

Caracterização de extratos obtidos a partir de resíduos da agroindústria com potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*

Palavras-Chave: COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, PRODUTOS NATURAIS, UHPLC, CROMATOGRAFIA

Autores(as):

MARIA EDUARDA CAVALHEIRO, FCA- UNICAMP

Dr^a, THAIS CARVALHO BRITO OLIVEIRA (co-orientadora), FCA- UNICAMP

Prof. Dr. MAURÍCIO ARIEL ROSTAGNO (orientador), FCA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O aproveitamento de resíduos da agroindústria vem sendo amplamente discutido por apresentar grande importância econômica, ambiental e tecnológica. Do ponto de vista financeiro, tal aproveitamento permite o estabelecimento da economia circular, amplamente difundida por permitir o uso restaurador de recursos [1]. Consequentemente, a transformação dos resíduos em novos recursos apresenta um impacto ambiental positivo, por minimizar o volume de material descartado, bem como a demanda pela extração de novos recursos naturais [2]. Já o interesse tecnológico é principalmente justificado pelo fato de muitos resíduos agroindustriais serem ricos em compostos fenólicos com propriedades bioativas, tais como as capacidades antioxidantes e antimicrobianas, podendo, então, ser adicionados e conferir valor à diversas formulações alimentícias, cosméticas e farmacêuticas [3,4].

Segundo a literatura, os compostos fenólicos são substâncias que apresentam grande importância no processo de proteção celular, ao sequestrar e/ou inibir as diversas espécies reativas de oxigênio reativo e transferir para radicais livres, ativando também enzimas antioxidantes e inibindo as oxidases [5]. Devido a essas capacidades, o consumo de tais compostos vem sendo apontado como um importante aliado na prevenção de algumas doenças, como arteriosclerose, diabetes e doenças neurodegenerativas [5].

Já dentre as capacidades antimicrobianas dos compostos fenólicos, destaca-se a atividade contra *Staphylococcus aureus*, bactéria extracelular gram positiva amplamente conhecida por sua ação infecciosa/inflamatória na pele humana, bem como em processos de intoxicação alimentar [6].

O aproveitamento dessas e de tantas outras propriedades funcionais dos compostos fenólicos presentes nos resíduos da agroindústria é possível a partir da aplicação de métodos de extração – tais como a extração assistida por ultrassom – UAE [7] e a adequada caracterização de extratos, por meio, por exemplo, de ensaios para a determinação das atividades antioxidantes das amostras [8,9].

Nesse sentido, o presente projeto de iniciação científica teve por objetivo a produção e caracterização de extratos de diferentes resíduos da agroindústria com potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* por meio de ensaios para a determinação do teor de fenólicos totais e atividades antioxidantes, bem como o desenvolvimento de ensaios de cromatografia líquida de ultra alta pressão ou eficiência (UHPLC) com detector fododiodo (PDA).

METODOLOGIA:

Para a varredura inicial de amostras, extratos foram preparados a partir dos seguintes resíduos da agroindústria: casca de manga, casca de maçã, folha de manga, casca de limão, casca de romã, folha de goiaba, borra de café, semente de melão e alecrim. As amostras foram secas, moídas e adequadamente peneiradas para a seleção de intervalo de tamanho de partícula, e armazenadas a -18°C até serem utilizadas nos experimentos.

Para o preparo dos extratos, as amostras secas e moídas foram submetidas a três extrações sequenciais do mesmo material, na seguinte sequência: (1) água, (2) água:etanol e (3) etanol (2g/25 ml em cada etapa). Em

