

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE CASCAVEL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS FOLIARES DE *Moringa oleifera* POR ULTRASSOM E**  
**APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE TOMATE-CEREJA**

**TAISE RAQUEL BECHLIN**

**CASCAVEL, PARANÁ**

**2023**

**TAISE RAQUEL BECHLIN**

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS FOLIARES DE *Moringa oleifera* POR ULTRASSOM E  
APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE TOMATE-CEREJA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Sistemas Biológicos e Agroindustriais.

**Orientador:** Dr. Divair Christ

**CASCADEL, PARANÁ**

**2023**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Bechlin, Taise Raquel  
Obtenção de extratos de folhas de Moringa oleifera por ultrassom e aplicação no tratamento de sementes de tomate-cereja / Taise Raquel Bechlin; orientador Divair Christ. -- Cascavel, 2024.  
68 p.

Tese (Doutorado Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, 2024.

1. Métodos emergentes de extração. 2. Folhas de Moringa oleifera. 3. Compostos bioativos. 4. Bioestimulante. I. Christ, Divair, orient. II. Título.



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Reitoria  
CNPJ 78.680.337/0001-84  
Rua Universitária, 1619, Jardim Universitário  
Tel.: (45) 3220-3000 - Fax: (45) 3225-4590 - www.unioeste.br  
CEP: 85819-110 - Cx. P.: 701  
Cascavel - PARANÁ



## **TAISE RAQUEL BECHLIN**

### **OBTENÇÃO DE EXTRATOS FOLIARES DE *Moringa oleifera* POR ULTRASSOM E APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE TOMATE CEREJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Sistemas Biológicos e Agroindustriais, linha de pesquisa Tecnologias de Produção Vegetal e Pós-colheita, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** DIVAIR CHRIST  
Data: 08/12/2023 20:17:35-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Orientador(a) - Divair Christ**

**Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)**

**Bianca Pierina Carraro**

**Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** SILVIA RENATA MACHADO COELHO  
Data: 08/12/2023 22:17:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Silvia Renata Machado Coelho**

**Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** LUCIANA BILL MIKITO  
Data: 12/12/2023 07:22:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Luciana Bill Mikito**

**Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** EVANDRO ANDRE KONOPATZKI  
Data: 09/12/2023 19:01:31-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)**

**Cascavel, 08 de dezembro de 2023.**

## **BIOGRAFIA**

2014 - Graduação: Engenharia Agrícola e Ambiental, Universidade Federal de Mato Grosso, campus Sinop, MT.

2019 - Mestrado em Engenharia Agrícola, na área de concentração de Sistemas Biológicos e Agroindustriais na linha de pesquisa Tecnologia de Produção Vegetal e Pós-Colheita, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Cascavel.

2019 - Doutoranda em Engenharia Agrícola, na área de concentração de Sistemas Biológicos e Agroindustriais na linha de pesquisa Tecnologia de Produção Vegetal e Pós-Colheita, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Cascavel.

2022 - Instrutoria dos cursos de Operação de Secadores e Secagem de Grãos, e Armazenamento de Soja e Milho, credenciada ao SENAR-MT.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que contribuíram para a realização desta tese. Sem o apoio, a orientação e a colaboração de muitas pessoas, este trabalho não teria sido possível.

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Dr. Divair Christ, por sua orientação valiosa, paciência e incentivo ao longo deste processo. Suas sugestões e insights foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa;

À minha família e amigos, que sempre estiveram ao meu lado, obrigada por seu apoio incondicional e por acreditarem em mim. Suas palavras de encorajamento foram um grande estímulo;

Aos colegas de laboratório, professores e funcionários da Unioeste campus Cascavel, agradeço pela troca de conhecimentos, discussões construtivas e pelo ambiente acadêmico enriquecedor;

Gostaria de expressar minha sincera gratidão ao Professor Edson Antônio da Silva (Unioeste, campus Toledo) por sua generosidade e apoio ao permitir o uso de seu laboratório durante a realização deste trabalho. Sua disponibilidade e coorientação foram fundamentais para o sucesso desta pesquisa;

Agradeço também à equipe do laboratório pela assistência técnica e pelo ambiente propício à experimentação e ao aprendizado. Sem dúvida, essa colaboração enriqueceu minha experiência acadêmica e contribuiu significativamente para os resultados alcançados;

Agradeço à Capes pela bolsa concedida durante o doutorado;

Por fim, agradeço à comunidade científica e a todos os pesquisadores cujo trabalho inspirou e enriqueceu esta tese. Suas contribuições são inestimáveis

Bechlin, Taise Raquel. **Obtenção de extratos de folhas de *Moringa oleifera* por ultrassom e aplicação no tratamento de sementes de tomate-cereja**. Orientador: Dr. Divair Christ. 68f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - Paraná, 2023.

## RESUMO

As folhas de *Moringa oleifera* são compostas de substâncias com potencial antioxidante e antimicrobiano, além de que as folhas ainda apresentam excelentes propriedades nutricionais. Neste sentido, o presente estudo abordou a otimização do processo de extração-assistida por ultrassom de folhas de *M. oleifera* e aplicação dos extratos como bioestimulante no tratamento de sementes de tomateiro cereja. Dessa forma, o processo de extração otimizado de folhas *M. oleifera* foi feito em termos de rendimento, teor de fenólicos e flavonoides e atividade antioxidante, obtendo-se as seguintes condições ótimas de operação: concentração de etanol de 75% (v/v), temperatura de 54,0 °C, e amplitude de 78%. Os extratos obtidos na condição otimizada apresentaram valores, respectivamente, para rendimento, DPPH, FRAP, TPC e TFC de 28,48%, 110,20 µgGAE g<sup>-1</sup>, 1496,36 µmol Fe(II)SE g<sup>-1</sup>, 473,11 µgGAE g<sup>-1</sup>, e 128,39 µgGAE g<sup>-1</sup>. Além de serem efetivos contra o crescimento micelial patogênico. Os maiores percentuais de inibição foram observados em 2,0 mg mL<sup>-1</sup> (50,47 ± 2,60%) contra *Aspergillus flavus* e 5,0 mg mL<sup>-1</sup> (59,67 ± 6,20%) contra *Penicillium italicum*. Os efeitos dessa atividade biológica podem ser explicados pela presença de compostos como a isoquercitrina e do α-tocoferol, que possuem elevada carga antioxidante, e determinados pela análise de CG-MS. Os extratos obtidos também foram avaliados como bioestimulante no tratamento de sementes de tomateiro cereja. Os principais resultados obtidos foram inibição inicial da germinação das sementes utilizando os extratos na concentração de 0,5–5,0 mg mL<sup>-1</sup>. Entretanto, a concentração de 2,0 mg mL<sup>-1</sup> foi considerada eficaz para crescimento de plântulas até 14 dias, obtendo maiores comprimentos de raízes e partes aéreas em relação ao controle. Os extratos foliares de *M. oleifera* apresentam compostos bioativos com atividade biológica capazes de contribuir para uma melhoria na produção de mudas de hortícolas e podendo ainda ajudar na prevenção de severidades causadas por fungos pós-colheita.

**PALAVRAS-CHAVE:** Métodos emergentes de extração, Folhas de *Moringa oleifera*, Compostos bioativos, Bioestimulante, Sementes de tomateiro

Bechlin, Taise Raquel. **Recovery of *Moringa oleifera* leaf extracts by ultrasound and application to cherry tomato seed treatment.** Advisor: Dr. Divair Christ; 68p. Thesis (Doctorate in Agricultural Engineering) – Western Paraná State University, Cascavel - Paraná, 2023.

## ABSTRACT

*Moringa oleifera* leaves are composed of substances with antioxidant and antimicrobial potential, in addition to the leaves having excellent nutritional properties. In this regard, the current work focused on the optimization of the *M. oleifera* leaf extraction procedure aided by ultrasound and the use of the extracts as a bio-stimulant in the treatment of cherry tomato seeds. Thus, the optimized extraction process of *M. oleifera* leaves was carried out in terms of yield, phenolic, and flavonoid content and antioxidant activity, obtaining the following optimal operating conditions: ethanol concentration of 75% (v/v), temperature of 54.0 °C, and amplitude of 78%. The extracts obtained in the optimized condition presented values, yield, DPPH, FRAP, TPC, and TFC of 28.48%, 110.20 µgGAE g<sup>-1</sup>, 1496.36 µmol Fe(II)SE g<sup>-1</sup>, 473.11 µgGAE g<sup>-1</sup>, and 128.39 µgGAE g<sup>-1</sup>, respectively. Likewise, it works well against pathogenic mycelial growth. The maximum percentages of inhibition against *Aspergillus flavus* and *Penicillium italicum* were found at 2.0 mg mL<sup>-1</sup> (50.47 2.60%) and 5.0 mg mL<sup>-1</sup> (59.67 6.20%), respectively. The existence of substances like isoquercitrin and α-tocopherol, which have a high antioxidant load and are identified by GC-MS analysis, can explain the consequences of this biological activity. The leaf extracts were further assessed for their potential as a bio-stimulant for the treatment of cherry tomato seeds. Initial seed germination inhibition employing extracts at a dosage of 0.5-5.0 mg mL<sup>-1</sup> was the main outcome. However, the 2.0 mg mL<sup>-1</sup> dose was found to be helpful for seedling growth up to 14 days, resulting in longer roots and aerial parts compared to the control. The *M. oleifera* leaf extracts include bioactive compounds that have the potential to boost vegetable seedling formation and may even aid in the prevention of severities brought on by post-harvest fungus.

**Keywords:** Emerging extraction technologies, *Moringa oleifera* leaves, Bioactive compounds, Bio-stimulant, Tomato seeds



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xiii
1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	3
2.1 Objetivo geral .....	3
2.2 Objetivos específicos .....	3
3. Revisão bibliográfica .....	4
3.1 <i>Moringa oleifera</i> .....	4
3.1.1 Aspectos gerais da <i>Moringa oleifera</i> .....	4
3.1.2 Composição nutricional das folhas de <i>Moringa oleifera</i> .....	4
3.1.3 Composição fitoquímica .....	5
3.2 Métodos de extração .....	6
3.2.1 Métodos convencionais de extração .....	6
3.2.2 Métodos emergentes de extração .....	8
3.4 Referências .....	13
4. Artigo 1. Extração-assistida por ultrassom de compostos bioativos de folhas de <i>moringa oleifera</i> : Otimização dos parâmetros de extração e análise CG-MS .....	17
RESUMO .....	17
PALAVRAS-CHAVE: .....	17
4.1 Introdução .....	18
4.2 Material e Métodos .....	19
4.2.1 Matéria-prima .....	19
4.2.2 Métodos de extração .....	19
4.2.2.1 Extração assistida por ultrassom .....	19
4.2.2.2 Extração assistida por agitação .....	20
4.2.3 Cinética de extração .....	20
4.2.4 Composto fenólicos totais (CFT) .....	21

4.2.5	Atividade antioxidante (AA).....	21
4.2.6	Flavonoides .....	22
4.2.7	Avaliação da atividade antifúngica.....	22
4.2.8	Identificação de compostos bioativos por CG-MS.....	23
4.2.9	Análise estatística.....	23
4.3	Resultados e Discussão .....	23
4.3.1	Cinética de extração e rendimentos.....	23
4.3.2	Influência dos parâmetros de ultrassom no processo de extração.....	26
4.3.3	Modelo de regressão e análise de variância .....	30
4.3.4	Otimização do processo .....	36
4.3.5	Determinação de compostos bioativos por GC-MS.....	37
4.3.6	Atividade antifúngica dos extratos foliares de <i>Moringa oleífera</i> .....	38
4.4	Conclusão .....	39
4.5	Referências .....	40
5.	Artigo 2. Efeito da aplicação de extratos foliares de <i>Moringa oleífera</i> como bioestimulante no tratamento de sementes de tomate-cereja .....	44
	RESUMO.....	44
	PALAVRAS-CHAVE: .....	44
5.1	Introdução .....	45
5.2	Material e Métodos .....	45
5.2.1	Sementes de tomate.....	45
5.2.2	Preparação dos extratos foliares .....	46
5.2.3	Tratamento das sementes .....	46
5.2.4	Análises fisiológicas.....	46
5.2.5	Delineamento experimental .....	47
5.3	Resultados e discussão.....	47
5.3.1	Efeitos dos extratos foliares de <i>Moringa oleífera</i> na germinação de sementes de tomateiro.....	47
5.3.2	Efeitos dos extratos foliares de <i>Moringa oleífera</i> no crescimento de plântulas	50

5.4	Conclusão .....	52
5.5	Referências .....	52

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Equipamento Clevenger para hidrodestilação..... 7
- Figura 2 Representação de um equipamento para extração por ultrassom, composto por (A) controlador, (B) conversor, (C) sonda ultrassônica, (D) depósito do solvente e amostra, (E) propagação das ondas, (F) controlador de temperatura, e (G) analisador. Adaptado de (KADAM et al., 2015)..... 9
- Figura 3 Representação esquemática do processo de extração com fluido supercrítico (PEREIRA et al., 2017). ..... 10
- Figura 4 (A) Cinética de extração para extração assistida por ultrassom (50°C; 50% de etanol v/v; e 54% de amplitude; e (B) cinética de extração obtida por extração por agitação em função do tempo de extração no rendimento dos extratos..... 24
- Figura 5 Cinética de extração de polifenóis de folhas de *M. oleifera* para (A) EAU e (B) EAA. .... 26
- Figura 6 Valores de t calculado dos efeitos lineares, quadráticos e interação entre as variáveis dependentes concentração de etanol ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ) e amplitude ( $X_3$ ) e suas respectivas respostas (A) rendimento dos extratos, atividade antioxidante pelos métodos (B) DPPH (C) FRAP, e (D) TPC, e (E) TFC. .... 29
- Figura 7 Gráfico normal de resíduos para as variáveis respostas (A) rendimento, (B) DPPH, (C) FRAP, (D) TPC e (E) TFC. .... 32
- Figura 8 Superfícies de resposta para os rendimentos dos extratos foliares de *M. oleifera* obtidos por extração-assistida por ultrassom. (A) Temperatura e concentração de etanol com amplitude constante (54%); e (B) Temperatura e amplitude com concentração de etanol constante (50%). .... 33
- Figura 9 Superfície de resposta para atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP dos extratos foliares de *M. oleifera* obtidos por extração-assistida por ultrassom. .... 34
- Figura 10 Superfície de resposta para compostos fenólicos totais (TPC) e conteúdo de flavonoides (TFC) dos extratos foliares de *M. oleifera* obtidos por extração-assistida por ultrassom. .... 35
- Figura 11 Perfil de desejabilidade usando o planejamento Box-Behnken para otimização da extração-assistida por ultrassom das folhas de *M. oleifera*. . 36
- Figura 12 Inibição do crescimento micelial de (A) *A. flavus* e (B) *P. italicum* utilizando extratos de folhas de *M. oleifera* obtidos por ultrassom a 75% (solução etanólica v/v), 54 °C e 78% (amplitude). As colunas verticais representam a média de três repetições e as barras verticais em vermelho corresponde ao desvio-padrão médio. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). .... 39

- Figura 13. Germinação diária acumulada de sementes de tomate-cereja tratadas com diferentes concentrações de extratos foliares de *Moringa oleífera*. Os pontos são as médias dos valores experimentais e as barras verticais são os desvios-padrão. .... 48
- Figura 14. Porcentagem de germinação de sementes de tomateiro aos 5 dias (A) e 14 dias (B). Índice de velocidade de germinação de sementes de tomateiro (C). Barras verticais em vermelho são os desvios-padrão obtido a partir das quatro repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). .... 49
- Figura 15 Comprimentos das partes aérea (A) e raiz (B) de plântulas de tomateiro Cereja sob imersão em diferentes concentrações de extratos foliares de *Moringa oleífera*. As barras verticais em vermelho são os desvios-padrão obtido a partir das quatro repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). .... 51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais componentes químicos presentes nas folhas de <i>Moringa oleifera</i> ...	5
Tabela 2 Parâmetros cinéticos do modelo de Peleg e variáveis estatísticas para rendimentos de extração de diferentes técnicas de extração.....	25
Tabela 3 Matriz do planejamento Box-Behnken e valores experimentais das variáveis respostas obtidos dos extratos foliares de <i>M. oleifera</i> obtidas por EAU .....	27
Tabela 4 Coeficientes de regressão e avaliação dos modelos matemáticos para rendimento, DPPH, FRAP, TPC e TFC dos extratos de folhas de <i>M. oleifera</i> obtidos por ultrassom.....	30
Tabela 5 Validação dos modelos a partir dos valores estimados para rendimento, atividade antioxidante (IC <sub>50</sub> e FRAP) e CFT .....	37
Tabela 6 Compostos bioativos determinados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa a partir de extratos foliares de <i>Moringa oleifera</i> obtidos por ultrassom em condições otimizadas .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

A *Moringa oleifera* é amplamente utilizada em muitos países por indústrias químicas, alimentícias e de biocombustíveis. Entre suas principais características destacam-se os altos valores nutricionais e medicinais, como também a presença de proteínas coagulantes para tratamento de água e efluentes. As folhas podem conter de 4,30 a 6,30% de óleo essencial, constituído principalmente por ácido 1,2-benzeno dicarboxílico e éster mono-2-etil-hexílico (Zhao; Zhang, 2013).

Pesquisas recentes mostraram que os extratos de folhas de *M. oleifera* têm várias propriedades biológicas úteis, incluindo atividades anti-hipertensivas, antifúngicas e antitumorais (Zhao; Zhang, 2013), devido à presença de grandes quantidades de diferentes compostos polifenólicos, principalmente flavonoides (Rocchetti et al., 2019). Por outro lado, a composição fitoquímica é influenciada por diversos fatores, como estágio fisiológico da planta, condições pedoclimáticas e origem geográfica (Lombardi et al., 2017). Além disso, os métodos e condições de extração em que o material vegetal é submetido podem também exercer grande influência nas propriedades e qualidade dos extratos.

A esse respeito, técnicas emergentes de extração mais seguras e ecologicamente corretas estão sendo aplicadas em comparação com os métodos de extração convencionais, para serem utilizadas na recuperação de compostos bioativos de partes vegetativas de diversas plantas, como folhas de cravo (Frohlich et al., 2019), raiz de vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) (Santos et al., 2019) e folhas de jaca (Vázquez-González; Ragazzo-Sánchez; Calderón-Santoyo, 2020). Um dos métodos emergentes de extração mais utilizados é a extração assistida por ultrassom (EAU), que em um curto intervalo de operação pode recuperar grandes quantidades de compostos orgânicos. Ela é empregada especialmente para extração de polifenólicos, carotenoides, aromas e polissacarídeos de matrizes vegetais. As variáveis associadas aos EAU, como potência, amplitude, ciclo de trabalho, temperatura, tempo, tipo de solvente e proporção líquido-sólido precisam de controle preciso para uma extração ideal. Os efeitos individuais e interativos dessas variáveis têm sido estudados por diversos pesquisadores na extração de compostos bioativos de produtos vegetais (sementes, frutas, cascas, raízes, folhas, flores etc.) (Kumar; Srivastav; Sharanagat, 2021). Em relação à extração de compostos bioativos a partir de folhas de *M. oleifera*, os efeitos dos parâmetros de temperatura de extração, amplitude e concentração de etanol devem ser mais bem estudados. A utilização de etanol+água como solvente pode contribuir, ainda, para um processo mais sustentável, em comparação aos solventes orgânicos como éter de petróleo, hexano e ciclohexano, e metanol, que são poluentes.

Recentes estudos sobre a aplicação dos extratos foliares de *M. oleífera* (EFM) para fins agrícolas na melhoria da germinação de sementes, crescimento e rendimento de culturas agrônômicas têm apresentado ótimo desempenho, como no aumento do crescimento de girassol usando 50% de extrato aquoso (Iqbal et al., 2020), melhoria do crescimento e os parâmetros bioquímicos da moringa cultivada em condições de baixa temperatura (Batool; Khan; Basra, 2020) atuou como bioestimulante natural para gerânio (Ali; Hassan; Elgimabi, 2018). Ainda, de acordo com Khan et al. (2022), sementes de arroz tratadas com EFM obtiveram melhoria na velocidade e propagação de plântulas em condição de estresse hídrico.

No que diz respeito à produção de sementes e plantas de tomateiros, muitas variedades não são tolerantes ou resistentes ao frio e estresse hídrico. Por isso, é necessário novos estudos com a aplicação de extratos bioativos de diferentes plantas que apresentam potencial para minimizar esse problema. Além disso, a aplicação de EFM em sementes de tomate pode ajudar a reduzir a contaminação por fitopatógenos fúngicos, como *Rhizoctonia solani* e *Fusarium ssp.*, que causam graves doenças nas plantas (Righini et al., 2021).

