver e crescer em uma variedade de vegetais frescos não processados, bem como minimamente processados, mesmo durante o armazenamento a temperaturas de geladeira, o que significa que a contagem variável no momento do consumo (BEUCHAT, 2002).

A maioria dos consumidores não estão cientes de que o produto fresco é um dos principais veículos para bactérias patogênicas. Os surtos de DTA's afetam muitos indivíduos e são uma preocupação de saúde pública global (NEWELL et al., 2010). As DTA's podem ser causadas por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados. Segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil ocorreram 17.186 hospitalizações em virtude de alimentos contaminados e, entre 2007 e 2016, cerca de 95,5% foram causadas por bactérias principalmente do gênero *Escherichia coli* e *Salmonella* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

As práticas agrícolas e condições higiênicas utilizadas durante a colheita, processamento, embalagem, transporte e armazenamento podem influenciar a

população microbiana. As frutas e verduras são tratadas com formulações aquosas de produtos químicos após a colheita para remover material estranho e microrganismos, entretanto, o grau em que a lavagem reduz a carga microbiana depende do produto em questão e do procedimento utilizado. Os microrganismos presentes na água podem contaminar os frutos através de lenticelas, estômatos e lesões durante a colheita (ZAGORY, 1999).

Os métodos de descontaminação utilizados para os vegetais visam reduzir as populações microbianas do sistema de processamento sem necessariamente eliminá-las. Uma variedade de desinfetantes, incluindo cloro, peróxido de hidrogênio e ozônio, tem sido usada para reduzir as populações bacterianas iniciais em vegetais (SUWA et al., 2013). Cloro e compostos à base de cloro, como o hipoclorito, são provavelmente os desinfetantes mais utilizados para o tratamento de legumes frescos. No entanto, alguns estudos demonstraram que as concentrações de cloro tradicionalmente utilizadas para a descontaminação (50 a 200 ppm) não são eficazes na redução das cargas de patógenos nos vegetais (LEE e BAEK, 2008). Considerando que os legumes frescos têm potencial para abrigar bactérias patogênicas, o desenvolvimento de novos e eficazes procedimentos de saneamento tem recebido muita atenção (DE OLIVEIRA et al., 2015).

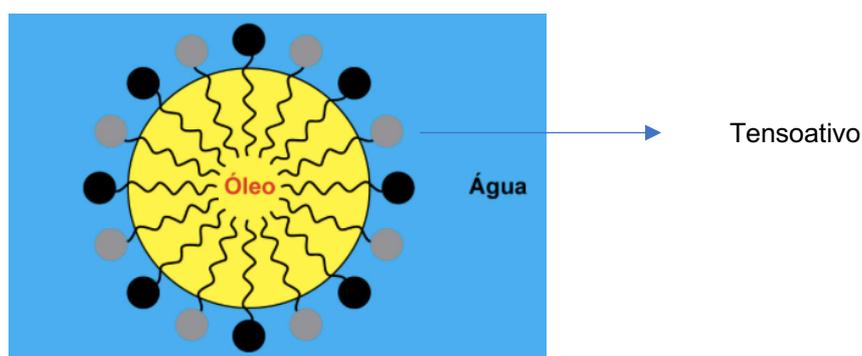
Os compostos à base de cloro são corrosivos e causam irritações na pele e no trato respiratório aos manipuladores de alimentos. A hipercloração de água gera altas concentrações de trihalometanos (triclorometano, bromodiodorometano, dibromoclorometano, tribromometano e clorofórmio) e outros subprodutos desinfetantes potencialmente carcinogênicos (PÉREZ-GREGORIO et al., 2011). Os compostos clorados têm sido o foco das preocupações ambientais, e alguns grupos ambientais sugeriram o fim do uso desses produtos em todo o mundo. Em países europeus, como os Países Baixos, Suécia, Alemanha e Bélgica, é proibida a utilização de cloro em produtos vegetais minimamente processados (RICO et al., 2007). Também foram estudados os patógenos emergentes que podem ser mais tolerantes aos compostos clorados, o que levanta novas preocupações sobre a eficácia e o uso do cloro na indústria de alimentos minimamente processados (ALVARO et al., 2009). Há de se ressaltar que o cloro continua sendo o desinfetante mais comumente usado devido à sua eficácia, relação custo-benefício e uso simples. No entanto, estão sendo criados novos regulamentos mais rigorosos sobre o uso de cloro em virtude dos riscos para a saúde dos manipuladores e consumidores de frutas e vegetais.

3.5 – Nanoemulsões

Extratos naturais apresentam compostos bioativos e, em produtos comerciais como alimentos ou preparações farmacêuticas, sua ação pode ser limitada devido à sua sensibilidade ao calor e ao oxigênio, à sua baixa solubilidade em água e sua fraca e variável biodisponibilidade (WESTERGREN e KALIKSTAD 2010). Por conseguinte, tem havido um interesse considerável no desenvolvimento de sistemas de entrega eficazes de compostos ativos para superar estes desafios. Estes sistemas podem ser utilizados para encapsular componentes para serem facilmente incorporados em produtos alimentares funcionais, suplementos dietéticos e preparações farmacêuticas. Podem também ser preparados utilizando operações de processamento relativamente simples e ingredientes comercialmente viáveis (LI et al., 2011).

Um exemplo de encapsulamento de compostos ativos é através das nanoemulsões (Figura 4). Brevemente, as nanoemulsões podem ser dispersões de óleo em água (O/A) de dois líquidos imiscíveis estabilizados usando um surfactante apropriado (MASON et al., 2006) contendo partículas pequenas (tipicamente cerca de 20-200 nm de diâmetro). Nas emulsões óleo em água (O/A) o óleo é a fase dispersa e a água a fase contínua e nas emulsões água em óleo (A/O), o conceito inverso prevalece. A redução do tamanho de partícula em sistemas de distribuição à base de emulsão tem uma série de vantagens que são benéficas para certas aplicações de alimentos, como por exemplo: *i)* maior estabilidade à agregação de partícula e à separação gravitacional; *ii)* clareza óptica mais elevada; *iii)* aumento da biodisponibilidade oral (SABERI et al., 2013).

Figura 4 - Estrutura de uma nanoemulsão óleo/água (O/A).



Fonte: (ARAÚJO, 1995).

A velocidade na qual uma nanoemulsão volta às fases separadas é também determinada pela frequência com que as gotículas de óleo entram em contato umas com as outras, o que depende do mecanismo principal responsável pelos contatos partícula-partícula (mecanismos físico-químicos pelos quais uma nanoemulsão pode ser quebrada, incluindo separação gravitacional, sedimentação, floculação, coalescência e maturação de Ostwald). As taxas a que esses processos de degradação ocorrem dependem da composição do sistema (tipo de óleo, solvente e surfactante, , concentrações, pH e força iônica) e condições ambientais (temperatura e forças aplicadas) (MCCLEMENTS, 2004).

3.5.1 Óleo

A fase oleosa das nanoemulsões normalmente é selecionada com base na solubilidade do composto de interesse a ser veiculado, na sua estabilidade, bem como na estabilidade da formulação desenvolvida (DATE e NAGARSENKER 2008). Diversos óleos têm sido utilizados na composição de emulsões, como os triglicerídeos de cadeia longa (TCL) e os triglicerídeos de cadeia média (TCM). Os TCM são obtidos pela re-esterificação de ácidos graxos do óleo de coco fracionados (principalmente cáprico e caprílico) com glicerina e ambos são aprovados para utilização pela *Food and Drug Administration* (FDA). Os TCM têm sido preferidos por serem 100 vezes mais solúveis em água do que os TCL. O tamanho da cadeia hidrocarbonada bem como o grau de saturação de suas ligações afeta capacidade de solubilização de alguns compostos nos óleos. Dessa forma, muitas vezes misturas de óleos são utilizadas para se alcançar boas solubilização e emulsificação (BENITA e LEVY, 1993).

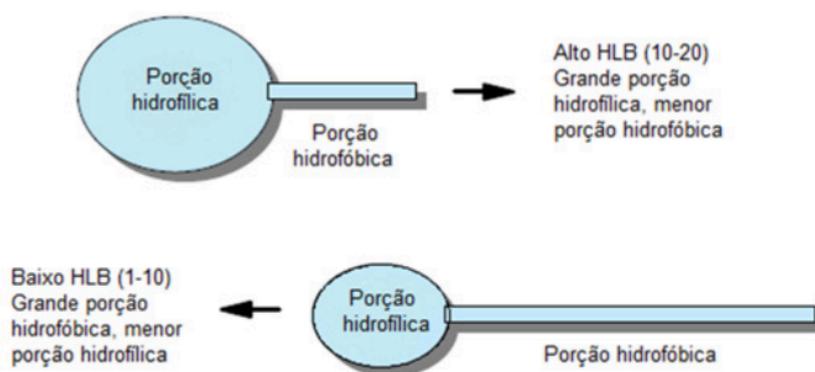
3.5.2 Surfactante/co-surfactante

Os surfactantes são moléculas anfifílicas que estabilizam as nanoemulsões através da redução da tensão interfacial, impedem a agregação de gotículas e proporcionam a estabilização. Um surfactante comum utilizado em nanoemulsões é a lecitina derivada da gema de ovo ou da soja (KLANG e VALENTA, 2011). Igualmente, co-surfactantes como o propileno glicol, polietilenoglicol, etanol, glicerina, etilenoglicol e propanol são usados para complementar a ação dos surfactantes a fim de fortalecer

a película interfacial (ZHANG et al., 2014; WANG et al., 2008; JO e KWON, 2014).

Tensoativos como o desoxicolato de sódio (sal biliar) (NASR et al., 2012) e cremophor EL (óleo de rícino polioxil-35) (VYAS et al., 2008) foram utilizados em produtos parenterais comercializados. O Tween 80 normalmente é o tensoativo preferido devido ao elevado valor de EHL (igual a 15). Este composto é de natureza não-iônica e estabiliza gotículas de emulsão por estabilização esteárica, ou seja, resultante da cobertura das partículas com camada de partículas solvatadas pelo meio contínuo. Além disso, sendo um surfactante de baixo peso molecular, é eficiente para minimizar o tamanho de partícula melhor do que os surfactantes poliméricos (GHOSH et al., 2013). Emulsionantes de equilíbrio hidrofílico e lipofílico (EHL), do inglês, *hydrophilic-lipophilic balance* (HLB) é uma medida de polaridade da substância, ou seja, quanto menor o seu valor, maior será a afinidade pela fase oleosa, enquanto emulsionantes de EHL elevado apresentam maior afinidade pela fase aquosa. Para emulsões O/A, em geral, são indicados emulsionantes com EHL de 8 a 18, sendo que esta faixa pode variar um pouco conforme a fonte consultada (SAJJADI, 2006). A Figura 5 apresenta a relação entre a polaridade e EHL de emulsionantes.

Figura 5 - Relação entre polaridade e EHL de emulsionantes.



Fonte: Adaptado por (CRODA, 2017).

3.5.3 - Formação de nanoemulsão utilizando ultrassom

A formação de nanoemulsões por métodos de alta energia é governada pela composição selecionada (tensoativos e compostos funcionais) e pela quantidade de energia aplicada. Portanto, as nanoemulsões produzidas por meio de métodos de alta

energia apresentam uma predisposição natural para preservar a formação de nanoemulsões contra a modificação da formulação por exemplo, adição de monômero, surfactante, co-surfactante, etc.

Quando dois líquidos imiscíveis são submetidos a ondas sonoras de alta frequência na presença de um surfactante, formam-se partículas de emulsão por cavitação (ANTON et al., 2008). Acredita-se que a emulsificação ultrassônica ocorre através de dois mecanismos: *i*) a aplicação de um campo acústico produz ondas interfaciais que se tornam instáveis, resultando eventualmente na erupção da fase oleosa no meio aquoso sob a forma de gotículas; *ii*) a aplicação de ultrassons de baixa frequência provoca a cavitação acústica, isto é, a formação e o subsequente colapso das microbolhas pelas flutuações de pressão de uma simples onda sonora. Cada evento de colapso de bolha (uma implosão em escala microscópica) provoca níveis extremos de turbulência altamente localizada, atuando como um método muito eficaz para quebrar gotas primárias de óleo disperso em gotas de tamanho sub-micrométrico (LI e FOGLER, 1978).

Kentish et al. (2008) produziram nanoemulsão utilizando óleo de semente de linhaça e Tween 40 como um emulsificante por ultrasonicador. Os resultados mostraram que existe um nível ótimo de entrada de energia acima do qual a formação de bolhas e de coalescência de partículas afeta a eficiência, reprodutibilidade e qualidade da produção de nanoemulsão. Aumentar o tempo de sonicação reduz os tamanhos de gotículas até um ponto, mas a sonicação contínua pode ser desnecessária. Há de se ressaltar que o uso de ultrassom ganhou interesse pela preparação de nanoemulsões devido ao baixo custo de produção, facilidade de manipulação do sistema, maior eficiência energética e menores requisitos instrumentais (LEONG et al., 2009).

Nanoemulsões preparadas pela técnica de cavitação oferece maior estabilidade com a redução da taxa de maturação de Ostwald do que sistemas preparados pelo método de inversão de fase. Observou-se que as nanoemulsões-assistidas por sonicação têm melhor estabilidade física e menor tamanho de partícula que o sistema de dispersão produzido por homogeneizador. Tang et al., (2013), revelaram que o ultrassom é 18 vezes mais eficiente do que a microfluidização para alcançar nanoemulsões com tamanho de gotas semelhante.

3.6 - Referencias bibliográficas

- ADJÉ, F., Y. F. LOZANO, P. LOZANO, A. ADIMA, F. CHEMAT, E. M. GAYDOU. Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. **Industrial Crops and Products**, 32, 3, 439-444, 2010.
- AL-MAYMAN, S. I., AL-ZAHRANI, S. M. Catalytic cracking of gas oils in electromagnetic fields: reactor design and performance. **Fuel Processing Technology**, 80, 2, 169-182, 2003.
- ALKAN, D., L. Y. AYDEMIR, I. ARCAN, H. YAVUZDURMAZ, H. I. ATABAY, C. CEYLAN, YEMENICIOGLU, A. Development of flexible antimicrobial packaging materials against *Campylobacter jejuni* by incorporation of gallic acid into zein-based films. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 59, 20, 11003–11010 2011.
- ALVARO, J. E., S. MORENO, F. DIANEZ, M. SANTOS, G. CARRASCO, URRESTARAZU, M. Effects of peracetic acid disinfectant on the postharvest of some fresh vegetables." **Journal of Food Engineering**, 95, 1, 11-15, 2009.
- ANGELO, P. M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** 66, 1, 2007.
- ANTON N., VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. **Pharmaceutical Research**, 28, 978-985, 2011.
- ANTON, N., J. P. BENOIT and P. SAULNIER. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review. **Journal of Control Release**, 128, 3, 185-199, 2008.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 335 p.
- ÁVILA, J. A., P. MORENO, G. FISCHER, D. MIRANDA. Influencia de la madurez del fruto y del secado del cáliz en uchuva (*Physalis peruviana* L.), almacenada a 18°C." **Acta Agronómica**, 55, 4, 2006.
- BAI, X. L., YUE, T. I., YUAN, H., ZHANG, H. W. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis. **Journal of Separation Science**, 33, 3751-3758, 2012
- BANACH, J. L., I. SAMPERS, S. VAN HAUTE, VAN DER FELSKLERX, H. J. Effect of Disinfectants on Preventing the Cross-Contamination of Pathogens in Fresh Produce Washing Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 12, 8, 8658-8677, 2015.
- BANDYOPADHYAY, M., CHAKRABORTY, R., RAYCHAUDHURI, U. A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh)." **LWT - Food Science and Technology**, 40, 5, 842-851, 2007.

