

Renan da Silva Lima

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CAROTENOIDES E
COMPOSTOS FENÓLICOS DA POLPA E DO RESÍDUO DO
PROCESSAMENTO DA GOIABA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.)**

Florianópolis
2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

Renan da Silva Lima

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CAROTENOIDES E
COMPOSTOS FENÓLICOS DA POLPA E DO RESÍDUO DO
PROCESSAMENTO DA GOIABA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.)**

Dissertação submetida ao Programa de
Ciência dos Alimentos da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção
do Grau de Mestre em Ciência dos
Alimentos
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jane Mara Block

**Florianópolis
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lima, Renan

Extração e Caracterização de Carotenoides e
Compostos Fenólicos da Polpa e do Resíduo do
Processamento da Goiaba (*Psidium guajava* L.) /
Renan Lima ; orientador, Jane Mara Block, 2019.
179 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Métodos não
convencionais de extração. 3. Compostos bioativos.
4. Atividade antioxidante. I. Block, Jane Mara. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CAROTENOIDES E
COMPOSTOS FENÓLICOS DA POLPA E DO RESÍDUO DE
PROCESSAMENTO DE GOIABA (*Psidium Guajava* L.)**

Por

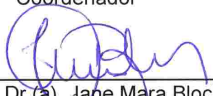
Renan da Silva Lima

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título “**de Mestrado** em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

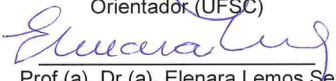
Florianópolis, 28 de fevereiro de 2019

Prof. (a). Dr. (a). Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenador

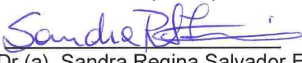
Banca Examinadora:



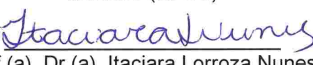
Prof. (a). Dr. (a). Jane Mara Block,
Orientador (UFSC)



Prof. (a). Dr. (a). Elenara Lemos Senna,
Membro (UFSC)



Prof. (a). Dr. (a). Sandra Regina Salvador Ferreira,
Membro (UFSC)



Prof. (a). Dr. (a). Itaciara Lorroza Nunes,
Membro (UFSC)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Rosângela e Paulo** por terem me proporcionado condições financeiras e emocionais ao longo de toda minha trajetória acadêmica, o que me permitiu manter um foco exclusivo em meu trabalho. Também os agradeço por apoiarem minhas decisões, mesmo sem concordar com todas elas.

À professora **Elane Prudêncio** por ter sido a primeira pessoa do CAL a enxergar o meu potencial. Sem sua indicação, eu provavelmente não estaria aqui hoje escrevendo esta dissertação.

À professora **Jane Block**, minha orientadora, pela generosidade em aceitar em seu laboratório alguém com um *background* tão diferente de sua linha de pesquisa. A ela também agradeço por ter me permitido autonomia na hora de conduzir esta pesquisa. Obrigado por ter me ajudado a me moldar como profissional e por ter me inspirado a me tornar um pesquisador cada vez melhor.

Aos professores parceiros desta pesquisa que forneceram estrutura, *know-how* e contribuíram para o sucesso deste trabalho, em especial as professoras **Itaciara Nunes e Sandra Ferreira** e o professor **Luciano Vitali**.

A todos os meus colegas do laboratório de Óleos e Gorduras pela ajuda e pela amizade. Em especial **Gabriela e Laércio**, sempre bem-humorados e demonstrando possuir *fair play*, especialmente durante minhas brincadeiras pouco ortodoxas.

A todos os **professores do CAL** com quem tive aula e ajudaram no fortalecimento de minha base teórica, essencial para a condução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao **Gui**, que sempre esteve ao meu lado, que impediu minha queda nos momentos mais difíceis, que insistiu para que eu me inscrevesse nesse programa, que me ajudou a planejar esta pesquisa e foi essencial para que tudo corresse bem até o fim. Obrigado por seu companheirismo, sua generosidade, sua confiança, sua inteligência. E, principalmente, obrigado por me dar a chance de conviver todos os dias com uma pessoa essencialmente boa.

E por último, ressalto minha alegria em ter tido a oportunidade de evoluir como pessoa e como profissional ao longo deste mestrado. Durante minha trajetória, me esforcei ao máximo para trilhar um caminho baseado em perseverança, comprometimento, foco, força de vontade e

determinação. Espero que estas características continuem sendo pilares fundamentais ao longo de toda minha carreira.

RESUMO

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma fruta popular em países tropicais, podendo ser consumida *in natura* ou transformada em diversos produtos. Tanto a polpa da goiaba quanto sua fração residual apresentam elevado teor de substâncias antioxidantes, como compostos fenólicos e carotenoides. Tais compostos podem ser isolados e utilizados para diversas aplicações. Porém, as técnicas convencionais de extração não podem ser usadas comercialmente, devido à falta de praticidade e às grandes quantidades de solventes tóxicos utilizadas. Por esta razão, existe um interesse crescente nas tecnologias de extração consideradas verdes. No presente trabalho foram obtidos extratos ricos em fenólicos e carotenoides a partir da polpa e do resíduo de goiaba por meio de diferentes técnicas verdes de extração: extração assistida por ultrassom (EAU), extração por líquido pressurizado (PLE) e extração por ultraturrax (UTE). Os extratos foram caracterizados quanto ao teor de fitoquímicos, perfil de fenólicos, teor de β -caroteno e licopeno e atividade antioxidante *in vitro*. Os compostos foram extraídos a partir de polpa e resíduo de goiaba em pó (PGP e RGP, respectivamente). Os fenólicos foram extraídos com uma mistura etanol:água (30:70, v/v) como solvente, na proporção de 1 g de amostra para 15 mL de solvente, por EAU utilizando-se um ultrassom de sonda (5 min a 25 °C) e um ultrassom de banho (30 min a 25 °C), PLE (30 min, 60 °C, 10 Mpa) e UTE (1 h, 25 °C). Os carotenoides foram extraídos com acetato de etila por maceração (ME) e EAU com ultrassom de sonda (5 min a 25 °C) e de banho (30 min a 25 °C). Os extratos fenólicos da polpa de goiaba apresentaram um maior teor de fenólicos totais comparados aos extratos do resíduo de goiaba e estes resultados foram independentes do método de extração. Os extratos do resíduo de goiaba apresentaram teores maiores de flavonoides, flavonóis e taninos condensados. A EAU por sonda foi o método de extração que apresentou o maior teor de fenólicos totais para a polpa de goiaba (2348,2 mg AGE 100 g⁻¹), sendo identificados 34 diferentes compostos fenólicos, com o ácido elágico, ácido gálico, ácido vanílico e quercetina como majoritários. Para o resíduo de goiaba, a PLE foi a técnica mais eficiente, com o extrato obtido apresentando um teor de fenólicos totais de 2266,0 mg AGE 100 g⁻¹. Nas amostras obtidas por PLE foram identificados 39 compostos fenólicos. Os extratos com o maior teor de fenólicos totais também obtiveram maior atividade antioxidante, por todos os métodos testados. Para a extração de carotenoides da polpa de goiaba, a ME e a EAU por ultrassom de banho foram observados os maiores teores de

licopeno (107,6 mg 100 g⁻¹ e 135,0 mg 100 g⁻¹, respectivamente) e β -caroteno (4,763 mg 100 g⁻¹ e 2,179 mg 100 g⁻¹, respectivamente). Este extrato também apresentou o maior teor de carotenoides totais, maior atividade antioxidante por todos os ensaios e coloração mais intensa. Para o resíduo de goiaba, a EAU por ultrassom de banho foi a técnica mais eficiente (licopeno = 76,64 mg 100 g⁻¹, β -caroteno = 3.264 mg 100 g⁻¹). Dessa forma, a EAU se mostrou um método eficaz para a extração de carotenoides da polpa e do resíduo de goiaba. Os pós de goiaba mostraram-se uma fonte rica em compostos antioxidantes, podendo ser usados como ingredientes em alimentos funcionais.

Palavras-chave: extração assistida por ultrassom, líquido pressurizado, ultra-turrax, atividade antioxidante, LC-ESI-MS/MS.

ABSTRACT

Guava (*Psidium guajava* L.), a popular fruit in tropical countries, can be consumed *in natura* or transformed into several products. Evidences indicate that both the pulp and the waste fraction of guava present a high content of antioxidant substances, such as phenolic compounds and carotenoids. Such substances can be isolated from their natural sources and used in many applications. However, the conventional extraction techniques cannot be used commercially, due to the lack of practicality and to the high amount of toxic solvent used. Therefore, these techniques are being replaced by green technologies. The objective of this work was to obtain phenolic- and carotenoid-rich extracts from guava's pulp and processing waste using different green extraction techniques: ultrasound-assisted extraction (UAE), pressurized liquid extraction (PLE), and ultraturax extraction (UTE). The extracts were characterized for their phytochemical content, phenolic profile, β -carotene and lycopene content, and *in vitro* antioxidant activity. The compounds were extracted from guava's pulp and waste powders (GPP and GWE, respectively). The phenolics were extracted with a mixture of ethanol:water (30:70, v/v) as solvent, in the proportion of 1 g of sample to 15 mL of solvent, by probe-type UAE (5 min at 25 °C) and bath-type UAE (30 min at 25 °C), PLE (30 min, 60 °C, 10 MPa), and UTE (1 h, 25 °C). The carotenoids were extracted with ethyl acetate by maceration (ME), probe-type UAE (5 min, 25 °C), and bath-type UAE (30 min, 25 °C). The phenolic extracts from guava's pulp presented a higher total phenolic content compared to the extracts from guava's waste regardless of the extraction method. On the other hand, the waste extracts were more concentrated in flavonoids, flavonols, and condensed tannins. Probe-type UAE was the extraction method that yielded the highest total phenolic content from guava's pulp (2348.2 mg GAE 100 g⁻¹). In this extract, a total of 34 different phenolics was identified, with ellagic acid, gallic acid, vanillic acid, and isoquercetin as the major ones. For guava waste, PLE was the most efficient extraction technique, presenting a total phenolic content of 2266.0 mg GAE 100 g⁻¹, where 39 different phenolic compounds were identified. The extracts with higher phenolic content also had higher antioxidant activities, by all the assays tested. For carotenoid extraction from guava's pulp, ME and bath-type UAE obtained the highest contents of lycopene (107.6 mg 100 g⁻¹ and 135.0 mg 100 g⁻¹, respectively) and β -carotene (4.763 mg 100 g⁻¹ and 2.179 mg 100 g⁻¹, respectively). This extract also presented the highest total carotenoid content, antioxidant

activity, and most intense color. For guava's waste, bath-type UAE was the most efficient technique (lycopene = 76.64 mg 100 g⁻¹, β-carotene = 3.264 mg 100 g⁻¹). Therefore, UAE showed to be a suitable alternative for the extraction of carotenoids from guava's pulp and waste. Guava's powders demonstrated to be a rich source of antioxidant compounds, and they may be used as ingredients in functional food.