Com base nos estudos mencionados, o trabalho visa avaliar e otimizar o processo de extração de compostos bioativos das folhas de *M. oleífera* em diferentes temperaturas, amplitudes e concentrações de etanol na EAU. O trabalho busca maximizar o rendimento de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos obtidos. bem como estudar o potencial bioestimulante dos extratos no tratamento de sementes de tomateiro.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a otimização do processo de extração de compostos bioativos de folhas de *Moringa oleífera* utilizando a extração-assistida por ultrassom em diferentes condições operacionais. Aplicar os extratos foliares aquosos de *M. oleífera* no tratamento de sementes de tomateiro.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estudar a cinética de extração pelos métodos de agitação e ultrassom e obter o melhor tempo de extração;
- Avaliar os extratos foliares de *Moringa oleífera* obtidos por ultrassom e soxhlet quanto a composição bioativa (compostos fenólicos e atividade antioxidante);
- Otimizar a extração de compostos bioativos de folhas de *Moringa oleífera* por ultrassom;
- Determinar os compostos bioativos presentes nos extratos foliares;
- Avaliar a efetividade dos extratos contra patógenos;
- Aplicar os extratos obtidos na condição ideal de ultrassom como tratamento de sementes de tomateiro;
- Avaliar os efeitos do tratamento de sementes de tomateiro sobre seu potencial germinativo e crescimento de plântulas;

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Moringa oleifera*

##### 3.1.1 Aspectos gerais da *Moringa oleifera*

*M. oleifera* é uma planta que data da antiguidade e tem origem na região ecológica do Indo-Paquistão (Shahzad et al., 2013); foi usada pelos antigos romanos, gregos e egípcios para fins alimentícios e cosméticos. Nas últimas décadas tem sido amplamente cultivada em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (Fahey, 2005), em particular na África Central e do Sul, China, Filipinas, Ceilão, Tailândia, Malásia, Birmânia, Paquistão, Cingapura, ainda na região Central e América do Sul, como no Brasil (Anwar et al., 2006).

A descrição taxonômica inclui reino Plantae, sub-reino Tracheobionta, superdivisão Spermatophyta, divisão Magnoliophyta, classe: Magnoliopsida, subclasse: Dilleniidae, ordem: Brassicales, família: Moringaceae, gênero: *Moringa* e espécies: *oleifera* (Fahey, 2005). No total, ainda são conhecidas 13 espécies do gênero *Moringa* (Leone et al., 2015), porém a *M. oleifera* é a mais utilizada para produção e pesquisa.

A árvore se adapta bem entre temperaturas de 19 a 35° C, sob luz solar direta, a uma altitude de 500 m em solo levemente ácido a alcalino (pH 5,0 a 9,0). Além disso, pode tolerar superaquecimento de até 48 °C, geadas de inverno, altitude e uma ampla gama de condições do solo (Saini; Sivanesan; Keum, 2016).

##### 3.1.2 Composição nutricional das folhas de *Moringa oleifera*

O uso eficiente dos recursos que as plantas podem oferecer é de grande importância para os sistemas industriais e agrícolas para uma produção sustentável e, sobretudo, para a melhoria da qualidade dos produtos e subprodutos deles derivados. Assim, o conhecimento das propriedades físicas, químicas, térmicas e nutricionais determina as principais características desses recursos e seus respectivos usos.

As folhas de *M. oleifera* são tradicionalmente utilizadas para consumo humano e animal. No entanto, pesquisas recentes mostraram uma série de outros usos, especialmente medicinais e farmacológicos. De acordo com Gopalakrishnan et al. (2016), folhas de *M. oleifera* têm excelentes propriedades antidiabéticas e anticâncer; sua presença em alimentos formulados trazem alto valor e qualidade nutricional. Na Tabela 1 é apresentada a caracterização química de suas folhas.

Tabela 1 Principais componentes químicos presentes nas folhas de *Moringa oleifera*

Composição química	Quantidade
Proteína (g 100 g <sup>-1</sup> )	28.5 – 32.4
Fibra (g 100 g <sup>-1</sup> )	33.2 – 38.7
Cinzas (g 100 g <sup>-1</sup> )	6.8 – 8.2
Carboidratos (g 100 g <sup>-1</sup> )	4.3 – 4.8
Lipídios (g 100 g <sup>-1</sup> )	5.2 – 7.72
Mg (mg 100 g <sup>-1</sup> )	200 – 255
Ca (mg 100 g <sup>-1</sup> )	1505 – 1915
P (mg 100 g <sup>-1</sup> )	245 – 415
K (mg 100 g <sup>-1</sup> )	1600 – 1705
Fe (mg 100 g <sup>-1</sup> )	11-15

Fonte: Sebola; Mlambo; Mokoboki (2019).

Tem sido relatado que as folhas são uma excelente fonte de proteínas, vitaminas, carotenoides, antioxidantes naturais e diversos minerais (Ca, K, Fe, Mg), o que a torna adequada para o consumo em países em desenvolvimento onde a desnutrição é uma questão-chave. As espécies de *Moringa* contêm mais vitamina A do que cenouras, mais vitamina C do que laranjas, mais ferro do que espinafre, mais potássio do que bananas, mais cálcio do que leite, e o teor de proteínas nas folhas de *Moringa* são relatados como sendo semelhante ao leite (Fahey, 2005). As folhas também contêm compostos antioxidantes como ácido ascórbico, flavonoides como rutina, quercetina, fenólicos e carotenoides (Ndong et al., 2007).

### 3.1.3 Composição fitoquímica

Caules, folhas, flores e vagens *M. oleifera* possuem metabólitos secundários bioativos, ácidos fenólicos (ácido elágico, ácido gálico, ácido ferúlico e ácido clorogênico), glicosídeos e glucosinolatos que possuem características nutricionais e farmacêuticas. Cada parte da *M. oleifera* é relatada apresentando um grupo de compostos conhecidos como os glucosinolatos, isto é, O-etil-4- ( $\alpha$ -L-ramnosiloxi) carbamato de benzila, 4-( $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi) benzilglucosinolato, 4- ( $\alpha$ -L-ramnosiloxi) benzil isotiocianato. Esses compostos são conhecidos pela atividade hipotensora, quimiopreventiva e antibacteriana (Akhtar; Ahmad, 1995; Anwar; Bhangar, 2003).

Os compostos fenólicos são outro grupo de fitoconstituintes relatados em *M. oleifera*. As folhas das plantas apresentam predomínio da quercetina e do kaempferol em suas formas 3-O-glicosídicas (Anwar et al., 2006). Quercetina e kaempferolm exibem

potente atividade antioxidante. A forma 3-O-glicosídica da quercetina é conhecida como isoquercitrina ou isotrifolina, experimentalmente comprovada por apresentar efeitos hipotensivos, antilipídêmicos e antidiabéticos em ratos obesos (Rivera et al., 2008). O ácido clorogênico e o ácido fenólico são identificados nas folhas da planta, mostrando a capacidade de auxiliar no metabolismo da glicose em ratos por meio da inibição da translocase de glicose no fígado de ratos (Karthikesan; Pari; Menon, 2010).

### 3.2 Métodos de extração

Os componentes bioativos presentes na matriz vegetal podem ser separados por meio de abordagens combinadas (bioquímicas, químicas e físicas) para extração seletiva e modificação dos componentes alvos e transformados em produtos alimentícios de maior valor ou aditivos (Baiano, 2014). Na maioria dos casos, uma extração com solvente apropriado é usada para recuperar as substâncias alvo e separá-las da matriz vegetal. Os óleos vegetais também podem ser extraídos por prensagem mecânica, com compostos voláteis por vapor ou hidrodestilação.

Para aumentar a eficiência da extração, ela pode ser precedida por vários processos de pré-tratamento, como moagem, mistura, homogeneização, extrusão, desidratação, secagem, entre outros. A hidrólise enzimática da matriz sólida pode facilitar o acesso do solvente à matriz vegetal e auxiliar na difusão das moléculas extraíveis no solvente. Em alguns casos, o pré-tratamento térmico também pode afetar fortemente a eficiência de extração, uma vez que, dependendo da temperatura, enzimas-chave podem ser ativadas ou inativadas (Galanakis, 2012). A seguir são descritos os principais métodos de extração entre convencionais e emergentes.

#### 3.2.1 Métodos convencionais de extração

Hidrodestilação: é o método mais simples para extração de óleos essenciais que teve origem por volta de 980-1037. Nesse método material vegetal fica imerso diretamente na água dentro de um frasco que é todo levado à ebulição. O dispositivo de extração inclui uma fonte de aquecimento sob um vaso no qual é colocado o material vegetal e água. A configuração compreende também um condensador e um decantador para coletar o condensado e separar os óleos da água, respectivamente (Figura 1). O princípio da extração é baseado na destilação azeotrópica. De fato, na pressão atmosférica e durante o processo de extração (aquecimento), as moléculas de água e os óleos essenciais formam uma mistura heterogênea que atinge sua temperatura de ebulição em um ponto mais baixo perto de 100 °C, enquanto para os componentes dos óleos essenciais este ponto é muito alto.

A mistura óleo/água é então destilada simultaneamente como se fossem um único composto. Isso é referido como co-destilação na presença de vapores de água como unidade de solvente. A vantagem da água é que ela é imiscível com a maioria das moléculas terpênicas dos óleos e, portanto, após a condensação, as moléculas lipídicas podem ser facilmente separadas da água por decantação simples. A hidrodistilação pelo sistema Clevenger é o mais recomendado e reconhecido internacionalmente.

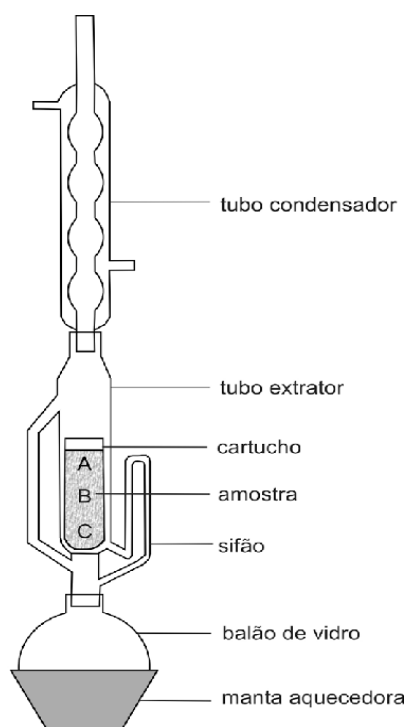


Figura 1 Equipamento Clevenger para hidrodistilação.

Extração por solventes: Os solventes comumente usados para extração são álcool, hexano, etanol, éter de petróleo e metanol. A principal vantagem da extração em relação à hidrodistilação é que uma temperatura mais baixa é usada durante o processo, reduzindo o risco de alterações químicas devido às altas temperaturas, que são usadas durante a destilação (Asbahani et al., 2015). A extração por solvente é barata e relativamente rápida e como as taxas de difusão são influenciadas pela temperatura, é possível aumentar a velocidade do processo usando outros solventes. Os extratos obtidos conterão uma pequena quantidade de solvente e água como resíduo e, portanto, devem ser retirados para obter um produto com maior pureza. Este método é comumente usado pela indústria de perfumes (Ríos, 2015).

Prensagem a frio: Este método se refere a qualquer processo físico durante o qual as glândulas de óleo essencial na casca e cutículas são quebradas para que o óleo seja

liberado. Esse processo resulta na produção de uma emulsão aquosa, que posteriormente é centrifugada para separar o óleo essencial (Bousbia et al., 2009).

### 3.2.2 Métodos emergentes de extração

Para superar os problemas encontrados na utilização de métodos convencionais e, principalmente, para reduzir o consumo de energia e impacto negativo no meio ambiente e no ser humano, diversos processos de extração alternativos (extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração com líquido pressurizado, extração de fluido supercrítico) foram desenvolvidos.

Extração assistida por ultrassom (EAU): A extração assistida por ultrassom tem atraído muito interesse nos últimos anos devido às suas muitas vantagens na recuperação de compostos orgânicos de alto valor de diferentes matrizes em comparação com os métodos de extração convencionais. Os principais benefícios são uma extração mais curta e eficaz, reduzindo assim o consumo de energia. O uso de temperaturas moderadas é benéfico para compostos sensíveis ao calor.

Ultrassons (US) são ondas mecânicas com frequências acima das sensíveis ao ouvido humano (de 20 kHz a 10 MHz). Particularmente na extração sólido-líquido assistida por US, a amostra é imersa no solvente e submetida ao ultrassom com sonda US ou banho US. Quando as ondas são transmitidas através do meio líquido, elas induzem um deslocamento longitudinal das partículas, enquanto a fonte da onda sonora atua como um pistão, resultando em uma sucessão de fases de compressão e rarefação no meio (Chemat; Zill-E-Huma; Khan, 2011).

Em comparação com os métodos de extração tradicionais, a EAU melhora a eficiência e a taxa de extração, reduz a temperatura de extração e aumenta as faixas de seleção dos solventes (Romanik et al., 2007). Os equipamentos são relativamente simples e baratos em comparação com outras técnicas, como a extração com fluido supercrítico. Além disso, a EAU é benéfica para materiais botânicos que são sensíveis à temperatura. As outras vantagens do ultrassom são a intensificação da transferência de massa, o rompimento das células, a melhora da penetração do solvente e o efeito capilar (Asbahani et al., 2015). A apresentação esquemática de um extrator por ultrassom é apresentada na Figura 2.

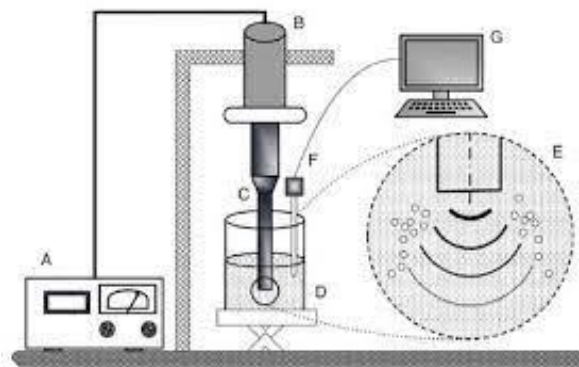


Figura 2 Representação de um equipamento para extração por ultrassom, composto por (A) controlador, (B) conversor, (C) sonda ultrassônica, (D) depósito do solvente e amostra, (E) propagação das ondas, (F) controlador de temperatura, e (G) analisador. Fonte: Adaptado de Kadam et al. (2015).

Extração assistida por micro-ondas (EAM): A EAM atraiu atenção significativa para pesquisas em várias áreas, especialmente para plantas medicinais. Apresenta custo de capital moderado, mecanismo de aquecimento especial e sua boa eficácia sob condições atmosféricas. As micro-ondas consistem em um campo elétrico e um campo magnético oscilando em uma frequência que varia de 0,3 a 300 GHz. As micro-ondas podem entrar em materiais vegetais e interagir com os componentes polares para gerar calor. O princípio do EAM depende da condução iônica e da rotação dipolar por meio de um efeito direto de micro-ondas nas moléculas do sistema extraído e também funciona porque apenas materiais direcionados e seletivos podem ser aquecidos com base em sua constante dielétrica (Sparr Eskilsson; Björklund, 2000).

O EAM pode ser classificada em “sistema fechado” e “sistema aberto” com base na operação acima e abaixo da pressão atmosférica, respectivamente. EAM padrão é comumente empregado em sistemas abertos ou fechados para extrair compostos termoestáveis. Para extração de compostos ativos degradáveis, existem várias técnicas EAM modificadas que são adequadas para a aplicação. A EAM dinâmica é adequada para extrair compostos degradáveis que requerem múltiplos ciclos de extração, uma vez que a técnica funciona em condições moderadas e de maneira contínua. Esta técnica promove uma etapa analítica eficiente e rápida, pois pode ser acoplada on-line ao sistema de análise HPLC. Além disso, para compostos altamente frágeis, que preveem altos riscos de oxidação e degradação térmica, a EAM a vácuo é adequada porque a extração é feita em baixa temperatura e sem influência das condições atmosféricas.

Extração por fluido supercrítico (EFS): o estado supercrítico de fluidos é alcançado em condições bem definidas: pressão crítica e temperatura, apresentando como principais características: baixa viscosidade, alta difusividade e densidade próxima à dos líquidos. O

dióxido de carbono é geralmente o solvente mais usado para a extração devido às seguintes vantagens: (i) ponto crítico é facilmente alcançado (baixa pressão crítica (72,9 atm) e temperatura (31,2 °C), (ii) não agressivo para moléculas termossensíveis que compõem o material vegetal (Herrero; Cifuentes; Ibañez, 2006); (iii) é quimicamente inerte e não tóxico, (iv) não inflamável, (v) disponível em alta pureza a um custo relativamente baixo, (vi) fácil eliminação de seus vestígios do extrato obtido (Pourmortazavi; Hajimirsadeghi, 2007) e (vii) sua polaridade semelhante ao pentano, o que o torna adequado para a extração de compostos lipofílicos. O CO<sub>2</sub> atinge o estado supercrítico por meio da alta compressão e aquecimento, ao entrar em contato com o extrato vegetal a matéria volátil é carregada, seguido por uma etapa de depressão: o extrato é encaminhado para um ou mais separadores, em que o CO<sub>2</sub> é gradualmente descomprimido (perdendo assim o seu poder solvente) para separar o extrato obtido a partir do fluido. Pode ser seguido por uma etapa de recuperação do solvente (Figura 3).



Figura 3 Representação esquemática do processo de extração com fluido supercrítico. Fonte: Adaptado de Pereira et al. (2017).

O uso de fluidos supercríticos para a extração de óxidos aumentou nas últimas duas décadas. O único obstáculo ao seu desenvolvimento é o alto custo dos equipamentos e das instalações (Asbahani et al., 2015). Porém, os custos operacionais do SFE são relativamente baixos, justificando seu uso. Além disso, estudos recentes relatam que o custo da matéria-prima é um fator limitante quando o resíduo de SFE não é reaproveitado. Albuquerque e Meireles (2012), em seu trabalho sobre SFE de sementes de urucum, encontraram o custo da matéria-prima como o mais representativo no Custo de Produção, podendo chegar a 80% do valor. A maior contribuição do custo da matéria prima para o custo de produção também foi observada por outros autores (Leal et al., 2010).



A extração é a principal etapa de obtenção de compostos com alta atividade biológica, a exemplo dos polifenóis. Nos últimos anos, técnicas de extração inovadoras têm sido aplicadas com sucesso, com tempos encurtados, uso reduzido de solventes orgânicos, maior recuperação dos compostos e um impacto ambiental minimizado em comparação com alguns métodos de extração convencionais, como maceração, extração térmica, entre outros (Saini; Keum, 2018). Assim, para que se tenha sucesso durante o aproveitamento da matéria-prima, a etapa de extração é crucial para obter um subproduto de alta qualidade e com valor agregado, e principalmente com as características adequadas para a sua finalidade.

### 3.3 Tomaticultura

O tomate (*Solanum lycopersicum* L., família Solanaceae) tornou-se, nos últimos cinquenta anos, uma das culturas hortícolas mais importantes e extensivamente cultivadas em todo o mundo. Em 2020, mais de 186,2 milhões de toneladas de tomate foram produzidas globalmente. A China é o maior produtor de tomate (mais de 64,7 milhões de toneladas), seguida pela Índia, Turquia, Estados Unidos e Egito são os maiores produtores de tomate na Europa (mais de 5,7 milhões e 4,7 milhões de toneladas, respectivamente). Na última década entre 2010 e 2020, a produção global de tomate aumentou em mais de 33 milhões de toneladas (FAO, 2022). *Solanum* é provavelmente o gênero economicamente mais importante presentes em todos os continentes temperados e tropicais e se destaca por sua diversidade morfológica e ecológica (Weese; Bohs, 2007).

Como os tomates apresentam um amplo pacote nutricional, são facilmente cultivados e são altamente adaptáveis. As incertezas no fornecimento de alimentos colocaram esta cultura no escalão superior para combater os problemas de segurança alimentar. Os tomates não são usados apenas como produtos frescos, mas também em uma ampla gama de produtos processados, como suco, pasta, pó, sopa, molho e concentrado. Eles são enriquecidos com nutrientes como  $\beta$ -caroteno, licopeno e vitamina C, todos conhecidos por seus impactos positivos na saúde humana (Bergougnoux, 2014).

