

Potencial bioativo de sementes de moringa (*Moringa oleifera* Lamarck) após processo de fermentação em estado sólido

Bioactive potential of moringa seeds (*Moringa oleifera* Lamarck) after solid-state fermentation process

Potencial bioactivo de las semillas de moringa (*Moringa oleifera* Lamarck) después del proceso de fermentación en estado sólido

Recebido: 02/04/2020 | Revisado: 05/04/2020 | Aceito: 07/04/2020 | Publicado: 12/04/2020

Paula Ribeiro Buarque Feitosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2890-6061>

Universidade Federal de Sergipe, Brasil

E-mail: paularbruarque@yahoo.com.br

Tacila Rayane Jericó Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3579-7449>

Universidade Federal de Sergipe, Brasil

E-mail: tacilarayane@hotmail.com

Nayjara Carvalho Gualberto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1553-2654>

Universidade Federal de Sergipe, Brasil

E-mail: nayjaracarvalho@gmail.com

Narendra Narain

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3913-5992>

Universidade Federal de Sergipe, Brasil

E-mail: narendra@ufs.br

Luciana Cristina Lins de Aquino Santana

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7231-2199>

Universidade Federal de Sergipe, Brasil

E-mail: aquinoluciana@hotmail.com

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar o conteúdo de compostos bioativos em farinha de sementes de moringa, com umidade inicial de 50% ou 70%, após o processo de fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus niger*. Extratos da farinha de sementes de

moringa fermentada e não fermentada foram obtidos utilizando-se os solventes água destilada, etanol 40% e 80%, acetona 40% e 80% e determinou-se os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais. As atividades antioxidante (pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP) e antimicrobiana foram determinadas para os extratos com maiores aumentos de compostos fenólicos e flavonoides totais após a fermentação. Os compostos fenólicos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência. O maior aumento de fenólicos (395,4%) em relação à farinha não fermentada foi obtido no extrato A40% (UI=70%) fermentado por 168h e o maior de flavonoides totais (273,7%) foi no extrato em E80% (UI=50%) fermentado por 168h. Os extratos em A80% da farinha não fermentada e da farinha fermentada (UI=70%) por 72h demonstraram maior AA pelo método DPPH. Os extratos fermentados demonstraram potencial inibitório frente às bactérias *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. marcescens*, enquanto que nenhuma bactéria foi sensível aos extratos não fermentados. Extratos fermentados demonstraram maiores concentrações dos compostos epicatequina, galato de epicatequina, galato de etila e epigalocatequina e a presença de galato de epigalocatequina não detectado nos extratos da não fermentados. A FES associada a extração com solventes orgânicos demonstrou eficiência para a obtenção de extratos da farinha de sementes de moringa com melhorado potencial bioativo.

Palavras-chave: Resíduo agroindustrial; Biotecnologia; Compostos bioativos.

Abstract

The present study aimed to evaluate the content of bioactive compounds in moringa seed flour, with an initial humidity of 50% or 70%, after the solid state fermentation process using *Aspergillus niger*. Extracts of fermented and unfermented moringa seed flour were obtained using distilled water, 40% and 80% ethanol, 40% and 80% acetone and the contents of phenolic compounds and total flavonoids were determined. Antioxidant (by DPPH, ABTS and FRAP) and antimicrobial activities were determined for extracts with greater increases in phenolic compounds and total flavonoids after fermentation. The phenolic compounds were quantified by high performance liquid chromatography. The greatest increase in phenolics (395.4%) in relation to unfermented flour was obtained in extract A40% (IU = 70%) fermented for 168 hours and the highest in total flavonoids (273.7%) was in the extract in E80% (UI = 50%) fermented for 168 hours. The extracts in A80% of the unfermented flour and the fermented flour (IU = 70%) for 72 hours showed greater AA by the DPPH method. The fermented extracts showed an inhibitory potential against the bacteria *B. subtilis*, *S. aureus* and *S. marcescens*, while no bacteria were sensitive to non-fermented extracts.

Fermented extracts demonstrated higher concentrations of the compounds epicatechin, epicatechin gallate, ethyl gallate and epigallocatechin and the presence of undetected epigallocatechin gallate in the extracts of unfermented. The FES associated with extraction with organic solvents demonstrated efficiency in obtaining extracts from the flour of moringa seeds with improved bioactive potential.

Keywords: Agro-industrial waste; Biotechnology; Bioactive compounds.