Keywords: ultrasound assisted extraction, pressurized liquid, ultra-turrax, antioxidant activity, LC-ESI-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Goiaba branca e vermelha -----	35
Figura 1.2 – Estrutura química do licopeno -----	39
Figura 1.3 – Estrutura química de alguns ácidos fenólicos e flavonoides -----	43
Figura 1.4 – Modelo de ultrassom de sonda -----	47
Figura 1.5 – Modelo de equipamento ultra-turrax -----	48
Figura 1.6 – Modelo de equipamento para extração por líquido pressurizado -----	50
Figura 2.1 – Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos identificados nas amostras de pó e extrato de polpa de goiaba (PGP e EPG) e pó e extrato de resíduo de goiaba (RGP e ERG) -----	84
Figura 2.2 - Taxa de fenólicos entre o extrato e o pó de polpa de goiaba (PG) e entre o extrato e o pó de resíduo de goiaba (RG) -----	87
Figura 3.1 – Taxa entre UTE e PLE e entre BEAU e PLE para cada determinação fitoquímica e ensaio de atividade antioxidante nos extratos de polpa (EPG) e de resíduo de goiaba (ERG) -----	117
Figura 3.2 – Taxa entre UTE e PLE e entre BEAU e PLE para cada composto fenólico quantificado no extrato de polpa de goiaba (EPG) e no extrato de resíduo de goiaba (ERG) -----	123
Figura 4.1 – Morfologia da polpa de goiaba em pó (PGP), magnificação de: a) e b) 50x, c) e d) 100x, e) 250x e f) 500x -----	146
Figura 4.2 – Morfologia do resíduo de goiaba em pó (RGP), magnificação de: a) 50x, b) 100x, c) 300x, d) e e) 500x e f) 1000x -----	148
Figura 4.3 – Teor de licopeno (1) e β -caroteno (2) dos extratos de polpa e resíduo de goiaba (EPG e ERG, respectivamente) obtidos por maceração (ME), extração assistida por ultrassom de banho (BEAU) e de sonda (PEAU) -----	154
Figura 4.4 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C e h) da (1) polpa de goiaba em pó e extrato (PGP e EPG, respectivamente) e (2) resíduo de goiaba em pó e extrato (RGP e ERG, respectivamente) obtidos por maceração (ME), extração assistida por ultrassom de banho (BEAU) e de sonda (PEAU) -----	159

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 – Perfil fenólico da goiaba reportado em diferentes Estudos -----	88
Quadro 4.1 – Compilação de estudos sobre a extração de licopeno e β -caroteno a partir da goiaba e seus subprodutos -----	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Composição nutricional da goiaba vermelha (porção de 100 g) -----	37
Tabela 2.1 – Teor de fenólicos totais, flavonoides, flavonóis, taninos condensados e atividade antioxidante (DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP) dos extratos de polpa e resíduo de goiaba (EPG e ERG, respectivamente) -----	76
Tabela 2.2 – Perfil fenólico dos pós de polpa (PGP, mg g ⁻¹ de amostra) e resíduo de goiaba (RGP, mg g ⁻¹ de amostra) e dos extratos de polpa (EPG, mg g ⁻¹ de amostra) e de resíduo (ERG, mg g ⁻¹ de amostra) de goiaba -----	79
Tabela 3.1 – Teor de fenólicos totais, flavonoides, flavonóis, taninos condensados e atividade antioxidante (DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP) dos extratos de polpa e resíduo de goiaba (EPG e ERG, respectivamente) obtidos por extração por ultra-turrax, extração assistida por ultrassom de banho e extração por líquido pressurizado -----	112
Tabela 3.2 – Perfil fenólico dos extratos de polpa (EPG, mg g ⁻¹ de amostra) e resíduo (ERG, mg g ⁻¹ de amostra) de goiaba obtidos por extração por ultra-turrax (UTE), extração assistida por ultrassom de banho (BUAE) e extração por líquido pressurizado (PLE) -----	118
Tabela 4.1 – Teor de carotenoides totais e atividade antioxidante (DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP) dos extratos de polpa e resíduo de goiaba (EPG e ERG, respectivamente) obtidos por maceração (ME), extração assistida por ultrassom de banho (BUAE) e de sonda (PUAE) -----	150
Tabela 4.2 – Coeficiente da correlação de Pearson e p-valor entre o teor de carotenoides totais (TCT) e atividade antioxidante para cada método de extração -----	153
Tabela 4.3 – Coeficiente da correlação de Pearson e p-valor entre o teor de licopeno e os parâmetros de cor para cada método de extração -----	160
Tabela A.1 – Parâmetros da análise de LC-ESI-MS/MS para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos nas amostras de pó e extrato de polpa de goiaba (PGP e EPG) e pó e extrato de resíduo de goiaba (RGP e ERG) referente ao Capítulo 2 -----	173
Tabela A.2 – Parâmetros da análise de LC-ESI-MS/MS para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos nas amostras de extrato de polpa de goiaba e resíduo de goiaba (EPG e ERG, respectivamente), obtidos por maceração (ME), extração assistida	

por ultrassom de banho (BEAU) e de sonda (PEAU), referente ao
Capítulo 3 ----- 175

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE – Ácido gálico equivalente
BEAU – Extração assistida por ultrassom de banho
CE – Catequina equivalente
EAU – Extração assistida por ultrassom
EPG – Extrato de polpa de goiaba
ERG – Extrato de resíduo de goiaba
FC – Teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu
FD – Flavonoides
FN – Flavonóis
MDPPH – DPPH modificado
PB – Teor de fenólicos totais por Prussian Blue
PGP – Polpa de goiaba em pó
PLE – Extração por líquido pressurizado
QE – Quercetina equivalente
RGP – Resíduo de goiaba em pó
SEAU – Extração assistida por ultrassom de sonda
TC – Taninos condensados
TFT – Teor de fenólicos totais
UTE – Extração por ultra-turrax

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO -----	25
INTRODUÇÃO -----	28
OBJETIVOS -----	32
Objetivo geral -----	32
Objetivos específicos -----	32
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	34
1.1 GOIABA -----	34
1.1.1 Histórico e Botânica -----	34
1.1.2 Produção e Consumo -----	36
1.1.3 Composição -----	36
1.2 CAROTENOIDES -----	38
1.3 EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES -----	40
1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS -----	42
1.5 MÉTODOS CONVENCIONAIS PARA A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS -----	44
1.6 MÉTODOS NÃO-CONVENCIONAIS PARA A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS -----	45
1.6.1 Extração assistida por ultrassom (EAU) -----	45
1.6.2 Extração por ultra-turrax (UTE) -----	48
1.6.3 Extração por líquido pressurizado (PLE) -----	49
1.7 MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA A DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE -----	51
1.7.1 DPPH -----	52
1.7.2 ABTS -----	53
1.7.3 FRAP -----	53
CAPÍTULO 2: A SUPERFRUTA GOIABA VERMELHA E SEU RESÍDUO DE PROCESSAMENTO PODEM SER UM POTENCIAL INGREDIENTE PARA O DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS FUNCIONAIS? -----	65
2.1 INTRODUÇÃO -----	66
2.2 MATERIAL E MÉTODOS -----	69
2.2.1 Amostras -----	69
2.2.2 Materiais -----	69
2.2.3 Extração assistida por ultrassom (EAU) -----	70
2.2.4 Caracterização dos extratos -----	70
2.2.4.1 Determinação do teor de fenólicos totais (TFT) por Folin- Ciocalteu -----	70
2.2.4.2 Determinação do teor de fenólicos totais (TFT) por Prussian Blue -----	71

2.2.4.3	Determinação de flavonoides -----	71
2.2.4.4	Determinação de flavonóis -----	71
2.2.4.5	Determinação de taninos condensados -----	72
2.2.4.6	DPPH -----	72
2.2.4.7	DPPH modificado -----	72
2.2.4.8	ABTS -----	73
2.2.4.9	FRAP -----	73
2.2.5	Identificação de quantificação dos compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS -----	74
2.2.5.1	Preparação das amostras -----	74
2.2.5.2	Análise por LC-ESI-MS/MS -----	74
2.2.6	Análise estatística -----	75
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	75
2.3.1	Caracterização dos extratos -----	75
2.3.2	Perfil fenólico -----	79
2.4	CONCLUSÃO -----	89
	CAPÍTULO 3: MÉTODOS VERDES DE EXTRAÇÃO COMO UMA FERRAMENTA PARA A OBTENÇÃO DE EXTRATOS RICOS EM FENÓLICOS A PARTIR DA POLPA E DO RESÍDUO DE PROCESSAMENTO DA GOIABA (<i>PSIDIUM GUAJAVA</i> L.) -----	100
3.1	INTRODUÇÃO -----	102
3.2	MATERIAL E MÉTODOS -----	105
3.2.1	Amostras -----	105
3.2.2	Materiais -----	105
3.2.3	Extração de compostos fenólicos -----	105
3.2.3.1	Extração por ultra-turrax (UTE) -----	106
3.2.3.2	Extração assistida por ultrassom de banho (BEAU) -----	106
3.2.3.3	Extração por líquido pressurizado (PLE) -----	106
3.2.4	Caracterização dos extratos -----	107
3.2.4.1	Determinação do teor de fenólicos totais (TFT) por Folin-Ciocalteu -----	107
3.2.4.2	Determinação do teor de fenólicos totais (TFT) por Prussian Blue -----	107
3.2.4.3	Determinação de flavonoides -----	108
3.2.4.4	Determinação de flavonóis -----	108
3.2.4.5	Determinação de taninos condensados -----	108
3.2.4.6	DPPH -----	109
3.2.4.7	DPPH modificado -----	109
3.2.4.8	ABTS -----	109

3.2.4.9 FRAP -----	110
3.2.5 Identificação de quantificação dos compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS -----	110
3.2.5.1 Preparação das amostras -----	110
3.2.5.2 Análise por LC-ESI-MS/MS -----	111
3.2.6 Análise estatística -----	111
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	112
3.3.1 Caracterização dos extratos -----	112
3.3.2 Perfil fenólico -----	117
3.4 CONCLUSÕES -----	124
CAPÍTULO 4: EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA A OBTENÇÃO DE LICOPENO E β-CAROTENO A PARTIR DE POLPA E RESÍDUO DE GOIABA VERMELHA (<i>PSIDIUM GUAJAVA L.</i>) -----	135
4.1 INTRODUÇÃO -----	137
4.2 MATERIAL E MÉTODOS -----	140
4.2.1 Amostras -----	140
4.2.2 Materiais -----	140
4.2.3 Morfologia dos pós de goiaba -----	141
4.2.4 Extração por maceração (ME) -----	141
4.2.5 Extração assistida por ultrassom de banho (BEAU) -----	141
4.2.6 Extração assistida por ultrassom de sonda (PEAU) -----	141
4.2.7 Caracterização dos extratos -----	142
4.2.7.1 Teor de carotenoides totais (TCT) -----	142
4.2.7.2 DPPH -----	142
4.2.7.3 DPPH modificado -----	143
4.2.7.4 ABTS -----	143
4.2.7.5 FRAP -----	144
4.2.8 Análise de licopeno e β -caroteno por HPLC -----	144
4.2.8.1 Preparação das amostras -----	144
4.2.8.1 Análise de HPLC -----	144
4.2.9 Análise de cor -----	145
4.2.10 Análise estatística -----	145
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	145
4.3.1 Morfologia dos pós de goiaba -----	145
4.3.2 Caracterização dos extratos -----	149
4.3.3 Análise de licopeno e β -caroteno por HPLC -----	154
4.3.4 Determinação de cor -----	158
4.4 CONCLUSÃO -----	161
CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	170

ANEXO A	-----	173
ANEXO B	-----	175
ANEXO C	-----	177
ANEXO D	-----	178
ANEXO E	-----	179

APRESENTAÇÃO

Desde sua concepção, este trabalho objetivou a exploração das principais classes de compostos bioativos da goiaba. Esta fruta, classificada como exótica em várias partes do mundo, é extremamente popular no Brasil, país que ocupa a terceira posição no ranking de maiores produtores mundiais de goiaba. Apesar disso, a literatura não é tão vasta no que diz respeito à composição e ao perfil de compostos fenólicos e carotenoides da goiaba, duas classes de substâncias com propriedades antioxidantes. Além disso, algumas evidências apontadas na literatura davam indícios de que o resíduo de processamento desta fruta poderia carrear ainda uma grande quantidade dos compostos citados. Portanto, estudar mais a fundo a composição de bioativos da goiaba para, especialmente, valorizar sua fração residual, foi a principal diretriz para o desenvolvimento deste projeto de mestrado. Para isso, decidimos trabalhar tanto com a polpa quanto com o resíduo de goiaba para que conseguíssemos entender como estas duas frações diferem em termos de bioativos.

Para recuperar os fenólicos e os carotenoides destas duas matérias-primas (polpa e resíduo), um método de extração precisava ser conduzido. Na busca pelo processo mais adequado, nos deparamos com metodologias convencionais, já bem elucidadas, mas que pecavam pelo uso elevado de solventes orgânicos tóxicos e pela falta de aplicação comercial. Diante disso, decidimos criar uma outra diretriz para esse trabalho: o estudo de técnicas alternativas de extração, visando-se a diminuição do uso destes solventes e o desenvolvimento de métodos que possam futuramente serem usados em larga escala pelas indústrias.

Com as diretrizes em mente, realizamos uma sequência de testes preliminares para decidir tanto as melhores condições de secagem para a transformação da polpa e do resíduo da goiaba em pós, quanto as condições experimentais de cada processo de extração que garantiriam os maiores teores dos compostos de interesse.

Estabelecidas as condições, o projeto foi organizado em três partes. Na primeira, que corresponde ao capítulo 2 dessa dissertação, focamos na exploração da composição fitoquímica e do perfil fenólico da polpa e do resíduo de goiaba. Nesta etapa, buscamos entender se a polpa e o resíduo de goiaba possuem uma composição de compostos fenólicos que as tornem aptas a serem utilizadas como ingredientes em alimentos funcionais. Utilizamos a extração assistida por ultrassom de sonda para obter extratos ricos em fenólicos. Esta foi a primeira vez que esta técnica foi usada para a goiaba e seus subprodutos. Os resultados deste experimento nos mostraram que tanto os pós quanto os extratos obtidos

de polpa e de resíduo de goiaba se mostraram matérias-primas com altas concentrações fitoquímicos e perfis fenólicos que apresentaram uma grande variedade de compostos com propriedades antioxidantes. De posse de tais resultados, concluímos que a goiaba é uma superfruta e que tanto a polpa quanto o resíduo da mesma podem ser potenciais ingredientes funcionais.