O tomate tipo cereja vem apresentando crescente produção devido principalmente ao melhoramento genético com desenvolvimento de cultivares híbridas e aprimoramento em cultivos protegidos. Constitui-se como uma opção rentável para produtores de hortaliças, combinando valor agregado, facilidade de produção e resistência a pragas (Rocha, et al., 2010). Entretanto, sua exposição contínua a novos fatores bióticos, como patógenos, podem causar novas emergências fitossanitárias (Davino et al., 2020). A cultura é susceptível a mais de 200 doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e fitoplasma

durante seu cultivo e manejo pós-colheita em variedades e híbridos existentes (Singh, 2018).

Os frutos do tomate-cereja apresentam tamanho reduzido, com aproximadamente 30 g, de formatos diversos tipicamente arredondados ou alongados, biloculares, dispostos na planta em cachos, com 8-18 ou mais frutos (Rocha; Peil; Cogo, 2010).

### 3.4 Referências

AKHTAR, A. H.; AHMAD, K. U. Anti-ulcerogenic evaluation of the methanolic extracts of some indigenous medicinal plants of Pakistan in aspirin-ulcerated rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 1, p. 1-6, 1995.

ALBUQUERQUE, C. L. C.; MEIRELES, M. A. A. Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 6, p. 86-95, 2012.

ALI, E. F.; HASSAN, F. A. S.; ELGIMABI, M. Improving the growth, yield and volatile oil content of *Pelargonium graveolens* L. Herit by foliar application with moringa leaf extract through motivating physiological and biochemical parameters. **South African Journal of Botany**, v. 119, p. 383-389, 2018.

ANWAR, F.; BHANGER, M. I. Analytical Characterization of *Moringa oleifera* Seed Oil Grown in Temperate Regions of Pakistan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6558–6563, 2003.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 17-25, 2006.

ASBAHANI, A. EL; MILADI, K.; BADRI, W.; M. SALA, E.H. AÏT ADDI, H. CASABIANCA, A. EL MOUSADIK, D. HARTMANN, A. JILALE, F.N.R. RENAUD, A. ELAISSARI. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015.

BAIANO, A. Recovery of biomolecules from food wastes - A review. **Molecules**, 2014.

BATTOOL, S.; KHAN, S.; BASRA, S. M. A. Foliar application of moringa leaf extract improves the growth of moringa seedlings in winter. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 347-353, 2020.

BERGOUGNOUX, V. The history of tomato: From domestication to biopharming. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 170-189, 2014.

BOUSBIA, N.; VIAN, M. A.; FERHAT, M. A.; MEKLATI, B. Y.; CHEMAT, F. A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 3, p. 409-413, 2009.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. **Anais...**, 2011.

DAVINO, S.; CARUSO, A. G.; BERTACCA, S.; BARONE, S.; PANNO, S. Tomato brown rugose fruit virus: Seed transmission rate and efficacy of different seed disinfection treatments. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1-13, 2020.

FAHEY, J. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. **Trees for life Journal**, v. 1, p. 5, 2005.

FROHLICH, P. C.; SANTOS, K. A.; PALÚ, F. CARDOZO-FILHO, I.; SILVA, CAMILA DA; SILVA, E. A. Evaluation of the effects of temperature and pressure on the extraction of

eugenol from clove (*Syzygium aromaticum*) leaves using supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 143, p. 313-320, 2019.

GALANAKIS, C. M. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 68-87, 2012.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136-148, 2006.

IQBAL, J.; IRSHAD, J.; BASHIR, S.; et al. Comparative study of water extracts of Moringa leaves and roots to improve the growth and yield of sunflower. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 221-224, 2020.

KADAM, S. U.; ÁLVARES, C.; TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. **Extraction of biomolecules from seaweed**. Seaweed Sustainability, Chapter 9, 27p, 2015.

KARTHIKESAN, K.; PARI, L.; MENON, V. P. Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 3, p. 643-650, 2010.

KHAN, S.; IBRAR, D.; BASHIR, S.; RASHID, N.; HASNAIN, Z.; NAWAZ, M.; AL-GHAMDI, A.A.; ELSHIKH, M.S.; DVOŘÁČKOVÁ, H.; DVOŘÁČEK, J. Application of Moringa Leaf Extract as a Seed Priming Agent Enhances Growth and Physiological Attributes of Rice Seedlings Cultivated under Water Deficit Regime. **Plants**, v. 11, n. 3, p. 261, 2022.

KUMAR, K.; SRIVASTAV, S.; SHARANAGAT, V. S. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 70, 105325, 2021.

LEAL, P. F.; KFOURI, M. B.; ALEXANDRE, F. C.; FÁBIO H.R. FAGUNDES, JULIANA M. PRADO, MARCOS H. TOYAMA, M. ANGELA A. Meireles Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 38-45, 2010.

LEONE, A.; SPADA, A.; BATTEZZATI, A.; SCHIRALDI, A.; ARISTIL, J.; BERTOLI, S. Cultivation genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of Moringa oleifera leaves: An overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 12791-12835, 2015.

LOMBARDI, G.; COSSIGNANI, L.; GIUA, L.; M.S. SIMONETTI, A. MAURIZI, G. BURINI, R. COLI, F. BLASI. Phenol composition and antioxidant capacity of red wines produced in Central Italy changes after one-year storage. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 90, p. 197-204, 2017.

NDONG, M.; UEHARA, M.; KATSUMATA, S.; SATO, S.; SUZUKI, K. Preventive effects of Moringa oleifera (Lam) on hyperlipidemia and hepatocyte ultrastructural changes in iron deficient rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 2007.

PEREIRA, R. G.; NAKAMURA, R. N.; RODRIGUES, M. V. N.; J. FELIPE OSORIO-TOBÓN, VERA LÚCIA GARCIA, JULIAN MARTINEZ. Supercritical fluid extraction of phyllanthin and niranthin from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 127, p. 23-32, 2017.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography A**, 2007.

RIGHINI, H.; FRANCIOSO, O.; DI FOGGIA, M.; PRODI, A.; QUINTANA, A. M.; ROBERT, R. Tomato seed biopriming with water extracts from *Anabaena minutissima*, *Ecklonia maxima* and *Jania adhaerens* as a new agro-ecological option against *Rhizoctonia solani*. **Scientia Horticulturae**, v. 281, p. 109921, 2021.

RÍOS, J. L. Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. In: PREED, V. R. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**, 2015.

RIVERA, L.; MORÓN, R.; SÁNCHEZ, M.; ZARZUELO, A.; GALISTEO, M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. **Obesity**, v. 16, n. 9, p. 2081-2087, 2008.

ROCCHETTI, G.; BLASI, F.; MONTESANO, D.; GHISONI, S.; MARCOTULLIO, M. C.; SABATINI, S.; COSSIGNANI, L.; LUCINI, L. Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of *Moringa oleifera* leaves. **Food Research International**, v. 115, n. xxxx, p. 319-327, 2019.

ROCHA, M. C.; GONÇALVES, L. S. A.; RODRIGUES, R.; SILVA, P. R. A.; CARMO, M. G. F.; ABOUD, A. C. S. Uso do algoritmo de Gower na determinação da divergência genética entre acessos de tomateiro do grupo cereja. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 423-431, 2010.

ROCHA, M. DE Q.; PEIL, R. M. N.; COGO, C. M. Rendimento do tomate cereja em função do cacho floral e da concentração de nutrientes em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 466-471, 2010.

ROMANIK, G.; GILGENAST, E.; PRZYJAZNY, A.; KAMIŃSKI, M. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 253-261, 2007.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, p. 90-103, 2018.

SAINI, R. K.; SIVANESAN, I.; KEUM, Y. S. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. **3 Biotech**, v. 6, p. 203, 2016.

SANTOS, K. A.; KLEIN, E. J.; DA SILVA, C.; DA SILVA, E. A.; CARDOZO-FILHO, L. Extraction of vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) root oil by supercritical CO<sub>2</sub>, pressurized-liquid, and ultrasound-assisted methods and modeling of supercritical extraction kinetics. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 150, p. 30-39, 2019.

SEBOLA, N. A.; MLAMBO, V.; MOKOBOKI, H. K. Chemical characterisation of *Moringa oleifera* (MO) leaves and the apparent digestibility of MO leaf meal-based diets offered to three chicken strains. **Agroforestry Systems**, v. 93, p. 149-160, 2019.

SHAHZAD, U.; KHAN, M. A.; JASKANI, M. J.; KHAN, I. A.; KORBAN, S. S. Genetic diversity and population structure of *Moringa oleifera*. **Conservation Genetics**, v. 14, p. 1161-1172, 2013.

SINGH, B. **Plant Breeding: Principles and Methods**. 11<sup>th</sup>.ed. New Delhi: Kalyani Publishers, 2018.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR, J. A.. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdate-tungstic acid reagents. **American Journal for Enology and Viticulture**, v. 1965, n. 16, p. 144-158, 1965.

SPARR ESKILSSON, C.; BJÖRKLUND, E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. **Journal of Chromatography A** 2000.

VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, Y.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A.; CALDERÓN-SANTOYO, M. Characterization and antifungal activity of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) leaf extract obtained using conventional and emerging technologies. **Food Chemistry**, 2020.

WEESE, T. L.; BOHS, L. A three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (Solanaceae). **Systematic Botany**, v. 32, n. 2, p. 445-463, 2007.

ZHAO, S.; ZHANG, D. Supercritical fluid extraction and characterisation of *Moringa oleifera* leaves oil. **Separation and Purification**

#### **4. Artigo 1. Extração-assistida por ultrassom de compostos bioativos de folhas de *moringa oleifera*: otimização dos parâmetros de extração e análise CG-MS**

**RESUMO:** A *Moringa oleifera* Lam. é uma planta que possui propriedades biológicas promotoras da saúde; esses compostos estão presentes em suas raízes, caules, folhas, flores e frutos. Este estudo otimizou a extração-assistida por ultrassom de compostos bioativos das folhas de *M. oleifera*. Três condições operacionais foram otimizadas separadamente ( $X_1$ : concentração de etanol,  $X_2$ : temperatura, e  $X_3$ : amplitude) empregando metodologia de superfície de resposta (RSM). A otimização maximizou a recuperação dos rendimentos, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais e flavonoides. As condições operacionais ideais previstas foram  $X_1$ : 75% (v/v),  $X_2$ : 54,0 °C e  $X_3$ : 78%. As respostas obtidas experimentalmente monitorados em condições ótimas estiveram dentro do intervalo de confiança para valores previstos. Assim, extração por ultrassom pode maximizar a recuperação de compostos bioativos em curto intervalo de tempo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Flavonoides, Extratos foliares, Temperatura, Etanol

## 4.1 Introdução

As folhas de *Moringa oleifera* (FMO) são ricas em fitoquímicos com alta atividade biológica. As suas propriedades em destaque incluem atividade antioxidante (Athira Nair et al., 2020; Nobossé et al., 2018), antidiabética (Tshabalala et al., 2020), antibacteriana (Farooq; Koul, 2020), e antifúngica (Tesfay et al., 2018; Kubheka et al., 2020). Seu efeito fungicida foi relatado com eficácia substancial no controle de *Alternaria solani* (Mvumi et al., 2017), *Alternaria alternativa*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Tesfay et al., 2017), e *Aspergillus flavus* (Sukmawati et al., 2020). Pesquisas recentes identificaram vários compostos bioativos presentes nos extratos de FMO, como compostos fenólicos (Mwamatope et al., 2020) e seu subgrupo flavonoides (Lin et al., 2018; Suresh et al., 2020), L-ascorbic acid (Ahmed et al., 2016), saponinas, taninos, alcaloides e terpenoides (Oladeji et al., 2020). Esses metabólitos primários e secundários das plantas são promotores da saúde e são os principais responsáveis pela atividade biológica. Portanto, o estudo de métodos eficientes e não tóxicos de extração deve ser empregado para que os recursos que as plantas possuem sejam bem aproveitados.

As técnicas emergentes de extração se intensificaram nos últimos anos e estão relacionadas a processos mais eco-sustentáveis, como é o exemplo de extração assistida por micro-ondas (Elez Garofulic et al., 2020; Shang et al., 2020), extração assistida por ultrassound (Cheila et al., 2020; Strieder et al., 2021; Wu et al., 2020), extração de alta pressão hidrostática (Vázquez-González et al., 2020) e extração assistida por enzimas (Wen et al., 2020); estes têm sido usados com sucesso para extrair e separar compostos bioativos dos materiais vegetais.

A extração assistida por ultrassom (EAU) é uma tecnologia emergente de baixo custo devido a seu baixo consumo de energia, menor tempo de processamento e menor consumo de solventes orgânicos (Chemat et al., 2017). Os mecanismos não térmicos envolvidos no processo de extração por ultrassom devem-se ao efeito de cavitação acústica (Vilkhu et al., 2008), o que causa rompimento das estruturas das paredes celulares e melhora a recuperação dos compostos presentes (Menezes Maciel Binde et al., 2019). Em relação EAU com solventes verdes, algumas informações sobre a adição de água ao etanol, amplitude e temperatura de extração devem ser mais bem estudadas para FMO para avaliar seus efeitos no rendimento de extratos, compostos bioativos e atividade antifúngica.

Assim, este trabalho teve como objetivo otimizar a extração-assistida por ultrassom para recuperação de composto bioativos a partir das folhas de *Moringa oleifera* de acordo



com o rendimento, atividade antioxidante e flavonoides dos extratos obtidos. A modelagem matemática para a cinética de extração de polifenóis também foi considerada no estudo.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Matéria-prima

As folhas de *M. oleifera* foram obtidas de pomar localizado em Toledo, PR, colhidas em dezembro de 2020. As plantas que formavam a cultura estavam com aproximadamente 2 anos, e as folhas foram colhidas após dois meses da poda anterior realizada a 1 m de altura em relação ao solo. As folhas recém-colhidas foram levadas ao laboratório e selecionadas, em seguida foram secas em estufa padrão com convecção de ar quente a 40 °C por 20 h. As folhas secas foram moídas utilizando liquidificador (Modelo, Faet), e em seguida peneiradas para obter o tamanho padrão de material triturado de 18-mesh. O armazenamento foi feito em sacos plásticos a -5 °C até o início dos experimentos de extração.

### 4.2.2 Métodos de extração

#### 4.2.2.1 Extração assistida por ultrassom

As extrações foram realizadas em um sistema composto por instrumento de ultrassom (Sonics, VCX 750) à frequência fixa de 20 kHz, equipado com sonda de titânio de 13 mm de diâmetro e célula de vidro cilíndrica (250 mL) conectada ao banho termostático (Quimis, Q214M2), controlando a temperatura de extração.

O delineamento Box-Behnken de três níveis com quatro repetições no ponto central foi aplicado para otimizar a concentração da solução de extração (25, 50 e 75% v/v etanol),  $X_1$ , temperatura (40, 50 e 60 °C),  $X_2$ ; e percentual de amplitude (30, 54, e 78% da potência nominal de 750 W),  $X_3$ . Foi utilizado volume fixo de solvente de 50 mL e 2 g de amostras, obtendo a razão sólido/solvente de 1:25. Após cada extração, a fração líquida-sólida obtida foi filtrada em condição de vácuo, e o solvente foi removido do extrato a 50 °C utilizando estufa convectiva. A duração do processo de remoção de solvente foi de 16-24 h até manutenção da massa após três pesagens consecutivas.

Os experimentos foram conduzidos de forma aleatória e o modelo de regressão polinomial de segunda ordem foi ajustado aos dados experimentais, conforme Equação 1.

$$\hat{Y} = a_0 + \sum_{i=1}^k a_i X_i + \sum_{i=1}^k a_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k a_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad \text{Eq.(1)}$$

em que:

$\hat{Y}$  é a variável dependente;

$a_0$  é a constante do modelo;

$a_i$ ,  $a_{ii}$  e  $a_{ij}$  são os coeficientes do modelo (termos lineares, quadráticos e de interação, respectivamente);

$X_i$  e  $X_j$  são os valores das variáveis independentes (temperatura, amplitude e concentração de etanol); e

$\varepsilon$  é o erro experimental.

Superfícies respostas foram gerados a partir dos coeficientes de regressão das equações polinomiais obtidas pelo modelo de regressão. As superfícies foram usadas para apresentar a relação entre as variáveis respostas (rendimento dos extratos, atividade antioxidante e compostos fenólicos) e os níveis de cada variável independente (temperatura, amplitude e concentração de etanol). A significância estatística de cada coeficiente de regressão foi determinada usando o teste t de Student. Os modelos de regressão polinomial foram avaliados por análise de variância (ANOVA). Além disso, a qualidade do ajuste dos modelos de regressão polinomial foi verificada estatisticamente pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{aj}$ ).

#### 4.2.2.2 Extração assistida por agitação

A extração assistida por agitação (EAA) da FMO em pó foi realizada utilizando 5 g de amostra e 75 mL de solvente a 50% de etanol, misturados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, seguido de extração a 50 °C, 175 rpm em diferentes tempos 30-720 min. Após cada extração, as fração líquida-sólida obtida foi filtrada em condição de vácuo, e o solvente foi removido do extrato a 50 °C utilizando estufa convectiva. A duração do processo de remoção de solvente foi de aproximadamente 24 h.

#### 4.2.3 Cinética de extração

O modelo de Peleg foi aplicado neste estudo para comparar o efeito dos parâmetros operacionais (reação de temperatura, razão etanol/água e percentual de amplitude) e extração. As constantes do modelo, a constante de taxa de Peleg ( $k_1$ ) e a constante de capacidade de Peleg ( $k_2$ ) foram utilizadas para avaliar a cinética de extração, bem como a efetividade do ultrassom na obtenção dos extratos de FMO.

O modelo de Peleg é uma ferramenta adequada para prever o rendimento máximo do processo de extração de líquido sólido, uma vez que as curvas de extração, definidas

em função do tempo, podem ser descritas com uma equação não exponencial de Peleg. As equações matemáticas correspondentes são expressas da seguinte forma:

$$C_t = C_i + \frac{t}{k_1 + k_2 t} \quad \text{Eq.(2)}$$

em que:

$C_t$  é o rendimento extraído a qualquer momento (%);

$C_i$  é rendimento inicial;

$t$  é o tempo de extração (min);

$k_1$  constante de taxa de Peleg ( $\text{min g g}^{-1}$ ), relaciona-se com a taxa de extração no início do processo de extração; e

$k_2$  é a constante de capacidade de Peleg ( $\text{g g}^{-1}$ ), refere-se ao rendimento máximo de extração durante o processo de extração.

Considerando que o rendimento inicial da extração é zero, então a equação se torna a seguinte:

$$C_t = \frac{t}{k_1 + k_2 t} \quad \text{Eq. (3)}$$

As diferenças entre as previsões do modelo e as medições experimentais foram calculadas utilizando-se a soma residual de quadrados (RSS) e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

#### 4.2.4 Composto fenólicos totais (CFT)

O CFT dos extratos foliares foram determinados de acordo com o método Folin-Ciocalteu descrito por Wang et al. (2009). Os extratos foliares foram avaliados na concentração de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ . A curva padrão foi preparada com ácido gálico em concentrações de  $50\text{--}500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os valores de absorvância foram medidos em espectrofotômetro (DR/2010, HACH, Lovalane USA) a  $760 \text{ nm}$ , e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de amostra em matéria seca ( $\mu\text{gGAE g}^{-1}$ ). As determinações foram realizadas em triplicata.

#### 4.2.5 Atividade antioxidante (AA)

A atividade antioxidante (AA) foi avaliada pelos ensaios de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e redução do poder antioxidante férrico (FRAP). O método DPPH foi

realizado de acordo com os procedimentos descrito por Müller et al. (2011), utilizando extratos de FMO a 10,0 mg mL<sup>-1</sup>. Os valores de absorvância foram medidos após 30 min da mistura de 1 mL da solução amostra com 3 mL de solução de radical DPPH 0,06 mM em espectrofotômetro (DR/2010, HACH, Lovalane USA) a 515 nm. Os resultados foram expressos em µg de equivalente de ácido gálico (GAE) por g de amostra em matéria seca (µgGAE g<sup>-1</sup>).