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el contenido de compuestos bioactivos en la harina de semilla de moringa, con una humedad inicial del 50% o 70%, después del proceso de fermentación en estado sólido utilizando *Aspergillus niger*. Se obtuvieron extractos de harina de semilla de moringa fermentada y no fermentada utilizando agua destilada, etanol al 40% y 80%, acetona al 40% y 80% y se determinaron los contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides totales. Se determinaron las actividades antioxidantes (por DPPH, ABTS y FRAP) y antimicrobianas para extractos con mayores aumentos en compuestos fenólicos y flavonoides totales después de la fermentación. Los compuestos fenólicos se cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución. El mayor incremento en fenólicos (395.4%) en relación con la harina no fermentada se obtuvo en extracto A40% (UI = 70%) fermentado durante 168 horas y el más alto en flavonoides totales (273.7%) estuvo en el extracto en E80% (UI = 50%) fermentado durante 168 horas. Los extractos en A80% de la harina no fermentada y la harina fermentada (UI = 70%) durante 72 horas mostraron mayor AA por el método DPPH. Los extractos fermentados mostraron un potencial inhibidor contra las bacterias *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. marcescens*, mientras que ninguna bacteria era sensible a los extractos no fermentados. Los extractos fermentados demostraron concentraciones más altas de los compuestos epicatequina, galato de epicatequina, galato de etilo y epigallocatequina y la presencia de galato de epigallocatequina no detectado en los extractos de fermentados. El FES asociado con la extracción con solventes orgánicos demostró eficiencia en la obtención de extractos de la harina de semillas de moringa con potencial bioactivo mejorado..

Palabras clave: Residuos agroindustriales; Biotecnología; Compuestos bioactivos.

1. Introdução

Os processos biotecnológicos podem ser considerados uma tecnologia promissora no desenvolvimento de bioprodutos de interesse industrial (Coelho, Leite, Rosa, & Furtado, 2001). Nos últimos anos vários processos de fermentação são utilizados para valorizar resíduos agroindustriais e partes de plantas na produção de diversos compostos de interesse industrial, bem como para melhorar características funcionais e nutricionais dos mesmos. Neste contexto pode ser destacado o emprego da fermentação como uma ferramenta poderosa para a extração e/ou produção de compostos bioativos presentes em sementes, folhas, cascas e frutos (Ajila, Brar, Verma, Tyagi, & Valéro, 2011; Dulf, Vodnar, & Socaciu, 2016).

Os compostos bioativos são formados por compostos flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, dentre outros, que em geral estão naturalmente presentes em pequenas quantidades em plantas e alimentos. Usualmente estes compostos são recuperados por extração líquido-líquido utilizando solventes orgânicos e mais recentemente outras técnicas também têm sido empregadas tais como: ultrassom, micro-ondas, extração por fluidos supercríticos e altas pressões. A extração e/ou produção destes compostos por fermentação em estado sólido (FES) consiste em uma alternativa interessante visto que o processo pode ser mais econômico do que os convencionais e resultar em extratos com elevada qualidade e potencial bioativo (Martins et al., 2011). Alguns pesquisadores estudaram a Fermentação em estado sólido (FES) para aumentar os teores de compostos bioativos em cascas de romã (Veana, Martínez-Hernández, Aguilar, Rodríguez-Herrera, & Michelena, 2014); resíduos de manga (da S. Pereira, Fontes-Sant'Ana, & Amaral, 2019), bagaço de “cranberry” (Vattem & Shetty, 2003), casca do coco verde (Camargo Prado et al., 2015), bem como em plantas tais como: *Jatropha dioica*, *Flourensia cernua*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Turnera diffusa* (Wong-Paz et al., 2015) oriundas do México, Argentina e Sudoeste dos Estados Unidos.

No Brasil, uma planta bastante rica em compostos bioativos é a *Moringa oleifera* Lam., conhecida popularmente como Moringa, a qual é originária do oeste do Himalaia partes do noroeste da Índia, Paquistão e Afeganistão (Ben Salem & Makkar, 2009). A moringa é altamente valorizada, já que quase todas as partes da árvore como folhas, raízes, flores e vagem são utilizadas como alimento de alto valor nutricional (Saucedo-Pompa et al., 2018). A oleaginosa pode ser usada para produzir biomassa, forragem para animais, agentes de limpeza doméstica, fertilizantes, nutrientes foliar, goma, suco clarificador de mel e açúcar de cana, biogás, mel medicinal, plantas ornamentais, biopesticida, celulose, tanino, para curtir couros, purificação da água, entre outros (Fuglie, 1999).

Vários estudos já relataram a presença de compostos fenólicos em diferentes tecidos da moringa e já descreveram a sua bioatividade tanto *in vitro* como *in vivo* (Al-Juhaimi, Alsawmahi, Abdoun, Ghafoor, & Babiker, 2019; Azam et al., 2019; Makita, Chimuka, Steenkamp, Cukrowska, & Madala, 2016). No entanto, a utilização da FES para a extração e/ou produção de compostos bioativos em sementes da moringa pode ser uma alternativa interessante, visto que uma maior quantidade de compostos pode ser obtida ou a produção de novos com elevado potencial bioativo (Martins et al., 2011). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a Fermentação em Estado Sólido associada com a extração com solventes orgânicos para a obtenção de extratos bioativos da farinha de sementes de moringa.