- BARBOZA, A. C. R. N., CRUZ, C. V. M. S., GRAZIANI, M. B., LORENZETTI, M. C. F., SABADINI, E. Aquecimento em forno de microondas/desenvolvimento de alguns conceitos e fundamentos. **Quimica Nova**, 24, 6, 901-2001, 2001.
- BARI, M. L., UKUKU, D., KAWASAKI, T., INATSU, Y., ISSHIKI, K., KAWAMOTO, S. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. **Journal of Food Protection**, 68, 7, 1381-1387, 2005.
- BAUERNFEIND, J. C., PINKERT, D.M. Food processing with added ascorbic acid. **Advances in Food Research**, 18, 219-315, 1970.
- BENITA, S., LEVY, M.Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Science**, 82, 1069-1079, 1993.
- BEUCHAT, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes and Infection**, 4, 413-423, 2002.
- BORGES, A., FERREIRA, C., SAAVEDRA, M.J., SIMOES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, 19, 256-265, 2013.
- CARNIEL, N., DALLAGO, R.M., DARIVA, C. BENDER, J.P, NUNES, A.L., ZANELLA, O., BILIBIO, D., PRIAMO, W.L. Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids from *physalis angulata*. **Journal of Food Process Engineering**, 40, 1-11, 2017.
- CAPELLO, C., FISCHER, U. HUNGERBUHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, 9, 927-934, 2007.
- CETIN-KARACA, H., NEWMAN, M.C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia Coli*. **Food Bioscience**, 11: 8-16, 2015.
- CHAN, C.-C., CHEN, Y.C. Demulsification of w/o emulsions by microwave radiation. **Separation Science and Technology**, 37, 3407-3420, 2002.
- CHANWITHEESUK, A., TEERAWUTGULRAG, A., KILBURN, J.D, RAKARIYATHAM, N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Food Chemistry**, 100, 1044-1048, 2007.
- CHAVES, A. C., SCHUCH, M.W., ERIG, A.C. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia** 29: 1281-1287, 2005.
- CHEONG, J. N., TAN, C. P., CHE MAN, Y. B., MISRAN, M. α -Tocopherol nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Journal of Food Engineering, London**, 89, 204-209, 2008.

- CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 81, 223S-229S, 2005.
- CHIREMBA, C., ROONEY, L.W., BETA, T. Microwave-assisted extraction of bound phenolic acids in bran and flour fractions from sorghum and maize cultivars varying in hardness. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 9, 4735-4742, 2012.
- COSSU, A., ERCAN, D., WANG, Q., PEER, W.A., NITIN, N., TIKEKAR, R.V. Antimicrobial effect of synergistic interaction between UV-A light and gallic acid against *Escherichia coli* O157:H7 in fresh produce wash water and biofilm. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 37, Part A: 44-52, 2016.
- CRODA. "The HLB System-Croda's time saving guide to emulsifier selection." <http://www.crodoatingsandpolymers.com>, 2017.
- CUSHNIE, T. P., LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 26, 343-356, 2005.
- DA PORTO, C., DECORTI, D. Ultrasound-assisted extraction coupled with under vacuum distillation of flavour compounds from spearmint (carvone-rich) plants: Comparison with conventional hydrodistillation. **Ultrasonics Sonochemistry**, 16, 795-799, 2009
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, 23, 174-181, 2012.
- DATE, A. A., NAGARSENKER, M.S. Parenteral microemulsions: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, 1, 19-30, 2008.
- DAVIDSON, P., TAYLOR, T., SCHMIDT, S. Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds, p 765-801. In Doyle M, Buchanan R (ed), Food Microbiology. ASM Press, Washington, DC. 2013.
- DE OLIVEIRA, K. Á. R., DE SOUSA, J.P., DA COSTA, M.J.A., DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q., MAGNANI, M., DE SIQUEIRA, J. J. P., DE SOUZA, E.L. Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. **Food Control**, 47, 334-339, 2015.
- DÍAZ-GÓMEZ, R., TOLEDO-ARAYA, H., LÓPEZ-SOLÍS, R., OBREQUE-SLIER, E. Combined effect of gallic acid and catechin against *Escherichia coli*. **LWT - Food Science and Technology**, 59, 896-900, 2014.
- DREOSTI, I. E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition**.16, 692-694, 2000.
- FDA (2015). GRAS substances (SCOGS) database — Select committee on GRAS substances (SCOGS) opinion: Tannic acid (hydrolyzable gallotannins).
- FORTUNY, M., SILVA, E.B., FILHO, A.C., MELO, R. L. F. V., NELE, M., COUTINHO, R.C.C., SANTOS, A.F. Measuring Salinity in crude oils: Evaluation of methods and an improved procedure. **Fuel**, 87, 1241-1248, 2008.

- GALVÃO, K. C. S. Desenvolvimento de nanoemulsões para uso em alimentos e uso tópico). Tese de Doutorado. FZEA – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, 2015, 213p.
- GHOSH, V., MUKHERJEE, A., CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, 20, 338-344, 2013.
- GRUNDHOFER, P., NIEMETZ, R., SCHILLING, G., GROSS, G.G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, 57, 915-27, 2001.
- HARAGUCHI, H., TANIMOTO, K., TAMURA, Y., MIZUTANI, K., KINOSHITA, T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. **Phytochemistry**, 48, 125-9, 1998.
- HERRERA, M. C., DE CASTRO, M.D. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, 23; 1-7, 2005.
- JO, Y.J., KWON, Y.J. Characterization of β -carotene nanoemulsions prepared by microfluidization technique. **Food Science and Biotechnology**, 23, 107-113, 2014.
- KANG, M. S., OH, J. S., KANG, I.C., HONG, S.J., CHOI, C.H. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **Journal of Microbiology**, 46, 744-750, 2008.
- KAPPE, O., DALLINGER, D., MURPHREE, S. Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: **Strategies, Instruments, and Protocols**, 2009.
- KENTISH, S., WOOSTER, T.J., ASHOKKUMAR, M., BALACHANDRAN, S., MAWSON, R., SIMONS, L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 9, 170-175, 2008.
- KHAN, M. K., ABERT-VIAN, M., FABIANO-TIXIER, A.S., DANGLES, O., CHEMAT, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chemistry**, 119, 851-858, 2010.
- KLANG, V., VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 21, 55-76, 2011.
- LANDETE, J. M. Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 52, 936-948, 2012.
- LEE, O. H., LEE, B.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresource Technology**, 101, 3751-3754, 2010.
- LEE, S.-Y., BAEK, S.Y. Effect of chemical sanitizer combined with modified atmosphere packaging on inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 in commercial spinach. **Food Microbiology**, 25, 582-587, 2008.

- LEONG, T. S., KENTISH, S. E., ASHOKKUMAR, M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. **Ultrasonic Sonochemistry**, 16, 721-7, 2009.
- LI, J.-E., FAN, S.T., QIU, Z.H., LI, C., NIE, S.P. "Total flavonoids content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Mosla chinensis* Maxim. cv. Jiangxiangru. **LWT - Food Science and Technology**, 64, 1022-1027, 2015.
- LI, M. K., FOGLER, H. S. Acoustic emulsification. Part 1. The instability of the oil-water interface to form the initial droplets. **Journal of Fluid Mechanics**, 88, 499-511, 1978.
- LI, X., ANTON, N.T., TA, T.M., ZHAO, M., MESSADDEQ, N., VANDAMME, T.F. Microencapsulation of nanoemulsions: novel Trojan particles for bioactive lipid molecule delivery. **International Journal of Nanomedicine**, 6, 1313-1325, 2011.
- LIANFU, Z., ZELONG, L. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. **Ultrasonics Sonochemistry**, 15, 731-737, 2008.
- LIN, Y. S., CHIANG, H.C., KAN, W.S., HONE, E., SHIH, S.J., WON, M.H. Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L extract. **The American Journal of Chinese Medicine**, 20: 233-243, 1992.
- LIU, M., WU, X., LI, J., LIU, L., ZHANG, R., SHAO, D., DU, X. The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon. **Food Control**, 73, Part B: 613-618, 2017.
- LUQUE-GARCÍA, J. L., LUQUE DE CASTRO, M.D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, 22, 41-47, 2003.
- MACIAS-SANCHEZ, M. D., MANTELL, C., RODRIGUEZ, M., MARTINEZ DE LA OSSA, E., LUBIAN, L.M., MONTERO, O. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. **Talanta**, 77, 948-952, 2009.
- MASON, T. G., WILKING, J.N., MELESON, K., CHANG, C.B., GRAVES, S.M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, 18, R635, 2006.
- MCCLEMENTS, D. J. Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Second Edition, 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Surto de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 2016.
- MORI, A., NISHINO, C., ENOKI, N., TAWATA, S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**, 26, 2231-2234, 1987.
- MUNIZ, J., KRETZSCHMAR, A.A., RUFATO, L., PELIZZA, T.R., MARCHI, T., DUARTE, A.E., LIMA, A.P.F., GARANHANI, F. Sistemas de condução para o cultivo de *physalis* no planalto catarinense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33: 830-838, 2011.

- NACZK, M., SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, 29, 1054, 95-111, 2004.
- NARUMI, K., SONODA, J., SHIOTANI, K., SHIGERU, M., SHIBATA, M., KAWACHI, A., TOMISHIGE, E., SATO, K., MOTOYA, T. Simultaneous detection of green tea catechins and gallic acid in human serum after ingestion of green tea tablets using ion-pair high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, 15, 147-53, 2014.
- NASR, M., NAWAZ, S., ELHISSI, A. Amphotericin B lipid nanoemulsion aerosols for targeting peripheral respiratory airways via nebulization. **International Journal of Pharmaceutics**, 15, 611-616, 2012.
- NEWELL, D. G., KOOPMANS, M., VERHOEF, L., DUIZER, E., AIDARA-KANE, A., SPRONG, H., OPSTEEGH, M., LANGELAAR, M., THREFALL, J., SCHEUTZ, F., VAN DER GIESSEN, J., KRUSE, H., Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, 30; S3-15, 2010.
- NIEMETZ, R., GROSS, G.G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. **Phytochemistry**, 66, 2001-2011, 2005.
- NOHYNEK, L. J., ALAKOMI, H.I., KAHKONEN, M.P., HEINONEN, M., HELANDER, I.M., OKSMAN-CALDENTY, K.M., PUUPPONEN-PIMIA, R.H. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. **Nutrition and Cancer**, 54, 18-32, 2006.
- OHEMENG, K. A., SCHWENDER, C.F., FU, K.P., BARRETT, J.F. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 3, 225-230, 1993.
- PAN, X., NIU, G., LIU, H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, 42, 129-133, 2003.
- PÉREZ-GREGORIO, M. R., GONZÁLEZ-BARREIRO, C., RIAL-OTERO, R., SIMAL-GÁNDARA, J. Comparison of sanitizing technologies on the quality appearance and antioxidant levels in onion slices. **Food Control**, 22, 2052-2058, 2011.
- RAUHA, J. P., REMES, S., HEINONEN, M., HOPIA, A., KAHKONEN, M. KUJALA, T. PIHLAJA, K., VUORELA, H., VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, 56, 3-12, 2000.
- RICO, D., MARTÍN-DIANA, A.B., BARAT, J.M., BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology**, 18, 373-386, 2007.

- ROCKENBACK, I. I., RODRIGUES, E., CATANEO, C., GONZAGA, L.V., LIMA, A., MANCINI-FILHO, J., FETT, R. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Alimentos e Nutrição**, 19, 271-276, 2008.
- ROSS, J. A., KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety **Annual Review of Nutrition**, 22, 19-34, 2002.
- ROUHANI, S. H., VALIZADEH, N. SALIMI, S.H. Ultrasonic assisted extraction of natural pigments from rhizomes of curcuma longa L. **Progress in color, colorants and coatings**, 2, 103-113, 2009.
- RUFATO, A. R., RUFATO, L., LIMA, C. S. M., MUNIZ, J. A cultura da physalis. p. 143-193. In: KRETZSCHMAR, A.A., RUFATO, L.; PELIZZA, T. R. (Org.). Pequenas frutas. Florianópolis: UDESC, 2013.
- SABERI, A. H., FANG, Y., MCCLEMENTS, D.J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions by spontaneous emulsification: Effect of propylene glycol and ethanol on formation, stability, and properties. **Food Research International**, 54, 812-820, 2013.
- SAJJADI, S. Effect of mixing protocol on formation of fine emulsions. **Chemical Engineering Science**, 61, 3009-3017, 2006.
- SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, 25, 660-667, 2002.
- SANTTORUS, I. Superfrutas. **Anuário Brasileiro**, 2017, 2ª ed, 72p.
- SHAPIRO, J. E., HOLDER, I.A. Effect of Antibiotic and Chemical Dips on the Microflora of Packaged Salad Mix. **Applied Microbiology**, 8, 341-345, 1960.
- SHIRSATH, S. R., SONAWANE, S.H., GOGATE, P.R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, 53, 10-23, 2012.
- SHU, Y. Y., KO, M. Y., CHANG, Y.S., Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root. **Microchemical Journal**, 74, 131-139, 2003.
- SILVA, E. M., SOUZA, J. N. S., ROGEZ, H., REES, J.F., LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, 101, 1012-1018, 2007.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, 15, 71-81, 2002.
- SOBRATTEE, M. A., NEERGHEEN, V.S., LUXIMON-RAMMA, A., ARUOMA, O.I., BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 579, 200-213, 2005.
- SOUSA, A., MALHEIRO, R., CASAL, S., BENTO, A., PEREIRA, J.A. Antioxidant activity and phenolic composition of Cv. Cobrançosa olives affected through the maturation process. **Journal of Functional Foods**, 11, 20-29, 2014.

- SUWA, M., OIE, S.F., FURUKAWA, H. Efficacy of disinfectants against naturally occurring and artificially cultivated bacteria. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 36, 360-363, 2013.
- TAGURI, T., TANAKA, T., KOUNO, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 27, 1965-1969, 2004.
- TANG, S. Y., SHRIDHARAN, P., SIVAKUMAR, M. Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions--comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer. **Ultrasonics Sonochemistry**, 20, 485-497, 2013.
- TAVEIRA, M., SILVA, L.R., VALE-SILVA, L.A., PINTO, E., VALENTÃO, P., FERRERES, F., DE PINHO, P.G., ANDRADE, P.B. *Lycopersicon esculentum* Seeds: An Industrial Byproduct as an Antimicrobial Agent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 9529-9536, 2010.
- THOSTENSON, E. T. CHOU, T.W. Microwave processing: fundamentals and applications." **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, 30, 1055-1071, 1999.
- TOMASSINI, T. C. B., BARBI, N.S., RIBEIRO, I.M., XAVIER, D.C.D. Gênero Physalis - uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**, 23: 47-57, 2000.
- VYAS, T. K., SHAHIWALA, A., AMIJI, M.M. Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, 347, 93-101, 2008.
- WANG, J., SUN, B., CAO, Y., TIAN, Y., LI, X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, 106, 804-810, 2008.
- WANG, X., JIANG, Y., WANG, Y.W., HUANG, M.T., HO, C.T., HUANG, Q. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. **Food Chemistry**, 108, 419-424, 2008.
- WESTERGREN, T., KALIKSTAD, B. Dosage and formulation issues: oral vitamin E therapy in children. **European Journal of Clinical Pharmacology**, 66, 109-118, 2010.
- WILLIAMS, R. J., SPENCER, J.P., RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules, **Free Radical Biology & Medicine**, 36, 838-849, 2004.
- XYNOS, N., PAPAEFSTATHIOU, G., PSYCHIS, M., ARGYROPOULOU, A., ALIGIANNIS, N., SKALTSOUNIS, A.L. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **The Journal of Supercritical Fluids**, 67: 89-93, 2012.
- ZAGORY, D. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. **Postharvest Biology and Technology**, 15, 313-321, 1999.