Sabendo-se da rica composição de fenólicos que a goiaba possui, na segunda parte do trabalho, nosso objetivo era estudar as possíveis técnicas para a recuperação destes compostos. Nesta etapa, buscávamos responder se as técnicas não-convencionais de extração seriam capazes de nos fornecer extratos ricos em compostos fenólicos, de forma a se aproveitar ao máximo o que nossa matéria-prima de interesse tem a oferecer. Para isso, testamos as extrações por ultra-turrax, por banho ultrassônico e por líquido pressurizado. Os resultados apontaram para dados interessantes, uma vez que os fenólicos da polpa foram extraídos em maior número e quantidade quando a extração por ultra-turrax foi utilizada. Em contrapartida, a extração por líquido pressurizado foi aquela que conseguiu recuperar o maior teor fenólicos a partir do resíduo. A extração por ultrassom de banho também obteve resultados satisfatórios, se mostrando um meio-termo entre as duas outras técnicas. Esta etapa do trabalho nos mostrou que as técnicas verdes de extração são capazes de recuperar os fenólicos da polpa e do resíduo de goiaba com alta eficiência, utilizando-se uma quantidade reduzida de solvente e tecnologias possíveis de serem usadas a nível comercial.

Após explorarmos os compostos fenólicos da polpa e do resíduo de goiaba, havia chegado a hora de explorar o outro grupo de compostos antioxidantes que esta fruta também possui, os carotenoides. Portanto, a terceira etapa deste trabalho teve como foco a extração e a caracterização dos carotenoides da goiaba por meio de uma técnica não-convencional, a extração por ultrassom, utilizada pela primeira vez para a extração de carotenoides nesta matéria-prima. Para isso, utilizamos tanto a sonda quanto o banho ultrassônico e comparamos ambos com a maceração, o protocolo clássico. O banho ultrassônico se mostrou uma técnica extremamente eficaz na recuperação dos carotenoides de ambas as frações, especialmente se considerarmos o teor de licopeno. A secagem da polpa e do resíduo de goiaba também se mostrou uma boa alternativa para aumentar a disponibilidade dos carotenoides quando comparada à extração utilizando-se amostras frescas, sendo possível, dessa forma, a recuperação de uma quantidade mais elevada de compostos como licopeno e β -caroteno.

INTRODUÇÃO

A goiaba é típica de regiões tropicais, sendo o Brasil o terceiro maior produtor desta fruta no mundo, com uma produção de mais de 400.000 ton por ano. Os Estados de São Paulo, Bahia, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná são os maiores produtores no país, concentrando 69% do volume total da produção nacional (KIST, 2018).

Do volume total de goiaba processada no país, os resíduos (cascas, sementes e polpa residual) representam em torno de 30%, o que corresponde a aproximadamente 68.468 ton (TRIECHEL, 2016; KIST, 2018). O resíduo gerado apresenta uma considerável concentração de fenólicos e carotenoides. Quando isolados de suas fontes naturais, seja da polpa da fruta ou do resíduo do processamento, estes compostos podem ser aplicados como corantes alimentícios naturais pela indústria de alimentos e/ou como antioxidantes que podem ser incorporados a medicamentos, cosméticos e alimentos funcionais com a função de retardar a oxidação de produtos com alto teor lipídico. Portanto, o reaproveitamento dos mesmos surge como uma possibilidade de agregar valor a este subproduto, além de diminuir os níveis de emissão de resíduos industriais (CHANG et al., 2018).

Nas frutas, dois grupos de compostos que apresentam atividade antioxidante se destacam. O primeiro deles, os fenólicos, são responsáveis pelas características sensoriais de adstringência e amargor das frutas (SHI et al., 2005). Podem ser subdivididos em ácidos fenólicos, antocianinas, flavonoides simples e flavonoides compostos. O teor de fenólicos totais de 62 frutas foi analisado por Fu et al. (2011). As três frutas que apresentaram as maiores concentrações destes compostos foram a jujuba (*Ziziphus jujubas*), com 585,52 mg de AGE/100g, a fruta-do-conde (*Annona squamosa*), com 405,41 mg de AGE 100 g⁻¹ e a goiaba (*Psidium guajava*), com 194,11 mg de AGE 100 g⁻¹.

O segundo grupo de compostos que possui atividade antioxidante em frutas são os carotenoides, uma classe de pigmentos que conferem coloração que varia entre o amarelo e o vermelho (PHAN-THI; WACHE, 2014). Neste grupo, o licopeno é aquele que apresenta a maior atividade antioxidante e, devido a isso, diversos estudos relacionam o consumo de produtos ricos neste composto com a redução do risco de desenvolvimento de câncer de próstata (BEYNON et al., 2018; JIANG et al., 2018). Na grande maioria destas pesquisas, o tomate e seus derivados têm sido utilizados como fonte deste carotenoide (PHINNEY et al., 2017; DOLATABADI et al., 2016; HO et al., 2015). Porém, o tomate não é a

fruta que possui a maior concentração de licopeno ($35 \mu\text{g g}^{-1}$). As frutas que contém o maior teor deste composto são a pitanga (*Eugenia uniflora*), com $74 \mu\text{g g}^{-1}$ e a goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.), com $52 \mu\text{g g}^{-1}$ (RODRÍGUEZ-AMAYA, 2008).

Para o isolamento de fenólicos e carotenoides de suas fontes naturais e posterior aplicação em diferentes matrizes, é necessária a condução de um processo de extração. As metodologias convencionais de extração, apesar de já serem bem elucidadas e não necessitarem de aparatos sofisticados, utilizam solventes orgânicos tóxicos, como hexano e éter de petróleo, que podem gerar danos ao meio ambiente e à saúde dos manipuladores (SELVAMUTHUKUMARAN; SHI, 2017).

Dessa forma, uma gama de novas tecnologias vem sendo estudadas com o objetivo de substituir estas técnicas. Três técnicas promissoras são a extração assistida por ultrassom (banho e sonda), a extração por ultraturrax e a extração por líquido pressurizado. A extração assistida por ultrassom permite a utilização de uma quantidade menor de solvente, além de ocorrer a uma velocidade mais rápida e a temperaturas brandas. A extração por ultra-turrax também promove uma diminuição no uso de solventes, promovida por uma maior eficiência de liberação dos compostos devido ao uso de rotação de alta velocidade. A extração por líquido pressurizado, por sua vez, faz uso de altas temperaturas (até 200°C), o que diminui a viscosidade do solvente, aumentando sua capacidade de solubilização do analito, em combinação com altas pressões (35 a 200 bar), que ajudam no rompimento das interações entre a matriz e os compostos-alvo. Dessa forma, estas três tecnologias são consideradas mais ambientalmente amigáveis em comparação às técnicas clássicas de extração que utilizam grandes quantidades de solventes tóxicos (SELVAMUTHUKUMARAN; SHI, 2017).

Na literatura, poucos estudos investigaram novas tecnologias de extração de compostos fenólicos e de carotenoides a partir da goiaba e, principalmente, seus subprodutos. Uma busca nas plataformas *Scopus*, *ScienceDirect* e Periódicos Capes foi realizada, utilizando-se as palavras-chave *guava*, *lycopene*, *carotenoids*, *phenolics*, *ultrasound*, *pressurized liquid* e *extraction*, no período entre 1970 e 2019. Foram encontrados 3 trabalhos que utilizaram a extração por ultra-turrax para extrair os fenólicos da polpa e da casca de goiaba (THAIPONG et al., 2006) e da goiaba inteira (MUSA et al., 2011; MUSA et al., 2015). A extração assistida por ultrassom de banho foi usada em 4 trabalhos para extrair os fenólicos da casca e da polpa de goiaba (ROJAS-GARBANZO et al.,

2017) e da goiaba inteira (MUSA et al., 2011, MUSA et al., 2015; MORENO et al., 2014).

Não foram encontrados trabalhos que utilizaram a extração por ultra-turrax para a obtenção de fenólicos da fração residual total do processamento da goiaba. Também não foram encontrados estudos que realizaram a extração de fenólicos desta matéria-prima por meio da utilização de líquido pressurizado e de extração assistida por ultrassom de sonda. A extração por ultrassom também nunca havia sido empregada para a obtenção de carotenoides da polpa e do resíduo de goiaba.

Dessa forma, este trabalho contribuiu para a exploração de uma matéria-prima ainda pouco estudada em relação aos tópicos abordados. A obtenção e caracterização de extratos ricos em carotenoides e fenólicos a partir da polpa e do resíduo de processamento da goiaba permitirão o desenvolvimento de novas formulações com alegações funcionais, dentre outras aplicações. Além disso, o uso da fração residual agregará valor a este subproduto, evitando que o mesmo seja disposto no meio ambiente. Por fim, o estudo das metodologias de extração assistida por ultrassom, ultra-turrax e por líquido pressurizado possibilitarão uma redução do impacto ambiental que os métodos convencionais ocasionam, além de possibilitar o desenvolvimento de novos métodos de extração com aplicações industriais.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Extrair e caracterizar os compostos fenólicos e carotenoides da polpa e do resíduo de goiaba para valorizar a fração residual do processamento desta fruta, através do uso de técnicas de extração menos agressivas ao meio ambiente.

Objetivos específicos

- Obter os pós da polpa e do resíduo (sementes, casca e polpa residual) da goiaba *in natura* por meio de uma despulpadeira laboratorial e por uma estufa de secagem com circulação forçada de ar;
- Analisar a morfologia dos pós obtidos por microscopia eletrônica de varredura;
- Extrair os compostos fenólicos dos pós de polpa e resíduo por extração assistida por ultrassom de sonda e de banho, por extração por ultra-turrax e por extração por líquido pressurizado utilizando-se uma mistura de água e etanol como solvente;
- Determinar o teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu e por Prussian Blue, flavonoides totais, flavonóis totais e taninos condensados nos extratos fenólicos obtidos de cada método de extração;
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS dos extratos;
- Extrair e determinar o teor de carotenoides a partir dos pós de polpa e resíduo por maceração, por extração assistida por ultrassom de sonda e de banho, e identificar e quantificar o teor de licopeno e β -caroteno por HPLC;
- Determinar a cor dos extratos de carotenoides;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP nos extratos ricos em carotenoides e fenólicos obtidos de cada método de extração;
- Comparar os resultados para determinar quais as técnicas mais adequadas para a extração de fenólicos e carotenoides.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 GOIABA

1.1.1 Histórico e Botânica

A goiabeira é originária do continente americano, onde acredita-se que tenha surgido no território que se estende do México meridional até a América Central. Esta árvore foi domesticada há mais de 2000 anos. Em 1526, foi relatado o primeiro cultivo comercial de goiaba, nas ilhas caribenhas. Posteriormente, o cultivo de goiaba foi difundido até as Filipinas e Índias, através de exploradores espanhóis (JOSEPH; PRIYA, 2011).

A goiabeira, que pertence à família *Myrtaceae*, é uma árvore de baixa estatura, variando entre 3 e 10 m de altura, com galhos próximos ao chão. Seus frutos usualmente medem entre 4 e 12 cm em diâmetro e pesam de 100 a 450 g, possuindo uma casca fina de coloração que varia de verde claro a amarelo brilhante. A polpa da fruta varia de acordo com a variedade da goiaba, com colorações que vão do branco ao vermelho, sendo a goiaba vermelha superior à branca em termos de aroma, sabor e valor nutricional (Figura 1.1). O sabor da fruta é normalmente doce ou levemente ácido, dependendo de seu estágio de maturação, enquanto o aroma varia de fraco a pungente. A polpa da goiaba é macia e possui sementes pequenas, numerosas, duras e de coloração levemente amarelada. Alguns cultivares de goiaba sem semente estão disponíveis em alguns países (JOSEPH; PRIYA, 2011).

Figura 1.1 – Goiaba branca e vermelha



Fonte: Produce Oasis (2017)

A goiabeira apresenta alta tolerância a diversas condições climáticas, adaptando-se de forma satisfatória a climas úmidos e secos, entre o nível do mar e 2.100 m de elevação. As condições ótimas para o cultivo da goiaba são temperaturas variando entre 20 e 30° C e precipitação pluvial variando de 1.000 a 2.000 mm. Em áreas onde a umidade relativa é alta, a qualidade da fruta diminui, uma vez que a melhor qualidade é atingida quando a maturação da goiaba acontece em períodos secos (POMMER; MURAKAMI, 2009).