2. Metodologia

Trata-se de um estudo analítico, experimental, laboratorial, quantitativo (Pereira, Shitsuka, Dorlivete Moreira Parreira, & Shitsuka, 2018), desenvolvido no período de março a agosto de 2019, no Laboratório de Microbiologia e Bioengenharia, Universidade Federal de Sergipe. As sementes de moringa foram coletadas em uma propriedade particular localizada no município de Poço do Gado em Arara-PB, Brasil. O microrganismo *A. niger* (IOC 3677) foi adquirido da coleção de culturas do instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil).

Inicialmente, as sementes foram pesadas e submetidas à secagem a 50°C em estufa por 24 h. Após esse período, as sementes foram trituradas, em liquidificador, para obtenção da farinha, a qual foi esterilizada em autoclave a 121°C durante 15 min. Em seguida, preparou-se uma suspensão de esporos do fungo em água destilada, glicose (50 g/L) e extrato de levedura (20 g/L) na concentração de $2,0 \times 10^8$ esporos/mL. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125mL, inoculando-se 5g da farinha de sementes, com umidade inicial (UI) de 50% ou 70%, com a suspensão de esporos (concentração final em torno de $1,0 \times 10^7$ esporos/g). Os frascos foram incubados a 30°C e nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 168 h de fermentação um frasco foi removido para obtenção dos extratos. O tempo zero de fermentação foi considerado como a farinha não fermentada.

Os compostos fenólicos e flavonoides foram extraídos da farinha utilizando água destilada, acetona 40%, acetona 80%, etanol 40% e etanol 80%. Para os experimentos utilizou-se 5mL da farinha e 25mL de cada solvente, mantendo-se sob agitação orbital a 200 rpm, temperatura de 30 °C durante 1h. Em seguida, as amostras foram filtradas através de papel de filtro e o sobrenadante obtido foi utilizado para as análises posteriores (Valvi, Rathod, & Yesane, 2011).

A determinação dos compostos fenólicos totais nos extratos foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu utilizando o ácido gálico como padrão (Shetty, Curtis, Levin, Witkowsky, & Ang, 1995). Alíquotas de 1mL dos extratos foram adicionadas à 1mL de solução de etanol a 95%, 5mL de água destilada, 0,5mL de reagente Folin-Ciocalteu 1N e 1mL de solução de carbonato de sódio a 5% (p/v) em tubos de ensaio, seguindo-se de homogeneização em vórtex (Ika, Brasil). Os tubos foram mantidos em câmara escura por 60 min e as absorbâncias das amostras foram lidas no comprimento de onda de 725nm contra o branco (solução de etanol a 95%). A seguir, foi construída uma curva de calibração a partir de diferentes concentrações de ácido gálico (0-150 mg/L) para converter as absorbâncias e os resultados foram expressos em termos de miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG) por 100 g de resíduo seco (mg EAG/100 g de resíduo seco). Os flavonoides totais foram determinados pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio conforme Dewanto, Xianzhong, Adom, & Liu (2002), com algumas modificações. Alíquotas do extrato foram adicionadas aos tubos de ensaio (2mL) e cloreto de alumínio a 2% (p/v) (2mL), depois foram homogeneizados e deixados em repouso no escuro por 30 min. As absorbâncias das amostras foram lidas a 415nm. A concentração total de flavonoides totais foi determinada por uma curva de calibração construída a partir de diferentes concentrações de ácido gálico (0-50mg/L). Os resultados foram convertidos e expressos em termos de miligramas de quercetina (QCT) por 100 g de resíduo seco (mg de QCT/100 g de resíduo seco).

Os extratos com maiores teores de fenólicos e flavonoides total foram analisados quanto à atividade antioxidante (AA) *in vitro* pelos métodos ABTS (Nenadis, Wang, Tsimidou, & Zhang, 2004), DPPH (Andrade, Denadai, de Oliveira, Nunes, & Narain, 2017) e FRAP (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Hawkins Byrne, 2006). O ensaio ABTS foi realizado segundo metodologia proposta por Nenadis et al. (2004), com modificações. Uma alíquota de 30 µL de extrato foi transferida para tubos de ensaio contendo 3,0mL do reagente e homogeneizado em vórtex. Após 6 min, o valor da absorbância foi lido em um espectrofotômetro a 734nm. Diferentes concentrações de Trolox variando de 100 a 1600µmol Trolox/L foram utilizadas para construir a curva de calibração. Os resultados foram expressos como µmol Trolox/g de resíduo. Para atividade antioxidante pelo método DPPH utilizou-se 250µL de extrato e 1,25mL do reagente. Após 5 min, a leitura da absorbância a 517nm foi realizada. Diferentes concentrações de Trolox entre 50 a 250µmol Trolox/L foram usadas para construir a curva de calibração. Os resultados foram expressos como µmol Trolox/g de resíduo. O método FRAP foi realizado segundo Thaipong et al. (2006). Para análise, uma alíquota de 90µL do extrato foi transferida para tubos de ensaio contendo 270µL

de água destilada e 2,7mL de reagente FRAP, homogeneizada em um vórtex e mantida a 37°C em banho-maria. Diferentes concentrações de 100 a 1200 µmol Trolox/L foram usadas para construir a curva de calibração. Os resultados foram expressos como µmol Trolox por g de resíduo. Para todas as análises o controle foi o extrato por etanol a 95% e o branco o etanol a 95%.