ZHANG, Y., Z. SHANG, C. GAO, M. DU, S. XU, H. SONG and T. LIU (2014). "Nanoemulsion for solubilization, stabilization, and in vitro release of pterostilbene for oral delivery." **AAPS PharmSciTech**, 15, 1000-1008, 2014.

ZHANG, H.F., ZHANG, X., YANG, X.H., QIU, N.X. WANG, Y., WANG, Z.Z. Microwave assisted extraction of flavonoids from cultivated *Epimedium sagittatum*: Extraction yield and mechanism, antioxidant activity and chemical composition. **Industrial Crops and Products**, 50, 857-865, 2013.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como mencionado no Capítulo 1, a presente seção apresenta os resultados obtidos desta Tese de Doutorado na forma de artigos científicos. Para isso, optou-se por realizar a tradução para a língua portuguesa, mantendo-se inalterada, qualquer informação ou dado já publicado. Igualmente, a fim de evitar a exaustiva leitura, somente as seções “Material e Métodos” e “Resultados e Discussão” serão apresentadas, uma vez que a parte introdutória e de revisão já se apresenta contemplada no presente documento.

4.1 – “Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids from *Physalis angulata*”

“Extração assistida por microondas de ácidos fenólicos e flavonoides presentes em *Physalis angulata*”

Journal of
Food Process Engineering

Journal of Food Process Engineering ISSN 1745-4530

MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC ACIDS AND FLAVONOIDS FROM *PHYSALIS ANGULATA*

NAIRA CARNIEL¹, ROGÉRIO M. DALLAGO¹, CLAUDIO DARIVA², JOÃO PAULO BENDER³, ANDERSON L. NUNES⁴, ODIVAN ZANELLA⁴, DENISE BILIBIO⁴ and WAGNER LUIZ PRIAMO^{4,5}

¹Department of Food Engineering, URI Campus de Erechim, Erechim Brazil

²Universidade Tiradentes – Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju Brazil

³Department of Engineering, UFFS, Chapecó, Brazil

⁴Department of Food Technology, IFRS – Campus Sertão, Sertão RS, 99170-000, Brazil

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Etanol (95% de pureza, Dinamica, Brazil) foi usado devido à sua compatibilidade ambiental, baixa toxicidade e custo. Ácido gálico, elágico, caféico, rutina, quercetina, mangiferina e o reagente Folin-Ciocalteu foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St.

Louis, MO, USA) e a solução 7.5% de Na₂CO₃ (Dinamica, Brazil) foi preparada pela dissolução de carbonato de sódio em água deionizada.

Preparo da amostra

Os frutos de *physalis* foram coletados manualmente no IFRS-Campus Sertão, RS, Brasil (27°58'48"S 52°15'36"O). As amostras foram secas em estufa de circulação de ar a 30°C ± 1°C/6 dias e trituradas em moinho. A polpa foi separada das sementes e todos os materiais não retidos em uma peneira (10 mesh) foram armazenados em recipientes de vidro e mantidos em freezer até o uso.

Extração-assistida por micro-ondas (MAE)

Todos os experimentos foram conduzidos em um modelo de reator de micro-ondas (modelo Discover SP, CEM Corporation, Matthews, Estados Unidos), o qual é capaz de fornecer 300 W de potência de micro-ondas contínua. O reator consiste de uma câmara interna cilíndrica de 25 mm de diâmetro e 100 mm de altura e o desenho cilíndrico garante irradiação uniforme ao longo de todo o volume de trabalho. Um sensor infravermelho localizado no fundo da câmara foi usado para monitorar a temperatura da reação (controlada com ar comprimido soprado na câmara). A Tabela 5 apresenta as variáveis e níveis investigados na etapa de extração. Os ensaios foram realizados da seguinte forma: diferentes concentrações de etanol (de acordo com a Tabela 5) e massa de *physalis* (previamente pesada numa balança analítica) foram adicionados ao reator e então, micro-ondas foram irradiadas na câmara (10, 20 ou 30 W) durante 30, 40 e 50 s. Finalmente, as soluções do reator foram filtradas através de filtros de seringa PTFE de 0,20µm (Millipore) para eliminar quaisquer sólidos suspensos e então analisadas.

Tabela 5 - Variáveis e níveis investigados na etapa de extração.

Variáveis independentes	Códigos	Variáveis codificadas		
		-1	0	+1
Potência de irradiação (W)	P	10	20	30
Tempo (s)	T	40	50	60
Razão etanol:água (% , v/v)	C	0	50	100
Razão líquido:sólido (mL.g ⁻¹)	L	10:1	20:1	30:1

Determinação do teor total de polifenóis (TPC)

O teor total de polifenóis foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu baseado em Nayak et al. (2015) com algumas modificações. Alíquotas filtradas de cada ensaio (500 µL) foram misturadas com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 2,0 mL de Na₂CO₃. A solução foi deixada em banho-maria (50°C) por 5 min e imediatamente resfriada. A absorbância das misturas de cor azul foi registrada a 765 nm (em triplicata) utilizando um espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão). TPC foi calculado como ácido gálico equivalente (a partir da curva de calibração com uma solução padrão de ácido gálico) e os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (AGE) por grama de extrato (mg AGE/g de extrato).

Cromatografia líquida de alto desempenho com análise por detecção de arranjo de diodo (HPLC-DAD)

A identificação/quantificação de compostos individuais (ácidos fenólicos e flavonoides) foi determinada com base em NAYAK et al., (2015) usando um cromatografo líquido (Shimadzu) equipado com um detector de arranjo de diodos e uma coluna C-18 (5 µm, 4,60 mm × 150 mm, Shimadzu). Todas as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm/15 min antes da análise, o volume de injeção foi de 10 µL e o fluxo da fase móvel de 0,25 mL.min⁻¹. A análise cromatográfica foi realizada a 40°C, utilizando-se a monitoração simultânea dos extratos realizados a 210, 257, 280 e 320 nm. A fase móvel "A" consistiu de uma mistura de ácido fosfórico 1:99 (v / v) em água destilada, enquanto a fase móvel "B" consistiu em 100% de metanol grau HPLC. O gradiente de eluição dos solventes nas proporções de volume foi o seguinte: 0-33 min, 5-100% B; 33-40, 5% B. Os compostos individuais foram identificados pelo tempo de

retenção e quantificados a partir da área do pico em diferentes comprimentos de onda mediante o emprego de padrões externos. A curva de resposta padrão foi uma regressão linear ajustada aos valores obtidos em cada concentração dentro da faixa de 10 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ácido gálico, ácido elágico, ácido cafeico, hidrato de rutina, quercetina e mangiferina.

Análise estatística

A influência de cada fator na obtenção dos compostos fenólicos totais e individuais foi avaliada estatisticamente através de um planejamento Box-Behnken (4 variáveis e 3 níveis), com diferenças significativas a 5% ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 6 apresenta o teor de polifenóis totais obtidos através do processo de extração-assistido por micro-ondas utilizando um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken. O teor máximo de polifenol (3,74 mg AGE/g de extrato) foi obtido a 30 W de potência de irradiação, 50 s de extração, 50% de etanol e 10:1 mL/g (ensaio 8). Por outro lado, o teor mais baixo de polifenol (0,03 mg AGE/g de extrato) foi obtido a 20 W de potência de irradiação, 40 s de extração, 50% de etanol e 30:1 mL/g (ensaio 21), representando uma diferença de cerca de 25%.

Tabela 6 - Matriz experimental, valores codificados (reais) e resposta do conteúdo total de polifenóis e compostos fenólicos individuais.

Ensaio	% de etanol (v/v)	Tempo (s)	Potência (W)	Razão sólido: líquido (mL/g)	TPC (mg AGE/g extrato)	Componentes individuais (mg/L)				
						Ácido Gálico	Ácido Elágico	Ácido Cafeico	Rutina	Mangiferina
1	0 (50)	-1 (40)	+1 (30)	0(20:1)	0,84	4.19	0.27	0.10	0.46	1.41
2	0 (50)	+1 (60)	-1 (10)	0(20:1)	0,64	3.87	0.51	0.14	0.30	1.02
3	-1 (0)	0(50)	0 (20)	-1(10:1)	0,37	3.28	0.37	0.02	0.27	0.89
4	+1 (100)	0(50)	0 (20)	-1(10:1)	0,52	1.76	0.34	N.D	0.47	2.41
5	-1 (0)	0(50)	0 (20)	+1(30:1)	0,63	4.44	N.D	N.D	0.29	1.77
6	+1 (100)	0(50)	0 (20)	+1(30:1)	0,43	1.47	N.D	N.D	0.25	1.95
7	0 (50)	0(50)	-1 (10)	-1(10:1)	2,40	7.27	0.55	0.19	0.78	1.43
8	0(50)	0(50)	+1 (30)	-1(10:1)	3,74	7.28	0.39	0.21	0.86	1.47
9	0 (50)	0(50)	-1 (10)	+1(30:1)	0,53	2.63	0.31	0.10	0.32	1.92
10	0 (50)	0(50)	+1 (30)	+1(30:1)	0,22	3.46	0.36	0.03	0.36	2.06
11	-1 (0)	-1 (40)	0 (20)	0(20:1)	0,55	6.54	0.35	0.10	0.40	2.23
12	-1 (0)	+1 (60)	0 (20)	0(20:1)	0,57	7.77	0.38	0.14	0.43	2.29
13	+1 (100)	-1 (40)	0 (20)	0(20:1)	0,39	1.77	N.D	0.22	0.32	2.29
14	+1 (100)	+1(60)	0 (20)	0(20:1)	1,45	1.40	N.D	N.D	0.34	2.26
15	-1 (0)	0(50)	-1 (10)	0(20:1)	0,54	5.05	0.44	0.11	0.47	2.22
16	-1(0)	0(50)	+1 (30)	0(20:1)	0,50	7.26	0.38	0.14	0.42	2.24
17	+1(100)	0(50)	-1(10)	0(20:1)	2,11	1.42	N.D	N.D	0.32	2.43
18	+1(100)	0(50)	+(30)	0(20:1)	0,29	1.15	N.D	0.26	0.31	2.32
19	0(50)	-1(40)	0 (20)	-1(10:1)	3,04	0.67	N.D	N.D	0.35	1.94
20	0(50)	+1(60)	0 (20)	-1(10:1)	1,29	0.97	N.D	N.D	0.34	1.94
21	0(50)	-1(40)	0 (20)	+1(30:1)	0,03	3.20	0.30	0.10	0.33	1.96
22	0(50)	+1(60)	0 (20)	+1(30:1)	0,42	4.87	0.33	0.14	0.50	2.31
23	0(50)	0(50)	0 (20)	0(20:1)	1,16	4.51	0.35	0.14	0.53	2.28
24	0(50)	0(50)	0 (20)	0(20:1)	1,08	4.09	0.35	0.10	0.50	2.21
25	0(50)	0(50)	0 (20)	0(20:1)	1,08	4.28	0.39	0.13	0.51	2.26
26	0(50)	-1(40)	-1(10)	0(20:1)	0,70	0.50	N.D	N.D	0.35	1.94
27	0(50)	+1(60)	+1(30)	0(20:1)	1,22	5.01	0.44	0.15	0.53	2.31

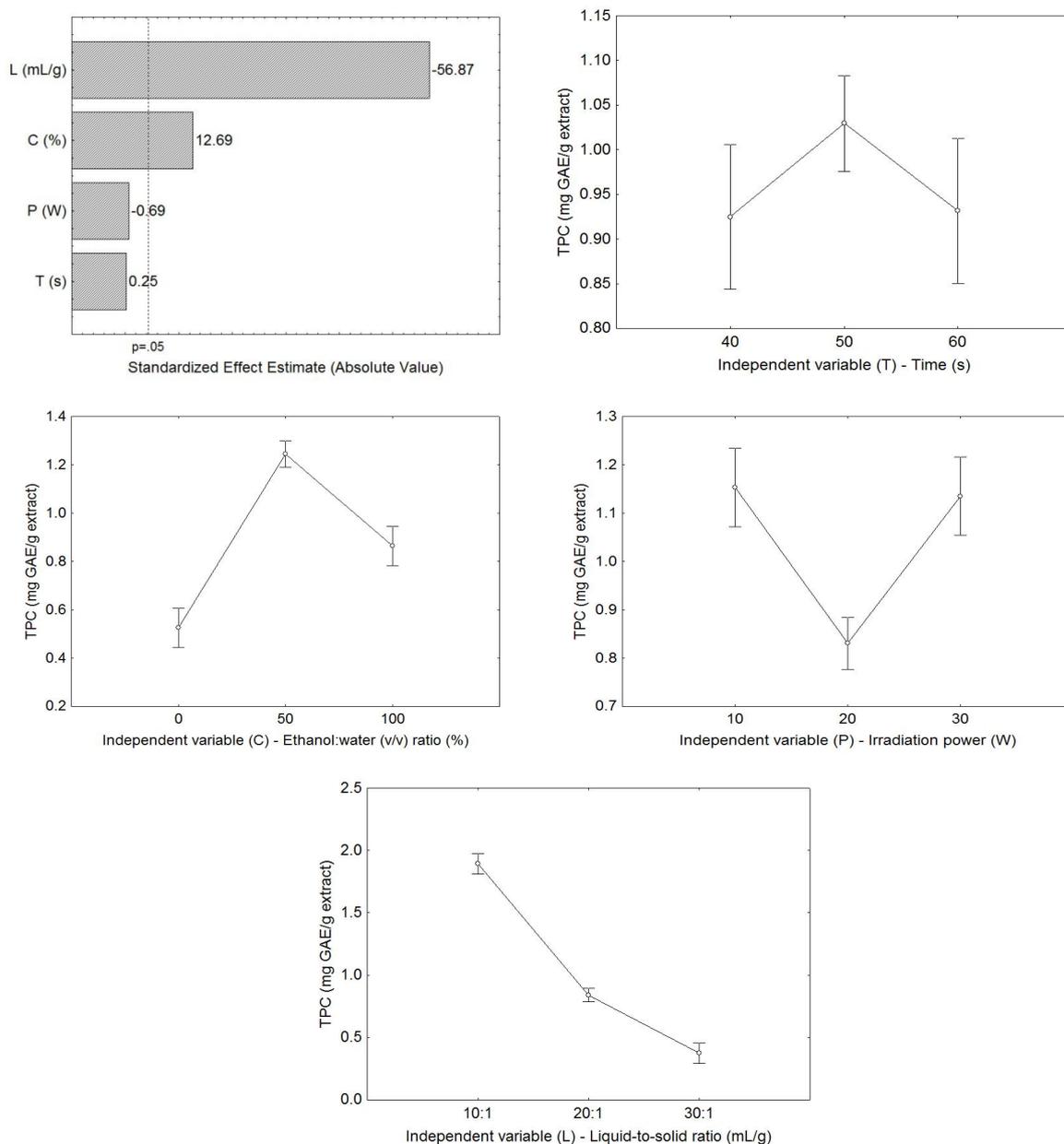
Ácido gálico (280 nm): 16,02 min; Ácido elágico (280nm): 28,38 min; Hidrato de rutina (210 nm): 28,39 min; Quercetina (210 nm): 32,41 min; Ácido cafeico (320 nm): 23,34 min; Kaempferol (360 nm): 33,00 min; Mangiferina (257nm): 24,38 min; N.D: não detectado. * Média da concentração de polifenóis totais e compostos individuais em cada condição de extração. A mesma resposta seguida pela mesma letra (s) não é significativamente diferente com base no HSD de Tukey.