cada uma das etapas, o solvente foi adicionado à amostra e ela foi, então, submetida à ultrassom (Elmasonic P - Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Alemanha - 37 Hz, modo sweep à temperatura ambiente) por 1 hora, com posterior centrifugação (Centrifuga de bancada, modelo K241R, Centurion Scientific West Ashling, UK) à 10.600 rcf, 25 °C por 10 minutos, e coleta do sobrenadante. Após isso, os extratos de cada etapa foram misturados e submetidos às análises para determinação de compostos fenólicos totais (TPC), a partir do método proposto por Folin-Ciocalteu [8] e capacidades antioxidantes por meio de ensaios de DPPH (Atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1picrilhidrazila); FRAP (Poder Antioxidante Redutor Férrico) e TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox). Por fim, as amostras foram caracterizadas por meio de cromatografia líquida de ultra alta pressão ou eficiência (UHPLC) com detector fotodiodo (PDA) (Acquity, Waters Co., Milford, MA, USA). O sistema de separação foi realizado em uma coluna Acquity UPLC BEH C18 50 × 2.1 mm, 1.7 µm e as fases móveis consistiram em água (A) e acetonitrila (B), ambas acidificadas com 0.1% ácido acético (v/v). O gradiente de eluição foi de 5-100% B em 0-10 min. As condições de cromatografia foram: vazão de 0,5 mL/min, forno da coluna a 40 °C e volume de injeção de 5 µL. Espectros UV foram registrados de 210 a 400 nm em λmax de 254. O software Empower 3 foi aplicado para o processamento de dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A análise de teor de fenólicos totais (TPC) foi a primeira a ser desenvolvida com todos os extratos produzidos. Os resultados apresentados na Tabela 1 foram calculados utilizando a curva de calibração feita utilizando padrão de ácido gálico, apresentada na Figura 1A.

Tais resultados indicaram que o extrato da casca de romã apresentou o maior valor dentre todos, sendo, por tanto, a amostra com maior conteúdo de fenólicos totais. De acordo com a literatura, a casca da romã apresenta diversos compostos fenólicos bioativos, incluindo polifenóis, flavonoides, taninos e antocianinas. [10]. Dentre os compostos presentes nesses resíduos, destacam-se as punicalaginas e o ácido elágico, que, segundo estudos, possuem fortes propriedades antioxidantes, conforme verificado na Tabela 1 [10]. Em contrapartida, o extrato da casca de maçã foi o que apresentou o menor conteúdo de fenólicos totais, revelando que, apesar da casca desse fruto apresentar compostos fenólicos (principalmente antocianinas e quercetina), sua concentração era menor [11].

Em seguida, foram iniciadas as análises das propriedades antioxidantes e o primeiro método aplicado foi o DPPH. Para tal método, os resultados apresentados na Tabela 2 foram calculados a partir da curva de calibração mostrada na Figura 1B e exibida em equivalentes de Trolox.

Como verificado a partir de tais dados, os extratos de folha de goiaba e casca de romã apresentaram maiores potenciais antioxidantes, não apresentando diferença estatística entre si ($p > 0.05$). A elevada capacidade antioxidante dos extratos de casca de romã já era esperada devido ao elevado teor de compostos fenólicos verificado a partir dos ensaios de TPC. Já com relação ao extrato de folha de goiaba, o elevado potencial antioxidante pode estar relacionado, segundo a literatura, à presença dos compostos ácido gálico e catequina [12]. Como verificado a partir das Tabelas 3 e 4, os ensaios de FRAP e TEAC também apontaram os extratos de casca de romã como mais interessantes por apresentarem maiores potenciais antioxidantes. Tais ensaios foram conduzidos e os resultados calculados a partir das curvas de calibração apresentadas nas Figuras 1(C) e 1 (D), respectivamente.

Tabela 1. Resultados das análises para determinação do teor de fenólicos totais (TPC)

Formulação	µg/ml equivalentes de ácido gálico
Extrato de casca de romã	3127,25 ^a ± 792,56
Extrato de alecrim	576,62 ^{c,d} ± 39,96
Extrato de casca de limão	274,46 ^{d,e} ± 21,17
Extrato de casca de maçã	77,63 ^e ± 8,43
Extrato de borra de café	396,99 ^{d,e} ± 51,46
Extrato de semente de melão	155,76 ^{d,e} ± 37,61
Extrato de casca de manga	524,38 ^d ± 56,99
Extrato de folha de goiaba	1371,54 ^b ± 211,03
Extrato de folha de manga	966,30 ^{b,c} ± 182,87