Os extratos com maiores teores de fenólicos totais e flavonoides totais também foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana através da técnica de difusão em discos, conforme o National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2015) frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (CBAM 0679), *Staphylococcus aureus* (CBAM 0629), *Bacillus cereus* (CBAM 0353), *Bacillus subtilis* (CBAM0441), *Serratia marcescens* (CBAM 0519) e *Escherichia coli* (CBAM 0002), adquiridas pela Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas e Maria Deane, Coleção de bactérias da Amazônia (CBAM) (Fiocruz, Manaus, Amazônia). *Enterococcus faecalis* (INCQS 00531) e *Salmonella enteritidis* (INCQS 00258) adquiridas da Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos, RJ. Placas de petri placas contendo ágar Mueller- Hinton foram semeadas com cada bactéria e em seguida adicionou-se discos de papel (6 mm de diâmetro), nos quais foram colocados 10µL dos extratos. As placas foram incubadas à 35°C por 24 h. A sensibilidade das bactérias aos extratos foi classificada pelo diâmetro dos halos de inibição conforme. Ponce, Fritz, Del Valle, & Roura (2003): não sensível (diâmetros < 8mm); sensível (diâmetros entre 9-14mm); muito sensível (diâmetros entre 15-19mm) e extremamente sensível (diâmetros > 20mm). Os testes foram realizados em duplicata.

Análise dos extratos selecionados foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, Columbia, Maryland, EUA) conforme Gomes et al., (2018) com modificações. O sistema foi equipado com duas bombas LC-20AD, um auto-injetor SIL-20A, forno CTO-20A, controlador de sistema CBM-20A e detector de arranjos de diodos SPD-M20A. Os extratos inicialmente foram rotaevaporados e ressuspensos em metanol para a injeção. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Kinetex C18 (tamanho de partícula de 5,0µm e 150 × 4,6mm i.d.; Phenomenex, Califórnia, EUA). A fase móvel consistiu em solução aquosa de ácido fórmico (A) a 0,1% (v / v) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico a 0,1% (B), com vazão de 1,0mL/min, sob eluição gradiente a 40°C. O perfil de gradiente foi o seguinte: 1-6 min, 15% de B; 7-12 min, 25% de B; 13-16 min, 30% de B; 17-20 min, 35% de B; 21-24 min, 40% de B; 25-27 min, 45% de B; 28-29 min, 50% de B; 30-32 min, 15% de B O volume de injeção foi de 10µL. A identificação dos compostos nas amostras foi realizada comparando os tempos de retenção e os espectros de absorção com os padrões

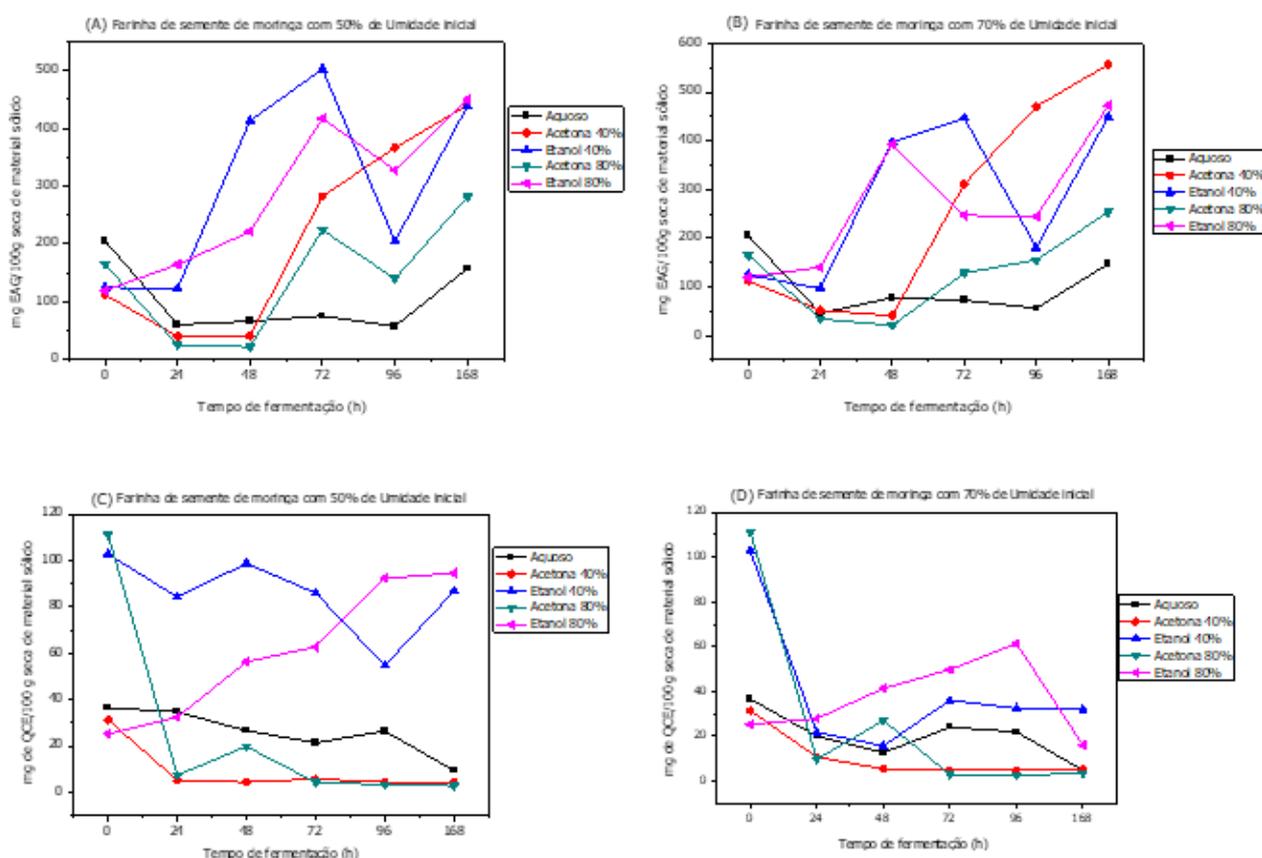
analíticos. As curvas de calibração para os padrões identificados nas amostras foram preparadas e a quantificação de compostos individuais foi calculada usando as áreas de pico dos compostos identificados em relação às áreas de pico do padrão analítico correspondente, todas as análises foram realizadas em triplicata