A Figura 6 apresenta o gráfico de Pareto das variáveis independentes em relação ao teor de polifenóis totais. O aumento da razão (líquido: sólido) levou a uma diminuição no TPC, enquanto uma maior concentração de etanol em água promoveu um aumento no total de fenóis extraídos. O efeito do poder de irradiação e o tempo de extração não foram significativos. KRISHNAN e RAJAN (2016) também observaram que a relação solvente-alimentação e temperatura tiveram um efeito significativo sobre o rendimento de flavonoides, taxa de extração e coeficiente de difusão efetivo com a maior relação solvente-a-alimentação e temperatura usando água como solvente. A diminuição do rendimento de extração para uma maior relação solvente:sólido pode dever-se à distribuição não uniforme e, conseqüentemente, à exposição ao aquecimento por micro-ondas (SPARR E BJÖRKLUND, 2000).

Em relação à concentração de etanol, o princípio de "semelhante dissolve semelhante" parece ser o mais adequado para explicar o comportamento de extração (NAYAK et al. 2015). Além disso, de acordo com MUSTAPA et al., (2015), vários estudos também relataram o valor de 50% (v/v) como a concentração ótima de etanol para a extração de polifenóis e/ou antioxidantes a partir de matriz vegetal. PAN et al. (2003) mostraram que a extração de polifenóis foi muito influenciada pela concentração de etanol e, portanto, 50% de etanol em água foi usado como a melhor condição. YANG et al. (2009) mostraram que a taxa de extração de polifenóis aumenta quando a concentração de etanol aumenta de 30 para 70% e diminui quando a concentração de etanol é superior a 70%. BAI et al. (2012) estudaram a extração de polifenóis de bagaço de maçã usando micro-ondas e mostraram condições ótimas de tempo de extração, concentração de etanol e razão de solubilidade de 53,7 s, 62,1% e 22,9:1, respectivamente. TANG et al. (2013) observaram que a energia de micro-ondas teve pouco efeito sobre o TPC quando a energia de micro-ondas, tempo de irradiação e etanol também aumentou.

Para permitir uma visão geral do comportamento em todos os ensaios, a Figura 6 também apresenta as médias observadas e os limites de confiança para cada variável independente no rendimento de TPC, o que é possível confirmar que um TPC máximo pode ser obtido em condições intermediárias de etanol:água e tempo de extração; relação mínima líquido:sólido com baixa ou alta potência.

Figura 6 - Gráfico de Pareto dos efeitos, médias observadas e limites de confiança para as variáveis independentes sobre a quantidade de polifenóis totais (TPC).



Compostos Individuais

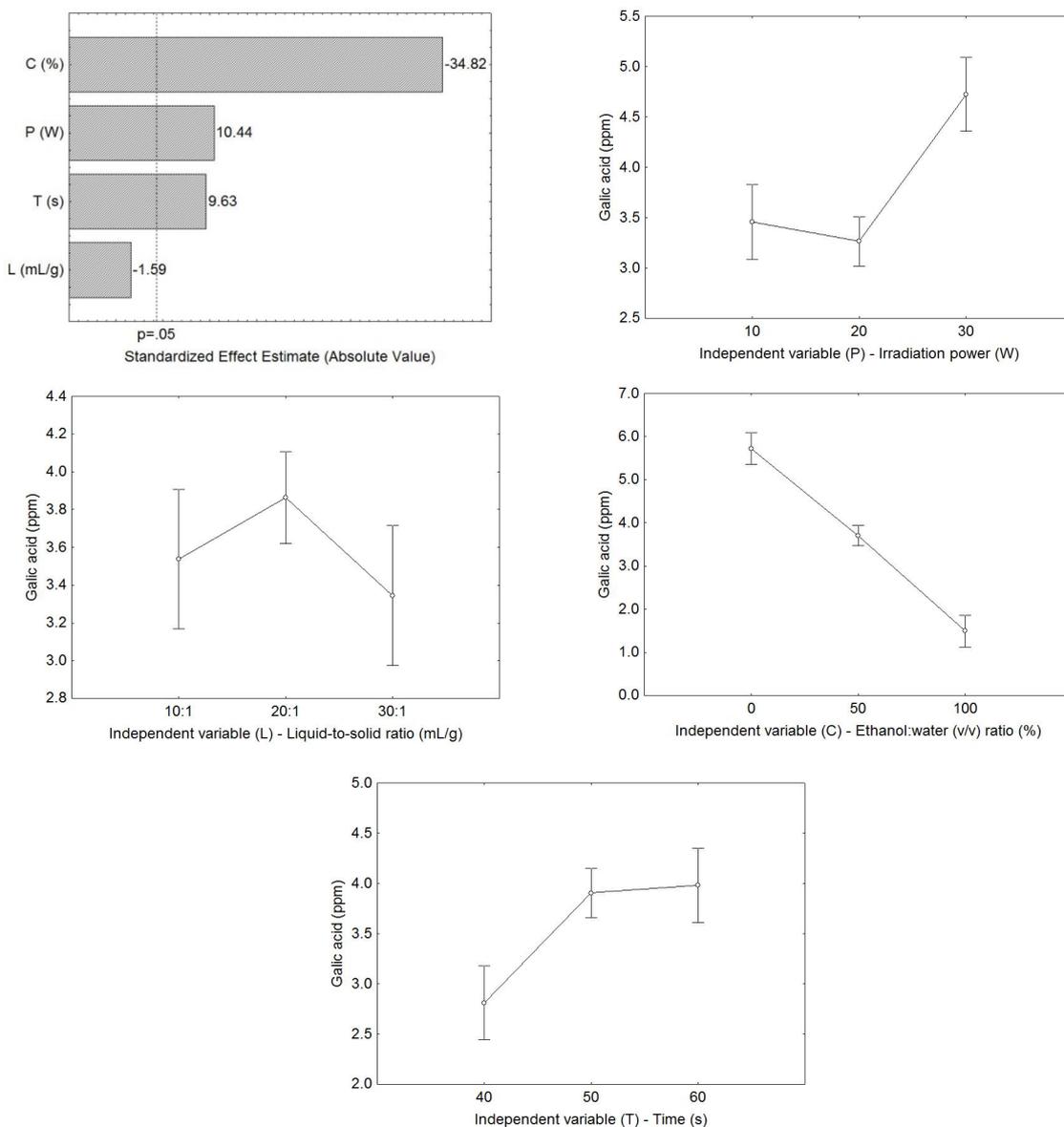
Avaliou-se o efeito de variáveis independentes sobre todos os ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico e ácido cafeico) e flavonoides (hidrato de rutina e Mangiferina). Apenas quercetina não foi detectada em nenhum dos extratos, como também relatado por NAYAK et al. (2015); contudo, não é possível inferir a ausência completa desse composto no fruto. O teor de um composto varia conforme as

condições experimentais (temperatura, razão sólido-líquido, potência de irradiação, porcentagem de etanol, etc.) e as propriedades intrínsecas (maturidade dos frutos, época de colheita e pré-tratamento). Por outro lado, o ácido gálico e a mangiferina foram os dois compostos mais abundantes nos extratos.

Ácidos Fenólicos

O teor de ácido gálico (Tabela 6) variou de 0,5 mg/L (ensaio 26) a 7,77 mg / L (ensaio 12). O teor máximo foi obtido a 20 W de potência de irradiação, 60 s de extração e utilizando 20 mL de água pura por grama de vegetal. Em contraste, o teor mais baixo foi encontrado em 10 W de potência de irradiação, 40 s de extração e também usando 20 mL por grama de *physalis*, mas com uma mistura de 50% (etanol:água), representando uma diminuição de aproximadamente 93%. Com relação ao comportamento de variáveis independentes no ácido gálico extraído (gráfico de Pareto, Figura 7), observou-se o efeito da concentração de etanol (negativo), potência de irradiação e tempo de extração (positivos), ou seja, a quantidade deste composto no extrato aumenta com a potência, e o tempo e porcentagem mínima de etanol. O ácido gálico é um ácido tri-hidroxibenzóico e, de preferência, é extraído por solventes polares, e o alto teor de etanol na mistura atinge um grau de polaridade não favorável à extração (como uma fraca interação oxigênio-hidrogênio e ligações de hidrogênio). Além disso, a alta potência de micro-ondas fornece aquecimento localizado na amostra e atua como uma força motriz para destruir a matriz vegetal para que o analito possa difundir-se e dissolver-se no solvente, explicando assim o comportamento observado (CHAN et al. 2011). De modo semelhante, a Figura 7 mostra também as médias e os limites de confiança para cada variável independente investigada, confirmando que a quantidade máxima de ácido gálico pode ser obtida com relação de concentração intermediária (líquido:sólido), quantidade mínima de etanol em água, potência máxima e tempo de extração.

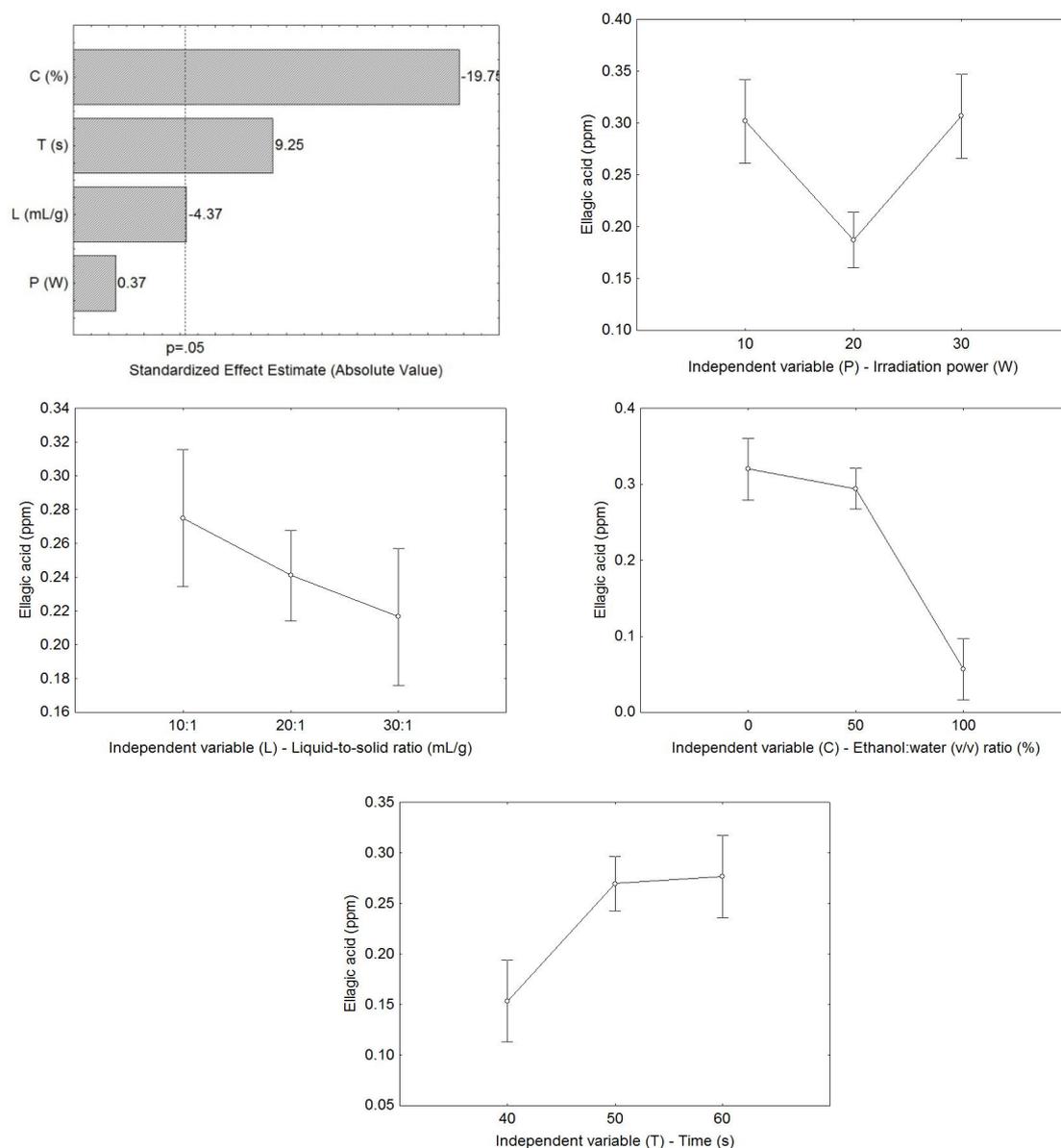
Figura 7 - Gráfico de Pareto dos efeitos, médias observadas e limites de confiança para as variáveis independentes sobre a quantidade de ácido gálico.



Foi observado um teor de ácido elágico variando de 0,27 mg/L (ensaio 1) a 0,55 mg/L (ensaio 7). O teor máximo e mínimo foi obtido a 10 W de irradiação 50 s de extração e 10 mL de uma mistura 50% (etanol: água) por grama de vegetais e 30 W de potência de irradiação, 40 s de extração e também usando 20 mL por grama de vegetais, mas com mistura 50% (etanol: água), respectivamente. A variação apresentou queda de 54%. A Figura 8 mostra o gráfico de Pareto, as médias e os limites de confiança para a variável independente investigada. Novamente, foram observados os efeitos negativos da concentração de etanol e da razão líquido:sólido e efeito positivo do tempo de extração. Além disso, observou-se um efeito negativo da

razão, indicando uma extração máxima de ácido elágico em maior tempo, alta ou baixa potência, concentração mínima e porcentagem de etanol.

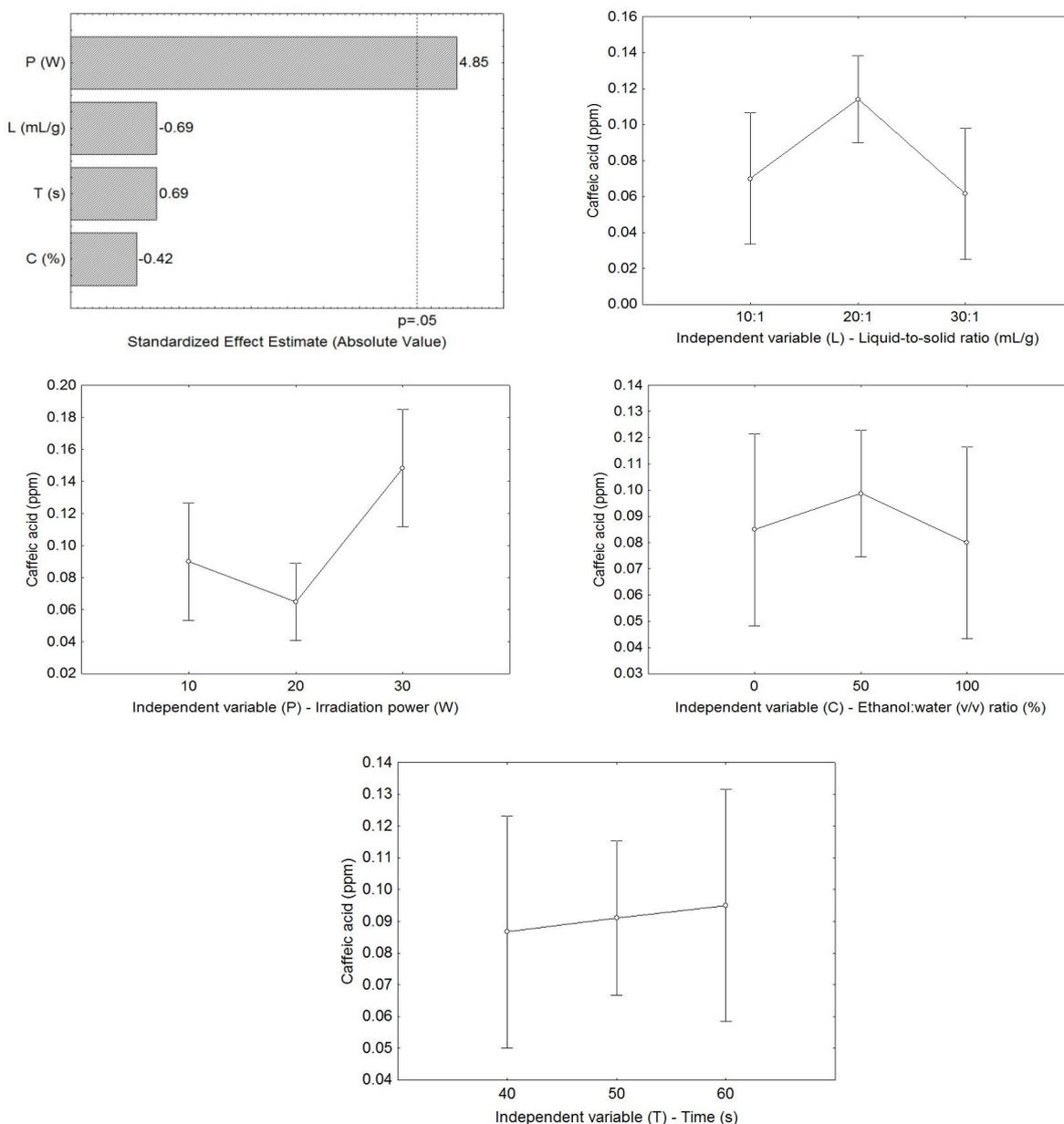
Figura 8 - Gráfico de Pareto dos efeitos, médias observadas e limites de confiança para as variáveis independentes sobre a quantidade de ácido elágico.