A goiaba é muito consumida na América Latina, tanto *in natura* quanto na forma de sucos, geleias, doces em compota, doces em barra, recheios de torta, molhos e incorporada a produtos lácteos, produtos de panificação, cereais matinais e diversas receitas. Em alguns países tropicais, suas raízes, cascas, folhas e a fruta verde são utilizadas como fitoterápicos em casos de gastroenterite, diarreia e disenteria. Além disso, folhas inteiras são, em alguns casos, mastigadas com o objetivo de aliviar dor de dente (JOSEPH; PRIYA, 2011).

1.1.2 Produção e Consumo

A China e a Índia são os maiores produtores de goiaba. O Brasil, que é o terceiro maior produtor mundial desta fruta, produziu 414.960 ton em uma área colhida de 17.119 ha, no ano de 2016 (KIST, 2018).

A exportação desta fruta também é significativa. Em 2017, um total de 142.689 kg de goiaba *in natura* e desidratada foi exportada, gerando US\$ 344.475 (KIST, 2018). Em Santa Catarina, a produção de goiaba se concentra na cidade de Biguaçu, localizada na região metropolitana de Florianópolis, com uma produção de 30 ton em uma área plantada de 4 ha, no ano de 2015 (IBGE, 2015).

De acordo com Triechel (2016), 55% do volume total de goiaba produzido no Brasil é destinado ao processamento e as perdas durante o processo, que corresponde às cascas e sementes da fruta, além de polpa residual, correspondem a 30% do volume total processado. Portanto, considerando que a produção brasileira de goiaba corresponde a 414.960 ton, um volume de 228.228 ton é processado pela indústria, gerando aproximadamente 68.468 ton de resíduos.

O gerenciamento de resíduos sólidos é um grande desafio para as indústrias de alimentos, principalmente aquelas que apresentam grandes perdas em seus processos, como a indústria de frutas. O tratamento de resíduos orgânicos possui elevado custo em função de sua composição complexa. Portanto, para se evitar que subprodutos atinjam a estação de tratamento das empresas, é essencial que os mesmos sejam reaproveitados. Devido à composição da goiaba, um manejo impróprio de seus subprodutos pode levar à multiplicação de micro-organismos, acelerando as reações de deterioração. Além disso, alguns estudos já apontaram evidências de que o resíduo de goiaba é rico em compostos com propriedade antioxidante, como fenólicos e carotenoides e, portanto, deve ser destinado apropriadamente visando-se novas aplicações (SOUZA et al., 2011; CASTRO-VARGAS et al., 2010).

1.1.3 Composição

Em muitos países tropicais, a goiaba é utilizada na medicina popular para o tratamento de disenteria, dores no estômago, vertigem, hemorragias, dentre outros (JOSEPH; PRIYA, 2011; KAMATH et al., 2008). A alegação dos efeitos benéficos relacionados à goiaba

pode ser explicada através da análise de seu valor nutricional (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Composição nutricional da goiaba vermelha (porção de 100 g)

Componente	Teor
Calorias (kcal)	54
Carboidratos (g)	13,0
Proteínas (g)	1,1
Lipídeos (g)	0,4
Gorduras saturadas (g)	0,1
Gorduras poli-insaturadas (g)	0,3
Fibra alimentar (g)	6,2
Vitamina C (mg)	80,6
Cálcio (mg)	4,5
Fósforo (mg)	15,4
Manganês (mg)	0,1
Magnésio (mg)	6,9
Ferro (mg)	0,2
Potássio (mg)	197,6
Zinco (mg)	0,1
β -caroteno ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3,74
Licopeno ($\mu\text{g g}^{-1}$)	52,0
Fenólicos totais (mg AGE 100 g ⁻¹)	194,11

Fonte: LIMA et al., 2004; PRADO et al., 2014; RODRÍGUEZ-AMAYA et al., 2008; Fu et al., 2011.

É possível observar que, além de possuir baixo teor calórico, a goiaba é uma fruta rica em diversos compostos que atuam de forma positiva na saúde humana, como a vitamina C, responsável por ajudar na prevenção e no tratamento do resfriado comum. Além disso, esta fruta também apresenta em sua composição o β -caroteno ($3,74 \mu\text{g g}^{-1}$), pigmento que possui proatividade de vitamina A, que está relacionada ao bom funcionamento da visão, entre outras funções. Outro carotenoide presente é o licopeno, estudado por suas propriedades antioxidantes (PRADO et al., 2014).

Geralmente, o licopeno aparece relacionado a tomate e seus derivados, porém, em relação à fruta *in natura*, a goiaba vermelha possui uma concentração de licopeno ainda maior que o tomate. No tomate, o teor de licopeno é $35 \mu\text{g g}^{-1}$, enquanto na goiaba é $52 \mu\text{g g}^{-1}$. A única fruta que supera a goiaba vermelha em relação a este componente é a pitanga madura, com $75 \mu\text{g g}^{-1}$ de licopeno g^{-1} de fruta (RODRÍGUEZ-AMAYA et al., 2008). Além da capacidade de diminuir as concentrações de radicais livres nas células devido a seu poder antioxidante, diversos estudos recentes têm relacionado a ingestão do licopeno a uma menor incidência de câncer de próstata (SOARES et al., 2017; BEYNON et al., 2018; JIANG et al., 2018).

Além da composição da fruta *in natura*, a fração residual da goiaba também já foi investigada. Souza et al. (2011) analisou, entre outras frutas, a composição da polpa e dos resíduos industriais do processamento de goiaba, com foco em compostos antioxidantes como carotenoides e fenólicos. Para a extração de carotenoides foi utilizada uma mistura de álcool isopropílico e hexano. Já para os fenólicos, foi realizada extração aquosa. De acordo com os resultados reportados, os resíduos apresentaram um teor de carotenoides totais de $644,9 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$, $1,06 \mu\text{g g}^{-1}$ de flavonoides, $75,90 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de vitamina C e $24,63 \text{ mg de AGE } 100 \text{ g}^{-1}$ para fenólicos totais.

1.2 CAROTENOIDES

Os carotenoides são um grupo de pigmentos naturais com mais de 600 compostos já reportados, responsáveis pelas colorações amarelo, laranja e vermelho em frutas, vegetais e flores. Tais compostos podem ser extraídos de suas fontes naturais para serem usados como corantes em produtos alimentícios, bebidas, ração animal, cosméticos e diversas outras aplicações (PHAN-THI; WACHE, 2014).

Em organismos animais, os carotenoides possuem importantes funções que podem ser diferenciadas de acordo com suas estruturas químicas. Podem ser precursores de retinol, atuando como provitamina A (β -caroteno e outros que possuem β -ionona na estrutura). Atuam também como antioxidantes e na fotoproteção contra a radiação ultravioleta; regulação da diferenciação celular, ciclo celular e apoptose (SAINI et al., 2015). Para o licopeno, são reportadas alegações de proteção contra câncer devido às propriedades antioxidantes (BEYNON et al., 2018; JIANG et al., 2018). Todas estas funções no organismo conferem ao

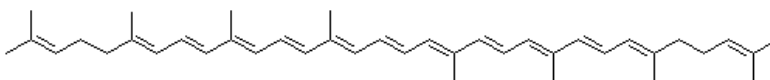
grupo dos carotenoides o status de compostos bioativos, o que justifica o interesse industrial pelos mesmos (SAINI et al., 2015).

Os carotenoides possuem em suas estruturas uma série de ligações duplas conjugadas, responsáveis por sua capacidade de absorver luz no espectro visível, além de sua reatividade química. A grande maioria dos compostos dessa classe caracterizam-se como hidrocarbonetos poli-insaturados contendo 40 átomos de carbono e dois sistemas de anéis terminais. Dentro deste grupo, existem duas grandes divisões - as xantofilas, que possuem carbono, hidrogênio e oxigênio na cadeia; e carotenos, que possuem apenas carbono e hidrogênio, apresentando, dessa forma, hidrofobicidade (AMBATI et al., 2014; GOUVEIA et al., 2003).

Dentro do grupo dos carotenos, destacam-se o β -caroteno e o licopeno. O β -caroteno é o principal precursor de vitamina A da natureza, portanto, é caracterizado como o mais importante caroteno na dieta humana (SAINI; KEUM, 2018).

Por outro lado, o licopeno é conhecido por possuir um eficiente mecanismo de desativação de oxigênio singlete. Acredita-se que esta propriedade seja a principal causa pela qual o consumo de alimentos ricos em licopeno tem sido associado a uma menor incidência de câncer de próstata (SAINI; KEUM, 2018). Pitanga, goiaba, tomate e seus derivados, melancia e mamão papaya são algumas importantes fontes de licopeno (RODRÍGUEZ-AMAYA et al., 2008). A estrutura química do licopeno é mostrada na Figura 1.2.

Figura 1.2 – Estrutura química do licopeno



Fonte: PubChem (2017)

A atuação dos carotenos como antioxidantes pode ocorrer por meio de dois mecanismos - desativação do oxigênio singlete (O_2^1) ou bloqueio de radicais livres. A inativação do O_2^1 pode ocorrer por via química ou física (KRINSKY; JOHNSON, 2005). Na via física, a energia do O_2^1 é transferida para o carotenoide, portanto, o oxigênio volta para o seu estado não-reativo, oxigênio triplete (O_2^3), enquanto o carotenoide, agora em estado excitado, dissipa sua energia por meio de rotação e vibração da

molécula, permanecendo intacto e gerando energia térmica (RODRÍGUEZ-AMAYA, 2015).

Por outro lado, na via química, o carotenoide reage quimicamente com o oxigênio singlete, sendo destruído e, conseqüentemente, levando à formação de produtos de oxidação. Devido a isso, a desativação física é mais eficiente, pois o carotenoide não é destruído e pode permanecer no meio para continuar sua ação protetora (RODRÍGUEZ-AMAYA, 2015).

No segundo mecanismo, os carotenoides bloqueiam radicais livres, interrompendo reações de propagação. Este tipo de reação pode acontecer por transferência de elétrons, doação de um átomo de hidrogênio ou adição da molécula do carotenoide ao radical livre (SHAHIDI, 2015).

1.3 EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES

Devido à presença de ligações duplas em suas estruturas, os carotenoides são altamente sensíveis à luz, oxigênio e altas temperaturas. Quando produtos contendo um teor significativo de carotenoides são submetidos a processamentos que os expõem a tais fatores, estes compostos usualmente passam pelo processo de isomerização *cis/trans*, ou podem se degradar, dependendo da intensidade do tratamento. Portanto, deve-se evitar a exposição dos carotenoides a fatores que podem levar à sua degradação e perda de função (STRATI; OREOPOULOU, 2016).

Estas mesmas preocupações devem ser levadas em consideração quando os carotenoides são extraídos de suas fontes naturais para aplicações posteriores. Os processos de extração exaustiva de carotenoides geralmente envolvem diversas etapas. Primeiramente, a matriz alimentar de onde o pigmento será extraído sofre um pré-tratamento, que pode ser físico (moagem, desidratação), químico (tratamento com ácidos, bases e surfactantes) ou biológico (uso de enzimas). Em seguida, há a ruptura das células do material para que o pigmento seja liberado e extraído. Na sequência, pode-se ou não haver um processo de saponificação, seguindo-se com a separação e análise dos carotenoides (SAINI; KEUM, 2018; RODRÍGUEZ-AMAYA, 1999).

Alguns pontos devem ser considerados para que se obtenha um processo de extração bem-sucedido para esta classe de compostos. Primeiramente, alguns materiais específicos com alto teor de água podem significar um problema, principalmente em extração por fluido supercrítico e líquido pressurizado, devido à natureza hidrofóbica dos carotenoides e de grande parte dos solventes utilizados. Portanto, é

recomendável que as amostras sejam desidratadas antes do início do processo de extração. Além disso, o conhecimento da estrutura dos compostos de interesse nos materiais desidratados é fundamental, uma vez que os mesmos podem assumir conformações que dificultam a sua liberação da matriz (SAINI; KEUM, 2018).

Alguns passos podem ser seguidos para a minimização da degradação e isomerização de carotenoides durante os processos de extração, armazenamento e análise. São eles: adição de um neutralizante, como carbonato de sódio ou bicarbonato de sódio durante a extração para que haja neutralização de ácidos liberados de alguns materiais vegetais, pois estes podem levar à isomerização; adição de composto antioxidante no solvente de extração; redução do tempo entre maceração e extração, além de utilização de temperaturas apropriadas; proteção contra a incidência de luz; armazenamento dos extratos em frascos adicionados de nitrogênio, para a eliminação de oxigênio e prevenção contra oxidação (SAINI; KEUM, 2018).