O ensaio FRAP foi realizado conforme descrito por Benzie e Strain (1996), utilizando uma concentração de extrato de 10,0 mg mL<sup>-1</sup>. A solução do reagente de trabalho FRAP foi formada por uma solução de tampão acetato (pH 4,7), 10 mmol de TPTZ dissolvido em 40 mmol L<sup>-1</sup> HCl e 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, na razão 10:1:1. Um volume 150 µL dos extratos foram misturados com 1.350 µL de solução reagente FRAP recém-preparada e deixados em repouso em ausência de luz e em temperatura ambiente por 30 min; em seguida, a absorvância da solução foi lida a 593 nm. A capacidade dos extratos em reduzir íons férricos foi obtida por meio de curva de calibração padrão, obtida a partir de cinco diluições de solução aquosa de FeSO<sub>4</sub> na faixa de 100–2000 µg mL<sup>-1</sup>. Os valores de FRAP foram expressos em µmol de equivalente de sulfato ferroso por g de amostra em matéria seca (µmol Fe(II.)SE g<sup>-1</sup>). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.2.6 Flavonoides

O teor de flavonoides foi quantificado pelo método colorimétrico de tricloreto de alumínio, de acordo com Qawasmeh et al. (2012) e Shraim et al. (2021). Para isso, foram utilizados extratos de FMO a 10,0 mg mL<sup>-1</sup> (1 mL), AlCl<sub>3</sub> a 0,1 mol L<sup>-1</sup> (2 mL) e NaAc-HAc tampão pH 4,7 (1 mL), os quais foram misturados e mantidos a 40 °C por 10 min. Após esse período, as medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (DR/2010, HACH, Lovalane USA) a 428 nm. O controle padrão utilizado foi a quercetina (10–100 µg mL<sup>-1</sup>). O conteúdo de flavonoides foi expresso em µg de quercetina equivalente por g de amostra em matéria seca (µgQuE g<sup>-1</sup>).

#### 4.2.7 Avaliação da atividade antifúngica

O efeito antifúngico de diferentes extratos contra *A. flavus* e *P. italicum* foi realizado de acordo com (González Estrada et al., 2017; Vázquez-González et al., 2020). Colônias de *A. flavus* e *P. italicum* foram previamente pré-cultivadas em ágar de dextrose de batata (PDA) por 7 dias a 28 °C. A avaliação foi realizada em discos PDA (6 mm) com micélio, que foi assepticamente colocado em meio PDA com extratos em diferentes concentrações (0,5, 1, 2, 5 e 10 mg mL<sup>-1</sup>). Finalmente, o meio inoculado foi incubado a

28 °C. O diâmetro de crescimento foi registrado durante sete dias. Placas Petri com PDA sem extratos foram usadas como controles. Os resultados foram expressos em percentual de inibição do crescimento micelial.

#### 4.2.8 Identificação de compostos bioativos por CG-MS

Os compostos bioativos em extratos de FMO foram identificados usando cromatógrafo a gás acoplado com sistema espectrômetro de massa GCMS-QP2010 SE (Shimadzu, Japão) com coluna capilar direta Rtx-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm de espessura de filme). A temperatura do forno da coluna foi inicialmente mantida a 70 °C por 2 min, depois aumentada para 250 °C a 10 °C min<sup>-1</sup> e finalmente aumentada para 300 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>. O atraso do solvente foi de 3 min, e amostras diluídas de 1 µl foram injetadas automaticamente usando Autosampler AS3000 (no modo splitless) acoplado ao GC. Hélio foi usado como gás de arraste com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> no modo splitless. O fluxo de gás foi mantido constante durante todo o tempo de análise. Os compostos bioativos foram identificados por espectros de massa com os bancos de dados disponíveis do National Institute Standards and Technology (NIST) 2005 Mass Spectral Library.

#### 4.2.9 Análise estatística

Os dados não analisados pela metodologia de superfície resposta (MSR) foram observados de acordo com um delineamento inteiramente casualizado por análise de variância. A diferença entre as médias dos tratamentos foi avaliada por teste LSD a 5% de significância. Os dados foram processados utilizando o software R-project (versão 4.0.5, R Development Core Team, Viena, Áustria).

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Cinética de extração e rendimentos

O processo de extração e os parâmetros operacionais que afetaram o rendimento da extração por ultrassom (temperatura, concentração de etanol e amplitude) foram modelados utilizando o modelo de Peleg. As constantes do modelo, constante de taxa de Peleg ( $k_1$ ) e a constante de capacidade de Peleg ( $k_2$ ) foram utilizadas para avaliar a cinética de extração e a eficiência do método de extração na obtenção dos extratos FMO.

Os rendimentos obtidos nas extrações por ultrassom variaram na faixa de 21,33 a 29,88% a 50 °C de temperatura, utilizando 50% de etanol (v/v) e 54% de amplitude para tempo de extrações de 1-30 min (Figura 4a). Em comparação com o método de extração

assistida por agitação (SAE), considerado neste estudo como método de extração convencional, apresentou valores de rendimento variando de 21,79 a 27,74% (Figura 4b). No entanto, o intervalo de tempo de extração foi maior (10-1440 min) do que na EAU. Isso demonstra que EAU é um método mais eficaz para a obtenção de extratos de FMO, exigindo tempo de extração consideravelmente menor e permitindo melhores resultados.

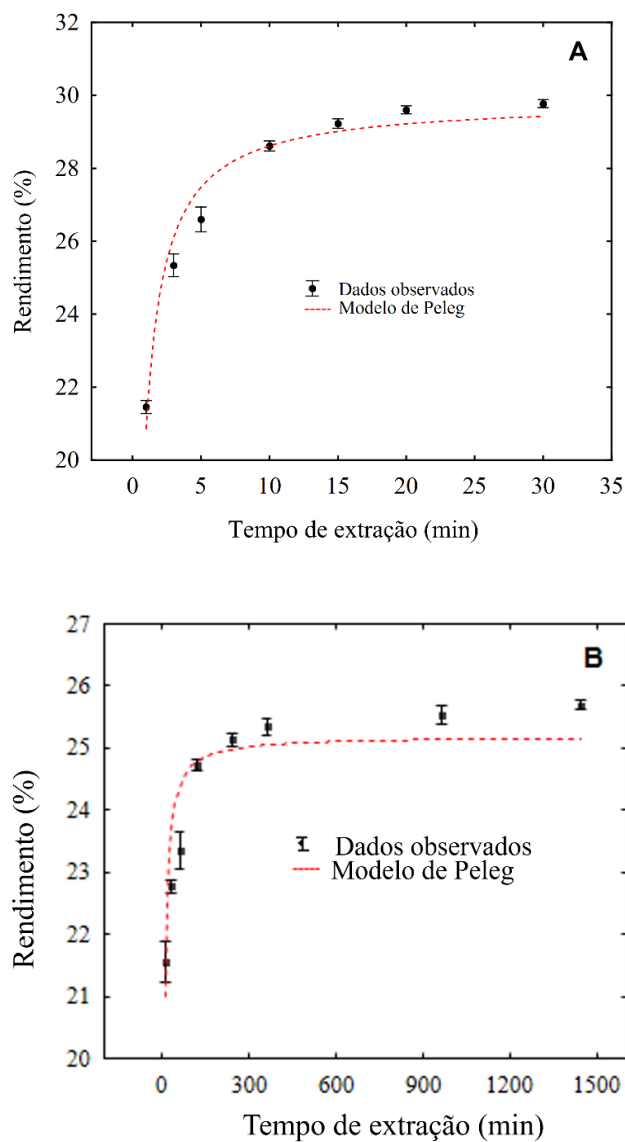


Figura 4 (A) Cinética de extração para extração assistida por ultrassom (50 °C; 50% de etanol v/v; e 54% de amplitude; e (B) cinética de extração obtida por extração por agitação em função do tempo de extração no rendimento dos extratos.

O poder do ultrassom em causar cavitação nos tecidos do material vegetal é bem conhecido, assim como a formação de microjatos que ajudam a aumentar a liberação de compostos ligados ao solvente (Ramandi et al., 2017). Portanto, a proporção de água

presente no solvente pode diminuir a viscosidade de reação do meio, aumentar a transferência de massa e melhorar a eficiência de extração. Além de afetar essas propriedades, a adição de água pode levar a uma mudança na polaridade do solvente, o que pode afetar significativamente sua capacidade de dissolver compostos-alvo. Um maior nível de solubilidade no solvente pode ser alcançado e, assim, impulsionar o processo de extração.

A temperatura também afeta a extração e os rendimentos dos polifenóis devido a mudanças na tensão superficial e viscosidade nos extratos. Prakash Maran et al. (2017) observaram que os rendimentos de antocianinas, flavonoides e fenólicos dos extratos de casca de *Nephelium lappaceum* obtidos pela EAU aumentaram com uso de temperaturas mais altas. Os resultados mostraram que o aumento da porosidade material, a maior solvatação e a transferência de massa podem ser os principais responsáveis pelo aumento do rendimento.

Outro fator significativo nos processos ultrassônicos é a amplitude. A amplitude pode influenciar o microambiente ultrassônico, causando erosão da sonda e reduzindo a formação de cavitação (Chemat et al., 2017). Por sua vez, alta amplitude pode causar agitação líquida em vez de cavitação, de modo que a amplitude é um fator que deve ser estudado e otimizado para encontrar um valor adequado para não prejudicar o processo de extração.

Os resultados de modelagem experimental e os dados experimentais para cinética de extração são apresentados na Tabela 2. Os valores da constante  $k_1$  para UAE e SAE foram de  $14,38 \pm 0,12 \times 10^{-3} \text{ min g g}^{-1}$  e  $79,43 \pm 5,97 \times 10^{-3} \text{ min g g}^{-1}$ , respectivamente; isso indica que a cinética de extração foi maior no EAA, possivelmente devido ao tempo superior de extração. A constante de capacidade do Peleg ( $k_2$ ) correlacionada inversamente à extensão de rendimento alcançado, sendo menor para a EAU. O valor da constante  $k_2$  para a EAU foi de  $33,54 \pm 0,02 \times 10^{-3} \text{ g}^{-1}$ , enquanto para SAE foi de  $39,69 \pm 0,11 \times 10^{-3} \text{ g}^{-1}$  (Tabela 2). O menor valor  $k_2$  indica o maior rendimento de extração obtido, que, como mencionado anteriormente, pode ser devido ao fenômeno de cavitação, que tem um efeito positivo no rendimento do extrato.

Tabela 2 Parâmetros cinéticos do modelo de Peleg e variáveis estatísticas para rendimentos de extração de diferentes técnicas de extração

Método de Extração	$k_1$ $\times 10^{-3} \text{ (min g g}^{-1}\text{)}$	$k_2$ $\times 10^{-3} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	RSS	R <sup>2</sup>
EAU	$14.38 \pm 0.12$	$33.54 \pm 0.02$	4.33	0.981
SAE	$79.43 \pm 5.97$	$39.69 \pm 0.11$	5.57	0.911

A comparação entre os métodos de extração também foi realizada pelos valores de compostos fenólico total (TPC) (Figura 5). Além disso, quanto aos objetivos deste trabalho, os resultados do TPC foram fundamentais para determinar o melhor tempo de extração a ser utilizado na análise de MSR em diferentes condições operacionais do UAE. De acordo com a Figura 5a, o tempo de extração que mais recuperou TPC pela EAU foi de 10 minutos com um valor de 250  $\mu\text{g GAE g}^{-1}$ ; sendo superior aos valores TPC obtidos pelo método SAE (60–97  $\mu\text{g GAE g}^{-1}$ ) utilizando faixa de tempo de 10 a 1440 min (Fig. 2B). A EAU pode ser usado para recuperar quantidades mais significativas de compostos fenólicos de extratos de FMO. Portanto, para otimização do processo de EAU foi utilizado para todos os ensaios o tempo de extração de 10 min.

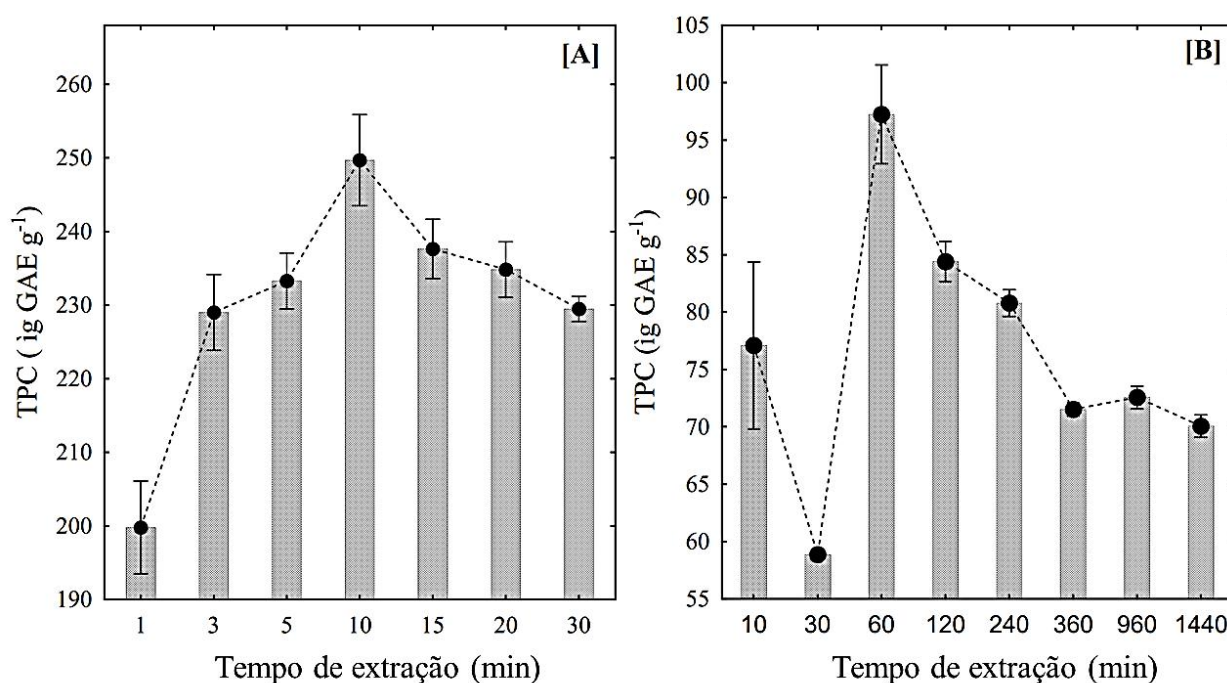


Figura 5 Cinética de extração de polifenóis de folhas de *M. oleifera* para (A) EAU e (B) EAA.

#### 4.3.2 Influência dos parâmetros de ultrassom no processo de extração

Os parâmetros estudados foram concentração de etanol, temperatura e amplitude. A matriz do planejamento experimental Box-Behnken é apresentada na Tabela 3 com os valores reais das variáveis independentes concentração de etanol ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ) e amplitude ( $X_3$ ), e os valores experimentais das respostas (rendimento dos extratos, atividade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides) obtidos no processo de extração por ultrassom ao final de 10 min. É possível observar que os valores obtidos para cada



resposta foram dependentes da concentração de etanol, temperatura e amplitude, devido principalmente aos diferentes valores observados.

Tabela 3 Matriz do planejamento Box-Behnken e valores experimentais das variáveis respostas obtidos dos extratos foliares de *M. oleifera* obtidas por EAU

Ensaio	Conc. de Etanol (%)	Temperat. (°C)	Amplit. (%)	Rend. (%)	Dpph (µgGAE g <sup>-1</sup> )	FRAP (µmol Fe(II.)SE g <sup>-1</sup> )	TPC (µgGAE g <sup>-1</sup> )	TFC (µgGAE g <sup>-1</sup> )
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>R</sub>	Y <sub>Dpph</sub>	Y <sub>FRAP</sub>	Y <sub>TPC</sub>	Y <sub>TFC</sub>
1	25 (-1)	40(-1)	54(0)	26,53	154,32	1344,10	291,68	90,52
2	25(-1)	60(+1)	54(0)	24,00	145,35	1475,79	422,62	93,80
3	75(+1)	40(-1)	54(0)	18,59	149,36	<b>1785,32</b>	<b>515,40</b>	<b>149,73</b>
4	75(+1)	60(+1)	54(0)	24,66	110,36	1600,21	488,05	127,19
5	25(-1)	50(0)	30(-1)	24,21	148,25	1440,24	382,90	99,21
6	25(-1)	50(0)	78(+1)	29,19	117,36	1519,01	441,05	118,68
7	75(+1)	50(0)	30(-1)	25,56	119,63	1588,90	441,32	122,06
8	75(+1)	50(0)	78(+1)	23,07	115,36	1665,65	474,79	118,85
9	50(0)	40(-1)	30(-1)	<b>29,03</b>	106,36	1503,62	309,37	75,23
10	50(0)	40(-1)	78(+1)	21,92	118,50	1621,62	350,52	81,69
11	50(0)	60(+1)	30(-1)	26,67	109,35	1563,25	361,40	98,70
12	50(0)	60(+1)	78(+1)	29,93	<b>105,25</b>	1520,36	336,51	97,31
13	50(0)	50(0)	54(0)	26,85	117,69	1634,55	385,28	96,48
14	50(0)	50(0)	54(0)	28,27	118,25	1618,79	382,22	95,77
15	50(0)	50(0)	54(0)	26,48	120,36	1633,33	384,32	94,91

A combinação dos parâmetros concentração de etanol 50%, temperatura 60 °C, e 78% da amplitude permitiu obter rendimento máximo de 29,93% de extratos (Tabela 3). Em relação às demais respostas, com exceção da atividade antioxidante pelo método DPPH, os valores de FRAP, TPC e TFC apresentaram valores máximo nas seguintes condições de operação da EAU: concentração de etanol 75%, temperatura 40 °C e amplitude 54%.

As estimativas dos efeitos principais e interações entre variáveis independentes do planejamento experimental Box-Behnken e as variáveis dependentes são apresentadas na Figura 6, em que (L) representa o termo linear e (Q) o termo quadrático do modelo. A análise estatística foi realizada considerando um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

A Figura 6a apresenta os valores de t-calculado para efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) do rendimento dos extratos, em que é possível observar que o efeito positivo sinérgico entre temperatura ( $X_2$ ) e amplitude ( $X_3$ ) foi mais significativo, aumentando linearmente, seguidos dos efeitos linear e quadrático da concentração de etanol ( $X_1$ ). Entretanto, o efeito linear da concentração de etanol apresentou significância negativa. Isso indica que a adição de água melhorou o rendimento dos extratos obtidos. O termo positivo quadrático

de  $X_1$  mostra que um nível mínimo de rendimento foi obtido ao adicionar água ao solvente. Esses dados mostram que o valor ideal de concentração de etanol pode ser encontrado para se obter o rendimento máximo. Por último, a interação entre concentração de etanol e temperatura também influenciou positivamente no aumento da taxa de extração. De acordo com Kumar et al. (2021), essa tendência variável pode ser causada pelos componentes presentes nos extratos serem mais solúvel e difusíveis devido à diminuição da constante dielétrica do solvente com o aumento da concentração de etanol.

Com concentração de etanol próxima a 100%, ou etanol extremamente puro, o tecido da planta fica desidratado e a proteína fica desnaturada, o que reduz o rendimento em uma concentração alta. O efeito positivo do aumento da temperatura com a concentração de etanol, e com a porcentagem de amplitude no rendimento pode ser atribuído ao aumento na taxa de difusão devido à redução da viscosidade e tensão superficial do solvente. O aumento da temperatura, aumenta a propriedade de desorção e a solubilidade do soluto no solvente, enquanto diminui a viscosidade do próprio solvente, o que leva ao aumento da difusividade do solvente na matriz do tecido.

Resultados semelhantes foram obtidos para as respostas TPC e TFC, em que os efeitos lineares (positivo) e quadráticos (negativo) da concentração de etanol foram os que mais influenciaram nos resultados. Isso sugere que o valor ideal de concentração de etanol para extração maximizada de polifenóis está dentro da faixa de 25-75%. Esse fato pode ser explicado devido ao aumento da solubilidade e difusividade do composto fenólico devido à diminuição da constante dielétrica do solvente com o aumento da concentração de etanol. Estes resultados estão de acordo com os observados na extração de fenólicos e antocianinas de cascas de berinjela roxa (Liao et al., 2022) e na extração de flavonoides de caules e folhas de *Astragalus membranaceus*, em que houve uma diminuição da extração de flavonoides quando a concentração de etanol era superior a 80% (Cui et al., 2022).

Outro resultado importante para as respostas de TPC e TFC foi que a interação entre concentração de etanol e temperatura ( $X_1.X_2$ ) tanto para os efeitos lineares e quadráticos apresentam significância negativa, ou seja, a combinação desses dois fatores diminuiu a concentração de compostos fenólicos e flavonoides nos extratos obtidos por EAU. Uma hipótese é que em altas temperaturas o aumento da pressão de vapor do solvente ocupa a bolha de cavitação formada durante o ciclo de rarefação, devido ao qual o gradiente de pressão entre o interior e o exterior da bolha é reduzido. Assim, mesmo que o número de bolhas de cavitação seja grande em alta temperatura, elas implodem com menor intensidade, causando menor dano à célula, diminuindo o rendimento (Kumar et al., 2021).