O ácido caféico também foi analisado e seu conteúdo variou de 0,02 mg/L (ensaio 3) a 0,26 mg/L (ensaio 18). Curiosamente, 20 mL de etanol por grama de vegetal, 30 W de potência de irradiação e 50 s de extração representaram a maior quantidade extraída. Caso contrário, a 20 W de potência de irradiação, 50 s de extração e utilizando 10 mL de água por grama de vegetal mostraram a menor quantidade extraída. A partir do gráfico de Pareto (Figura 9) foi observado que o poder

de irradiação mostrou efeito positivo, enquanto as outras três variáveis não apresentaram qualquer efeito. Também, como evidenciado a partir das médias observadas, independentemente da razão, tempo de extração e porcentagem de etanol, não haverá diferença na quantidade de ácido cafêico extraído.

Figura 9 - Gráfico de Pareto dos efeitos, médias observadas e limites de confiança para as variáveis independentes sobre a quantidade de ácido cafêico.

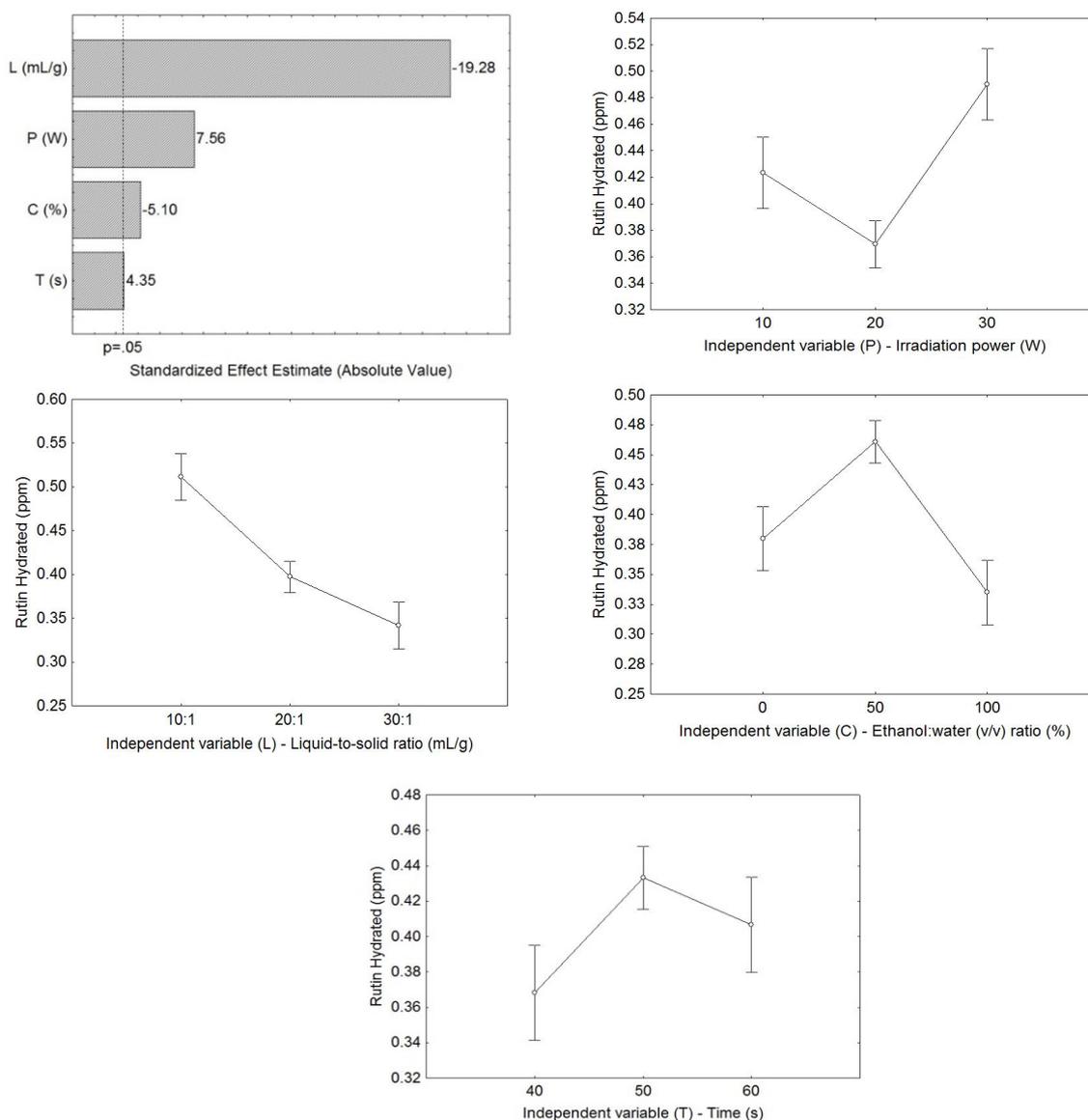


Flavonoides

A rutina e a mangiferina, ambos flavonoides, mostraram comportamento de extração diferentes. Todas as variáveis independentes apresentaram efeito

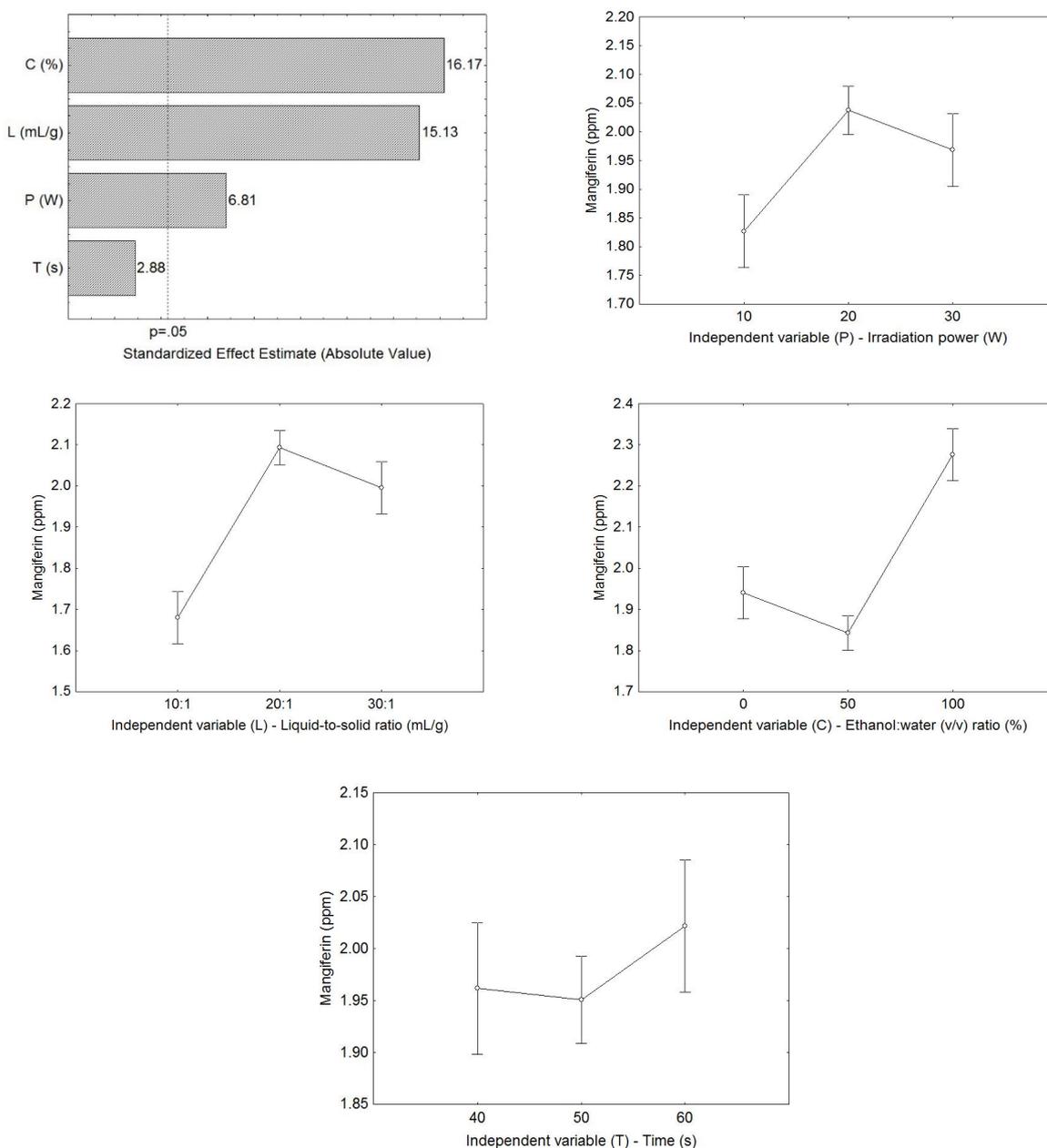
significativo para a extração da rutina. Especificamente, a concentração de etanol e a relação líquido:sólido tiveram efeito negativo, enquanto a potência e o tempo mostraram efeitos positivos. O teor máximo de rutina (0,86 mg/L) foi obtido a 30 W de potência de irradiação, 50 s de extração e utilizando 10 mL por grama de vegetais, mas com uma mistura de 50% (etanol: água), enquanto que a quantidade mínima (0,25 mg/L) foi encontrado a 20 W de potência de irradiação, 50 s de extração e também usando 30 mL de etanol (diferença de 29%). Com base em todos os ensaios, obtiveram-se valores elevados de rutina com porcentagem intermediária de etanol e tempo de extração, baixa relação e alta potência.

Figura 10 - Gráfico de Pareto dos efeitos, médias observadas e limites de confiança para as variáveis independentes sobre a quantidade de rutina.



Quanto à mangiferina, com exceção do tempo de extração, todas as variáveis apresentaram efeito positivo (Figura 11).

Figura 11 - Gráfico de Pareto dos efeitos, médias observadas e limites de confiança para as variáveis independentes sobre a quantidade de rutina.



A quantidade extraída variou de 2,43 mg/L (ensaio 17) a 0,89 mg/L (ensaio 3). A 10 W, 50 s e utilizando 20 mL de etanol puro por grama de vegetais foi obtida a quantidade máxima, mas em contraste, o teor mais baixo de mangiferina foi em 20W, 50s e 10mL por grama de physalis (diferença de 35%). Valores intermédios de potência e razão de irradiação, bem como, percentagem elevada de etanol

conduziram a um maior rendimento deste composto.

Em termos de flavonoides, ZHANG et al. (2013) verificaram a extração máxima quando a concentração de etanol foi de 60%, corroborando com XIE et al. (2015), onde os autores observaram que o rendimento de flavonoides aumentou quando as concentrações de etanol aquoso variaram de 50 a 70%. Ambas as pesquisas sugerem que a adição de água pode melhorar a eficiência de extração porque a água tem potencial de aumentar a polaridade do etanol aquoso. Outro motivo possível pode ser devido ao aumento do inchaço do material vegetal pela água, o que aumenta a área de superfície de contato entre a matriz vegetal e o solvente (HEMWIMON et al. 2007).

Por outro lado, MUSTAPA et al. (2015) mencionou pesquisas as quais relatam que uma maior concentração de água pode reduzir o rendimento de extração, uma vez que o grau de polaridade não é mais favorável para a extração quando o teor de água aumenta substancialmente. De fato, a seleção do solvente é um ponto crítico no processo e uma análise individual de cada composto alvo deve ser realizada para obter a separação desejável, ou seja, devido á complexidade dos materiais encontrados nas plantas, o solvente pode determinar a quantidade e o tipo de compostos a serem extraídos. Em ambos os casos de extração de flavonoides, o aumento do rendimento com a potência das micro-ondas pode estar relacionado aos efeitos diretos sobre biomoléculas por condução iônica e rotação dipolar que resultam em dissipação de energia no interior do material solvente/vegetal, gerando movimento molecular e aquecimento (GFRERER e LANKMAYR, 2005; XIAO et al., 2008). Normalmente, quando a potência das micro-ondas é aumentada, mais energia eletromagnética é rapidamente transferida para o sistema, melhorando, conseqüentemente, a eficiência de extração (Xiao, Han et al., 2008). No entanto, o efeito do micro-ondas sob o solvente não é completamente claro. Por exemplo, MUSTAPA et al. (2015) observaram que um aumento na energia específica absorvida não acompanhou a melhora no rendimento da extração e, portanto, duas hipóteses precisam ser investigadas em termos de energia absorvida associada às variações nas propriedades da mistura solvente.

4.2 – “The effects of ultrasound-assisted extraction on polyphenolics compounds obtained from *Physalis angulata* using response surface approach”

“Efeitos da extração-assistida por ultrassom de compostos polifenólicos presentes em *Physalis angulata* usando a metodologia da superfície de resposta”

Acta Scientiarum



<http://periodicos.uem.br/ojs/acta>
ISSN on-line: 1807-8664
Doi: 10.4025/actascitechnol.v40i4.35530

SCIENCE, FOOD TECHNOLOGY AND FOOD ENGINEERING

The effects of ultrasound-assisted extraction on polyphenolics compounds obtained from *Physalis angulata* using response surface approach

Naira Carniel¹, Rogério Marcos Dallago¹, Denise Bilibio², Anderson Luiz Nunes², João Paulo Bender³ and Wagner Luiz Priamo⁴

Materiais e métodos

Materiais e preparação de amostras

Amostras de physalis foram obtidas e preparadas de acordo com (CARNIEL et al., 2017). Além disso, os seguintes materiais foram utilizados neste trabalho: etanol (95% de pureza, Dinamica, Diadema/Brasil); flavonoides, ácidos fenólicos e reagente de Folin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e Na₂CO₃ (Dinamica, Diadema/Brasil).