Outro ponto crítico do processo de extração diz respeito à escolha do solvente. Os solventes orgânicos mais utilizados para a extração de carotenoides são acetona ($\log P = -0,26$), clorofórmio ($\log P = +2,00$), hexano ($\log P = +3,50$), metanol ($\log P = -0,69$) e acetato de etila ($\log P = 0,23$), sendo este último considerado um solvente menos agressivo ao meio ambiente, além de apresentar resultados similares aos obtidos com n-hexano para a extração de carotenoides (YARA-VARÓN et al., 2016). A escolha do solvente está relacionada à polaridade dos carotenoides alvos da extração. Licopeno e β -caroteno, por exemplo, são altamente lipofílicos devido às suas estruturas ausentes de compostos polares. Portanto, comumente o hexano é o solvente usado para extrair estes carotenoides. Porém, o mesmo apresenta alta toxicidade e pode causar danos ao meio ambiente (AMORIM-CARRILHO et al., 2014).

Após a extração dos carotenoides, é comum a condução de uma etapa de saponificação. Este processo tem por objetivo a remoção de clorofilas e ácidos graxos presentes na amostra que podem interferir na análise cromatográfica. Esta etapa não é obrigatória e deve ser conduzida apenas quando necessária, uma vez que pode causar perdas quantitativas devido à degradação dos carotenoides. Já a análise cromatográfica irá permitir a quantificação e identificação dos carotenoides presentes no extrato. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) é largamente utilizada para este propósito (RODRÍGUEZ-AMAYA, 1999).

Como pode ser observado, durante o processo de obtenção de carotenoides, a extração caracteriza-se como o ponto mais crítico do

processo. São muitas as variáveis que devem ser estudadas para a obtenção de extratos com características desejáveis. Uma extração bem-sucedida levará a um alto rendimento de carotenoides, com o mínimo de isomerização, fazendo com que o composto permaneça em sua forma mais biodisponível para as diversas aplicações possíveis.

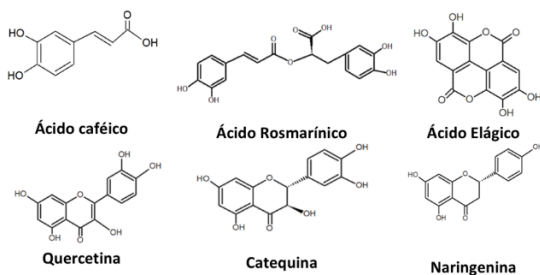
1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os fenólicos são uma classe de compostos que inclui ácidos fenólicos, antocianinas e flavonoides simples e compostos. Possuem um importante papel no que diz respeito ao aroma e sabor das frutas, uma vez que são responsáveis pelas características de adstringência e amargor típicas destes alimentos. Isto ocorre devido à interação entre os fenólicos e as glicoproteínas presentes na saliva (SHI et al., 2005).

Os flavonoides são o principal subgrupo dentro dos polifenóis, com mais de 5.000 compostos diferentes. Sua estrutura básica é formada por dois anéis aromáticos, ligados por 3 carbonos, formando um heterociclo oxigenado (GÜLÇİN, 2012).

Já os ácidos fenólicos constituem em torno de 30% dos fenólicos totais presentes em plantas nas formas livre e ligada (ROBBINS, 2003). A forma ligada é frequentemente encontrada como ésteres, glicosídeos e complexos insolúveis (ROSS et al., 2009). Estes compostos são derivados de ácidos carboxílicos aromáticos, podendo ser originados do grupo ácido benzóico ou do grupo ácido cinâmico, com os derivados deste possuindo maior eficiência no que diz respeito à atividade antioxidante (GÜLÇİN, 2012). As estruturas químicas de alguns dos principais ácidos fenólicos e flavonoides encontrados em frutas são mostradas na Figura 1.3.

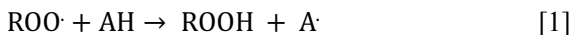
Figura 1.3 – Estrutura química de alguns ácidos fenólicos e flavonoides



Fonte: Autor

Os fenólicos são conhecidos por exibir atividade antioxidante, que será dependente de suas características estruturais e do meio onde são aplicados. No caso dos ácidos fenólicos, por exemplo, o número de hidroxilas presente na estrutura dos mesmos irá ditar o poder antioxidante da molécula. Além disso, a posição onde a hidroxila se encontra na estrutura também determinará o poder antioxidante do composto, sendo a localização na posição *para* superior em termos de ação em comparação com a localização nas posições *orto* e *beta*. (SHAHIDI, 2015).

O principal mecanismo pelo qual os fenólicos interrompem a oxidação lipídica é através da doação de átomos de hidrogênio a radicais livres, interrompendo a propagação de reações em cadeia (SHI et al., 2005). Este mecanismo é representado pela reação representada em [1], onde ROO· é o radical livre, enquanto AH é a molécula antioxidante.



Após a estabilização do radical livre por parte do fenólico, este transforma-se em um radical fenoxil, que por sua vez é estabilizado por meio do deslocamento de elétrons não-pareados ao redor do anel aromático (SHI et al., 2005).

Nunes et al. (2016) conduziram um experimento para verificar a composição de fenólicos da goiaba. Comparou-se o conteúdo fenólico de pó de goiaba desidratado através de secagem em estufa e pó de goiaba liofilizado. Neste estudo, 16 fenólicos foram identificados, com a quercetina-3-o-rutinosídeo e a naringenina representando 56% de todos os fenólicos identificados.

Ademiluyi et al. (2016) investigaram os fenólicos de quatro variedades de goiaba (branca gigante, branca pequena, sem casca e rosa). O teor de fenólicos total encontrado variou de 44,8 (goiaba branca pequena) a 66,1 mg AGE 100 g⁻¹ (goiaba rosa). Além disso, foram identificados 14 compostos fenólicos, sendo o ácido rosmarínico, eugenol, carvacrol, catequina e ácido caféico os dominantes.

1.5 MÉTODOS CONVENCIONAIS PARA A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos são substâncias que, apesar de não serem essenciais ao funcionamento normal dos organismos vivos, podem promover benefícios à saúde caso sejam consumidos. Um dos mais conhecidos benefícios relacionados aos bioativos é a ação antioxidante de alguns de algumas classes de compostos, como os compostos fenólicos e os carotenoides. O isolamento destas substâncias de suas fontes naturais permite a aplicação dos mesmos para o desenvolvimento de formulações com propriedades funcionais (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Os métodos convencionais de extração de carotenoides e fenólicos baseiam-se na interação entre o solvente escolhido e o material de onde o composto será extraído. Alguns fatores-chave devem ser observados quando se planeja um procedimento de extração, como a polaridade do solvente, a difusão do mesmo através da matriz, a interação entre o composto alvo e o solvente e a estrutura da matriz. Além disso, a nível laboratorial, algumas técnicas de extração convencional, com a maceração, são geralmente usadas em pequena escala, quando se objetiva uma quantificação de compostos, uma vez que demandam muito tempo e há um alto consumo de energia, como no caso da extração por Soxhlet (PRADO et al., 2014).

A utilização de solventes acoplada à maceração é um dos métodos mais clássicos de extração de compostos bioativos. Esta técnica é simples, econômica, pois não requer equipamentos sofisticados, e é relativamente fácil de ser conduzida. Outra vantagem da maceração, principalmente se comparada ao método de Soxhlet, é a possibilidade de conduzir a mesma à temperatura ambiente, evitando-se um dos fatores que leva a degradação de muitos compostos, em especial os carotenoides (RODRÍGUEZ-AMAYA, 1999).

Em geral, esta extração consiste em várias etapas. Primeiramente, o material que é fonte do composto passa por um processo de moagem, reduzindo o tamanho de suas partículas para aumentar a área superficial,

objetivando-se facilitar a penetração do solvente na matriz. Em seguida, o solvente selecionado é adicionado ao material moído e esta mistura é macerada até que todo o composto alvo seja extraído. Para que isto ocorra, deve-se repetir este procedimento 2 ou 3 vezes para que a extração seja eficiente. Para facilitar o processo de maceração, uma agitação ocasional pode ser realizada, uma vez que se aumenta a difusão e remove-se a solução concentrada da superfície da amostra (RODRÍGUEZ-AMAYA, 1999).

Porém, a maceração é uma técnica quantitativa de extração de carotenoides. Portanto, apesar de importante para o estudo do teor de carotenoides em uma matriz, esta metodologia não é aplicável em escala industrial. Para se produzir extratos ricos em carotenoides e fenólicos para aplicações comerciais, métodos mais rápidos e eficientes necessitam ser empregados, tornando viável o isolamento destes compostos de suas fontes naturais.

1.6 MÉTODOS NÃO-CONVENCIONAIS PARA A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Para a substituição das extrações convencionais, diversas tecnologias emergentes têm surgido nas últimas décadas, dentre elas podemos citar a extração por líquido pressurizado, extração assistida por campo elétrico pulsado, extração por fluido supercrítico, extração assistida por ultrassom e extração enzimática (SAINI; KEUM, 2018). Como fizeram parte do presente trabalho, as extrações assistidas por ultrassom, ultra-turrax e por líquido pressurizado serão detalhadas a seguir.

1.6.1 Extração assistida por ultrassom (EAU)

Ultrassom são ondas sonoras que possuem altas frequências, variando de 20 kHz a 100 kHz (CHEMAT et al., 2017). No momento em que um composto alvo está sendo extraído de uma matéria-prima com o uso de ultrassom, um fenômeno chamado cavitação acústica acontece. Este fenômeno consiste na formação de bolhas que aumentam gradativamente de tamanho até sofrerem colapso (SUSLICK; PRICE, 1999). A formação e implosão destas bolhas causam ondas com alta energia de cisalhamento, além de turbulência na área de cavitação (FLINT; SUSLICK, 1991).

Devido à cavitação, as células do material sofrem ruptura, facilitando a penetração do solvente. Portanto, a função da cavitação acústica é acelerar a transferência de massa durante o processo de extração (SUSLICK; PRICE, 1999).

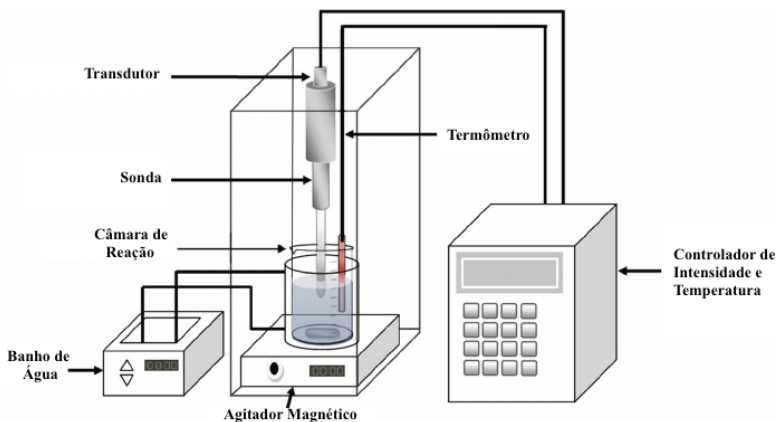
Dois fatores principais são responsáveis pelo aumento da eficiência geralmente alcançado com o uso de ultrassom: a liberação do composto alvo de sua matriz, devido à ruptura das células e maior difusão do solvente através das paredes celulares (MASON et al., 1996). Devido a este mecanismo, a extração assistida por ultrassom apresenta diversas vantagens, como uma redução da temperatura e do tempo total de extração, uma vez que a transferência de energia ocorre de forma mais rápida. Além disso, uma menor quantidade de solvente pode ser utilizada, devido à otimização da transferência de massa (CHEMAT et al., 2012).

O ultrassom também pode ser usado como um tratamento preliminar para outros processos de extração, como a extração por fluido supercrítico. Outra vantagem apresentada é a possibilidade de escalonamento do processo, uma vez que há redução de custos devido a um menor gasto energético proveniente de tempos mais curtos de extração e maior eficiência (CHEMAT et al., 2012).

Para técnicas convencionais de ultrassom, existem dois tipos de sistemas que podem ser utilizados, o banho ultrassônico e o ultrassom de sonda. O banho ultrassônico consiste em um tanque de aço inoxidável com um ou mais transdutores, sua fonte de potência. Geralmente, o equipamento também possui controle de temperatura e opera em frequência de 40 kHz. Este sistema possui como vantagens o custo relativamente econômico em relação ao ultrassom de sonda e a possibilidade de se trabalhar com várias amostras ao mesmo tempo. Por outro lado, o banho ultrassônico pode apresentar uma menor eficiência quando comparado ao ultrassom de sonda devido a uma maior dissipação de energia e baixa reprodutibilidade em alguns casos (CHEMAT et al., 2017).