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si comparadas pelo teste de Tukey e correlação de Pearson a 5% de significância utilizando o Programa SISVAR 5. 7.

3. Resultados e Discussão

Nas Figuras 1A e 1B estão contidos os valores de fenólicos totais dos extratos obtidos a partir das farinhas de sementes de moringa não fermentada (tempo zero) e fermentadas com umidade inicial de 50% (1A) e 70% (1B). Já nas figuras 1C e 1D encontram-se os dados obtidos dos teores de flavonoides totais nos extratos das farinhas de sementes de moringa não fermentada (tempo zero) e fermentadas com umidade inicial de 50% (1C) e 70% (1D).

Figura 1. Teores de fenólicos totais nos extratos obtidos a partir das farinhas de sementes de moringa não fermentada (tempo zero) e fermentadas com umidade inicial de 50% (A) e 70% (B). Teores de flavonoides totais nos extratos obtidos a partir das farinhas de sementes de moringa não fermentada (tempo zero) e fermentadas com umidade inicial de 50% (C) e 70% (D).



Nas farinhas de sementes de moringa, com umidade inicial de 50% e 70%, foram obtidos aumentos nos teores de fenólicos totais de 303,0% e 395,4% em relação à farinha não fermentada, respectivamente após 72h e 168h de fermentação, respectivamente utilizando etanol 40% (de 124,7 para 502,5 mg EAG/100 g seca de material sólido) e acetona 40% (de 112,4 para 557,0mg EAG/100g seca de material sólido), respectivamente (Figura 1A e 1B). Resultados contrários foram obtidos por Ijarotimi *et al.* (2013) os quais analisaram as sementes de moringa fermentadas naturalmente em folha de bananeira e obtiveram redução no teor de fenólicos totais quando comparado às sementes não fermentadas (diminuição de 40,0 para 23,0mg EAG /100g seca de material sólido).

Em relação ao teor de flavonoides total (Figura 1C e 1D), verificou-se aumento de 273,7% no extrato da farinha (UI=50%) fermentada por 168h (de 25,3 para 94,6mg de QCE/100 g seca de material sólido) e 142,1% no extrato da farinha (UI=70%) fermentada por 96h (de 25,3 para 61,3mg de QCE/100 g seca de material sólido) usando etanol 80% como solvente extrator.

O fato do etanol 80% ter sido o melhor solvente para a extração, significou a presença de compostos flavonoides menos polares do que a água e mais polares do que a acetona na farinha das sementes fermentada. Entretanto, o maior teor destes compostos foi obtido no extrato da farinha não fermentada em etanol 40% (111,2mg de QCE/100 g seca de material sólido). Com exceção dos extratos em etanol 80%, para os demais o teor de flavonoides diminuiu ao longo do tempo de fermentação. Ijarotimi *et al.*, (2013) também obtiveram a diminuição no teor de flavonoides totais em sementes de moringa fermentadas naturalmente em folha de bananeira e concluiu que este resultado provavelmente pode ser devido à degradação ou consumo destes compostos durante o processo fermentativo.