Procedimento de extração

A extração-assistida por ultrassom (EAU) foi realizada de acordo com (FILIPPI et al, 2015) utilizando banho ultrassônico (Unique, USC-1800A) com frequência de 40 kHz e potência de 154W. Frequências na faixa de 18 a 40 kHz pode promover a ruptura da parede celular, o que facilita o acesso do solvente ao conteúdo celular (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2014). O procedimento de extração foi conduzido

como previamente descrito por (Conte et al., 2016), mas no trabalho atual, o sistema foi mantido em contato durante 120 min e no final, os tubos foram centrifugados (4000 rpm/5 min) e o sobrenadante usado para análises posteriores. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Metodologia Experimental e análise

O delineamento composto central rotacional (DCCR), apresentado na Tabela 7, consistiu em um planejamento fatorial 2^3 completo (8 experimentos), pontos axiais (6 experimentos) e pontos centrais replicados (6 experimentos), totalizando 20 experimentos (PEREIRA et al., 2016; RODRIGUES e IEMMA, 2005). Todos os ensaios foram realizados com a máxima potência de ultrassom e em ordem aleatória para minimizar os efeitos da variabilidade inesperada nas respostas observadas. Os dados foram analisados utilizando o software STATISTICA 5.0 (Statsoft, Oklahoma, EUA) considerando um nível de significância ($p \leq 0,05$) pela análise de variância (ANOVA).

Caracterização de Compostos

O conteúdo total de polifenóis (TPC) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, como descrito anteriormente por CARNIEL et al. (2017). A concentração de ácidos fenólicos e flavonoides nos extratos foi avaliada por HPLC-DAD (dentro da faixa de 1-100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para ambos os compostos) de acordo com condições analíticas relatadas por (CARNIEL et al., 2016) e (NAYAK et al., 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração-assistida por ultrassom

O teor de polifenóis totais foi primeiramente estudado através do processo de extração-assistido por ultrassom utilizando-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , cuja matriz e respectivos resultados estão apresentados na

Tabela 7. A partir dos resultados obtidos pode-se observar que o teor de polifenóis (TPC) variou de 1,039 a 0,117 mg AGE/g de extrato, obtido a 40°C, 0,01g.mL⁻¹ e 53% de etanol e 40°C, 0,06 g.mL⁻¹ e 91% de etanol, respectivamente. A quantidade mínima e máxima de ácido gálico foi de 11,15 mg.L⁻¹ (ensaio 14, realizado a 40°C, 91 % de etanol e 0,06 g de physalis por mL de solvente) e 104,88 mg.L⁻¹ (ensaio 1, a 35°C, 30 % de etanol e 0,03 g de physalis por mL de solvente), representando uma diminuição aproximada de 9,4 vezes. O ácido elágico foi observado apenas em dois ensaios e a composição variou de 3,28 mg.L⁻¹ (ensaio 4) a 8,37 mg.L⁻¹ (ensaio 7). Finalmente, o teor de ácido caféico variou de 0.70 mg.L⁻¹ (ensaio 12) a 4.04 mg.L⁻¹ (ensaio 1).

Em relação aos flavonoides, ambos apresentaram comportamento de extração diferente. A quercetina não foi detectada em nenhum extrato (resultados semelhantes encontrados por NAYAK et al., (2015) e CARNIEL et al., (2016). O kaempferol mostrou comportamento de extração similar ao ácido elágico e foi encontrado apenas em 2 ensaios. Finalmente, os teores de rutina e mangiferina variaram de 1,71 mg.L⁻¹ e 2,58 mg.L⁻¹ a 1,7 mg.L⁻¹ e 1,87 mg.L⁻¹, respectivamente.

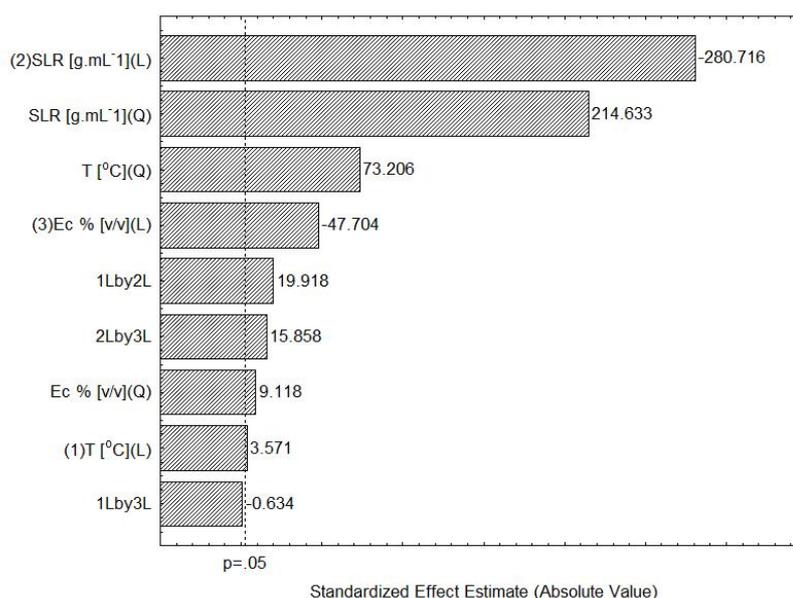
Tabela 7 - Matriz do DCCR 23 (valores reais e codificados) e respectiva resposta em termos de teor total de polifenóis e compostos individuais pelo método de ultrassom.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão Sólido:Solvente (g.mL ⁻¹)	%Etanol (v/v)	Polifenóis totais (mg/g)	Componente Individual (mg.L ⁻¹)					
					Ácido Gálico	Ácido Elágico	Ácido Cafeico	Rutina	Kaempferol	Mangiferina
1	-1 (35)	-1 (0.03)	-1 (30)	0.627 ^b	104.88 ^a	N.D	4.04 ^a	7.47 ^{bc}	N.D	8.76 ^c
2	+1 (45)	-1 (0.03)	-1 (30)	0.549 ^c	78.20 ^b	N.D	3.69 ^b	6.37 ^c	N.D	13.26 ^a
3	-1 (35)	+1 (0.09)	-1 (30)	0.191 ^{hi}	34.39 ^g	N.D	1.39 ^{ef}	2.42 ^{de}	N.D	2.98 ^g
4	+1 (45)	+1 (0.09)	-1 (30)	0.242 ^{fg}	48.39 ^{de}	3.28 ^b	1.90 ^d	3.38 ^{de}	0.95 ^b	5.17 ^e
5	-1 (35)	-1 (0.03)	+1 (76)	0.483 ^d	51.16 ^d	N.D	3.34 ^c	8.33 ^b	N.D	10.46 ^b
6	+1 (45)	-1 (0.03)	+1 (76)	0.453 ^d	46.91 ^{de}	N.D	3.39 ^c	6.54 ^c	N.D	10.83 ^b
7	-1 (35)	+1 (0.09)	+1 (76)	0.160 ^{hij}	16.60 ^{hij}	8.37 ^a	1.31 ^{efg}	2.42 ^{de}	N.D	4.06 ^f
8	+1 (45)	+1 (0.09)	+1 (76)	0.158 ^{hij}	15.72 ^{ij}	N.D	1.10 ^{gh}	2.43 ^{de}	N.D	3.84 ^f
9	-1.68 (32)	0 (0.06)	0 (53)	0.262 ^f	35.07 ^g	N.D	2.00 ^d	3.49 ^d	N.D	6.22 ^d
10	+1.68 (48)	0 (0.06)	0 (53)	0.319 ^e	37.88 ^{fg}	N.D	1.93 ^d	4.11 ^d	1.87 ^a	5.75 ^{de}
11	0 (40)	-1.68 (0.01)	0 (53)	1.039 ^a	66.80 ^c	N.D	N.D	58.28 ^a	N.D	N.D
12	0 (40)	+1.68 (0.11)	0 (53)	0.129 ^j	13.59 ^j	N.D	0.70 ⁱ	1.71 ^e	N.D	2.58 ^g
13	0 (40)	0 (0.06)	-1.68 (14)	0.198 ^{gh}	43.66 ^{ef}	N.D	1.49 ^e	2.90 ^{de}	N.D	5.24 ^e
14	0 (40)	0 (0.06)	+1.68 (91)	0.117 ^j	11.15 ^j	N.D	N.D	2.96 ^{de}	N.D	N.D
15	0 (40)	0 (0.06)	0 (53)	0.139 ^j	21.52 ^{hi}	N.D	1.11 ^{gh}	2.78 ^{de}	N.D	N.D
16	0 (40)	0 (0.06)	0 (53)	0.143 ^{ij}	20.93 ^{hi}	N.D	1.14 ^{fgh}	3.88 ^d	N.D	N.D
17	0(40)	0(0.06)	0(53)	0.142 ^j	20.52 ^{hi}	N.D	0.99 ^h	2.95 ^{de}	N.D	N.D
18	0(40)	0(0.06)	0(53)	0.138 ^j	21.05 ^{hi}	N.D	1.05 ^{gh}	3.07 ^{de}	N.D	N.D
19	0(40)	0(0.06)	0(53)	0.136 ^j	21.82 ^h	N.D	1.24 ^{efgh}	3.55 ^d	N.D	N.D
20	0(40)	0(0.06)	0(53)	0.137 ^j	20.95 ^{hi}	N.D	1.09 ^{gh}	2.71 ^{de}	N.D	N.D

Ácido gálico (280 nm): 16,02 min; Ácido elágico (280nm): 28,38 min; Hidrato de rutina (210 nm): 28,39 min; Quercetina (210 nm): 32,41 min; Ácido cafeico (320 nm): 23,34 min; Kaempferol (360 nm): 33,00 min; Mangiferina (257nm): 24,38 min; N.D: não detectado. * Média da concentração de polifenóis totais e compostos individuais em cada condição de extração. A mesma resposta seguida pela mesma letra (s) não é significativamente diferente com base no HSD de Tukey.

VU et al, (2016) mencionaram que os rendimentos de recuperação de compostos fenólicos, flavonoides, proantocianidinas e propriedades antioxidantes foram afetados pelos parâmetros de extração. Verificou-se que as condições de extração ótimas se encontravam a uma temperatura de 30 °C, tempo de ultrassom de 5 min, potência de 150 W, razão de amostra:solvente de 8:100 g/mL e concentração de acetona de 60%. Sob estas condições ótimas, 23,49 mg de compostos fenólicos, 39,46 mg de flavonoides de 1g de casca de banana foram extraídos. TSAI et al. (2014) otimizou a extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos de *Phyllanthus emblica*. Em condições ótimas (15 min de tempo de extração, 60 °C de temperatura de extração, 70% de concentração de etanol, 56 kHz de frequência ultrassônica e uma relação de sólidos:solvente de 1:50), a taxa de lixiviação dos compostos fenólicos foi até 55,34 mg.g⁻¹. Finalmente, BATISTON et al. (2013) mostraram que o teor fenólico total de dez frutos variou de 58,97 a 675,73 mg.100 g⁻¹. A Figura 12 apresenta o gráfico de Pareto dos efeitos estimados de variáveis testadas no planejamento experimental sobre o composto fenólico total (TPC).

Figura 12 - Gráfico de Pareto dos efeitos estimados de variáveis testadas no planejamento experimental sobre o composto fenólico total (TPC), onde: SLR é a razão de sólido:líquido (g.mL⁻¹), T é a temperatura (°C) e Ec é a porcentagem de etanol em água (v/v).



Com base no gráfico de Pareto é possível perceber que todas as variáveis

independentes mostraram um efeito significativo na quantidade de polifenóis totais. Apenas a interação linear entre a temperatura e concentração de etanol não foi significativa. O aumento da concentração de etanol e razão sólido-líquido promoveu uma diminuição de TPC, mas, por outro lado, o aumento do T levou a um aumento na extração desses compostos.

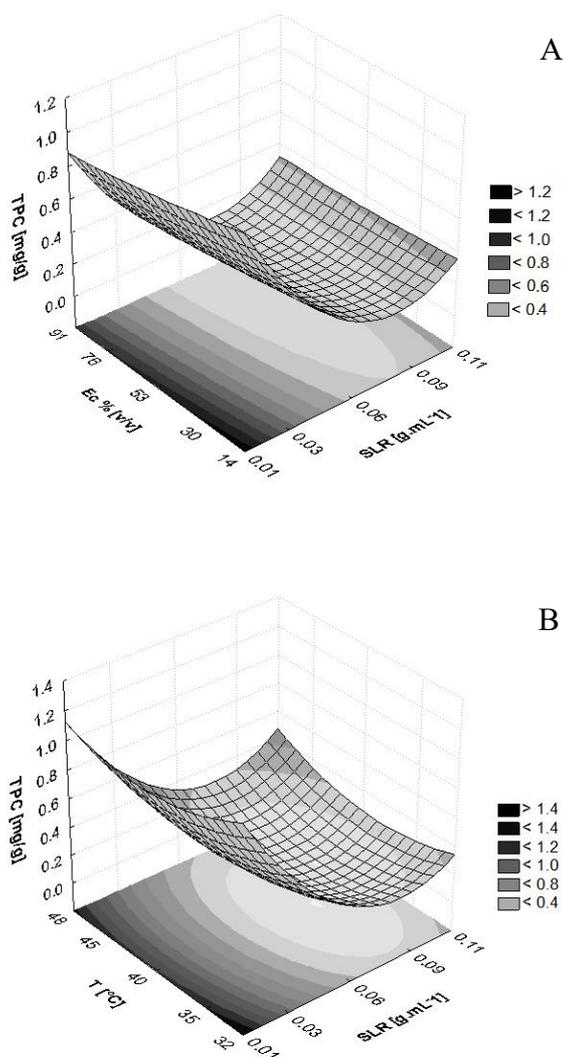
A literatura relata comportamentos semelhantes com os resultados obtidos neste trabalho. Por exemplo, a influência positiva das altas temperaturas pode ser devida ao aumento da solubilidade e difusividade, bem como, uma diminuição na viscosidade dos compostos fenólicos. Ambos os efeitos melhoram a transferência de massa e aceleram as taxas de extração. Em relação à proporção sólido-líquido, deve-se observar que o volume de solvente deve ser suficiente para permitir uma boa hidratação e inchaço da fase sólida (PRADAL et al. 2016). Em termos de rendimento, YUE et al. (2012) obtiveram 13,26 mg AGE/g de maçã verde a 30 min, potência de 519,39 W, 50 °C e concentração de etanol de 50%. HAMINIUK et al., (2012) apresentaram uma revisão interessante sobre compostos fenólicos em frutas, sugerindo resultados de 14 frutos com teor de polifenóis variando de 226,00 a 1515,90 AGE / 100g de peso fresco.

A equação 1 apresenta um modelo quadrático (TPC em função das variáveis independentes codificadas) com base na análise dos efeitos apresentados:

$$TPC = 0.1391 + 0.0027 \times T + 0.0538 \times T^2 - 0.2118 \times SLR + 0.1578 \times SLR^2 - 0.0360 \times Ec + 0.0067 \times Ec^2 + 0.0196 \times T \times SLR - 0.0006 \times T \times Ec + 0.0156 \times SLR \times Ec \quad (\text{Equação 1})$$

A análise de variância indicou que o $F_{calculado}$ foi nove vezes maior do que o valor do $F_{tabelado}$ e o coeficiente de regressão (R^2) foi 0,9640, ou seja, com base nesse valor, somente 3,60% da variação total não foi explicada pelo modelo. Portanto, como o valor de R^2 mostrou alta significância, o modelo foi utilizado para prever as condições ótimas do processo de extração. A seguir a Figura 13 apresenta a superfície de resposta.

Figura 13 - Superfície de resposta do conteúdo de polifenóis totais (TPC) em função de: A) temperatura *versus* razão sólido-líquido e B) concentração de etanol *versus* razão sólido-líquido.



As Figuras 13, A e B, apresentam os efeitos da porcentagem de etanol *versus* razão sólido-líquido e temperatura *versus* razão sólido-líquido na recuperação de TPC, respectivamente. Em ambos os casos, com baixas razão sólido-líquido e valores intermediários de porcentagem de etanol, pode ser recuperada uma quantidade elevada de polifenóis totais. Embora a temperatura tenha mostrado um pequeno efeito positivo sobre o conteúdo de polifenóis totais recuperado, pode ser adotado um valor intermediário (cerca de 40°C), preservando, portanto, estes compostos termolábeis.