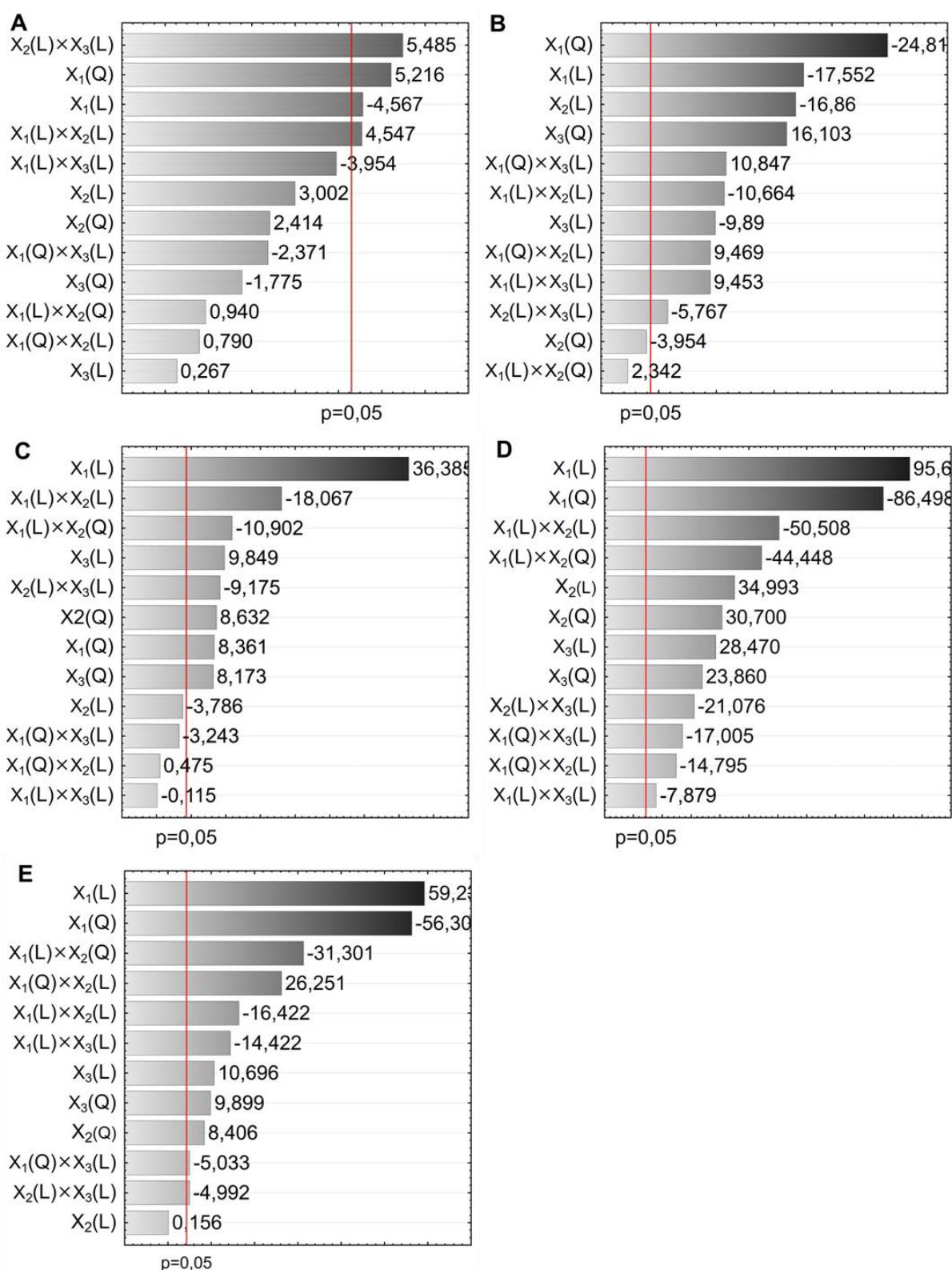


Figura 6 Valores de t calculado dos efeitos lineares, quadráticos e interação entre as variáveis dependentes concentração de etanol ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ) e amplitude ( $X_3$ ) e suas respectivas respostas (A) rendimento dos extratos, atividade antioxidante pelos métodos (B) DPPH (C) FRAP, e (D) TPC, e (E) TFC.

#### 4.3.3 Modelo de regressão e análise de variância

A análise de variância (ANOVA, Tabela 4b) mostrou que os modelos polinomiais quadráticos (Equações 4 a 8) obtidos foram significativos ( $p < 0,05$ ), confirmando que os modelos possuem capacidade de prever as respostas por meio de equações de regressão. A precisão dos modelos e o grau de concordância entre os valores observado e estimados foram avaliados com base no coeficiente de determinação ( $R^2$ ), coeficiente de determinação ajustado ( $R_{aj}^2$ ) e análise dos resíduos. Assim, os altos valores obtidos para  $R^2$  ( $\geq 0,986$ ) e  $R_{aj}^2$  ( $\geq 0,903$ ) indicam que os modelos podem representar adequadamente os efeitos da concentração de etanol, temperatura e amplitude sobre o rendimento, atividade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides dos extratos de FMO.

Tabela 4 Coeficientes de regressão e avaliação dos modelos matemáticos para rendimento, DPPH, FRAP, TPC e TFC dos extratos de folhas de *M. oleifera* obtidos por ultrassom

	Rendimento	DPPH	FRAP	TFC	TPC
<b>A. Coeficientes de regressão</b>					
$a_0$	59,16*	539,39*	-4583,16*	-3730,04**	-697,23*
$X_1$	-0,38*	-16,07*	97,41*	67,25**	5,077*
$X_1^2$	-0,0055*	0,14*	-0,11 <sup>ns</sup>	-0,087*	0,143*
$X_2$	-1,15 <sup>ns</sup>	-9,17 <sup>ns</sup>	197,23*	142,66**	35,11*
$X_2^2$	0,001 <sup>ns</sup>	0,075 <sup>ns</sup>	-1,74*	-1,235**	-0,38**
$X_3$	-0,32 <sup>ns</sup>	0,79 <sup>ns</sup>	19,54*	10,92**	2,16*
$X_3^2$	0,001 <sup>ns</sup>	-0,02*	-0,06*	-0,034*	-0,007*
$X_1X_2$	0,042*	0,21*	-2,97*	-2,39**	-0,49
$X_1X_2^2$	-0,0002 <sup>ns</sup>	-0,001 <sup>ns</sup>	0,027*	0,02**	0,007*
$X_1^2X_2$	-0,00008 <sup>ns</sup>	-0,001*	-0,0005 <sup>ns</sup>	0,0027*	-0,002*
$X_1X_3$	-0,01369 <sup>ns</sup>	0,083*	-0,135 <sup>ns</sup>	-0,136*	-0,028*
$X_1^2X_3$	0,00010 <sup>ns</sup>	-0,001*	0,0013 <sup>ns</sup>	0,0013*	0,0002*
$X_2X_3$	0,011*	-0,017*	-0,168*	-0,069*	-0,01*
<b>B. Resumo Anova: modelo polinomial quadrático</b>					
Regressão	72,63	1976,40*	81566,77*	30182,67*	5658,70*
Erro puro	0,89	1,98	76,86	2,46	1,23
$R^2$	0,986	0,998	0,999	0,999	0,999
$R_{aj}^2$	0,903	0,992	0,993	0,999	0,998

<sup>ns</sup> não-significativo, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$

$$Y_{rend} = 59,16 - 0,38X_1 - 0,055X_1^2 + 0,042X_1X_2 + 0,11X_2X_3 \quad \text{Eq.(4)}$$

$$Y_{DPPH} = 539,39 - 16,07X_1 + 0,14X_1^2 - 0,02X_3^2 + 0,21X_1X_2 - 0,001X_1^2X_2 + \quad \text{Eq.(5)}$$

$$+ 0,083X_1X_3 - 0,001X_1^2X_3 - 0,017X_2X_3$$

$$Y_{Frap} = -4583,16 - 97,41X_1 + 197,23X_2 - 1,74X_2^2 + 19,54X_3 - 0,06X_3^2 - \quad \text{Eq.(6)}$$

$$- 2,97X_1X_2 + 0,027X_1X_2^2 - 0,168X_2X_3$$

$$Y_{TPC} = -3730,04 + 67,25X_1 - 0,087X_1^2 + 142,66X_2 - 1,235X_2^2 + 10,92X_3 \quad \text{Eq.(7)}$$

$$- 0,034X_3^2 - 2,39X_1X_2 + 0,02X_1X_2^2 + 0,0027X_1^2X_2$$

$$- 0,136X_1X_3 - 0,0013X_1^2X_3 - 0,069X_2X_3$$

$$Y_{TPC} = -697,23 + 5,077X_1 + 0,14X_1^2 + 35,11X_2 - 0,38X_2^2 + 2,16X_3 \quad \text{Eq.(8)}$$

$$- 0,007X_3^2 - 0,49X_1X_2 + 0,007X_1X_2^2 - 0,002X_1^2X_2$$

$$- 0,028X_1X_3 + 0,0002X_1^2X_3 - 0,0082X_2X_3$$

A Figura 7 ilustra o gráfico de resíduos normalizados. Dados próximos à linha reta indicam um efeito aprimorado. Assim, a relação linear satisfatória apresentada neste experimento indicou a reprodutibilidade aceitável do método.

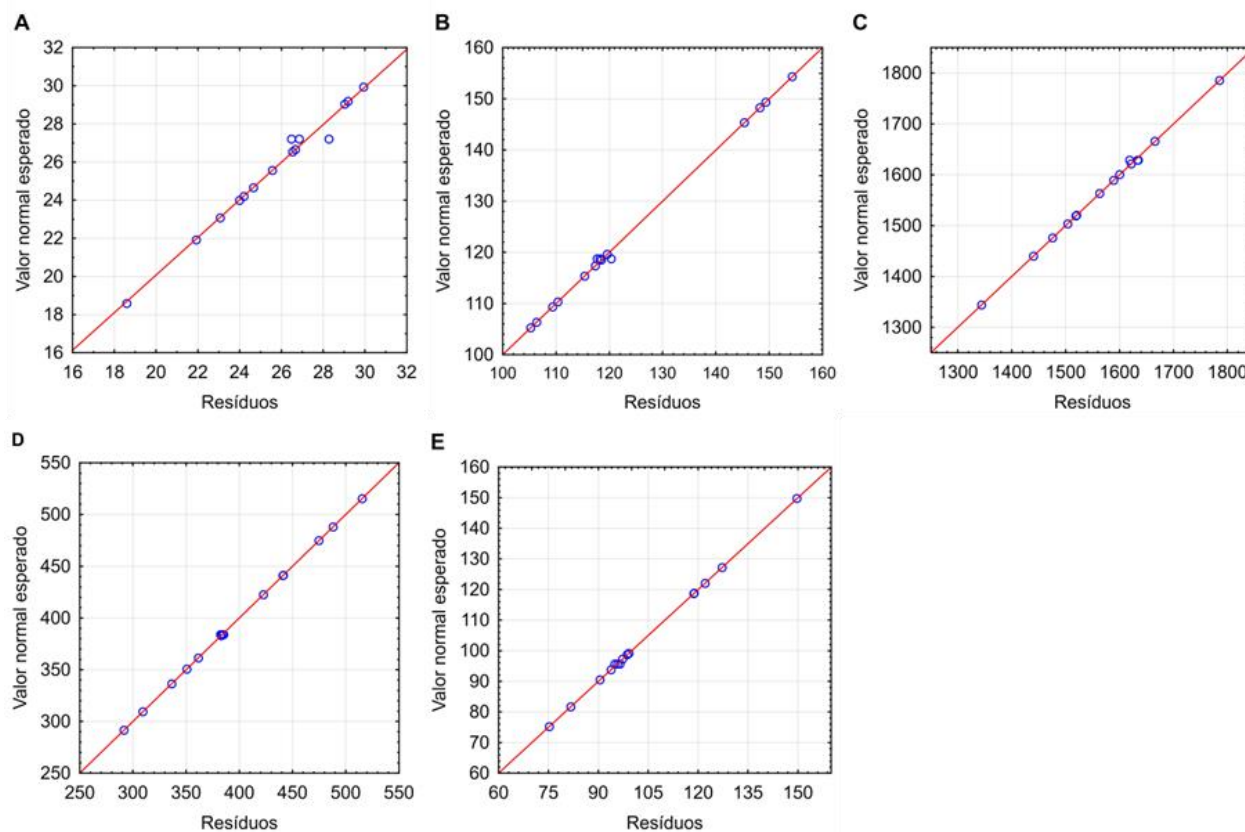


Figura 7 Gráfico normal de resíduos para as variáveis respostas (A) rendimento, (B) DPPH, (C) FRAP, (D) TPC e (E) TFC.

Após o ajuste dos modelos foi construído os gráficos de superfícies de contorno representados pelas Figuras 8 a 10, onde observa-se os efeitos das variáveis independentes (temperatura,  $X_1$ , concentração de etanol,  $X_2$ , e amplitude,  $X_3$ ) e suas interações no rendimento dos extratos. O fator concentração de etanol teve um efeito sinérgico significativo com a temperatura, com efeito positivo. O fator quadrático da concentração de etanol,  $X_1^2$ , influenciou os resultados de rendimento, com efeito negativo. Isso significa que as superfícies tiveram um formato côncavo, em que os maiores rendimentos se encontram próximos aos pontos centrais do planejamento para a variável concentração de etanol, e próximo ao nível superior da variável temperatura. O impacto negativo do termo quadrático da concentração de solvente pode ser explicado pelo fato de a adição de água ao etanol melhorar a taxa de extração, devido à afinidade com a água dos compostos-chaves presentes nos extratos, como relatado também relatado por Shehata et al. (2021) e Castañeda-Valbuena et al. (2021). Ademais, os efeitos lineares de temperatura e amplitude afetaram positivamente o rendimento (Figura 8).

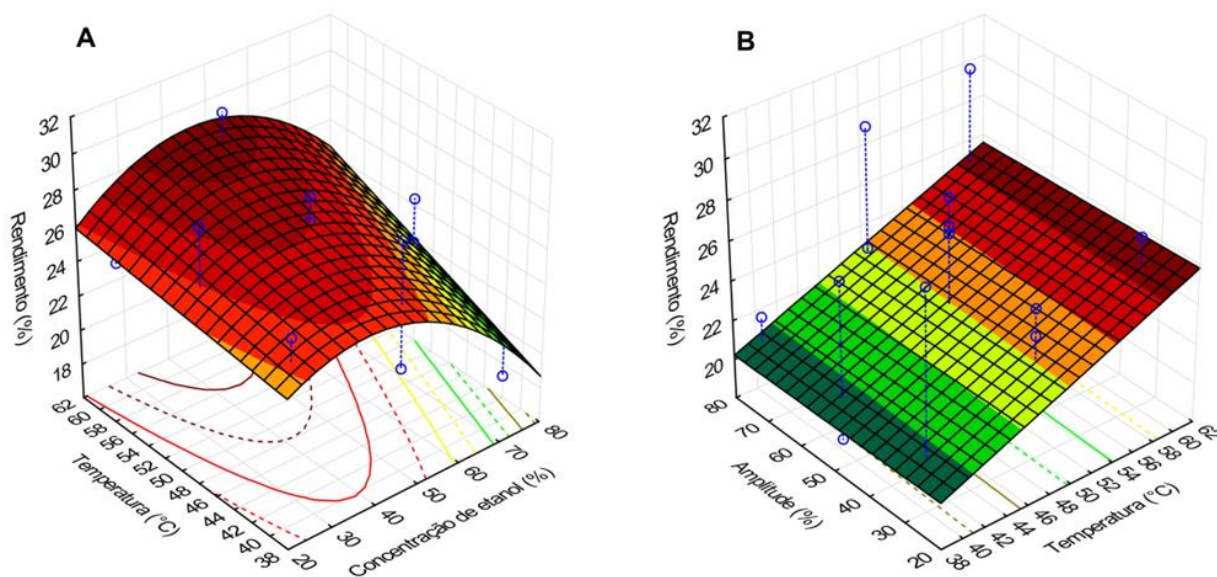


Figura 8 Superfícies de resposta para os rendimentos dos extratos foliares de *M. oleifera* obtidos por extração-assistida por ultrassom. (A) Temperatura e concentração de etanol com amplitude constante (54%); e (B) Temperatura e amplitude com concentração de etanol constante (50%).

A temperatura e concentração do solvente são os fatores mais críticos para recuperação dos compostos bioativos com capacidade antioxidante. A temperatura pode acelerar o desencadeamento das reações e a concentração do solvente determinará a seleção das moléculas, contribuindo para a sua seletividade. Foi observado que a temperatura teve efeito distinto entre os métodos avaliados para atividade antioxidante (Figura 9); enquanto o aumento da temperatura contribuiu para a atividade antioxidante pelo método de DPPH, a redução da temperatura foi melhor para o método FRAP (Figura 9b).

Como existem vários métodos para análise da atividade antioxidante, sendo que cada método analisa apenas uma pequena parte da atividade antioxidante, a temperatura pode ter efeito restritivos na extração de compostos bioativos, ou seja, baixas temperaturas extraem compostos mais sensíveis a análise por FRAP, enquanto as altas temperaturas extraem compostos mais sensíveis ao método DPPH para folhas de *M. oleifera*. Os resultados obtidos para análise TPC e TFC (Figura 10) foram semelhantes ao obtidos para o método de FRAP.

Em geral, o aumento da concentração de etanol de 25-75% e o aumento da amplitude de 30-80% contribuíram tanto para atividade antioxidante, quanto para a extração de flavonoides. Esse aumento pode estar associado a fatores como intensificação e restrição reações sonoquímicas orgânicas, polimerização e/ou despolimerização, ruptura de ligações, intensificação de interação indesejada de compostos extraídos e produção de agentes oxidantes (Martínez et al., 2021). A concentração de etanol contribui ainda para

um aumento de difusão de líquido devido a mistura etanol-água; o gradiente de tensão superficial entre a água e o etanol favorecerem uma transferência de massa localizada conhecida como efeito Marangoni, devido às diferentes tensões superficiais dos dois líquidos (Rojas et al., 2020).

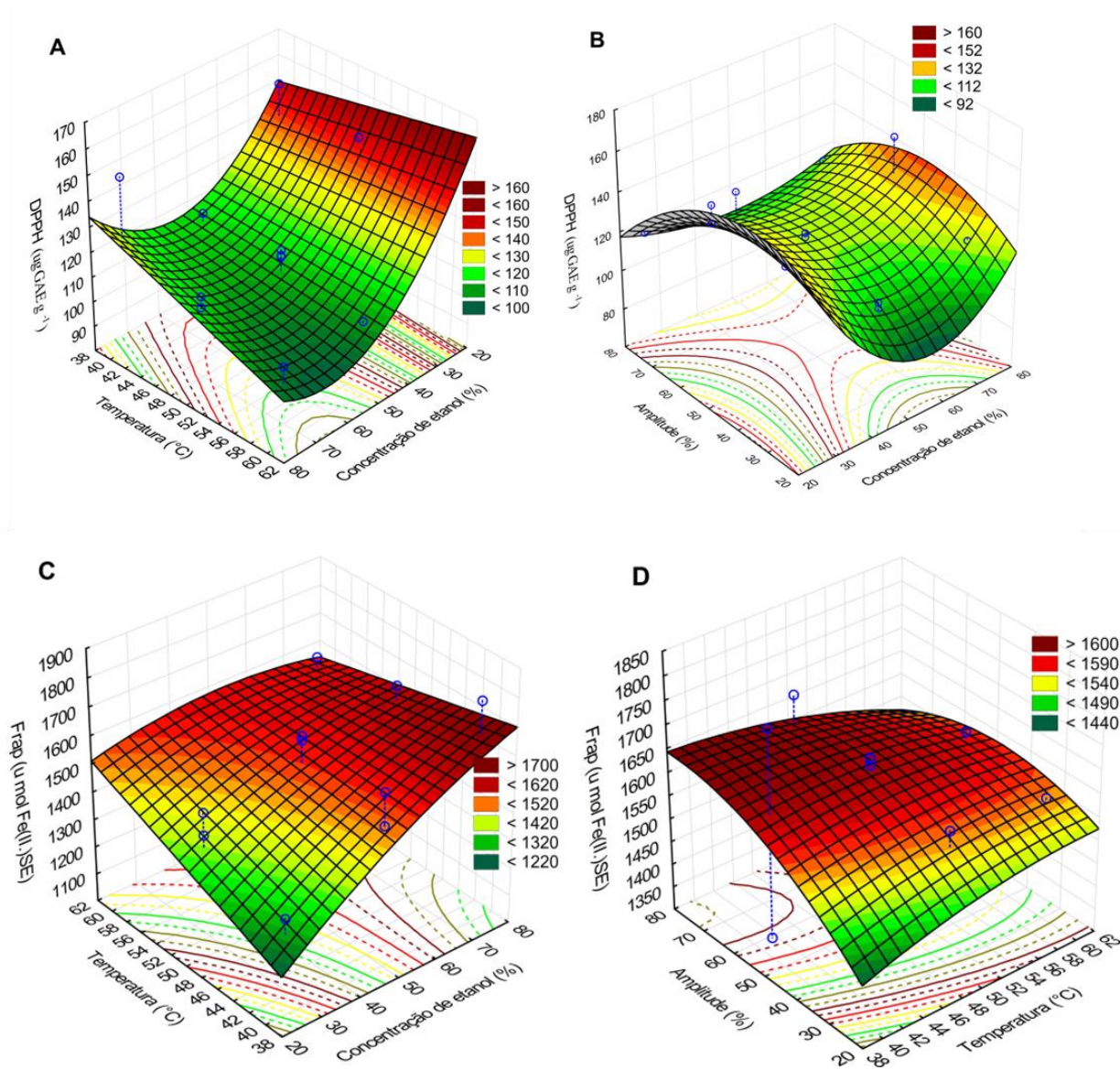


Figura 9 Superfície de resposta para atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP dos extratos foliares de *M. oleifera* obtidos por extração-assistida por ultrassom.