Os extratos que apresentaram maiores aumentos no teor de fenólicos totais e flavonoides totais após a fermentação da farinha foram então selecionados para determinar a atividade antioxidante, antimicrobiana e os compostos bioativos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Na Tabela 1 encontram-se os valores obtidos da atividade antioxidante dos extratos das farinhas de sementes de moringa não fermentada e fermentada pelos métodos DPPH e FRAP.

Tabela 1. Atividade antioxidante dos extratos das farinhas de sementes de moringa.

Farinha de Semente	Solvente	Atividade Antioxidante ($\mu\text{mol Trolox/g}$)		
		Tempo Fermentação (h)	DPPH	FRAP
Não fermentada	Acetona 40%	0	93,8 \pm 2,3 ^b	47,9 \pm 2,6 ^c
	Acetona 80%	0	94,8 \pm 2,0 ^b	42,4 \pm 1,4 ^e
	Etanol 80%	0	108,4 \pm 2,4 ^a	42,2 \pm 1,8 ^e
Fermentada (Umidade Inicial=50%)	Acetona 80%	72	103,6 \pm 2,5 ^a	49,2 \pm 1,1 ^b
	Etanol 80%	168	63,4 \pm 2,4 ^c	48,6 \pm 0,3 ^b
	Etanol 80%	96	97,5 \pm 2,4 ^b	53,5 \pm 1,5 ^a
Fermentada (Umidade Inicial=70%)	Acetona 40%	168	93,9 \pm 0,3 ^b	44,6 \pm 1,5 ^c

Resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (n=3). ^{a-e} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores médios de acordo com o teste de Tukey.¹

Pelo método DPPH os maiores valores de AA, foram nos extratos em etanol 80% da farinha não fermentada (108,4 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de material sólido) e em acetona 80% da farinha (UI=70%) fermentada por 72h (103,6 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de material sólido), os quais não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Já pelo método FRAP, a AA foi inferior ao obtido pelo DPPH, sendo o maior valor encontrado no extrato em 80% de etanol da farinha fermentada (UI = 70%) por 96h (53,5 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de material sólido), o qual diferiu ($p < 0,05$) estatisticamente dos valores obtidos nos demais extratos. Os extratos analisados não demonstraram AA pelo método ABTS

O resultado da atividade antimicrobiana dos extratos das farinhas de semente de moringa não fermentada e fermentada estão descritos na Tabela 2

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos extratos das farinhas de sementes de moringa.

Farinha de semente	Solvente	Tempo de Fermentação (h)	Sensibilidade das bactérias aos extratos testados							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Não fermentada	Acetona 40%	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Acetona 80%	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Etanol 80%	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentada (Umidade Inicial=50%)	Acetona 80%	72	-	+	-	-	-	-	-	-
	Etanol 80%	168	-	+	-	-	-	-	+	+
	Etanol 80%	96	-	+	-	-	-	-	-	+
Fermentada (Umidade Inicial=70%)	Acetona 40%	168	-	+	-	-	-	-	-	-

(-) = não sensível; (+) = sensível. (1) *B. cereus*; (2) *B. subtilis*; (3) *E. faecalis*; (4) *E. coli*; (5) *P. aeruginosa*; (6) *S. enteritidis*; (7) *S. marcescens*; (8) *S. aureus*.

Nenhuma bactéria foi sensível aos extratos das farinhas não fermentada. Entretanto, após a fermentação, o *B. subtilis* foi sensível a todos os extratos (halos de inibição entre 9,0 e 11,5mm), o *S. aureus* foi sensível aos extratos em etanol 80% da farinha (UI=70%) fermentada por 96h e da farinha (UI=50%) fermentada por 168h. Este último extrato, também foi efetivo contra *S. marcescens*.

Os compostos bioativos presentes nos extratos de semente de moringa fermentada e não fermentada foram identificados e quantificados por CLAE e estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Concentrações de compostos fenólicos nas farinhas de sementes de moringa.

Compostos fenólicos (mg/g seca de material sólido)	NF A40	NF A80	NF E80	FA80 50 (72h)	FE80 50 (168h)	FA40 70 (168h)	FE80 70 (96h)
Ácido benzóico	0,0014±0,0000	0,0056±0,0005	ND	ND	ND	ND	ND
Catequina	ND	0,0526±0,00005	ND	ND	ND	0,0629±0,0016	0,1130±0,0023
Coumarin	0,0008±0,0003	0,0040±0,0012	0,0022±0,0001	ND	ND	ND	ND
Epicatequina	0,0824±0,0002	0,1033±0,0016	0,0872±0,0022	0,1340±0,0087	0,1032±0,0009	0,1141±0,0007	0,1482±0,0039
Galato de epicatequina	0,0489±0,0000	0,0442±0,0038	0,0313±0,0006	0,1441±0,0168	0,0654±0,0017	ND	0,1177±0,0038
Epigallocatequina	0,1220±0,0022	0,1595±0,0008	0,1184±0,0253	0,4270±0,0018	0,4454±0,0021	0,2755±0,0030	0,4739±0,0004
Galato de epigallocatequina	ND	ND	ND	0,0435±0,0011	0,0400±0,0004	0,0255±0,0005	0,0456±0,0044
Galato de etila	0,0159±0,0000	0,0198±0,0001	0,0182±0,0000	0,0339±0,0003	0,0202±0,00003	0,0150±0,000013	0,0270±0,0002
Ácido gálico	0,5311±0,0003	0,6465±0,0595	3,1150±3,6152	1,0474±0,0012	1,0142±0,0026	0,6575±0,0053	1,2300±0,0018
Ácido vanílico	ND	ND	0,0004±0,0000	ND	ND	ND	ND