Compostos Individuais

De acordo com a análise estatística verificou-se que as variáveis do processo podem ser moduladas visando atingir a quantidade desejável de ácido fenólico e flavonoides ($p \leq 0,05$). A quantidade mínima e máxima de ácido gálico foi $0,0111 \text{ mg.g}^{-1}$ (ensaio 14, realizado a 40°C , 91% de etanol e 0,06 g de physalis por mL de solvente) e $0,1049 \text{ mg.g}^{-1}$ (ensaio 1, a 35°C , 30% de etanol e 0,03 g de physalis por mL de solvente), representando uma diminuição em torno de 9,4 vezes. O ácido elágico foi observado apenas em dois ensaios e a composição variou de $0,0033 \text{ mg.g}^{-1}$ (ensaio 4) a $0,0084 \text{ mg.g}^{-1}$ (ensaio 7). Finalmente, o conteúdo de ácido caféico variou de $0,0007 \text{ mg.g}^{-1}$ (ensaio 12) a $0,0040 \text{ mg.g}^{-1}$ (ensaio 1).

Em relação aos flavonoides, ambos mostraram diferentes comportamentos de extração. A quercetina não foi detectada em nenhum extrato (resultados similares encontrados por NAYAK et al., (2015) e CARNIEL et al., (2017). Kaempferol apresentou comportamento de extração similar ao ácido elágico e só foi encontrado em 2 ensaios, variando de $0,0009 \text{ mg.g}^{-1}$ (ensaio 4) a $0,0019 \text{ mg.g}^{-1}$ (ensaio 10). A rutina e a mangiferina apresentaram os valores mínimos de $0,0017 \text{ mg.g}^{-1}$ e $0,0026 \text{ mg.g}^{-1}$ (ensaio 12), enquanto que os teores máximos foram $0,0583 \text{ mg.g}^{-1}$ e $0,0133 \text{ mg.g}^{-1}$ para cada composto, respectivamente. Para fins comparativos, CARNIEL et al., (2017) adotaram a extração assistida por micro-ondas e encontraram valores máximos de TPC, ácidos fenólicos (gálico, elágico e caféico) e flavonoides (rutina e mangiferina) iguais a $3,74 \text{ mg GAE.g}^{-1}$, $7,77 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,55 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,26 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,86 \text{ mg.L}^{-1}$, $2,43 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, e, embora o TPC aqui encontrado fosse menor do que usando a extração assistida por micro-ondas, deve-se notar que a quantidade extraída de cada composto foi consideravelmente maior. FU et al., (2011) apresentaram um estudo sobre as capacidades antioxidantes e os teores fenólicos totais de 62 frutos, indicando que a quantidade máxima de ácidos fenólicos (ácido gálico, elágico e caféico) e flavonoides (rutina e kaempferol) foi de $50,25 \text{ mg.100g}^{-1}$, $2,85 \text{ mg.100g}^{-1}$, $2,16 \text{ mg.100g}^{-1}$, $1,89 \text{ mg.100g}^{-1}$ e $6,67 \text{ mg.100g}^{-1}$, respectivamente.

VU et al., (2016) mencionaram que os rendimentos de recuperação de compostos fenólicos, flavonoides, proantocianidinas e propriedades antioxidantes foram afetados pelos parâmetros de extração. As condições ótimas de extração foram encontradas na temperatura ultrassônica de 30°C , tempo ultrassônico de 5 min, potência ultrassônica de 150 W, relação amostra/solvente de $8:100 \text{ g.mL}^{-1}$ e concentração de acetona de 60%. Sob estas condições ótimas, $23,49 \text{ mg}$ de

compostos fenólicos, 39,46 mg de flavonoides a partir de 1 g de casca de banana podem ser extraídos. TSAI et al., (2014) otimizaram a extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos de *Phyllanthus emblica* e sob condições ótimas (15 min de tempo de extração, 60°C de temperatura de extração, 70% de etanol, 56 kHz de ultrassom e uma relação 1:50 sólido/solvente), a taxa de lixiviação de compostos fenólicos foi de até 55,34 mg.g⁻¹. Por fim, BATISTON et al., (2015) mostraram o teor total de fenólicos de dez frutos variando de 58,97 a 675,73 mg.100g⁻¹.

Os resultados encontrados podem ser considerados complementares aqueles da literatura científica. Além disso, mostram-se relevantes e fornecem subsídios para o campo de purificação/separação, uma vez que estes compostos apresentam propriedades farmacológicas bem conhecidas e indicam aplicações futuras promissoras.

4.3 – “GRAS nanoemulsion from Goldenberry to the control of foodborne bacteria on fresh cucumber”

“Nanoemulsões a partir de *Physalis* para o controle de bactérias de origem alimentar em pepinos frescos”

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais, procedimento de extração e caracterização

Etanol (95%, Dinamica, Diadema/Brasil); Na₂CO₃ (Dinamica, Diadema/Brasil); flavonoides (mangiferina, rutina e quercetina), ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico e ácido cafeico), Tween 80, reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e triglicerídeos de cadeia média (MCT, Miglyol® 812) foram utilizados neste trabalho. Os extratos fenólicos utilizados nas nanoemulsões foram preparados como descrito a seguir: as amostras de *physalis* foram adquiridas e preparadas de acordo com Carniel et al., (2016) e a extração dos compostos fenólicos deu-se através de extração-assistida por ultrassom conforme descrito por CONTE et al., (2016), com algumas modificações. Resumidamente, as *physalis* foram adicionadas a uma solução etanólica (30% v/v) a 30mg.mL⁻¹ durante 120min, 35°C e a 154W de potência de ultrassom. A solução foi então centrifugada (4000 rpm/5 min) e a fase líquida evaporada sob vácuo a 30°C ± 1°C durante 2 dias para posterior liofilização. O teor total de polifenóis (TPC) foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (CARNIEL et al., (2017) e a concentração de ácidos fenólicos e flavonoides nos extratos foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) conforme descrito na literatura (CARNIEL et al., 2017; NAYAK et al., 2015).

Preparação e caracterização de nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas por emulsificação usando um método de titulação (fase orgânica adicionada lentamente em uma fase aquosa contendo um agente surfactante) de acordo com BOUCHEMAL et al. (2004), com algumas modificações. A fase oleosa foi composta por um triglicerídeo de cadeia média (MCT - triglicerídeo caprílico/cáprico, agente solubilizante - 33,3 mg), lecitina de soja

(estabilizador, 7,2 mg) e etanol (co-solvente para aumentar a solubilidade dos antimicrobianos em MCT, 3,3 mg). A fase aquosa foi composta por Tween 80, um tensoativo não iônico de grau alimentício com o objetivo de estabilizar as gotas de nanoemulsão (22,5 mg) e água ultrapura (10 mL). Com o objetivo de estudar o potencial de diferentes formulações, a fase oleosa foi completada (individualmente) com: extrato seco de physalis (NE) obtido como descrito anteriormente (agente antimicrobiano, 200 mg) e ácido gálico (NGA) - (componente principal no extrato, 200 mg). Ambas as fases foram homogeneizadas separadamente por 10 minutos usando um sonicador (Modelo 300, *Fisher Scientific Sonic Dismembrator*) a $750\text{ W}/25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. O etanol foi então evaporado e a fase oleosa foi lentamente adicionada à fase aquosa contendo surfactante sob sonicação.

Caracterização das nanoemulsões

O tamanho de partícula e a distribuição de tamanho foram determinados pelo método dinâmico de espalhamento de luz a laser usando um equipamento Malvern ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). As amostras das nanoemulsões foram diluídas a 1:1000 em água e sua carga superficial (potencial Zeta, ζ) foi determinada a 25°C.

Ensaio Antimicrobianos

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das nanoemulsões

A CIM da nanoemulsão contendo o extrato de physalis foi avaliada para *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Salmonella Typhimurium* ATCC 19585 e *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 700927 usando o método de microdiluição em caldo de acordo com as diretrizes do *Clinical Laboratories Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012). Culturas estoque de cada microrganismo foram cultivadas em caldo TSB (Difco, Detroit, MI) a 37 °C durante 18 h. As nanoemulsões ($20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram dissolvidas em Caldo Mueller-Hinton (MHB, Difco, Detroit, MI) e então serialmente diluídas em placa de 96 poços. O inóculo bacteriano ($50\mu\text{L}$) foi adicionado aos poços a fim de se obterem concentrações finais de 20,0, 10,0, 5,0, 2,5, 1,2, 0,6, 0,31, 0,15 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. O antibiótico padrão ampicilina (Rosco, Taastrup, Dinamarca) foi usado como controle

positivo e dissolvido em água ultrapura para obter uma concentração de estoque de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O crescimento bacteriano foi inibido quando a solução no poço permaneceu límpida após 24 h de incubação a 37 °C e a CIM foi determinada como a menor concentração que não apresentou sinais visíveis de crescimento.

Inoculação dos pepinos e aplicação de nanoemulsões no manejo pós-colheita de patógenos bacterianos

Mini pepinos foram adquiridos em supermercado local (Kroger, Detroit/MI/EUA) e sanitizados em saco plástico com alvejante comercial contendo 5,25 % de hipoclorito de sódio (Clorox Company, Oakland, CA) usando uma diluição em água estéril para uma concentração final de 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, durante 15 minutos. Decorrido este tempo, a solução sanitizante foi descartada e então adicionada água destilada esterilizada ao saco durante 2 minutos sob agitação manual. Após sanitização, os pepinos foram secos em uma câmara microbiológica à temperatura ambiente durante 1 h. Individualmente as bactérias foram inoculadas nos pepinos (4 unidades para cada tratamento) usando um saco homogeneizador durante 30 min/37 °C e imediatamente secas na mesma câmara microbiológica durante 1 h. Para avaliar a capacidade das duas nanoemulsões em diminuir as cargas bacterianas, foram estudados 3 tratamentos: 1S: pulverização única da nanoemulsão em toda a superfície do pepino (totalizando 3 pulverizações); 2S: pulverização dupla da nanoemulsão em toda a superfície do pepino (totalizando 6 pulverizações); Mergulho: pepino mergulhado em nanoemulsão (10 mL da nanoemulsão). Após cada tratamento, os pepinos foram armazenados em sacos Ziploc a 4 °C/24 h e, em seguida, 90 mL de água peptonada foi adicionada ao saco sob agitação manual durante 1 min. Finalmente, diluições seriadas foram realizadas em uma placa, incubadas a 37 °C e, no 3º dia, as colônias de microrganismos foram contadas e calculadas em termos de UFC/mL (considerando o número de colônias na placa, a diluição da amostra e volume).

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A sobrevivência microbiana em diferentes grupos de tratamento foi comparada por análise de variância (ANOVA) com um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) aplicado usando o Software

STATISTICA 5.0 (Statsoft Inc., EUA). Diferenças significativas no nível de 5% ($\alpha = 0,05$) foram analisadas pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do extrato (análise HPLC-DAD)

Extrato de physalis enriquecido em polifenóis apresentou teor máximo de 0,627 mg AGE.g⁻¹ de fruta, 104,80 mg.L⁻¹ de ácido gálico, 4,04 mg.L⁻¹ ácido caféico, 7,47 mg.L⁻¹ de rutina e 8,76 mg.L⁻¹ de mangiferina e foi obtido à 35°C, 0,03 g.mL⁻¹ (fruta/solvente) em solução hidroalcoólica (53%), de acordo com CARNIEL et al., (2018).

Tamanho de partícula e potencial zeta da nanoemulsão

As nanoemulsões NE e NGA apresentaram um tamanho médio de partícula, índice de polidispersividade e potencial Zeta médio de 121 nm e 130 nm, 0,1 e 0,2; -30 mV -37 mV, respectivamente. SINGH et al., (2017) mencionam que, como regra geral, valores de potencial zeta >30 mV ou <-30 mV podem ser considerados como bons indicadores em termos de estabilidade em longo prazo, porque o menor potencial zeta pode eventualmente agregar e promover a separação de fases. Da mesma forma, de acordo com a uniformidade do tamanho das gotículas, as nanoemulsões podem ser consideradas como “monodispersas” (índice de polidispersão <0,2).

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

CIM de nanoemulsão contendo extrato de physalis foi de 20 mg.mL⁻¹ para as três bactérias. Por outro lado, o ácido gálico contido na nanoemulsão apresentou CIM de 1,25 mg.mL⁻¹ e 0,62 mg.mL⁻¹ para *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*, respectivamente. A CIM não pode ser determinada para *Listeria monocytogenes* uma vez que o valor foi menor que o mínimo estudado (0,16 mg.mL⁻¹). A nanoemulsão sem extrato não teve efeito sobre o crescimento bacteriano e, da mesma forma, o etanol usado para preparar os extratos não inibiu o crescimento microbiano nas

concentrações testadas. Os resultados podem ser considerados satisfatórios quando comparados com outros trabalhos. Por exemplo, MRABET et al., (2017) encontraram valores de CIM variando de 3,13 a 25 mg.mL⁻¹ para oito bactérias usando extratos fenólicos obtidos de variedades secundárias de tâmaras tratadas termicamente e , finalmente, OUSSAID et al., (2017) encontraram CIM para extratos brutos de *Scirpus holoschoenus* de 0,8 mg.mL⁻¹ contra *S. aureus*.

Efeito antimicrobiano das nanoemulsões na superfície do pepino

As Figuras 14, 15 e 16 apresentam, respectivamente, as reduções de células (CFU/mL) de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* na superfície do pepino aos 3 dias de armazenamento, aplicando os tratamentos com nanoemulsão (NE) ou nanoemulsão com ácido gálico (NGA).

Figura 14 - Redução de células (UFC/mL) de *Listeria monocytogenes* na superfície do pepino: A) tratamento com NE; B) tratamento NGA.

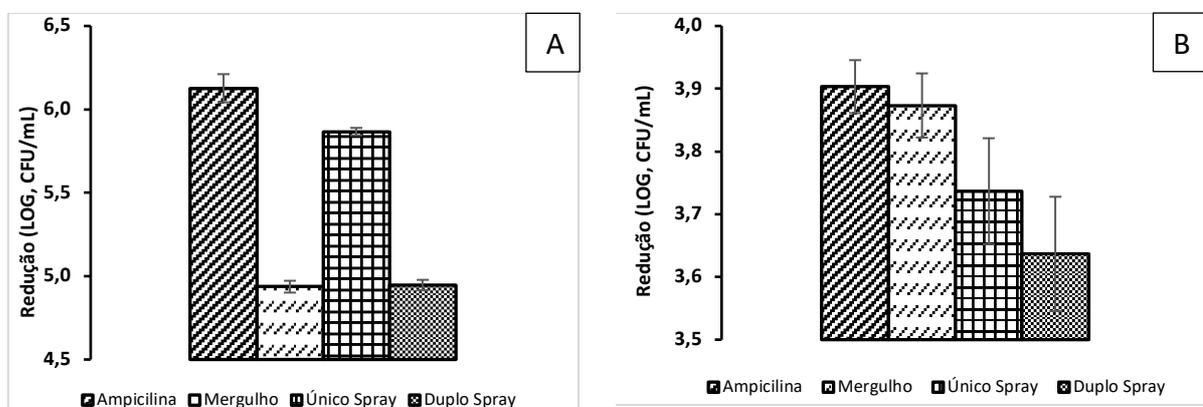


Figura 15 - Redução de células (UFC/mL) de *Salmonella Typhimurium* na superfície do pepino: A) tratamento com NE; B) tratamento NGA.