Em contrapartida, no ultrassom de sonda, a potência é aplicada diretamente na amostra, tornando, dessa forma, o processo mais eficiente. Este equipamento é geralmente operado a uma frequência de 20 kHz. O transdutor é conectado à sonda, que por sua vez é imersa no reator, consistindo em um mínimo de perda de energia (CHEMAT et al., 2017). Este aparo é mostrado na Figura 1.4.

Figura 1.4 – Modelo de ultrassom de sonda



Fonte: Adaptado de Gasmalla et al. (2015)

Alguns autores conseguiram bons resultados com o uso da EAU. Li et al. (2015) comparou três métodos (maceração, soxhlet, EAU) para extração de licopeno de mamão papaya. A melhor condição experimental para a EAU foi alcançada à temperatura de 50° C, durante 25 minutos, com uma razão amostra:solvente de 1:5. Nesta condição, foi possível se obter um extrato contendo 189.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ de licopeno, em contraste com a maceração, onde foi obtida uma quantidade de 153.9 $\mu\text{g g}^{-1}$, e a extração por soxhlet, o menor rendimento dentre todos métodos, obtendo-se 68.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ de licopeno.

A EAU também demonstrou potencial para ser utilizada na extração de fenólicos. Liu et al. (2014) conduziram um estudo para otimizar as condições experimentais para a extração de compostos fenólicos de folhas de goiaba. A potência ultrassônica foi fixada em 1100 W, enquanto a temperatura e a taxa de sólido para solvente eram variadas. A condição ótima encontrada (26,12% de fenólicos totais) foi à temperatura de 59,8° C, por 5,1 min e com uma relação de sólidos para solvente de 12,1.

A extração assistida por ultrassom demonstra possuir grande potencial para ser usada em substituição aos métodos convencionais. Esta técnica, até o presente momento, foi pouco explorada para a obtenção de extratos ricos em carotenoides e compostos fenólicos a partir da polpa e

do resíduo de goiaba. Por conta de sua composição rica em compostos bioativos, a goiaba se mantém como uma interessante matriz alimentar a ser avaliada no que diz respeito à extração de tais compostos por meio de técnicas mais amigáveis ao meio ambiente, como a EAU.

1.6.2 Extração por ultra-turrax (UTE)

O ultra-turrax é um equipamento de homogeneização que trabalha com rotações em alta velocidade. Versátil, este dispositivo encontra inúmeras aplicações laboratoriais, como a homogeneização de sistemas imiscíveis líquido/líquido, formação de emulsões, dispersão de cristais em fase aquosa, dentre outras (SCHOLZ; KECK, 2015). A Figura 1.5 mostra um modelo de homogeneizador ultra-turrax comum.

Figura 1.5 – Modelo de equipamento ultra-turrax



Fonte: IKA, 2018

O mecanismo de funcionamento do ultra-turrax o torna adequado para a liberação de compostos-alvo de uma gama de materiais. O ultra-turrax fornece alta força de cisalhamento devido à rotação em alta velocidade, o que leva ao rompimento das paredes celulares do material, liberando os compostos-alvo e permitindo sua transferência para o solvente de extração. Portanto, a extração por ultra-turrax (UTE) é uma técnica que pode ser aplicada em matrizes alimentícias com o objetivo de se recuperar compostos bioativos de interesse (XU et al., 2016).

As vantagens da UTE incluem a simplicidade de condução dos experimentos, o custo relativamente econômico do aparato e a possibilidade de escalonamento. Como desvantagem, apenas um ensaio pode ser conduzido por vez, assim como a extração assistida por ultrassom de sonda (XU et al., 2016).

Poucos estudos já abordaram a extração de compostos bioativos a partir da goiaba por meio da UTE. Thaipong et al. (2006) extraiu os fenólicos de amostras de polpa e casca de goiaba por UTE utilizando metanol como solvente. O tempo de extração e a rotação do equipamento não foram reportados. Com este método, foi possível obter-se um teor de fenólicos totais de até 344,9 mg AGE 100 g⁻¹ no extrato, uma alta recuperação de fenólicos levando-se em consideração que a fruta não passou por um processo prévio de desidratação.

Na literatura, ainda não existem estudos sobre a extração de fenólicos a partir da fração residual do processamento da goiaba usando-se UTE.

1.6.3 Extração por líquido pressurizado (PLE)

A extração por líquido pressurizado (PLE) consiste na combinação entre pressão (35-200 bar) e temperatura elevadas (até 200 °C) para extrair os compostos de interesse em uma matriz (MUSTAFA; TURNER, 2011).

As altas temperaturas promoverão um decaimento da viscosidade do solvente de escolha, aumentando, portanto, sua habilidade em penetrar o material e solubilizar o analito alvo. Além disso, a temperatura também ajuda na quebra das ligações entre a matriz e o composto-alvo por meio do decaimento da energia de ativação exigida para o rompimento de interações de van der Waals, pontes de hidrogênio e atração dipolo-dipolo (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005).

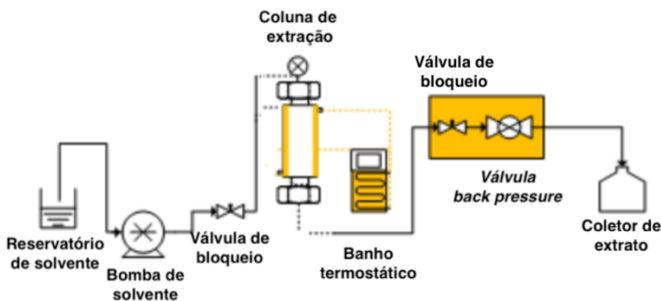
Já a aplicação de altas pressões durante o processo permite que o solvente seja utilizado a temperaturas acima do ponto de ebulição, porém, mantendo-se no estado líquido. Além disso, a pressão também ajuda na quebra das interações que mantêm os compostos-alvo ligados aos componentes da matriz, o que aumenta a transferência de massa do analito da amostra para o solvente (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005).

O solvente escolhido para este processo dependerá da natureza da matriz e do composto-alvo, ou seja, solventes polares devem ser usados para analitos polares, enquanto solventes apolares devem ser usados para analitos apolares. Estes são utilizados abaixo de seu ponto crítico. No caso de fenólicos, etanol, metanol e água são comumente utilizados, tanto em separado quanto misturados em diferentes proporções. Misturas de metanol e etanol com água, inclusive, são menos agressivas ao meio ambiente do que quando se utiliza álcoois puros ou misturas de propanol com água. Também é importante ressaltar que a água pode ser utilizada como solvente único. Neste caso, o processo é chamado de extração por água subcrítica e tem como uma de suas principais vantagens a

eliminação completa de solventes orgânicos do processo (MUSTAFA; TURNER, 2011).

Em relação ao equipamento usado para a condução da extração por líquido pressurizado, o mesmo pode operar em modo estático ou dinâmico. Em modo estático, um volume fixo de solvente é adicionado junto à matriz na câmara de extração. Neste modo, os fatores críticos são a temperatura e o tempo de extração. Como desvantagem, devido à saturação do solvente durante o procedimento por conta da não renovação do mesmo, a extração do composto pode não ser completa. Em contrapartida, no modo de operação dinâmico, o solvente é constantemente bombeado na câmara de extração até que todo o composto-alvo seja extraído da matriz (ONG et al., 2006). Um esquema de um equipamento de PLE é apresentado na Figura 1.6.

Figura 1.6 – Modelo de equipamento PLE



Fonte: adaptado de Mazzutti et al. (2018)

Santos et al. (2012) extraíram compostos fenólicos da casca de jabuticaba por meio de PLE. No experimento, etanol foi utilizado como solvente, testando-se diferentes pressões, temperaturas e tempo de extração. Em comparação com a extração convencional (percolação), a PLE obteve um rendimento 1,66 vezes maior. As condições ótimas para a extração de fenólicos por PLE obtidas no estudo foram pressão entre 48 e 50 bar, temperatura entre 118 e 120 °C, vazão de 1,67 cm³/min e tempo de extração em modo estático de 14 a 15 minutos.

Espada-Bellido et al. (2018) utilizaram a PLE para extrair os compostos fenólicos de polpa de amora. Sob temperatura de 99,4 °C, pressão de 100 bar, tempo de 10 min e utilizando-se uma mistura de metanol e água (74,6% de metanol) como solvente, obteve-se um teor de

fenólicos totais entre 1980,0 e 2100,0 $\mu\text{g g}^{-1}$. Com o PLE foi possível se obter um maior teor de fenólicos comparado ao uso de extração assistida por ultrassom.

Pereira et al. (2019) obtiveram extratos ricos em fenólicos a partir de bagaço de uva usando-se PLE. A condição ótima de extração foi conduzida à temperatura de 100 °C, pressão de 100 bar e solvente composto por etanol e água (50:50, v/v), obtendo-se um teor de fenólicos totais de 65,68 mg AGE g^{-1} .

1.7 MÉTODOS *IN VITRO* PARA A DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os métodos para determinação da atividade antioxidante são utilizados para simular o efeito que um antioxidante, seja ele natural ou sintético, exerce em condições de estresse oxidativo (MAGALHÃES et al., 2009). Para que se tenha uma avaliação confiável da atividade antioxidante de um sistema alimentício, é preciso que o método escolhido siga alguns princípios básicos (PRIOR et al. 2005). São eles:

- Apresentar uma forma de medição das reações químicas que estão acontecendo na aplicação em potencial;
- Utilizar uma fonte de radicais livres que seja biologicamente relevante para o sistema estudado;
- De simples condução;
- Utilizar um método com mecanismos químicos já conhecidos;
- Usar um método adaptável tanto para antioxidantes hidrofílicos quanto para lipofílicos;
- Adaptável para análises rotineiras de qualidade.

Basicamente, os métodos de análise de atividade antioxidante podem ser divididos em dois grupos de acordo com o mecanismo de reação: aqueles que avaliam antioxidantes que atuam transferindo um átomo de hidrogênio para a espécie reativa (HAT, do inglês *hydrogen atom transfer*) e aqueles que atuam transferindo um elétron para a mesma (SET, do inglês *single electron transfer*) (GÜLÇİN, 2012).

Os ensaios que medem o mecanismo HAT incluem a capacidade de absorção de radical oxigênio (ORAC), parâmetro antioxidante de captura de radical (TRAP), inibição da oxidação induzida de LDL, ensaio da capacidade de eliminação de oxiradical (TOSCA) e ensaio de quimioluminescência (GÜLÇİN, 2012).

O mecanismo SET é dependente do pH, uma vez que a reatividade relativa nestes métodos é baseada no potencial de desprotonação e ionização dos grupos funcionais reativos (LEMANSKA et al., 2001; WRIGHT et al., 2001).

Os ensaios que medem o mecanismo SET incluem poder antioxidante representado pela redução de íons de ferro (FRAP); eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); eliminação do radical ácido 2,2-azinobis 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS). Dentre estes, o método ABTS pode ser usado tanto para o mecanismo HAT quanto para o SET (GÜLÇİN, 2012).

1.7.1 DPPH

O DPPH é um dos métodos mais utilizados para a determinação da atividade antioxidante em sistemas alimentícios, sendo uma metodologia baseada no mecanismo SET (PRIOR et al., 2005), porém, também há a ocorrência do mecanismo HAT de forma lenta quando utilizados solventes que proporcionam fortes ligações de hidrogênio, como etanol e metanol (FOTI et al., 2004a,b). O radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) possui forte coloração roxa. Quando uma molécula antioxidante reage com o mesmo, transferindo elétrons e neutralizando-o, há uma mudança de coloração, medida em um comprimento de onda de 517 nm. A intensidade na mudança da cor é um indicativo do poder antioxidante da molécula estudada (ZHONG; SHAHIDI, 2015).

Alguns pontos críticos para a realização deste ensaio incluem o tipo e a quantidade de solvente usado, a presença e a concentração de hidrogênio e íons metálicos no meio reacional e a data em que o reagente DPPH foi preparado (deve ser preparado no dia da utilização) (BENZIE e STRAIN, 1999). Musa et al. (2013) modificou o método clássico de condução deste ensaio para utilização em microplacas, simplificando a forma de operação e diminuindo a quantidade de reagente necessária.

Outro problema que pode acontecer durante a condução do ensaio é a superestimação dos resultados devido a um efeito de desprotonação do DPPH, a forma reduzida pelo DPPH* após a reação com o antioxidante. Para contornar este efeito, Staško et al. (2007) modificaram a técnica, através da condução do experimento em uma solução de etanol:água (1:1, v/v), promovendo uma maior solubilidade dos antioxidantes presentes na amostra e atenuando o efeito da desprotonação.