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabela 2. Resultados da análise de DPPH dos diferentes extratos

Formulação	µg/ml equivalentes de Trolox
Extrato de folha de goiaba	5156,09 ^a ± 109,63
Extrato de casca de romã	4605,88 ^a ± 677,82
Extrato de folha de manga	2982,76 ^b ± 108,95
Extrato de casca de limão	378,87 ^d ± 167,99
Extrato de borra de café	742,76 ^d ± 30,54
Extrato de alecrim	1902,18 ^c ± 256,29
Extrato de casca de maçã	852,56 ^d ± 38,26
Extrato de casca de manga	914,99 ^d ± 103,63
Extrato de semente de melão	2224,57 ^c ± 970,48

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabela 3. Resultados da análise de FRAP dos diferentes extratos

Formulação	µg/ml equivalentes de sulfato ferroso heptahidratado
Extrato de folha de manga	21073,33 ^b ± 1834,55
Extrato de borra de café	8450 ^c ± 1554,87
Extrato de casca de limão	1662,22 ^d ± 147,44
Extrato de semente de melão	811,67 ^d ± 194,40
Extrato de folha de goiaba	21811,11 ^b ± 4045,04
Extrato de casca de manga	5978,89 ^{c,d} ± 511,72
Extrato de casca de maçã	1600,56 ^d ± 201,1402
Extrato de casca de romã	81266,67 ^a ± 10060,47
Alecrim	7624,44 ^c ± 649,525

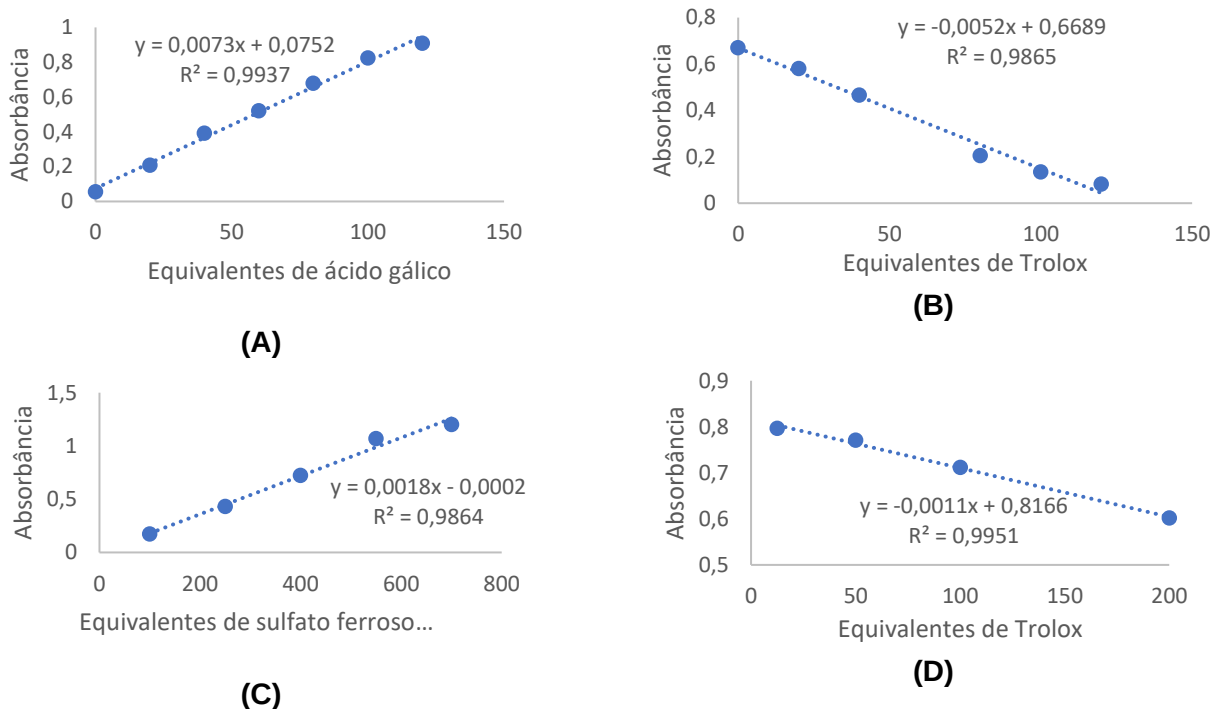
Médias seguidas por letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabela 4. Resultados da análise de TEAC dos diferentes extratos