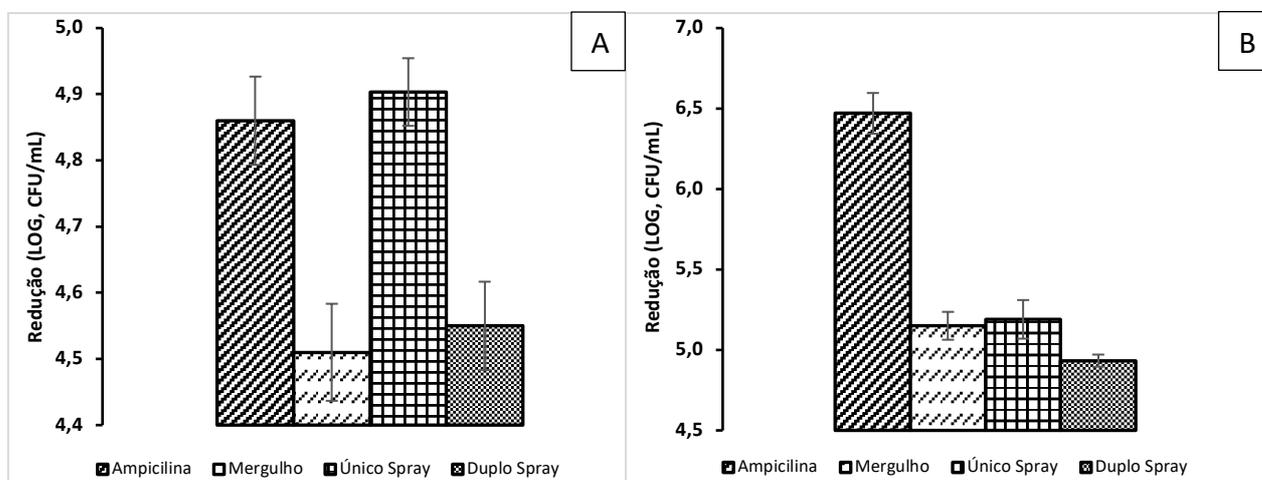
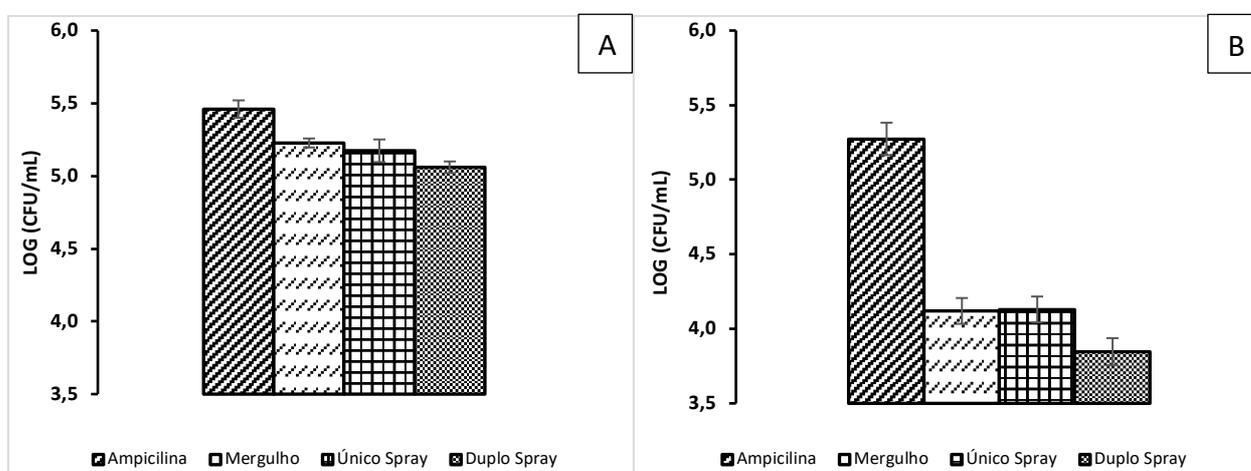


Figura 16 - Redução de células (UFC/mL) de *Escherichia coli* na superfície do pepino: A) tratamento com NE; B) tratamento NGA.



Para ambas as bactérias, os comportamentos de redução foram observados em relação ao controle positivo. O tratamento com NGA foi mais efetivo que o NE contra *Listeria monocytogenes*, com redução máxima de células em torno de 99,23% (sanitização através de mergulho) e 95,75% (sanitização com único spray), respectivamente. No primeiro tratamento, a análise estatística demonstrou que todas as sanitizações foram diferentes do controle positivo, entretanto, “mergulho” e “duplo spray” apresentaram o mesmo efeito. Quando o NGA foi utilizado, as sanitizações

“único spray” e “duplo spray” foram diferentes dos outros tratamentos (Controle = mergulho).

Para *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* observou-se um efeito inverso da ação das nanoemulsões em relação à redução celular, ou seja, os tratamentos com NE foram mais eficientes do que aqueles conduzidos com NGA. Para o primeiro microrganismo, NE promoveu uma redução total das células, enquanto que 80,20% foram reduzidas no tratamento utilizando NGA (ambas com sanitização “único spray”). Em relação aos métodos de sanitização no tratamento NE, observou-se que o “único spray” foi igual ao controle e diferentes de “mergulho” e “duplo spray”. Para o tratamento com NGA, ambos os tratamentos propostos foram diferentes do controle positivo, mas iguais entre si. Finalmente, os tratamentos utilizando NE e NGA promoveram reduções de 95,78% e 78,35% nas células de *Escherichia coli* e todas as formas de sanitização foram diferentes do controle positivo.

Discussão

Nesta pesquisa, foram avaliadas as nanoemulsões GRAS (*Generally Recognized as Safe*) de physalis para o manejo pós-colheita de patógenos bacterianos em superfícies de pepino. Primeiramente, realizou-se o processo de extração da fração polifenólica, sua caracterização e concentração. As nanoemulsões foram escolhidas com o objetivo de proteger o extrato aumentando sua estabilidade e reduzindo o tamanho das partículas entre outros benefícios. Deve-se ressaltar que, embora os benefícios potenciais do uso de nanoemulsões sobre emulsões convencionais apoiem sua aplicação em produtos alimentícios, faltam pesquisas nesse sentido (SALVIA-TRUJILLO et al., 2015), principalmente em relação à incorporação de compostos fenólicos. De fato, o maior número de publicações refere-se ao efeito antimicrobiano da fração oleosa (óleos essenciais) obtida de vegetais e, portanto, os mecanismos de ação dos compostos fenólicos na inibição do desenvolvimento de patógenos/doenças não são totalmente compreendidos.

No melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro relato sobre a atividade de extratos fenólicos de espécies de physalis contra importantes espécies bacterianas causadoras de doenças pós-colheita de pepino e os resultados mostraram diferentes comportamentos de redução das bactérias dependendo do tratamento e formas de sanitização.

Listeria monocytogenes é um microrganismo psicrotrófico oportunista com capacidade de se multiplicar em temperaturas abaixo de 0 °C, persistindo em ambientes industriais refrigerados (SANZ-PUIG et al., 2015). *Salmonella*, um importante patógeno entérico de origem alimentar, está entre os principais agentes causadores de gastroenterite aguda no mundo. A capacidade deste microrganismo de aderir ao hospedeiro desempenha um papel importante na enteropatogênese, multiplicação e colonização (SALAHEEN et al., 2016). *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa, curta, em forma de bastonete, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (BAE e LEE, 2017) e uma quantidade significativa de produtos alimentícios consumidos regularmente carrega a cepa O157:H7, que foi identificada como patogênica em 1982 (BESSER et al., 1993).

Compostos como polifenóis, flavonoides e glicosinolatos têm sido relatados como responsáveis pelas propriedades bioativas atribuídas aos vegetais (Sanz-Puig et al., 2015), porém, tem sido limitada a pesquisa relacionada à relação estrutura-função desses e de outros recursos naturais. Como resultado, a importância da composição química de compostos derivados de plantas sobre sua atividade antimicrobiana ainda não é bem compreendida. Nesse sentido, DAGLIA (2012) corrobora com uma revisão sobre o uso de polifenóis como agentes antimicrobianos. Especificamente, os ácidos fenólicos (não flavonoides), como os ácidos gálico, cafeico e ferúlico, mostraram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) e Gram-negativas (*E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). No que diz respeito aos flavonóis, pode-se observar uma notável atividade contra várias bactérias Gram-positivas, provavelmente devido a diferentes mecanismos de ação, dentre os quais o mais convincente identificado é o efeito agregativo sobre todas as células bacterianas (CUSHNIE et al., 2007; DAGLIA, 2012). YADAV et al., (2015) inferem que a parede lipo-polissacarídica de bactérias Gram-negativas pode ser uma barreira para os polifenóis entrarem no citoplasma enquanto TAJKARIMI et al., (2010) sugerem que a atividade antimicrobiana também pode variar dependendo do tipo de microrganismo, método de extração, meio de cultura, tamanho do inóculo e método de determinação.

A hipótese mais plausível em relação aos mecanismos de ação dos compostos fenólicos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas parece estar relacionada à posição dos grupos hidroxila (-OH) no anel aromático (ALCARÁZ et al., 2000; DORMAN e DEANS, 2000) e a quantidade de ligações duplas na cadeia lateral

alifática (GOCHEV et al., 2010; ULTEE et al., 2002). Geralmente, grupos ativos como -OH promovem a deslocalização de elétrons que atuam como trocadores de prótons e reduzem o gradiente através da membrana citoplasmática de células bacterianas (GYAWALI e IBRAHIM, 2014). Os grupos hidroxila (-OH) podem interagir com a membrana celular das bactérias para interrompê-la e causar o vazamento dos componentes celulares. O grupo ativo (-OH) promove a deslocalização de elétrons que atuam como trocadores de prótons e reduzem o gradiente de pH através da membrana citoplasmática levando à morte celular. Por outro lado, o déficit de ligações duplas impede que o grupo -OH libere seu próton (ULTEE et al., 2002).

Para contribuir com a discussão, os resultados encontrados neste trabalho podem estar correlacionados com os descritos na literatura. Por exemplo, PALAKAWONG et al., (2013) aplicaram os extratos fenólicos (máximo de 69.11mg GAE.g⁻¹) de mangostão (*Garcinia mangostana* L.) e os resultados revelaram atividade contra Gram bactérias positivas, especialmente *Listeria monocytogenes*. ÖZKAN et al., (2004) concluíram que *Escherichia coli* O157: H7 e *Salmonella Typhimurium* foram inibidas por extratos de bagaço de uva nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 20 %. YADAV et al. (2015) demonstraram a resistência completa de *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* contra a ação antibacteriana de extratos de casca de uva selecionados em todas as concentrações e, portanto, endossam a importância dos dados desta pesquisa, os quais promoveram um efeito antimicrobiano contra essas bactérias.

Finalmente, a interação eletrostática entre gotículas de nanoemulsões e paredes celulares microbianas carregadas também precisa ser discutida, mas atualmente, não há uma confirmação clara sobre o comportamento. Por exemplo, espera-se que a interação eletrostática de cargas positivas de nanoemulsões com paredes celulares microbianas carregadas negativamente aumente a concentração do princípio ativo no local de ação (CHANG et al., 2015) e/ou ajude a promover a ruptura de membrana celular. No entanto, essa hipótese ainda é controversa, devido à possível ação antimicrobiana paralela de um surfactante catiônico (DONSÌ e FERRARI, 2016).

5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho foram apresentados estudos sobre o processo de extração de compostos fenólicos presentes em *physalis* utilizando as técnicas de ultrassom e micro-ondas. A partir dos extratos enriquecidos em polifenóis, foram produzidas e caracterizadas nanoemulsões, avaliando, posteriormente, o potencial contra microrganismos causadores de contaminação bacteriana em pepinos *in natura*. Detalhadamente, podem ser relatadas as seguintes conclusões:

- Fenóis totais, incluindo flavonoides (rutina, mangiferina e kaempferol) e ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico e ácido caféico) de *physalis* foram obtidos através de extração assistida por ultrassom e quantificados por espectroscopia UV-VIS e cromatografia líquida de alta eficiência. Os parâmetros de processo foram acessados através de um delineamento composto central rotacional e um modelo (com coeficiente de regressão igual a 0.9640) foi usado para estabelecer as condições ótimas de extração juntamente com suas respectivas superfícies de resposta. O aumento na porcentagem de etanol e razão sólido-líquido promoveu um decréscimo na quantidade de polifenóis totais extraídos enquanto que a temperatura, quando aumentada, promoveu um aumento na quantidade dos compostos. Os resultados experimentais indicaram um teor máximo de polifenóis totais de 1,039 mg EAG/g de extrato. Em paralelo, os valores máximos de ácido gálico, ácido caféico, ácido elágico, rutina, mangiferina e kaempferol foram de 104,88 mg.L⁻¹, 4,04 mg.L⁻¹, 8,37 mg.L⁻¹, 58,28 mg.L⁻¹, 13,26 mg.L⁻¹ e 1,87 mg.L⁻¹, respectivamente.
- Extração assistida por micro-ondas (MAE) foi desenvolvida para a extração de polifenóis totais de *physalis*. Parâmetros de processo (concentração de etanol, potência de irradiação, tempo de extração e relação líquido/sólido) foram avaliados através de um delineamento experimental de Box-Behnken (4 variáveis e 3 níveis). Os resultados indicaram variação de 3,74 a 0,03 mg GAE/g de extrato (polifenol total), 7,77 a 0,5 mg.L⁻¹ (ácido gálico), 0,55 a 0,27 mg.L⁻¹ (ácido elágico), 0,26 a 0,02 mg.L⁻¹ (ácido caféico), 0,86 a 0,25 mg.L⁻¹

(Rutina) e 2,43 a 0,89 mg.L⁻¹ (Mangiferina) e diferentes efeitos foram observados dependendo dos compostos.

- O extrato enriquecido em polifenóis obtido através da técnica de ultrassom foi encapsulado em nanoemulsões com o auxílio do surfactante de grau alimentício. As nanoemulsões foram caracterizadas quanto ao seu tamanho e carga superficial, possuindo um diâmetro hidrodinâmico (HD) de 121nm e potencial zeta (ζ) de -30mV. Seu potencial como controle microbiano (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*) pós-colheita foi testado em pepinos frescos e a concentração inibitória mínima (MIC) das nanoemulsões em relação aos mesmos microrganismos foi de 20 mg.mL⁻¹. O tratamento com NGA foi mais efetivo que o NE contra *Listeria monocytogenes*, com redução máxima de células em torno de 99,23% e 95,75%, respectivamente. Para *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* observou-se um efeito inverso da ação das nanoemulsões em relação à redução celular, ou seja, os tratamentos com NE foram mais eficientes do que aqueles conduzidos com NGA, com reduções de até 95%.
- Em resumo, o objetivo desta tese de doutorado foi plenamente atingido através da obtenção de informações relevantes sobre os processos de extração da fração polifenólica de *physalis* e sua posterior aplicação para a produção de nanoemulsões de grau alimentício a serem utilizadas em pepinos frescos. Criam-se assim, perspectivas interessantes para as indústrias de alimentos no tocante da inovação tecnológica para a produção de sanitizantes livres de solventes bem como, na incorporação dos extratos em alimentos visando explorar seu potencial antioxidante, também cientificamente comprovado.

Sugestões para trabalhos futuros

- Realizar o estudo de outras técnicas de extração (líquidos pressurizados, supercrítica) isoladamente e/ou combinadas, a fim de verificar as diferenças nos rendimentos e composição química do extrato;
- Realizar a concentração e purificação do extrato a fim de obter aquele(s) composto(s) de interesse para aplicações específicas;
- Aplicar as nanoemulsões em outros vegetais com forte susceptibilidade à ataques microbianos na etapa de pós-colheita;
- Estudar os mecanismos envolvidos na resistência microbiana quando os extratos livres ou encapsulados são aplicados em vegetais, a fim de incrementar as discussões na literatura científica.