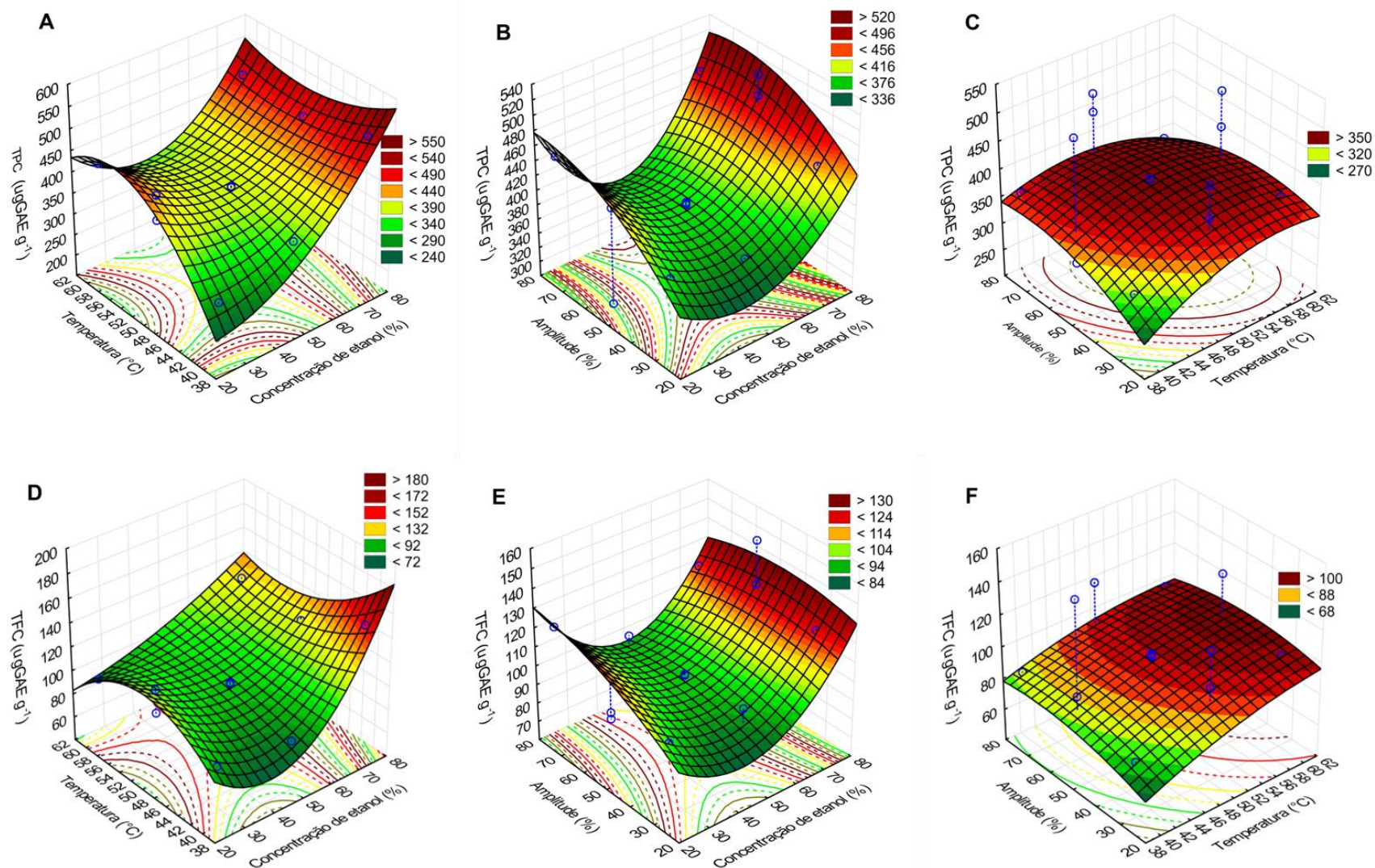


Figura 10 Superfície de resposta para compostos fenólicos totais (TPC) e conteúdo de flavonoides (TFC) dos extratos foliares de *M. oleifera* obtidos por extração-assistida por ultrassom.

#### 4.3.4 Otimização do processo

A Figura 11 apresenta os perfis para os valores preditos na otimização das variáveis temperatura, concentração de etanol e porcentagem de amplitude. A otimização apresentou valor de 0,748, e a condição ótima, prevista para a extração de compostos bioativos com alto rendimento foi de 75,0% ( $X_1$ ), 54,0 °C ( $X_2$ ) e 78,0% ( $X_3$ ), com valores preditos para o rendimento DPPH, FRAP, TPC e TFC de 25,44%, 105,21  $\mu\text{gGAE g}^{-1}$ , 1591,89  $\mu\text{mol Fe(II)SE g}^{-1}$ , 484,23  $\mu\text{gGAE g}^{-1}$ , e 124,77  $\mu\text{gGAE g}^{-1}$ , respectivamente. Para validação dos modelos de cada variável resposta obtida na otimização extração, foram realizadas extrações (em triplicata) na condição otimizada (CO). Os resultados experimentais e a previsibilidade das respostas pelos modelos são apresentados na Tabela 5. Os valores obtidos para rendimento, DPPH, FRAP, TPC e TFC de 28,48%, 110,20  $\mu\text{gGAE g}^{-1}$ , 1496,36  $\mu\text{mol Fe(II)SE g}^{-1}$ , 473,11  $\mu\text{gGAE g}^{-1}$ , e 128,39  $\mu\text{gGAE g}^{-1}$ , respectivamente. Isso indica a repetibilidade e alta capacidade preditiva dos modelos RSM desenvolvidos ( $p < 0,05$ , considerando-se um intervalo de confiança = 0,95) para extração de compostos bioativos das folhas de *M. oleifera*.

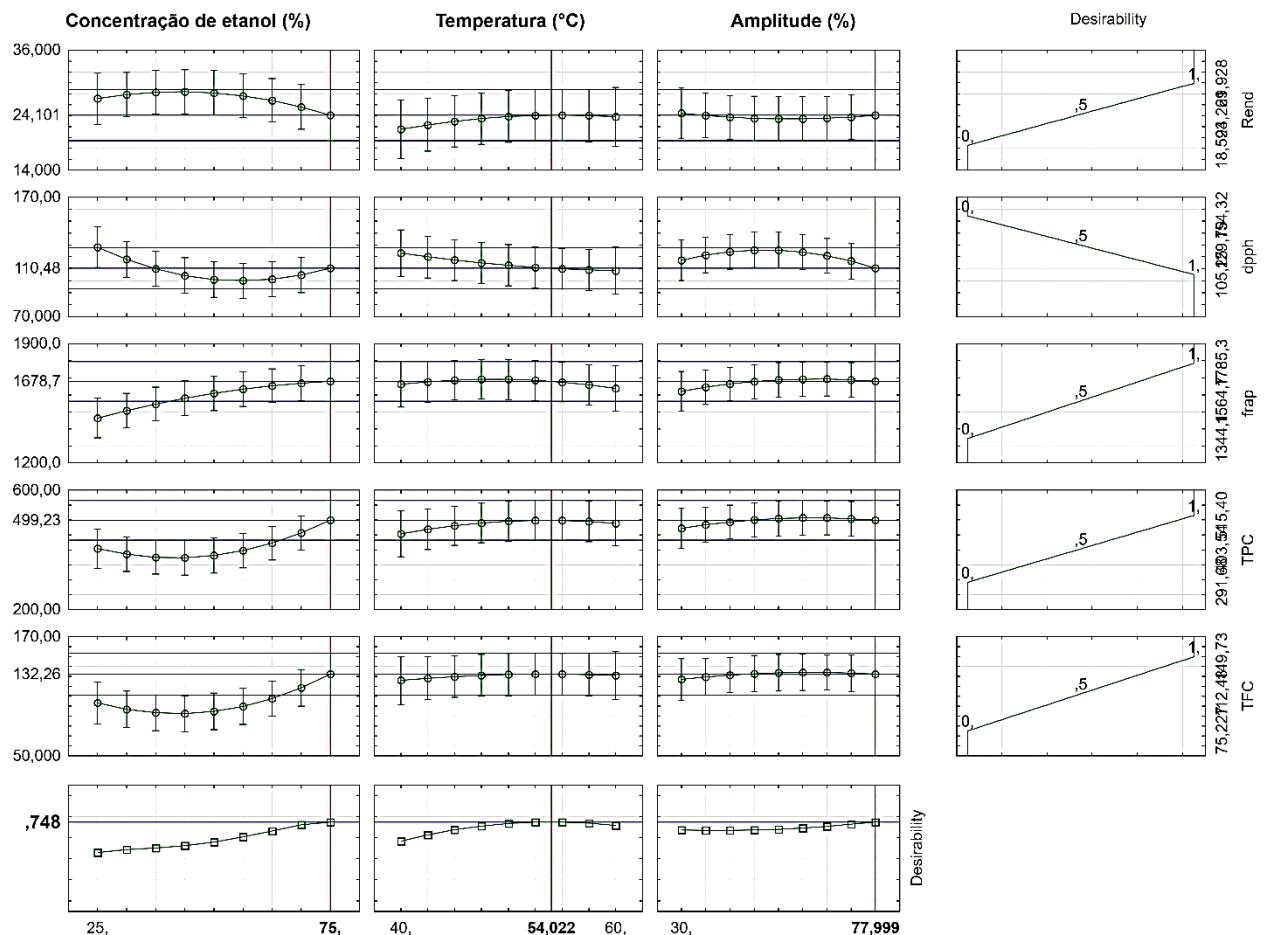


Figura 11 Perfil de desejabilidade usando o planejamento Box-Behnken para otimização da extração-assistida por ultrassom das folhas de *M. oleifera*.

Tabela 5 Validação dos modelos a partir dos valores estimados para rendimento, atividade antioxidante (IC<sub>50</sub> e FRAP) e CFT

Respostas	Valores estimados	Intervalo de confiança (0,98)	Valores Experimentais*
Rendimento (%)	25,44	± 4,29	28,48 ± 2,23
DPPH (µgGAE g <sup>-1</sup> )	105,21	± 6,39	110,20 ± 2,01
FRAP (µmol Fe(II)SE g <sup>-1</sup> )	1591,89	± 39,76	1496,36 ± 10,58
TPC (µgGAE g <sup>-1</sup> )	484,23	± 7,11	473,11 ± 8,56
TFC µgGAE g <sup>-1</sup> )	124,77	± 3,56	128,39 ± 7,56

\*A validação foi realizada em condições otimizadas em três repetições e os valores experimentais obtidos foram apresentados como média ± desvio padrão.

Esses resultados foram diferentes ao relatados na extração por ultrassom de FMO obtidas por Lin et al. (2021), em que encontraram a seguinte condição ótima para aumentar simultaneamente o conteúdo de flavonoides e as atividades antioxidantes: potência ultrassônica de 188 W, concentração de etanol de 52%, relação líquido/sólido de 40:1 (mL/g), a temperatura de 30 °C e o tempo de extração de 20 min. A explicação pode estar relacionada com os diferentes parâmetros de ultrassom analisados, como também das variáveis respostas utilizadas na formulação condição ótima. Entretanto, resultados similares foram obtidos por Prasetyaningrum et al. (2023) na recuperação de flavonoides com temperatura de 49,76 °C, tempo de extração de 20,68 min e concentração de solvente de 71,16%. Em relação à temperatura mais elevada, como ocorrido nesse estudo, considera-se que uma redução da tensão superficial do solvente em temperaturas altas seja principal causa para a diminuição da intensidade do colapso da bolha de cavitação, diminuindo assim, a transferência de massa do componente a ser extraído (Kumar et al., 2021).

#### 4.3.5 Determinação de compostos bioativos por GC-MS

Os resultados revelaram um total de 8 compostos presentes nos extratos de FMO (Tabela 6). Em geral, as frações voláteis foram compostas por cetonas (óxido mesitilo e piran-4-ona) e ácidos orgânicos (ácido quínico, ácido palmítico e ácido linoleico), além de importantes flavonoide e vitamina. Esses resultados são consistentes com os apresentados por Rodríguez-Pérez et al. (2016) e Da Silva et al. (2022). Esses resultados mostram que as FMO apresentam fitoquímicos com elevada atividade biológica, principalmente atividade antioxidante, a exemplo da isoquercitrina e do  $\alpha$ -tocoferol, que possuem a maior atividade antioxidante entre seus isômeros.

Tabela 6 Compostos bioativos determinados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa a partir de extratos foliares de *Moringa oleifera* obtidos por ultrassom em condições otimizadas

Number	Tempo de retenção (min)	Composto	Fórmula molecular
1	3,410	Óxido de mesitilo	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O
2	12,775	3-Pinanilamina	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N
3	15,010	Ácido quínico	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
4	19,035	Ácido palmítico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
5	20,955	Ácido linoleico	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
6	19,040	α-Tocoferol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>
7	24,510	Isoquercitrina	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>
8	34,945	Piran-4-ona	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>

#### 4.3.6 Atividade antifúngica dos extratos foliares de *Moringa oleifera*

A Figura 12 ilustra as porcentagens de inibição do crescimento micelial para cada concentração de extrato FMO obtido na condição otimizada de extração. Os maiores percentuais de inibição foram observados em 2,0 mg/mL (50,47 ± 2,60%) contra *A. flavus* e 5,0 mg/mL (59,67 ± 6,20%) contra *P. italicum*.

Os taninos são um tipo de composto fenólico que reduz a degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Quando presentes em quantidades consideráveis, esses compostos podem ser prejudiciais a muitos patógenos, pois se tornam espécies altamente reativas de oxigênio (ROS), que causam danos oxidativos aos patógenos (Carvalho et al., 2018). Os mecanismos pelos quais os fenóis apresentam propriedades antimicrobianas ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, vários estudos sugerem que esses compostos podem diminuir a dissociação de celulose, pectinas ou hemiceluloses, o que pode perder a ligação ou desativação de enzimas ou substratos secretados. Notavelmente, os fenóis de maior peso molecular podem induzir maiores efeitos inibitórios em situações específicas, apontando para um papel potencial de ligação a proteínas (Dehghanian et al., 2022).

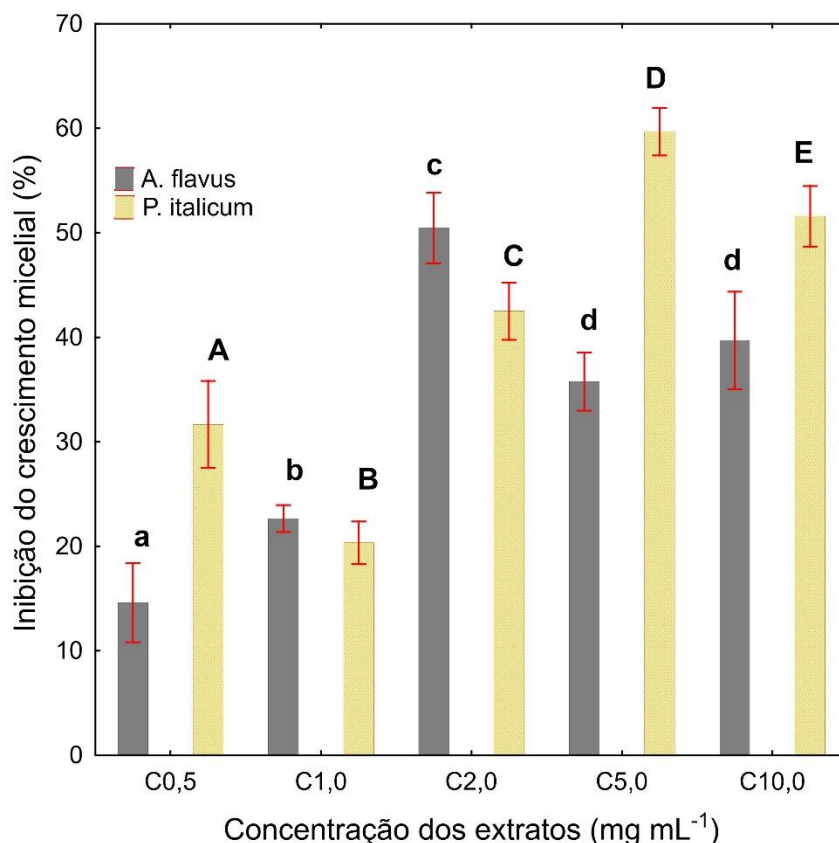


Figura 12 Inibição do crescimento micelial de (A) *A. flavus* e (B) *P. italicum* utilizando extratos de folhas de *M. oleifera* obtidos por ultrassom a 75% (solução etanólica v/v), 54 °C e 78% (amplitude). As colunas verticais representam a média de três repetições e as barras verticais em vermelho corresponde ao desvio-padrão médio. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Os extratos apresentaram um bom desempenho de inibição, o que pode ser atribuído à presença de compostos extraídos com polaridade moderada. Vázquez-González et al. (2020) estudaram diferentes frações de extrato entre muito polares ou completamente apolares e descobriram que os extratos com polaridade intermediária tiveram mais atividade antifúngica contra *Penicillium italicum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Por fim, os extratos das folhas de *Moringa oleifera* podem servir como um agente protetor no controle de patógenos ao longo da cadeia produtiva agrícola. Dada a sua composição rica em fenólicos, existe um potencial significativo para melhorar a sua utilização e aplicabilidade.

#### 4.4 Conclusão

A extração por ultrassom pode ser considerada uma técnica adequada para melhoria dos rendimentos dos extratos com atividade antioxidante. A otimização do processo ocorreu com as seguintes condições operacionais: concentração de etanol de 75% (v/v), temperatura de 54,0 °C e amplitude de 78%. A análise CG-MS revelou que os extratos obtidos consistiam

em fitoquímicos importantes, como ácidos orgânicos e vitamina. Os valores experimentais para atividade antioxidante e flavonoides nas condições ótimas calculadas estiveram em concordância com os valores previstos, sugerido pela precisão preditiva dos modelos gerados. No geral, a EAU pode ser um método alternativo para recuperação de compostos bioativos com menor consumo de solvente e energia.

#### 4.5 Referências

Ahmed, K., Banik, R., Hossain, M., Jahan, I., 2016. Vitamin C (L-ascorbic Acid) Content in Different Parts of *Moringa oleifera* Grown in Bangladesh. *Am. Chem. Sci. J.* 11, 1-6. <https://doi.org/10.9734/acsj/2016/21119>

Athira Nair, D., James, T.J., Sreelatha, S.L., Kariyil, B.J., 2020. Antioxidant and antiproliferative properties of *Moringa oleifera* Lam. leaf aqueous extract. *Plant Sci. Today* 7, 649-657. <https://doi.org/10.14719/PST.2020.7.4.936>

Carvalho, R.S., Carollo, C.A., de Magalhães, J.C., Palumbo, J.M.C., Boaretto, A.G., Nunes e Sá, I.C., Ferraz, A.C., Lima, W.G., de Siqueira, J.M., Ferreira, J.M.S., 2018. Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots: Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. *South African Journal of Botany* 114, 181-187.

Cheila, C.B., dos Anjos, G.L., Nóbrega, R.S.A., da S. Magaton, A., de Miranda, F.M., de S. Dias, F., 2020. Greener ultrasound-assisted extraction of bioactive phenolic compounds in *Croton heliotropiifolius* Kunth leaves. *Microchem. J.* 159, 105525. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105525>

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

Cui, L., Ma, Z., Wang, D., Niu, Y., 2022. Ultrasound-assisted extraction, optimization, isolation, and antioxidant activity analysis of flavonoids from *Astragalus membranaceus* stems and leaves. *Ultrason. Sonochem.* 90, 106190. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106190>

da Silva, M., Trancoso, J., Tormen, L., Bombardelli, M.M., Corazza, M.L., Bainy, E.M., 2022. Extraction of compounds from *Moringa oleifera* leaves using supercritical CO<sub>2</sub> plus ethanol as a cosolvent. *J. Food Process Eng.* 45, e13979. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13979>

Dehghanian, Z., Habibi, K., Dehghanian, M., Aliyar, S., Asgari Lajayer, B., Astatkie, T., Minkina, T., Keswani, C., 2022. Reinforcing the bulwark: unravelling the efficient applications of plant phenolics and tannins against environmental stresses. *Heliyon*.