ND: não detectado. FSMNF1: extrato em acetona 40% da farinha de sementes de moringa não fermentada; FSMNF2: extrato em acetona 80% da farinha de sementes de moringa não fermentada; FSMNF3: extrato em etanol 80% da farinha de sementes de moringa não fermentada; FSMF1: extrato em acetona 80% da farinha de sementes de moringa (umidade inicial de 50%) fermentada por 72 h; FSMF2: extrato em etanol 80% da farinha de sementes de moringa (umidade inicial de 50%) fermentada por 168 h; FSMF3: extrato em acetona 40% da farinha de sementes de moringa (umidade inicial de 70%) fermentada por 168 h; FSMF4: extrato em etanol 80% da farinha de sementes de moringa (umidade inicial de 70%) fermentada por 96 h

Um total de 7, 8 e 7 compostos foram identificados nos extratos em acetona 40%, acetona 80% e etanol 80% da farinha não fermentada, respectivamente. Já na maioria dos extratos da farinha fermentada foram encontrados 6 compostos, exceto o extrato em etanol 80% da farinha (UI=70%) fermentada por 96 h onde identificou-se 7 compostos. O galato de epigallocatequina foi o único composto encontrado nos extratos das farinhas fermentadas, significando que o mesmo foi sintetizado por enzimas produzidas pelo *A. niger*. Além deste, o ácido vanílico foi somente identificado no extrato em etanol 80% da farinha não fermentada. Por outro lado, as concentrações de compostos como catequina, galato de epicatequina; epigallocatequina e galato de etila foram aumentadas após a fermentação das farinhas. Estes compostos são derivados da catequina e possuem comprovada variedade de atividades biológicas como antioxidante (Cooper, Ph, Morré, Morré, & Al, 2005; Evacuasiyany et al., 2014; Rice-evans, Miller, Bolwell, Bramley, & Pridham, 1995; Tachibana, 2009) e antimicrobiana (Friedman, Henika, Levin, Mandrell, & Kozukue, 2006). O composto majoritário encontrado em todos os extratos foi o ácido gálico, sendo o maior valor no extrato em etanol 80% da farinha não fermentada (3,1150 mg/ g seca de material sólido). Este

composto foi obtido em menores concentrações nos extratos das farinhas fermentadas, provavelmente isto ocorreu devido a uma degradação e/ou consumo pelo fungo durante o tempo de fermentação.

4. Considerações Finais

A FES foi eficiente para aumentar o teor de fenólicos totais e flavonoides totais na farinha de sementes de moringa em 395,4% e 273,7%, respectivamente em relação aos teores inicialmente presentes na farinha não fermentada. A farinha fermentada demonstrou atividade antioxidante in vitro pelo método DPPH similar à não fermentada.

A atividade antimicrobiana foi maior desde que *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. marcescens* foram inibidos somente pelos extratos da farinha fermentada. Essa FES também proporcionou a síntese do composto galato de epigallocatequina e aumento das concentrações de catequina, galato de epicatequina; epigallocatequina e galato de etila na farinha.

Os extratos de farinha de sementes de moringa fermentada demonstraram potencial para serem explorados em trabalhos futuros como fontes de compostos bioativos de interesse para as indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética.

Agradecimentos

Todos os autores agradecem o apoio financeiro recebido do CNPq através do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Frutas Tropicais (Processo 57573781/2008-7).

Referências

Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2011). Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerochaete chrysosporium* - Liberation and extraction of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 126(3), 1071–1080. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.129>.

Al-Juhaimi, F. Y., Alsawmahi, O. N., Abdoun, K. A., Ghafoor, K., & Babiker, E. E. (2019). Antioxidant potential of Moringa leaves for improvement of milk and serum quality of Aardi goats. *South African Journal of Botany*, 3–6. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.03.022>.

Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L., & Narain, N. (2017).

Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International*, 101(July), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.066>.

Azam, S., Nouman, W., Rehman, U., Ahmed, U., Gull, T., & Shaheen, M. (2019). Adaptability of *Moringa oleifera* Lam. under different water holding capacities. *South African Journal of Botany*, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.08.020>.

Ben Salem, H., & Makkar, H. P. S. (2009). Defatted *Moringa oleifera* seed meal as a feed additive for sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 150(1–2), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.07.007>.