1.7.2 ABTS

Este ensaio é baseado na capacidade de moléculas antioxidantes em eliminar radicais catiônicos ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS⁺). Este radical apresenta coloração verde com absorção máxima no comprimento de onda de 734 nm. Esta absorção decai à medida que compostos antioxidantes reagem com o radical, podendo esta neutralização ocorrer através da doação de um átomo de hidrogênio (HAT) ou por meio da doação de um elétron (SET), sendo o balanço entre estes dois mecanismos determinado pela estrutura do antioxidante presente e o pH do meio (PRIOR et al., 2005).

Originalmente neste ensaio, metamioglobina e peróxido de hidrogênio eram usados como forma de geração do radical ferrilmioglobina, que por sua vez reagia com o ABTS, produzindo ABTS⁺. Atualmente, o persulfato de potássio é utilizado para este propósito (ZHONG; SHAHIDI, 2015).

Além disso, assim como o método do DPPH, o ABTS também pode ser adaptado para a metodologia de microplacas, reduzindo a utilização de reagente e permitindo a análise de diversas amostras ao mesmo tempo (MILARDOVIC et al., 2007).

O radical ABTS é solúvel tanto em ambientes hidrofílicos quanto hidrofóbicos, sendo possível, dessa forma, a avaliação em uma variada gama de sistemas (MAGALHÃES et al., 2008).

1.7.3 FRAP

Este ensaio tem como princípio a medida da redução de complexos contendo íons férricos (Fe³⁺) pela ação de antioxidantes, resultando em complexos de Fe²⁺, que apresentam intensa coloração azulada (ANTOLOVICH et al., 2002). A reação é conduzida em meio ácido (pH = 3,6) para manter a solubilidade do ferro e permitir a transferência de elétrons (HEGERMAN et al., 1998), sendo a atividade antioxidante determinada como o aumento da absorbância em comprimento de onda de 593 nm. Os resultados podem ser expressos como equivalente de Fe²⁺ micromolar ou como equivalente de um antioxidante padrão (ANTOLOVICH et al., 2002).

O ferricianeto de potássio é muito utilizado como reagente férrico no ensaio FRAP. Neste caso, azul da prússia é o produto final, sendo quantificado espectrofotometricamente para indicar o poder redutor do antioxidante testado. O azul da prússia pode ser produzido tanto por redução do Fe³⁺ em Fe²⁺, que por sua vez se liga ao ferricianeto formando

o composto, ou então pela redução do ferricianeto a ferrocianeto, onde o Fe^{3+} que se encontra livre em solução se liga, também formando o azul da prússia (BERKER et al., 2010).

O FRAP é um método simples, rápido e econômico, pois não requer equipamentos sofisticados para sua execução. Em contrapartida, por ser um método que avalia o potencial redox, o mesmo possui pouca relação com o mecanismo de doação de hidrogênio para interromper reações em cadeia que ocorrem em sistema lipídicos, além de possuir baixa correlação com outros métodos de medição de atividade antioxidante. Devido a este fator, não é recomendável que o FRAP seja usado como único método de determinação de atividade antioxidante, devendo o mesmo ser usado em combinação com outros métodos que representam de forma mais fidedigna o sistema avaliado (PRIOR et al., 2005).

Referências bibliográficas

ADEMILUYI, A. O., OBOH, G., OGUNSUYI, O. B., OLORUNTOBA, F. M. A comparative study on antihypertensive and antioxidant properties of phenolic extracts from fruits and leaf of some guava (*Psidium guajava* L.) varieties. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, p. 363-374, 2016.

ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P. D., PATSALIDES, E., MCDONALD, S., ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183–198, 2002.

AMBATI, R. R., PHANG, S. M., RAVI, S., ASWATHANARAYANA, R. G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - a review. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, p. 128-152, 2014.

AMORIM-CARRILHO, K. T., CEPEDA, A., FENTE, C., REGAL, P. Review of methods for analysis of carotenoids. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49-73, 2014.

BENZIE, I. F. F., STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Method in Enzymology**, v. 299, p. 15–27, 1999.

BERKER, K. I., GUECLUE, K., TOR, I., DEMIRATA, B., APAK, R. Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/Prussian blue method. **Food Analytical Methods**, v. 3, p. 154–168, 2010.

BEYNON, R. A., RICHMOND, R. C., FERREIRA, D. L. S., NESS, A. R., MAY, M., SMITH, G. D., VICENT, E. E., ADAMS, C., ALAKORPELA, M., WÜRTZ, P., SOIDINSALO, S., METCALFE, C., DONOVAN, J. L., LANE, A. J., MARTIN, R. M. Investigating the effects of lycopene and green tea on the metabolome of men at risk of prostate cancer: The ProDiet randomised controlled trial. **International Journal of Cancer**, v. 0, n. 0, 2018.
DOI:10.1002/ijc.31929

CARABIAS-MARTÍNEZ, R., RODRÍGUEZ-GONZALO, E., REVILLA-RUIZ, P., HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, p. 1-17, 2005.

CASTRO-VARGAS, H. I., RODRIGUEZ-VARELA, L. I. FERREIRA, S. R. S., PARADA-ALFONSO, F. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 3, p. 319-324, 2010.

CHANG, S. K., ALASALVAR, C., SHAHIDI, F. (2018). Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects – A comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2018.
DOI: 10.1080/10408398.2017.1422111.

CHEMAT, F., ROMBAUT, N., SICAIRE, A-G., MEULLEMIESTRE, A., FABIANO-TIXIER, A-S., ALBERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540-560, 2017.

CHEMAT, F., VIAN, M. A., CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 8615-8627, 2012.

CHOE, E., MIN, D. B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 1, p. 1-22, 2006.

DAVIES, M. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochemical Society Symposia**, v. 61, n.1, p. 1-31, 1995.

DOLATABADI, Z., RAD, A. H. E., FARZANEH, V., FEIZABAD, S. H. A., ESTIRI, S. H., BAKHSHABADI, H. Modeling of the lycopene extraction from tomato pulps. **Food Chemistry**, v. 190, p. 968-973, 2016.

ESPADA-BELLIDO, E., FERREIRO-GONZÁLEZ, M., BARBERO, G. F., CARRERA, C., PALMA, M., BARROSO, C. G. Alternative extraction method of bioactive compounds from mulberry (*Morus nigra* L.) pulp using pressurized-liquid extraction. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 9, p. 2384-2395, 2018.

FLINT, E. B., SUSLICK, K. S. The temperature of cavitation. **Science**, v. 253, p. 1397-1399, 1991.

FOTI, M.C., DAQUINO, C., GERACI, C. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 69, p. 5888–5896, 2004a.

FOTI, M.C., DAQUINO, C., GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 69, p. 2309–2314, 2004b.

FU, L., XU, B-T., XU, X-R., GAN, R-Y., ZHANG, Y., XIA, E-Q., LI, H-B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 345-350, 2011.

GOUVEIA, L., REMA, P., PEREIRA, O., EMPIS, J. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. **Aquaculture Nutrition**, v. 9, n. 2, p. 123-129, 2003.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345-391, 2012.

HO, K. K. H. Y., FERRUZZI, M. G., LICEAGA, A. M., SAN MARTÍN-GONZÁLEZ, M. F. Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Effect of extraction conditions on all *trans* and *cis*-isomer yields. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 160-168, 2015.

IBGE. Produção agrícola municipal - lavoura permanente. 2015. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2015/default.sh> tm. Acesso em: 20/09/2017.

JIANG, L-N., LIU, Y-B., LI, B-H. Lycopene exerts anti-inflammatory effect to inhibit prostate cancer progression. **Asian Journal of Andrology**, v. 20, p. 1-6, 2018.

JOSEPH, B., PRIYA, M. R. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of guava (*Psidium guajava* LINN.). **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 1, p. 53-69, 2011.

KAMATH, J. V., RAHUL, N., KUMAR, A. C. K., LAKSHMI, M. S. *Psidium guajava* L.: A review. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 2, n. 1, p. 9-12, 2008.

KIST, B. B. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2018. 88 p.

KONG, K-W., RAJAB, N. F., PRASAD, K. N., ISAMIL, A., MARKOM, M., TAN, C-P. Lycopene-rich fractions derived from pink guava by-product and their potential activity towards hydrogen peroxide-induced cellular and DNA damage. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1142-1148, 2010.

KRINSKY, N. I., JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 6, p. 459-516, 2005.

KRIS-ETHERTON, P. M., HECKER, K. D., BONANOME, A., COVAL, S. M., BINKOSKI, A. E., HILPERT, K. F., GRIEL, A. E., ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 71-88, 2002.

LEMANSKA, K., SZYMUSIAK, H., TYRAKOWSKA, B., ZIELINSKI, R., SOFFER, A.E.M.F., RIETJENS, I.M.C.M. The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p.869–881, 2001.

LI, A-N., LI, S., XU, D-P., XU, X-R., CHEN, Y-M., LING, W-H., CHEN, F. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Lycopene from Papaya Processing Waste by Response Surface Methodology. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 5, p. 1207-1214, 2015.

LIMA, D. M., COLUGNATI, F. A. B., PADOVANI, R. M., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., GALEAZZI, M. A. M., PATENATE, A. J. **Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO**. Flamboyant: Campinas, 2004. 42 p.

LIU, C-W., WANG, Y-C., LU, H-C., CHIANG, W-D. Optmization of ultrasound-assisted extraction conditions for total phenols with anti-hyperglycemic activity from *Psidium guajava* leaves. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1601-1605, 2014.

MAGALHÃES, L.M., SANTOS, M., SEGUNDO, M.A., REIS, S., LIMA, J.L.F.C. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. **Talanta**, v. 77, p. 1559–1566, 2009.

MAGALHÃES, L. M., SEGUNDO, M. A., REIS, S., LIMA, J. L. F.C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1–19, 2008.

MASON, T. J., PANIWNZYK, L., LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, p. 253-26-, 1996.

MILARDOVIC, S., KEREKOVIC, I., RUMENJAK, V. (2007). A flow injection biamperometric method for determination of total antioxidant capacity of alcoholic beverages using bienzymatically produced ABTS+. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1688–1694, 2007.

MORENO, M. A., ZAMPINI, I. C., COSTAMAGNA, M. S., SAYAGO, J. M., ORDÓÑEZ, R. M., ISLA, M. I. Phytochemical composition and

antioxidant capacity of *Psidium guajava* fresh fruits and flour. **Food and Nutrition Science**, v. 5, p. 725-732, 2014.

MUSA, K. H., ABDULLAH, A., JUSOH, K., SUBRAMANIAM, V. Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): Effect of extraction techniques and solvents. **Food Analytical Methods**, v. 4, p. 100–107, 2011.

MUSA, K. H., ABDULLAH, A., KUSWANDI, B., HIDAYAT, M. A. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 141, p. 4102–4106, 2013.

MUSA, K. H., ABDULLAH, A., SUBRAMANIAM, V. Flavonoid profile and antioxidant activity of pink guava. **ScienceAsia**, v. 41, p. 149-154, 2015.

MUSTAFA, A., TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, p. 8-18, 2011.

NUNES, J. C., LAGO, M. G., CASTELO-BRANCO, V. N., OLIVEIRA, F. R., TORRES, A. G., PERRONE, D., MONTEIRO, M. Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders. **Food Chemistry**, v. 197, Parte A, p. 881-890, 2016.

ONG, E. S., CHEONG, J. S. H., GOH, D. Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1-2, p. 92-102, 2006.

PEREIRA, D. T. V., TARONE, A. G., CAZARIN, C. B. B., BARBERO, G. F., MARTÍNEZ, J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. **Journal of Food Engineering**, v. 340, p. 105-113, 2019.

PERVEEN, R., SULERIA, H. A., ANJUM, F. M., BUTT, M. S., PASHA, I., AHMAD, S. Tomato (*Solanum lycopersicum*) carotenoids and lycopene's chemistry: Metabolism, absorption, nutrition, and allied health claims - A comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 7, p. 919-929, 2015.

PHAN-THI, H., WACHE, Y. Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from *Momordica cochinchinensis* (jac) by moderate heat treatment with UV-Vis spectra as a marker. **Food Chemistry**, v. 156, p. 58-63, 2014.

PHINNEY, D. M., FRELKA, J. C., COOPERSTONE, J. L., SCHWARTZ, S. J., HELDMAN, D. R. Effect of solvent addition sequence on lycopene extraction efficiency from membrane neutralized caustic peeled tomato waste. **Food Chemistry**, v. 215, p. 354-361, 2017.

POMMER, C. V., MURAKAMI, K. R. N. Breeding guava (*Psidium guajava* L.). IN: JAIN, S. M., PRIYADARSHAN, P. M. (eds) Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species. Springer: New York, p. 83-120, 2009.

PRADO, J. M., VEGGI, P. C., MEIRELES, M. A. A. Extraction Methods for Obtaining Carotenoids from Vegetables - Review. **Current Analytical Chemistry**, v. 10, p. 29-66, 2014.