Elez Garofulić, I., Kruk, V., Martić, A., Martić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović, S., Dragović-Uzelac, V., 2020. Evaluation of Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of *Pistacia lentiscus* L. Leaves and Fruit Extract Obtained by Optimized Microwave-Assisted Extraction. *Foods* 9, 1556. <https://doi.org/10.3390/foods9111556>

Farooq, B., Koul, B., 2020. Comparative analysis of the antioxidant, antibacterial and plant growth promoting potential of five Indian varieties of *Moringa oleifera* L. *South African J. Bot.*

129, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.12.014>

González Estrada, R.R., Ascencio Valle, F. de J., Ragazzo Sánchez, J.A., Calderón Santoyo, M., 2017. Use of a marine yeast as a biocontrol agent of the novel pathogen *Penicillium citrinum* on Persian lime. *Emirates J. Food Agric.* <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-09-1273>

Kubheka, S.F., Tesfay, S.Z., Mditshwa, A., Magwaza, L.S., 2020. Evaluating the efficacy of edible coatings incorporated with moringa leaf extract on postharvest of “maluma” avocado fruit quality and its biofungicidal effect. *HortScience* 55, 410-415. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14391-19>

Kumar, K., Srivastav, S., Sharanagat, V.S., 2021. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrason. Sonochem.* <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

Liao, J., Xue, H., Li, J., 2022. Extraction of phenolics and anthocyanins from purple eggplant peels by multi-frequency ultrasound: Effects of different extraction factors and optimization using uniform design. *Ultrason. Sonochem.* 90, 106174. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2022.106174>

Lin, M., Zhang, J., Chen, X., 2018. Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. *J. Funct. Foods.* <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.011>

Lin, X., Wu, L., Wang, X., Yao, L., Wang, L., 2021. Ultrasonic-assisted extraction for flavonoid compounds content and antioxidant activities of India *Moringa oleifera* L. leaves: Simultaneous optimization, HPLC characterization and comparison with other methods. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 20, 100284. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100284>

Martínez, R.F., Cravotto, G., Cintas, P., 2021. Organic Sonochemistry: A Chemist's Timely Perspective on Mechanisms and Reactivity. *J. Org. Chem.* <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c00805>

Menezes Maciel Binde, M., Hespanhol Miranda Reis, M., Luiz Cardoso, V., Boffito, D.C., 2019. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from green tea leaves and clarification with natural coagulants (chitosan and *Moringa oleifera* seeds). *Ultrason. Sonochem.* 51, 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.10.014>

Mvumi, C., Ngadze, E., Marais, D., du Toit, E.S., Mvumi, B.M., 2017. *Moringa oleifera* leaf extracts inhibit spore germination of *Alternaria solani*, causal agent of early blight disease of tomato (*Solanum lycopersicum*). *South African J. Plant Soil* 34, 161-165. <https://doi.org/10.1080/02571862.2016.1266401>

Nobossé, P., Fombang, E.N., Mbofung, C.M.F., 2018. Effects of age and extraction solvent on phytochemical content and antioxidant activity of fresh *Moringa oleifera* L. leaves. *Food Sci. Nutr.* <https://doi.org/10.1002/fsn3.783>

Oladeji, O.S., Odelade, K.A., Oloke, J.K., 2020. Phytochemical screening and antimicrobial investigation of *Moringa oleifera* leaf extracts. *African J. Sci. Technol. Innov. Dev.* 12, 79-84. <https://doi.org/10.1080/20421338.2019.1589082>

Prakash Maran, J., Manikandan, S., Vigna Nivetha, C., Dinesh, R., 2017. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. *Arab. J. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.007>

Prasetyaningrum, A., Widayat, W., Jos, B., Ratnawati, R., Riyanto, T., Prinanda, G.R., Le Monde, B.U., Susanto, E.E., 2023. Optimization of Sequential Microwave-Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoid Compounds from *Moringa oleifera*. *Trends Sci.* 20, 6401. <https://doi.org/10.48048/tis.2023.6401>

Ramandi, N.F., Ghassempour, A., Najafi, N.M., Ghasemi, E., 2017. Optimization of ultrasonic assisted extraction of fatty acids from *Borago Officinalis* L. flower by central composite design. *Arab. J. Chem.* 10, S23-S27. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.06.009>

Rodríguez-Pérez, C., Mendiola, J.A., Quirantes-Piné, R., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., 2016. Green downstream processing using supercritical carbon dioxide, CO<sub>2</sub>-expanded ethanol and pressurized hot water extractions for recovering bioactive compounds from *Moringa oleifera* leaves. *J. Supercrit. Fluids* 116, 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.009>

Rojas, M.L., Augusto, P.E.D., Cárcel, J.A., 2020. Ethanol pre-treatment to ultrasound-assisted convective drying of apple. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 61, 102328. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102328>

Shang, X., Chu, D., Zhang, J., Zheng, Y., Li, Y., 2020. Microwave-assisted extraction, partial purification and biological activity in vitro of polysaccharides from bladder-wrack (*Fucus vesiculosus*) by using deep eutectic solvents. *Sep. Purif. Technol.* 118169. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118169>

Strieder, M.M., Neves, M.I.L., Zobot, G.L., Silva, E.K., Meireles, M.A.A., 2021. A technoeconomic evaluation for the genipin recovery from *Genipa americana* L. employing non-thermal and thermal high-intensity ultrasound treatments. *Sep. Purif. Technol.* 258, 117978. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117978>

Sukmawati, D., Andrianto, M.H., Arman, Z., Ratnaningtyas, N.I., Al Husna, S.N., El-Enshasy, H.A., Dailin, D., Kenawy, A.A., 2020. Antagonistic activity of phylloplane yeasts from *Moringa oleifera* Lam. leaves against *Aspergillus flavus* UNJCC F-30 from chicken feed. *Indian Phytopathol.* 73, 79-88. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00194-2>

Suresh, S., Chhipa, A.S., Gupta, M., Lalotra, S., Sisodia, S.S., Baksi, R., Nivsarkar, M., 2020. Phytochemical analysis and pharmacological evaluation of methanolic leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. in ovalbumin induced allergic asthma. *South African J. Bot.* 130, 484-493. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.046>

Tesfay, S.Z., Magwaza, L.S., Mbili, N., Mditshwa, A., 2017. Carboxyl methylcellulose (CMC) containing moringa plant extracts as new postharvest organic edible coating for Avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 226, 201-207. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.047>

Tesfay, S.Z., Magwaza, L.S., Mditshwa, A., Mbili, N., 2018. Carboxyl methylcellulose (CMC) incorporated with moringa leaf and seed extracts as new postharvest organic edible coating for avocado (*Persea americana* Mill.) fruit, in: *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science, pp. 161-168. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1201.22>

Tshabalala, T., Ndhlala, A.R., Ncube, B., Abdelgadir, H.A., Van Staden, J., 2020. Potential substitution of the root with the leaf in the use of *Moringa oleifera* for antimicrobial, antidiabetic and antioxidant properties. *South African J. Bot.* 129, 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.01.029>

Vázquez-González, Y., Ragazzo-Sánchez, J.A., Calderón-Santoyo, M., 2020.



Characterization and antifungal activity of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) leaf extract obtained using conventional and emerging technologies. *Food Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127211>

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>

Wen, L., Zhang, Z., Sun, D.W., Sivagnanam, S.P., Tiwari, B.K., 2020. Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1602823>

Wu, L., Li, L., Chen, S., Wang, L., Lin, X., 2020. Deep eutectic solvent-based ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* L. leaves: Optimization, comparison and antioxidant activity. *Sep. Purif. Technol.* 247, 117014. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117014>

## 5. Artigo 2. Efeito da aplicação de extratos foliares de *Moringa oleífera* como bioestimulante no tratamento de sementes de tomate-cereja

**RESUMO:** O tomate apresenta restrições de cultivo e sensibilidade a variações de temperatura. Além disso, o uso de fertilizantes sintéticos causa sérios danos à saúde e ao meio ambiente. Para resolver esses problemas, o uso de bioestimulantes pode ser promissor para estimular desenvolvimento vegetativo de várias culturas hortícolas de forma econômica e sustentável. As folhas de *Moringa oleífera*, em particular, apresentam compostos fitohormônios, aminoácidos e nutrientes que demonstram melhorar significativamente a germinação, o crescimento, o rendimento e a qualidade de várias culturas agrícola, possibilitando ainda eficiência em estresses abióticos. O objetivo do estudo foi utilizar os extratos foliares de *Moringa oleífera* como tratamento bioestimulante de sementes tomate-cereja. Os resultados mostraram um efeito inibidor inicial na germinação das sementes, porém um efeito benéfico tardio no crescimento das plântulas foi relatado. A concentração de 2,0 mg mL<sup>-1</sup> mostrou ser eficaz para o crescimento de raízes e parte aérea quando comparadas ao controle. Embora a produção de várias culturas agrícola dependa de fertilizantes sintéticos para seu cultivo em grande escala, o uso de bioestimulantes pode ser uma opção para os pequenos produtores orgânicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sementes de tomateiro, Potencial fisiológico, Germinação, Plântulas

## 5.1 Introdução

Atualmente o setor hortícola tem enfrentado vários desafios para manter crescente sua produtividade e alcançar suas metas globais de demanda. As mudanças climáticas, por exemplo, causam danos na estabilidade da produção (Wheeler; Von Braun, 2013). Infestações por pragas, doenças, salinidade, seca e baixas temperaturas podem afetar ainda mais a produção, o que torna ainda mais dependente de vários insumos químicos. Entretanto, a demanda de produtos orgânicos e sustentável podem contribuir para novas estratégias de produção sustentável de hortifruticulturas (Zulfiqar et al., 2019; Meena et al., 2020).

A produção orgânica está diretamente ligada ao uso de bioestimulantes derivados de plantas com capacidade para aumentar produção e qualidade das culturas. Os bioestimulantes podem acelerar o crescimento das plantas, melhorando os processos fisiológicos, como absorção de nutrientes, crescimento e tolerância a estresses abióticos. Seu uso vem se intensificando em sistemas de produção integrados, contribuindo para uma melhor sustentabilidade (Zulfiqar et al., 2020; Godínez-Mendoza et al., 2023;).

Nos últimos anos, bioestimulantes estão sendo aplicados na horticultura para manter a produtividade, aplicações com microalgas (Supraja et al., 2020), extrato de alho (Hayat et al., 2018) e, mais particularmente, extrato obtido de folhas de moringa (Batool et al., 2020; El-Serafy; El-Sheshtawy, 2020; Sardar et al., 2021; Admane et al., 2023), tem garantido a melhoria na promoção do crescimento, rendimento e atributos de qualidade. A moringa possui compostos bioativos essenciais, como fitohormônios (auxinas, giberelinas e citocininas), vitaminas, flavonóis, fenóis, esteróis e taninos, além de vários fitoquímicos são benéficos ao cultivo (Arif et al., 2022).

O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial estimulante dos extratos foliares de *M. oleifera* em diferentes concentrações em sementes de tomate-cereja. Foram avaliados germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento da parte aérea e raiz e taxa de crescimento de plântulas.

## 5.2 Material e Métodos

### 5.2.1 Sementes de tomate

Foram utilizadas sementes de tomate-cereja (*Solanum pimpinellifolium*), variedade Carolina, obtidas no campo experimental do Instituto Federal de Mato Grosso, campus Juína, em novembro de 2022. Os tomates maduros colhidos foram previamente higienizados e classificados em relação a coloração. As sementes foram retiradas dos frutos, embebidas em

20 ml de solução de hipoclorito de sódio a 5% por 10 min lavadas três vezes com água destilada e submetidas a secagem convectiva por 12 h a 35 °C. As sementes classificadas foram armazenadas a 5 °C em embalagem plástica.

### 5.2.2 Preparação dos extratos foliares

Os extratos foliares de *Moringa oleífera* (EFMO) foram preparados nas concentrações de 0,5, 1, 2 e 5 mg mL<sup>-1</sup> a partir da concentração original de 10 mg mL<sup>-1</sup>. Os extratos foram obtidos por extração-assistida por ultrassom utilizando emissor de ondas ultrassônicas (Sonics, VCX 750) na frequência fixa de 20 kHz, equipado com sonda de titânio de 13 mm de diâmetro e célula de vidro cilíndrica (250 mL) conectada ao banho termostático. As condições de operação foram 75,0% de concentração de solvente etanoico, 54,0 °C de temperatura e 78,0% de amplitude. As extrações foram realizadas em 10 min de operação.

### 5.2.3 Tratamento das sementes

As sementes foram emergidas em quatro diferentes concentrações de EFMO + 1 controle (somente água destilada) totalizando 5 tratamentos. O tempo de imersão foi de 1 h utilizando recipientes plásticos de 50 ml. O experimento foi realizado em quadruplicada, totalizando 20 unidades experimentais. Após o processo de tratamento as sementes foram submetidas a análises fisiológicas.

### 5.2.4 Análises fisiológicas

#### 5.2.4.1 Teste de germinação

O teste de germinação foi conduzido com sementes tratadas germinadas em papel para germinação. Cada tratamento consistiu por quatro repetições divididas em quatro subamostras de 50 sementes. As sementes foram mantidas em câmaras de germinação por fotoperíodos de 12 h (claro) /12 h (escuro), a 25 °C (Brasil, 2009).

#### 5.2.4.2 Porcentagem de germinação

A porcentagem de germinação (%G) foi determinada de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), por meio da contagem do número de sementes germinadas após 14 dias, utilizando-se como critério de avaliação a porcentagem de plântulas normais. A primeira contagem de germinação foi determinada aos cinco dias após incubação.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado de forma complementar e o critério para considerar uma semente como germinada foi a radícula visivelmente saliente do tegumento em pelo menos 2 mm de tamanho.

#### 5.2.4.3 Comprimento da parte aérea e da raiz e massa seca

Os comprimentos foram medidos em plântulas com 14 dias de idade (150 plântulas de cada tratamento) utilizando régua milimetrada digital. As plântulas foram separadas em parte aérea ou raízes, e as diversas partes foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada de ar a 50 °C até atingirem massa constante e, posteriormente, pesadas em balança analítica (0,001 g) para determinação do peso seco (Nakagawa, 1999).

#### 5.2.5 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a testes de normalidade e, quando atendiam a esse pressuposto, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ( $p < 0,05$ ). A diferença entre as médias dos tratamentos foi avaliada por teste LSD (least significant difference) a 5% de significância. Os dados foram processados utilizando o software R-project (versão 4.0.5, R Development Core Team, Viena, Áustria).

### 5.3 Resultados e discussão

Os efeitos de extratos de folhas de *M. oleífera* (EFMO) no tratamento de sementes de tomate-cereja, foram avaliados quanto a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e crescimento da parte aérea e radículas das plântulas. A redução na germinação foi observada em todos os tratamentos com o extrato aquoso quando comparados ao tratamento controle. Os efeitos benéficos da aplicação dos extratos líquidos foram observados pelo crescimento das plântulas, evidenciando que os EFMO podem influenciar a fisiologia das sementes de tomate durante a etapa de germinação e no crescimento das plântulas.

#### 5.3.1 Efeitos dos extratos foliares de *Moringa oleífera* na germinação de sementes de tomateiro

A germinação de sementes de tomateiro foi consideravelmente afetada pelos tratamentos em diferentes concentrações de EFMO (Figura 13; Figura 14). Embora a diferença dos tratamentos com EFMO em relação ao tratamento controle pode ser notada a partir do segundo dia de germinação, entre os tratamentos com EFMO essa diferença foi verificada a partir do quinto dia (Figura 14). No terceiro dia após o tratamento com solução aquosa a 2,0 mg mL<sup>-1</sup>, observou-se o desenvolvimento da radícula, e no quinto dia a

germinação chegou a  $15,8 \pm 0,2\%$ . Comparando-se ao controle, a germinação iniciou no segundo dia, chegando a  $26,5 \pm 0,5\%$  ao quinto dia. No entanto, as sementes tratadas com solução aquosa a  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$  não apresentaram desenvolvimento adequado; nesse caso, a germinação no quinto dia foi de  $7,0 \pm 0,9\%$  (Figura 13; Figura 14). Nos tratamentos com 0,5 e  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  de EFMO, a germinação apresentou resultados similares, não diferenciando-se estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ), como apresentado na Figura 14.

Observa-se que a germinação foi retardada nas sementes tratadas com EFMO, como demonstrado na Figura 14b após 14 dias de germinação. Apesar da germinação atingir  $88\% \pm 0,2$  quando tratadas a  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  do bioestimulante, a germinação em amostras controle foi de  $95,5 \pm 0,4\%$ . O maior retardo foi observado após os 14 dias nas sementes tratadas com  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$  do bioestimulante, com  $62 \pm 1,0\%$  de germinação.

O índice de velocidade de germinação (IGV) apresentou efeitos estatisticamente significativos entre os tratamentos estudados (Figura 14c). Observou-se redução de IVG em sementes tratadas com EFMO de até 56% menor em relação às amostras controle. O menor índice para amostras tratadas com  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $18,55 \pm 0,4$  IGV) e o maior índice para amostras tratadas com  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $31,88 \pm 0,24$  IGV).

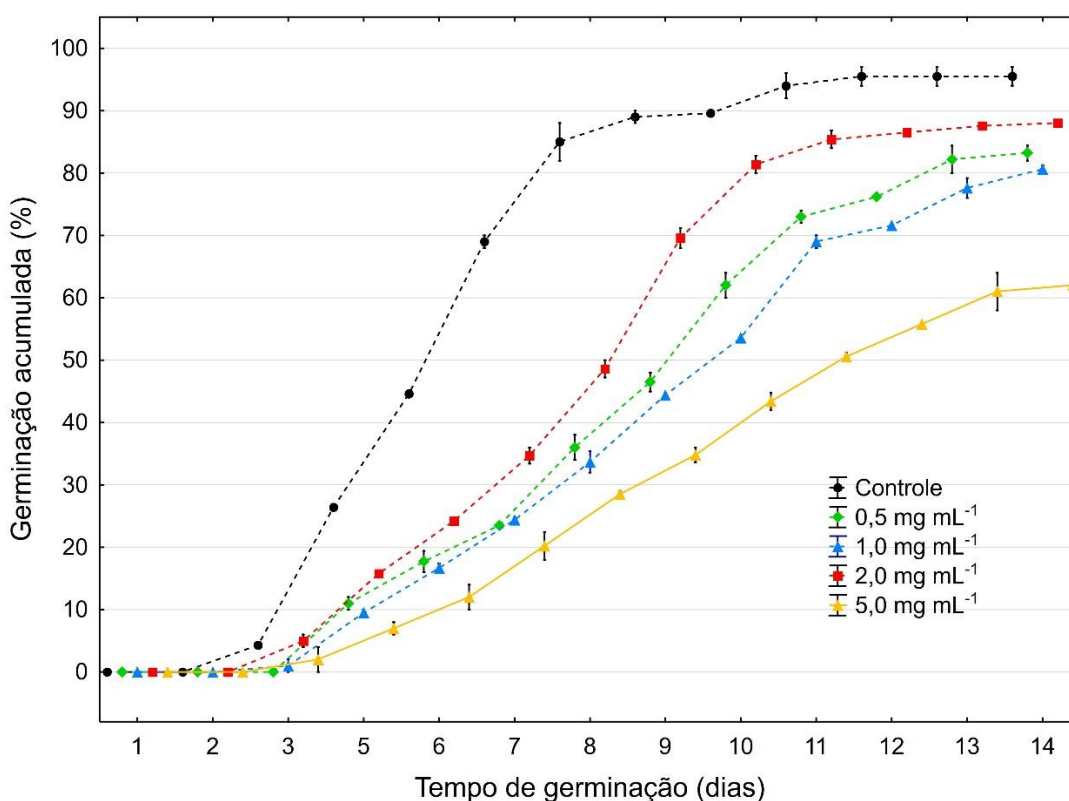


Figura 13 Germinação diária acumulada de sementes de tomate-cereja tratadas com diferentes concentrações de extratos foliares de *Moringa oleifera*. Os pontos são as médias dos valores experimentais e as barras verticais são os desvios-padrão.