Camargo Prado, F., De Dea Lindner, J., Inaba, J., Thomaz-Soccol, V., Kaur Brar, S., & Soccol, C. R. (2015). Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 12, 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.020>.

CLSI. (2015). *Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Difusão : Norma Aprovada – Oitava Edição* (Vol. 23).

Coelho, M. A. Z., Leite, S. G. F., Rosa, M. D. F., & Furtado, A. A. L. (2001). Aproveitamento De Resíduos Agroindustriais: Produção De Enzimas a Partir Da Casca De Coco Verde. *Boletim Do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 19(1), 33–42. <https://doi.org/10.5380/cep.v19i1.1220>.

Cooper, R., Ph, D., Morré, D. J., Morré, D. M., & Al, C. E. T. (2005). Medicinal benefits of green tea: Part II. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 11(4), 639–652.

da S. Pereira, A., Fontes-Sant’Ana, G. C., & Amaral, P. F. F. (2019). Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. *Food and Bioprocess Processing*, 115, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.02.002>.

Dewanto, V., Xianzhong, W., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing

enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>.

Dulf, F. V., Vodnar, D. C., & Socaciu, C. (2016). Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. *Food Chemistry*, 209, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.016>.

Evacuasiyany, E., Ratnawati, H., Liana, L., Widowati, W., Maesaroh, M., Mozef, T., & Risdian, C. (2014). Cytotoxic and antioxidant activities of catechins in inhibiting the malignancy of breast cancer. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 3(2), 141. <https://doi.org/10.5455/oams.240614.or.066>.

Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E., Mandrell, R. E., & Kozukue, N. (2006). Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 69(2), 354–361. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.2.354>.

Fuglie, L. J. (1999). *The Miracle Tree: Moringa oleifera: Natural Nutrition for the Tropics*. Church World Service.

Gomes, W. F., França, F. R. M., Denadai, M., Andrade, J. K. S., da Silva Oliveira, E. M., de Brito, E. S., ... Narain, N. (2018). Effect of freeze- and spray-drying on physico-chemical characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of papaya pulp. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6), 2095–2102. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3124-z>.

Ijarotimi, O. S., Adeoti, O. A., & Ariyo, O. (2013). Comparative study on nutrient composition, phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented *Moringa oleifera* seed flour. *Food Science & Nutrition*, 1(6), 452–463. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70>.

Makita, C., Chimuka, L., Steenkamp, P., Cukrowska, E., & Madala, E. (2016). Comparative analyses of flavonoid content in *Moringa oleifera* and *Moringa ovalifolia* with the aid of UHPLC-qTOF-MS fingerprinting. *South African Journal of Botany*, 105, 116–122.

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.12.007>.

Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008>.

Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., & Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS .+ assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669–4674. <https://doi.org/10.1021/jf0400056>.

Pereira, A. S., Shitsuka, Dorlivete Moreira Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da Pesquisa Científica - Licenciatura em Computação*.

Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 679–684. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4).

Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375–383. <https://doi.org/10.3109/10715769509145649>.

Saucedo-Pompa, S., Torres-Castillo, J. A., Castro-López, C., Rojas, R., Sánchez-Alejo, E. J., Ngangyo-Heya, M., & Martínez-Ávila, G. C. G. (2018). Moringa plants: Bioactive compounds and promising applications in food products. *Food Research International*, 111(2017), 438–450. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.062>.

Shetty, K., Curtis, O. F., Levin, R. E., Witkowsky, R., & Ang, W. (1995). Prevention of Vitrification Associated with in vitro Shoot Culture of Oregano. (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *Journal of Plant Physiology*, 147(3–4), 447–451. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)82181-4](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82181-4).

Tachibana, H. (2009). Molecular basis for cancer chemoprevention by green tea polyphenol EGCG. *Forum of Nutrition*, 61, 156–169. <https://doi.org/10.1159/000212748>.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>.

Valvi, S. R., Rathod, V. S., & Yesane, D. P. (2011). Screening of three wild edible fruits for their antioxidant potential. *Current Botany*, 2(1), 48–52.

Vattem, D. A., & Shetty, K. (2003). Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry*, 39(3), 367–379. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00089-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00089-X).

Veana, F., Martínez-Hernández, J. L., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R., & Michelena, G. (2014). Utilization of molasses and sugar cane bagasse for production of fungal invertase in solid state fermentation using *Aspergillus niger* GH1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 373–377. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200002>.

Wong-Paz, J. E., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., Carrillo-Inungaray, M. L., López, L. I., Nevárez-Moorillón, G. V., & Aguilar, C. N. (2015). Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(2), 104–111. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60299-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60299-6).

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Paula Ribeiro Buarque Feitosa – 25%

Tacila Rayane Jericó Santos – 20%

Nayjara Carvalho Gualberto – 20%

Narendra Narain – 15%

Luciana Cristina Lins de Aquino Santana – 20%