Formulação	µg/ml Equivalentes de Trolox
Casca de manga	1384,97 ^b ± 155,92
Folha de goiaba	1167,38 ^b ± 148,05
Folha de manga	1128 ^b ± 98,15
Semente de melão	187,12 ^{c,d} ± 32,37
Casca de limão	68,40 ^d ± 10,60
Alecrim	635,67 ^c ± 59,75
Casca de maçã	222,67 ^{c,d} ± 25,32
Borra de café	479,64 ^{c,d} ± 21,33
Casca de romã	4640 ^a ± 857,12

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Figura 1. Curvas de calibração para os métodos: (A) TPC (B) DDPH (C) FRAP (D) TEAC



Por fim, as análises cromatográficas foram realizadas por UHPLC acoplado a detector de arranjo de diodos (UHPLC-PDA), técnica que permite a separação, detecção e quantificação simultânea de diversos compostos com alta resolução e sensibilidade. O detector PDA possibilita a obtenção de espectros em múltiplos comprimentos de onda, facilitando a identificação dos constituintes fenólicos da amostra [13].

Os resultados obtidos foram confrontados com a literatura e tentativas de identificação foram conduzidas para a obtenção do perfil fenólico aproximado dos extratos produzidos.

As tentativas de identificação dos extratos de borra de café indicaram a possível presença de compostos como ácidos cafeico, ferúlico, clorogênico e p-cumárico, conforme reportado na literatura (NIEMEYER et al., 2003; ESQUIVEL et al., 2012; TRANDAFIR, M. et al., 2013). Já o extrato de casca de manga apresentou, em sua maior parte, ácido elágico, rutina e ácido clorogênico, (BARBOSA et al., 2019; SOUSA, M. S. B. et al., 2010; CLIFFORD, 2000). O extrato de folha de manga expressou os mesmos compostos, além dos ácidos p-cumárico, e protocatecuico, hesperidina e naringenina (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2019; NAKAMURA et al., 2003; HILGERT, N. et al., 2014).

Os resultados obtidos a partir dos extratos de folha de goiaba revelaram compostos como quercetina e rutina, os quais, segundo JAIN et al. (1976) e JIMÉNEZ et al. (2007), apresentam grande potencial antioxidante, estando possivelmente relacionados aos resultados previamente discutidos.

No extrato de casca de maçã, foram identificados compostos como quercetina, ácido clorogênico, catequina e rutina. Segundo estudos, seus espectros de absorção coincidem com os dados observados na análise - 255–270 nm e 370–385 nm (LEE, K. W. et al., 2003; KIM, H. et al., 2010; CLIFFORD, 2000).

Já as amostras de semente de melão indicaram a possível presença de ácido clorogênico como um dos principais compostos presentes, além de quercetina, também reportada na literatura. (CLIFFORD, 2000; DUTTA et al., 2012).

Conforme esperado segundo dados da literatura, os extratos de alecrim mostraram-se especialmente ricos em ácido rosmarínico, enquanto os extratos de casca de romã apresentaram picos relacionados à presença de ácido elágico (em maiores concentrações) e as punicalaginas [14,15].

Por fim, os resultados dos extratos da casca de limão revelaram alguns ácidos, além de outros compostos como naringenina, hesperetina, diosmetina, sinensetina e leuteolina, os quais, segundo a literatura, são os constituintes mais abundantes de frutos cítricos [16].