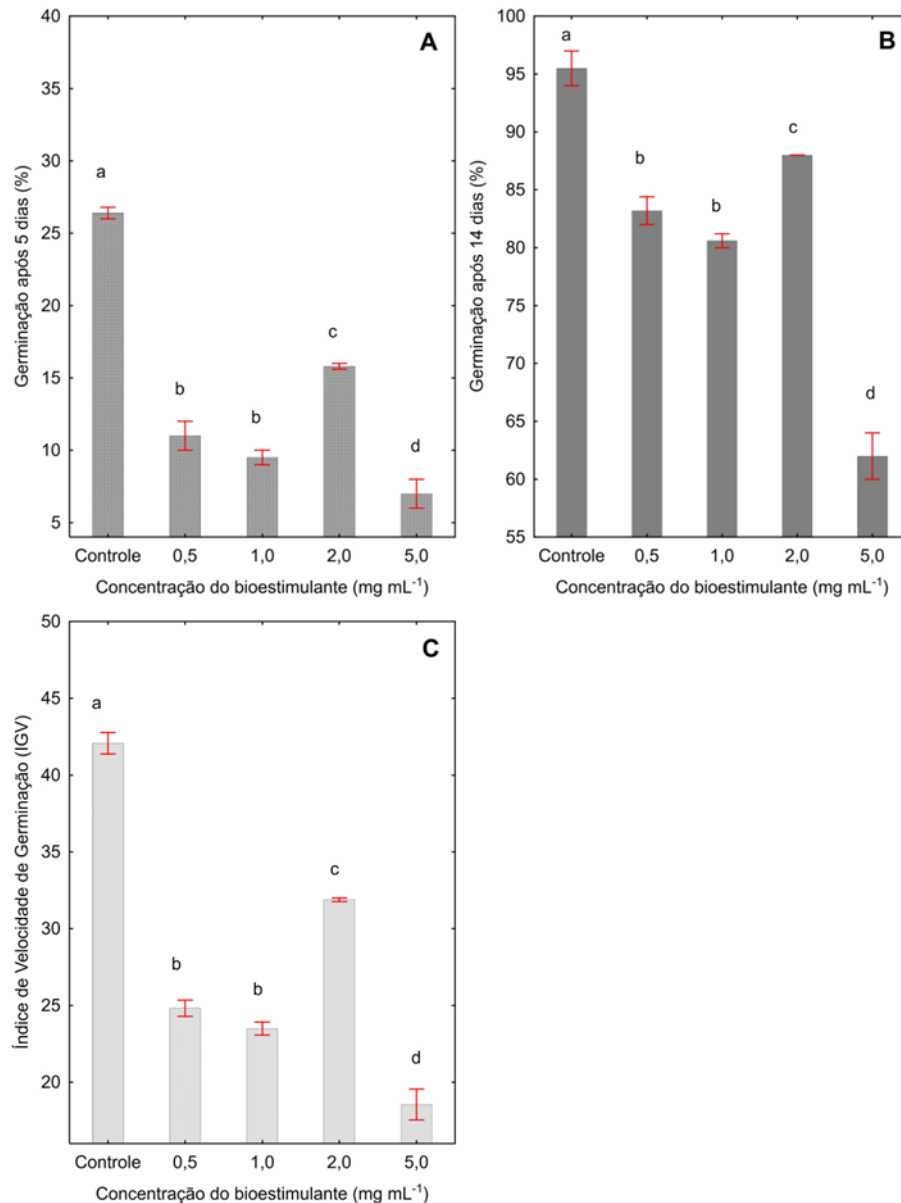


Figura 14 Porcentagem de germinação de sementes de tomateiro aos 5 dias (A) e 14 dias (B). Índice de velocidade de germinação de sementes de tomateiro (C). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Os bioestimulantes vegetais vêm sendo utilizados para melhoria do crescimento e produtividade de várias culturas hortícolas. O aumento da disponibilidade de nutrientes pode ser resultado direto de nutrientes, aminoácidos, peptídeos, peptonas ou proteínas presentes no material vegetal (Lucini et al., 2018). Peptídeos bioativos, por exemplo, podem desencadear vias de sinalização envolvendo a biossíntese de fitohormônios, podendo explicar os efeitos positivos dos bioestimulantes (Elzaawely et al., 2016). As recentes pesquisas com folhas de *M. oleifera* para melhor o crescimento vegetativo são feitas com aplicações foliares utilizando concentrações de até 5% ou na proporção 1:30 (p:v), utilizando água como solvente

principal (Arif et al., 2022; Zulfiqar et al., 2020). Os estudos compreendem ainda as respostas das plantas em estresse alcalino, hídrico ou nutricional. Assim, as aplicações foliares têm garantido a melhoria de desempenho de várias culturas como flores (Ahmad et al., 2019), stevia (Sardar et al., 2021), cártamo (Hafeez et al., 2022), grão-de-bico (Irshad et al., 2022) e trigo (Khan et al., 2020). A aplicação foliar acelera o crescimento das plantas, da área foliar e retarda a senescência, devido à presença de citocininas nas folhas de *M. oleífera* (Rady et al., 2015). Os hormônios promotores de crescimento, como a zeatina presente nas folhas de *M. oleífera*, que aumentaram a atividade enzimática, a taxa fotossintética e vários processos bioquímicos, podem estar relacionadas a melhoria do desempenho dessas culturas (Irshad et al., 2022).

No caso da germinação, o tratamento com extratos foliares de *M. oleífera* obtiveram diferentes resultados dependendo da espécie vegetal tratada. Em feijão houve efeito positivo na germinação com aumento de 4% utilizando extratos a 10%, enquanto reduziu a germinação de sementes de amendoim em 4% na mesma concentração (Phiri e Mbewe, 2010). Em pimenta, os EFMO nas concentrações de 2 e 4% aumentaram a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação. Os efeitos promotores fisiológicos tiveram relação com o aumento das concentrações dos extratos aplicados. Vários reguladores vegetais, aminoácidos, fenóis e nutrientes minerais que estão presentes nas folhas podem ter promovido a indução da germinação (Abou El-Nour et al., 2017).

Os resultados do presente trabalho apresentaram efeito inibitório do uso de EFMO na germinação de sementes de tomateiro. A principal causa pode estar relacionada à alta concentração de compostos bioativos que inibem a atividade de enzimas bioquímicas que regulam o desenvolvimento do embrião. O endosperma de sementes de tomateiro contém quantidades de galacto(glico)mananos, e o enfraquecimento dessa capa do endosperma por hidrólise enzimática resulta da atividade de endo- $\beta$ -mananase, que tem sido geralmente reconhecida como marcador de germinação do tomateiro (Moles et al., 2019). A presença de ácidos orgânicos, como ácido salicílico, pode estar relacionada à inibição da atividade dessa enzima, que tem sido relatado como importante papel na germinação de sementes de tomateiro. Do mesmo modo, a presença de ácido palmítico, linoleico, ou quínico, que estão presentes nos EFMO aplicados no tratamento, podem ter contribuído para essa inibição.

### 5.3.2 Efeitos dos extratos foliares de *Moringa oleífera* no crescimento de plântulas

O EFMO aplicado nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg mL<sup>-1</sup> nas sementes de tomateiro resultou em comprimento médio de parte aérea de 28,55  $\pm$  1,17 mm e 27,98  $\pm$  0,52 mm, respectivamente, não apresentando diferença estatística entre os tratamentos (p<0,05). As plantas tratadas com o extrato na concentração de 5,0 mg mL<sup>-1</sup> apresentaram menores



comprimentos de plântulas, como valor médio de  $16,08 \pm 1,0$  mm. As folhas das plântulas de tomateiros tratados com o extrato de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  de EFMO apresentaram em média  $26,48 \pm 0,46$  mm, enquanto as folhas das plantas controles apresentaram em média  $25,89 \pm 0,27$  mm, não diferenciando-se estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). Os dados mostraram tendência polinomial, refletindo flutuação quanto aos ganhos no comprimento aéreo, dentro da faixa estudada de  $0,5$  a  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$  (Figura 15a). A aplicação do bioestimulante afetou o comprimento da raiz de forma diferente quando comparado aos resultados do comprimento da parte aérea. Os menores valores observados foram nas concentrações de  $0,5$  e  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , de  $36,41 \pm 1,80$  mm e  $38,55 \pm 1,21$  mm, respectivamente. O maior valor observado e diferente dos demais foi observado utilizando a concentração de  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  atingindo o comprimento de  $55,7 \pm 3,7$  mm, superando os resultados das amostras controle (Figura 15b).

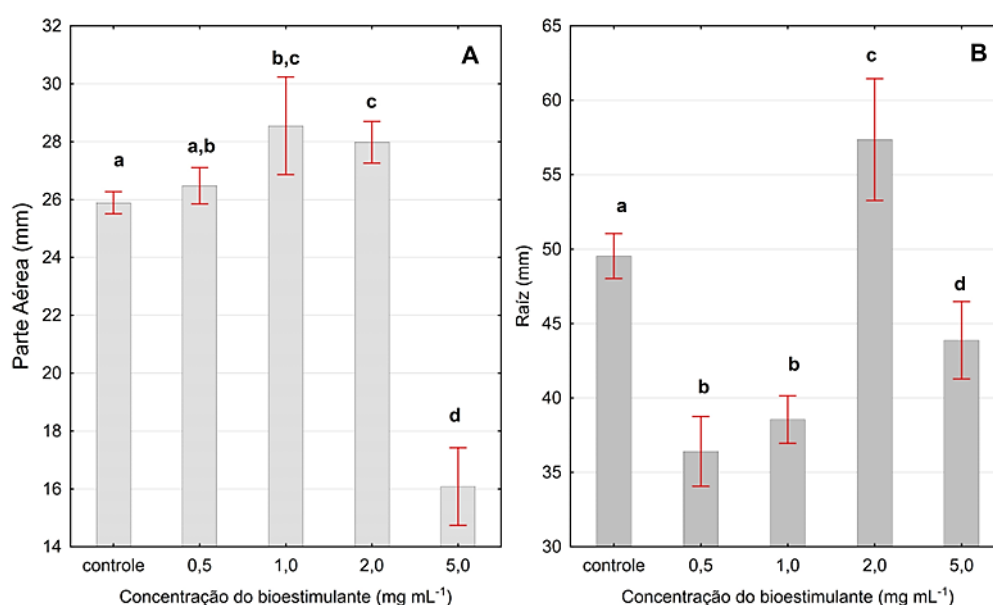


Figura 15 Comprimentos das partes aérea (A) e raiz (B) de plântulas de tomateiro Cereja sob imersão em diferentes concentrações de extratos foliares de *Moringa oleifera*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Os resultados deste estudo são consistentes com os observados por Ahmed e El-Mahdy (2022), que relataram que a imersão de até 20 h em EFMO (1:10 p:v) como agentes de condicionamento de sementes afetou o comprimento de plântulas de milho. Da mesma forma, o condicionamento osmótico do EFMO promoveu o aumento efetivo do comprimento da parte aérea; porém, os tratamentos não apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre o comprimento radicular de plântulas de pimenta (Yuniati et al., 2023). Este efeito estimulador tardio do EFMO pode estar ligado à multiplicação celular no meristema apical da raiz após o tratamento. Além disso, condicionamento osmótico com folha de *M. oleifera* pode reparar os danos à membrana, reduzir as barreiras físicas do endosperma, aumentar o

crescimento do embrião imaturo e lixiviar os inibidores da germinação para promover o crescimento da raiz (Chen et al., 2021).

Esses efeitos benéficos do EFMO podem ser atribuídos à presença da zeatina, uma citocinina, substância promotora do crescimento vegetativo. Ela desempenha um papel importante para promover a divisão celular em sistemas de raiz e parte aérea (Azzam et al., 2022). No presente estudo, os tratamentos em diferentes concentrações de folhas de *M. oleifera* foram capazes de melhorar o processo de crescimento e das características de plântulas de tomateiro. O uso de extratos na concentração de 2,0 mg mL<sup>-1</sup> apresentou resultados ligeiramente superiores.

#### 5.4 Conclusão

O tratamento de imersão de extratos foliares de *Moringa oleifera* afetou significativamente a germinação, a velocidade de germinação e o crescimento das plântulas de tomate-cereja. A aplicação dos extratos foliares de *Moringa oleifera* mostrou efeito benéfico tardio sobre o crescimento de plântula e inibiu a germinação das sementes. O tratamento a 2,0 mg mL<sup>-1</sup> alcançou resultados superiores entre os tratamentos com extratos foliares, promovendo o crescimento da parte aérea e raízes de plântulas de tomateiro. É necessário, porém, estudos mais abrangentes sobre o método de aplicação mais adequado para diferentes culturas, além da concentração e da escolha de solventes mais seletivos na extração de compostos bioativos, como os fitohormônios.

#### 5.5 Referências

- Admane, N., Cavallo, G., Hadjila, C., Cavalluzzi, M. M., Rotondo, N. P., Salerno, A., Cannillo, J., Difonzo, G., Caponio, F., Ippolito, A., Lentini, G., & Sanzani, S. M. (2023). Biostimulant Formulations and Moringa oleifera Extracts to Improve Yield, Quality, and Storability of Hydroponic Lettuce. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(1). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28010373>
- Ahmad, I., Tanveer, M. U., Liaqat, M., & Dole, J. M. (2019). Comparison of corm soaks with preharvest foliar application of moringa leaf extract for improving growth and yield of cut Freesia hybrida. *Scientia Horticulturae*, 254, 21-25. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.074>
- Ahmed, A. A., & El-Mahdy, A. A. (2022). Improving seed germination and seedling growth of maize (*Zea mays*, L.) seed by soaking in water and moringa oleifera leaf extract. *Current Chemistry Letters*, 11, 147-156. <https://doi.org/10.5267/j.ccl.2022.2.005>
- Arif, Y., Bajguz, A., & Hayat, S. (2022). Moringa oleifera Extract as a Natural Plant Biostimulant. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(3), 1291-1306. <https://doi.org/10.1007/S00344-022-10630-4/FIGURES/4>

Abou El-Nour, H., Res, V., & Ewais, A. (2017). Effect of *Moringa oleifera* Leaf Extract (MLE) on Pepper Seed Germination, Seedlings Improvement, Growth, Fruit Yield and its Quality. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 06(02), 448-463.

Azzam, C. R., Zaki, S. N. S., Bamagoos, A. A., Rady, M. M., & Alharby, H. F. (2022). Soaking Maize Seeds in Zeatin-Type Cytokinin Biostimulators Improves Salt Tolerance by Enhancing the Antioxidant System and Photosynthetic Efficiency. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/PLANTS11081004>

Batool, S., Khan, S., & Basra, S. M. A. (2020). Foliar application of moringa leaf extract improves the growth of moringa seedlings in winter. *South African Journal of Botany*, 129, 347-353. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2019.08.040>

Chen, X., Zhang, R., Xing, Y., Jiang, B., Li, B., Xu, X., & Zhou, Y. (2021). The efficacy of different seed priming agents for promoting sorghum germination under salt stress. *PLoS One*, 16(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0245505>

El-Serafy, R. S., & El-Sheshtawy, A. A. (2020). Effect of nitrogen fixing bacteria and moringa leaf extract on fruit yield, estragole content and total phenols of organic fennel. *Scientia Horticulturae*, 265, 109209. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2020.109209>

Elzaawely, A. A., Ahmed, M. E., Maswada, H. F., & Xuan, T. D. (2016). Enhancing growth, yield, biochemical, and hormonal contents of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sprayed with moringa leaf extract. <https://doi.org/10.1080/03650340.2016.1234042>, 63(5), 687-699. <https://doi.org/10.1080/03650340.2016.1234042>

Godínez-Mendoza, P. L., Rico-Chávez, A. K., Ferrusquía-Jimenez, N. I., Carbajal-Valenzuela, I. A., Villagómez-Aranda, A. L., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (2023). Plant hormesis: Revising of the concepts of biostimulation, elicitation and their application in a sustainable agricultural production. *Science of The Total Environment*, 894, 164883. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.164883>

Hafeez, A., Tipu, M. I., Saleem, M. H., Al-Ashkar, I., Saneoka, H., & Sabagh, A. El. (2022). Foliar application of moringa leaf extract (MLE) enhanced antioxidant system, growth, and biomass related attributes in safflower plants. *South African Journal of Botany*, 150, 1087-1095. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2022.09.021>

Hayat, S., Ahmad, H., Ali, M., Hayat, K., Khan, M. A., & Cheng, Z. (2018). Aqueous Garlic Extract as a Plant Biostimulant Enhances Physiology, Improves Crop Quality and Metabolite Abundance, and Primes the Defense Responses of Receiver Plants. *Applied Sciences* 2018, Vol. 8, Page 1505, 8(9), 1505. <https://doi.org/10.3390/APP8091505>

Irshad, S., Matloob, A., Iqbal, S., Ibrar, D., Hasnain, Z., Khan, S., Rashid, N., Nawaz, M., Ikram, R. M., Wahid, M. A., Al-Hashimi, A., Elshikh, M. S., & Diao, Z. H. (2022). Foliar application of potassium and moringa leaf extract improves growth, physiology and productivity of kabuli chickpea grown under varying sowing regimes. *PLOS ONE*, 17(2), e0263323. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0263323>

Khan, S., Basra, S. M. A., Nawaz, M., Hussain, I., & Foidl, N. (2020). Combined application of moringa leaf extract and chemical growth-promoters enhances the plant growth and productivity of wheat crop (*Triticum aestivum* L.). *South African Journal of Botany*, 129, 74-81. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2019.01.007>

Lucini, L., Roupheal, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., Baffi, C., & Colla, G. (2018). A vegetal biopolymer-based biostimulant promoted root growth in melon while triggering

brassinosteroids and stress-related compounds. *Frontiers in Plant Science*, 9, 370680. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00472/BIBTEX>

Meena, R. S., Kumar, S., Datta, R., Lal, R., Vijayakumar, V., Brtnicky, M., Sharma, M. P., Yadav, G. S., Jhariya, M. K., Jangir, C. K., Pathan, S. I., Dokulilova, T., Pecina, V., & Marfo, T. D. (2020). Impact of Agrochemicals on Soil Microbiota and Management: A Review. *Land 2020*, Vol. 9, Page 34, 9(2), 34. <https://doi.org/10.3390/LAND9020034>

Moles, T. M., Guglielminetti, L., & Huaranca Reyes, T. (2019). Differential effects of sodium chloride on germination and post-germination stages of two tomato genotypes. *Scientia Horticulturae*, 257, 108730. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2019.108730>

Nakagawa, J. (1999). Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In J. B. Krzyzanowski, F.C. Vieira, R.D. França Neto (Ed.), *Vigor de sementes: conceitos e testes*. (pp. 1-24). Abrates.

Phiri, C., & Mbewe, D. N. (2010). Influence of Moringa oleifera leaf extracts on germination and seedling survival of three common legumes. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(2), 315-317.

Rady, M. M., Mohamed, G. F., Abdalla, A. M., & Ahmed, Y. H. M. (2015). Integrated application of salicylic acid and Moringa oleifera leaf extract alleviates the salt-induced adverse effects in common bean plants. *Journal of Agricultural Technology*, 11(7), 1595-1614.

Sardar, H., Nisar, A., Anjum, M. A., Naz, S., Ejaz, S., Ali, S., Javed, M. S., & Ahmad, R. (2021). Foliar spray of moringa leaf extract improves growth and concentration of pigment, minerals and stevioside in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Industrial Crops and Products*, 166, 113485. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.113485>

Supraja, K. V., Behera, B., & Balasubramanian, P.. (2020). Efficacy of microalgal extracts as biostimulants through seed treatment and foliar spray for tomato cultivation. *Industrial Crops and Products*, 151, 112453. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2020.112453>

Wheeler, T., & Von Braun, J. (2013). Climate Change Impacts on Global Food Security. *Science*, 341(6145), 508-513. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1239402>

Yuniati, N., Mubarak, S., & Nurhadi, B. (2023). Germination performance and seedling characteristics of chili pepper after seed priming with leaf extract of Moringa oleifera. *Agronomy Research*, 21. <https://doi.org/10.15159/AR.23.004>

Zulfiqar, F., Allaire, S. E., Akram, N. A., Méndez, A., Younis, A., Peerzada, A. M., Shaukat, N., & Wright, S. R. (2019). Challenges in organic component selection and biochar as an opportunity in potting substrates: a review. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1617310>, 42(11-12), 1386-1401. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1617310>

Zulfiqar, F., Casadesús, A., Brockman, H., & Munné-Bosch, S. (2020). An overview of plant-based natural biostimulants for sustainable horticulture with a particular focus on moringa leaf extracts. *Plant Science*, 295, 110194. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2019.110194>