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, todos os extratos analisados apresentaram teores relevantes de compostos fenólicos e atividade antioxidante significativa. Entre os extratos avaliados, a casca de romã apresentou os maiores valores de atividade antioxidante, especialmente associados ao ácido elágico e às punicalaginas. Esses dados reforçam o potencial funcional da casca de romã como uma fonte promissora de compostos bioativos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Geisendorf, S., & Pietrulla, F. (2018). The circular economy and circular economic concepts—a literature analysis and redefinition. *Thunderbird International Business Review*, 60(5), 771-782.
- [2] Ricardino, I. E. F., Souza, M. N. C., & da Silva Neto, I. F. (2020). Vantagens e possibilidades do reaproveitamento de resíduos agroindustriais. *Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente*, 1(8), 55-79.
- [3] Jovanović, J., Tanasković, S. J., Šekuljica, N., Gazikalović, I., Stefanović, A., Grbavčić, S., ... & KneževićJugović, Z. (2021). Extraction of phenolic compounds from agro-industrial wastes and evaluation of their antioxidative potential. *Journal of Hygienic Engineering & Design*, 34.
- [4] Soares, M., Welter, L., Gonzaga, L., Lima, A., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2008). Evaluation of antioxidant activity and identification of phenolic acids present in the pomace of Gala variety apples. *Food Science and Technology*, 28, 727-732.
- [5] Souza, A. V. D., Vieira, M. R. D. S., & Putti, F. F. (2018). Correlations between the phenolic compounds and antioxidant activity in the skin and pulp of table grape varieties. *Brazilian Journal of Food Technology*, 21, e2017103.
- [6] Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2021). *Staphylococcus aureus*. StatPearls [Internet].
- [7] Ferreira, B. L., Beik, J. V., Alves, S. J., Henrique, F. A., Sauer, E., Chornobai, C. A., ... & Chaves, E. S. (2020). Extração assistida por ultrassom para determinação de lipídeos em alimentos: um experimento de laboratório. *Química Nova*, 43, 1320-1325.
- [8] Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Sousa, C. A. S., & Pastore, G. M. (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Food Science and Technology*, 27, 53-60.
- [9] Leite, A. V., Malta, L. G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., & Marostica Junior, M. R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(6), 2277-2283.
- [10] Dutta, S., Nishad, K., Usha, T., Ramesh, N., & Middha, S. K. (2024). In-vitro scientific validation of anti-inflammatory activity of *Punica granatum* L. on Leukemia monocytic cell line. *African Health Sciences*, 24(3), 128-137.
- [11] HUBER, G.m.; RUPASINGHE, H.p.v.. Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Apple Skin Extracts. *Journal Of Food Science*, [s.l.], v. 74, n. 9, p.693-700, nov. 2009.
- [12] ANG, M. et al. Improvement in the anti-inflammatory activity of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts through optimization of extraction conditions. *Journal of Functional Foods*, [S.l.], v. 21, p. 396–408, 2016.
- [13] SANTOS, J. S. et al. Phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of Brazilian vegetables and fruits: A comparative study using HPLC-DAD and UHPLC-ESI-QTOF-MS. *Food Chemistry*, v. 233, p. 667–678, 2017.
- [14] PIZANI, R. S. et al. New selective and sustainable ultrasound-assisted extraction procedure to recover carnosic and rosmarinic acids from *Rosmarinus officinalis* by sequential use of bio-based solvents. *Food Chemistry*, v. 435, p. 137540, 2024.
- [15] OLIVEIRA, I. L. et al. Selective separation of α -punicalagin, β -punicalagin, and ellagic acid from pomegranate husk aqueous extract by an optimized adsorption process employing a (deep) eutectic solvent. *Food and Bioprocess Technology*, v. 18, n. 3, p. 2519–2530, 2025.
- [16] MANTHEY, J. A. et al. HPLC analysis of flavonoids in citrus peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 3565–3571, 1999.