PRIOR, R.L., WU, X.L., SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 2866-2887, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington: International Life Sciences Institute, 1999. 64p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., KIMURA, M., GODOY, H.T., AMAYA-FARFAN, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 6, 445-463, 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Status of carotenoid analytical methods and in vitro assays for the assessment of food quality and health effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 56-63, 2015.

ROJAS-GARBANZO, C., ZIMMERMANN, B. F., SCHULZE-KAYERS, N., SCHIEBER, A. Characterization of phenolic and other polar compounds in peel and flesh of pink guava (*Psidium guajava* L. cv. 'Criolla') by ultra-high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. **Food Research International**, v. 100, p. 445–453, 2017.

ROSS, K. A., BETA, T. S., ARNTFIELD, D. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. **Food Chemistry**, v. 113, p. 336-344, 2009.

SAINI, R. K., NILE, S. H., PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, n. 3, p. 735-750, 2015.

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

SANTOS, D. T., VEGGI, P. C., MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jaboticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p. 444-452, 2012.

SELVAMUTHUKUMARAN, M., SHI, J. Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. **Food Quality and Safety**, v. 1, n. 1, p. 61-81, 2017.

SCHOLZ, P., KECK, C. M. Nanoemulsions produced by rotor-stator high speed stirring. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 482, n. 1-2, p. 110-117, 2015.

SHAHIDI, F. Antioxidants: Principles and Applications. *In*: SHAHIDI, F. **Handbook of Antioxidants for Food Preservation**. Elsevier: Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition, 276 ed., p. 1-12, 2015.

SHI, J., NAWAZ, H., POHORLY, J., MITTAL, G., KAKUDA, Y., JIANG, Y. Extraction of Polyphenolics from Plant Material for Functional Foods - Engineering and Technology. **Food Reviews International**, v. 21, n. 1, p. 139-166, 2005.

SOARES, N. C. P., MACHADO, C. L., TRINDADE, B. B., LIMA, I. C. C., GIMBA, E. R. P., TEODORO, A. J., TAKIYA, C., BOROJEVIC, R. Lycopene Extracts from Different Tomato-Based Food Products Induce Apoptosis in Cultured Human Primary Prostate Cancer Cells and Regulate TP53, Bax and Bcl-2 Transcript Expression. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 2, p. 339-345, 2017.

SOUZA, M. S. B, VIEIRA, L. M., SILVA, M. J., LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.3, p. 554-559, 2011.

STRATI, I. F., OREOPOULOU, V. Recovery and isomerization of carotenoids from tomato processing by-products. **Waste and Biomass Valorization**, v. 7, n. 4, p. 843-850, 2016.

SUSLICK, K. S., PRICE, G. J. Applications of ultrasound to materials chemistry. **Annual Review of Materials Science**, v. 29, p. 295-326, 1999.

TAPIERO, H., TOWNSEND, D. M., TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 2, p. 100-110, 2004.

THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L., BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, 2006.

TRIECHEL, M. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 88p.

XU, W-J., ZHAI, J-W., CUI, Q., LIU, J-Z., LUO, M., FU, Y-J., ZU, Y-G. Ultra-turrax based ultrasound-assisted extraction of five organic acids from honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) and optimization of extraction process. **Separation and Purification Technology**, v. 116, p. 73-82, 2016.

WRIGHT, J.S., JOHNSON, E.R., DILABIO, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical methods, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 1173–1183, 2001.

YARA-VARÓN, E., FABIANO-TIXIERA, A. S., BALCELLS, M., CANELA-GARAYOA, R., BILY, A., CHEMAT, F. Is it possible to substitute hexane with green solvents for extraction of carotenoids? A theoretical *versus* experimental solubility study. **RSC Advances**, v. 6, p. 27750-27759, 2016.

ZHONG, Y., SHAHIDI, F. Methods for assessment of antioxidant activity in foods. In: **Handbook of Antioxidants for Food Preservation**. Elsevier: Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition, v. 276, p. 287-322, 2015.

CAPÍTULO 2: A SUPERFRUTA GOIABA VERMELHA E SEU RESÍDUO DE PROCESSAMENTO PODEM SER UM POTENCIAL INGREDIENTE PARA O DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS FUNCIONAIS?

O conteúdo deste capítulo foi publicado quase na íntegra no periódico *Food Research International*:

LIMA, R. S., FERREIRA, S. R. S., VITALI, L., BLOCK, J. M. May the superfruit red guava and its processing waste be a potential ingredient in functional foods?. **Food Research International**, v. 115, p. 451-459, 2019. (Anexo C)

RESUMO

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma fruta popular em países tropicais, podendo ser consumida *in natura* ou transformada em diversos produtos. O resíduo de processamento da goiaba (sementes, casca e polpa residual) podem representar até 30% do volume da fruta. Evidências indicam que esta fração ainda possui um teor significativo de substâncias antioxidantes, como compostos fenólicos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a composição fitoquímica (fenólicos totais, flavonoides, flavonóis e taninos condensados), o perfil fenólico e a atividade antioxidante (DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP) de extratos da polpa (EPG) e do resíduo (ERG) de goiaba obtidos a partir da polpa (PGP) e do resíduo de goiaba (RGP) em pó. A extração foi conduzida em um ultrassom de sonda por 2 min a 25 °C, utilizando-se etanol:água (30:70, v/v) como solvente (15 mL para 1 g de amostra). O perfil fenólico dos pós e dos extratos de goiaba foram analisados por LC-ESI-MS/MS. O EPG apresentou a concentração mais alta de fenólicos totais (2348,3 mg EAG 100 g⁻¹ pelo método Folin-Ciocalteu e 518 mg EAG 100 g⁻¹ pelo método Prussian Blue) e a maior atividade antioxidante *in vitro* dentre todos os testes usados. Por outro lado, o ERG apresentou um maior teor de flavonoides (1006,8 mg QE 100 g⁻¹), flavonóis (352,59 mg CE 100 g⁻¹) e taninos condensados (1466,9 mg CE 100 g⁻¹). Ao todo, 37 compostos fenólicos foram identificados dentre todas as amostras, com 14 compostos sendo reportados pela primeira vez em goiaba vermelha. O ácido elágico foi o fenólico majoritário em todas as amostras. Os resultados mostraram que a polpa e o resíduo de goiaba são uma fonte

rica de compostos fenólicos e podem ser utilizados como um ingrediente para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

Palavras-chave: resíduo de goiaba; extração assistida por ultrassom; ácido elágico; antioxidantes; polifenóis; flavonoides.

2.1 INTRODUÇÃO

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma das frutas exóticas mais populares em países tropicais, devido a seu sabor levemente adocicado e aroma característico. A mesma tem chamado a atenção de pesquisadores devido a seu alto teor de fenólicos e outras substâncias antioxidantes, o que poderia potencialmente classifica-la como uma superfruta. A coloração da polpa da goiaba varia de acordo com o seu tipo, sendo a vermelha superior à branca em termos de sabor, aroma e compostos antioxidantes, como carotenoides, por exemplo (YADAVA, 1996). A goiaba é uma fruta versátil, podendo ser consumida *in natura* ou transformada em sucos, geleias, doces, dentre outros produtos. Esta fruta e seus resíduos apresentam potencial para serem incorporados em alimentos com propriedades funcionais, devido a suas características sensoriais e à presença de compostos bioativos.

O Brasil, com uma produção de goiaba de 414.960 ton, é o terceiro maior produtor de goiaba do mundo (KIST, 2018). As variedades ‘Pedro Sato’ e ‘Paluma’ são as mais utilizadas tanto para o consumo *in natura* quanto para o processamento industrial (SOUZA, 2014). Além disso, estima-se que 55% do volume total de goiaba produzida no Brasil é destinado ao processamento, o que corresponde a 228.228 ton. Segundo Triechel (2016), 30% deste volume total de goiaba processada é perdido na forma de resíduos (casca, sementes e resíduos de polpa). Dessa forma, um total de 68.468 ton de resíduo é produzido e, em muitos casos, descartado, apesar de seu alto teor de compostos bioativos.

A composição fitoquímica da goiaba vermelha já foi anteriormente analisada por alguns autores, apresentando alta concentração de fenólicos totais (VASCO et al., 2008) e flavonoides (KONG et al., 2010). Os compostos fenólicos são um grupo de metabólitos secundários encontrados em plantas, caracterizados pela presença de unidades fenólicas em sua estrutura. Os flavonoides compõem o maior subgrupo de fenólicos e consistem em um esqueleto de 15 carbonos, com dois anéis aromáticos ligados através de um anel pirano. Outras classes de compostos fenólicos incluem os ácidos fenólicos, os flavonóis (um

subgrupo dos flavonoides) e os taninos, que são oligômeros e polímeros de flavonóis que possuem três ou mais unidades de fenol, sendo classificados como taninos condensados e hidrolisados (ésteres de ácido gálico). Tais substâncias são responsáveis pela adstringência e o amargor das frutas. Além disso, os múltiplos grupos hidroxila presentes nas estruturas químicas dos fenólicos permitem que os mesmos exerçam ação antioxidante através da doação de átomos de hidrogênio a radicais livres, estabilizando-os e interrompendo as reações em cadeia dos processos de oxidação (SHI et al., 2005; GÜLÇIN, 2012).

As reações de oxidação representam um problema para a indústria de alimentos, especialmente em produtos ricos em ácidos graxos insaturados, promovendo perdas de qualidade e vida de prateleira reduzida (GÜLÇIN, 2012). Ademais, a produção excessiva de radicais livres em células humanas está relacionada ao desenvolvimento de doenças crônicas, como câncer e Alzheimer (POPRAC et al., 2017). Os antioxidantes podem ser usados para retardar reações de oxidação em alimentos, além de serem utilizados para o desenvolvimento de alimentos com propriedades funcionais. Estes antioxidantes podem ser quimicamente sintetizados ou extraídos de fontes naturais, como plantas, frutas e vegetais (GÜLÇIN, 2012).

Alguns estudos demonstraram que extratos ricos em fenólicos obtidos a partir de fontes naturais apresentam atividade farmacológica. *Terminalia Muellieri*, que contém em sua composição alta concentração de ácido gálico, ácido elágico, dentre outros fenólicos, exibe atividade anti-inflamatória e analgésica, assim como ação protetora contra danos ao fígado (FAHMY et al., 2017). Além disso, o extrato etanólico de *Euphorbia hirta linn.*, rico em flavonoides e taninos, demonstrou efeito sobre a cicatrização de feridas (TUHIN et al., 2017). Os polifenóis presentes em mel também já demonstraram efeitos benéficos à saúde. Hossen et al. (2017) revisou a literatura existente sobre os efeitos farmacológicos dos fenólicos encontrados em mel, como ácido gálico, ácido elágico, ácido vanílico, quercetina, miricetina, dentre outros. Alguns destes efeitos incluem a redução do estresse oxidativo, efeito hepatoprotetor, atividade anti-carcinogênica, indução da apoptose e atividade antimicrobiana. Este fato sugere que polifenóis extraídos de fontes de naturais podem ser uma fonte para a produção de suplementos e nutracêuticos.

As frutas também são extensivamente estudadas como uma fonte para a extração de fenólicos. Algumas destas têm sido consideradas “superfrutas”, uma nova terminologia criada recentemente para se referir a frutas exóticas que contêm alta concentração de compostos

antioxidantes, como fenólicos, carotenoides, ácido ascórbico, dentre outros (CHANG et al., 2018). Além disso, como já abordado por diversos autores, os subprodutos provenientes das superfrutas são uma fonte potencial para a produção de ingredientes em pó que podem ser usados na formulação de alimentos funcionais de alto valor agregado (CHANG et al., 2018; PEIXOTO et al., 2016; CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011; SCHRECKINGER et al., 2010).

Porém, a maioria dos estudos sobre a extração de compostos bioativos a partir de goiaba utilizam grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos, como metanol, ácido clorídrico (ADEMILUYI et al., 2016; CONTRERAS-CALDERÓN et al., 2011; ROJAS-GARBANZO et al., 2017), ácido fórmico (FLORES et al., 2015), dentre outros. Este tipo de solvente pode poluir o meio ambiente e provocar efeitos deletérios à saúde dos profissionais envolvidos no processo. Além disso, muitos destes estudos usam técnicas convencionais de extração, como a maceração (MUSA et al., 2011; EL ANANAY et al., 2013; ADEMILUYI et al., 2016) e a extração por Soxhlet (ONGPHIMAI et al., 2013). Estas técnicas são laboriosas e demandam longo tempo, o que as impede de serem utilizadas em escala comercial.

Contrariamente, técnicas verdes de extração como a extração assistida por ultrassom, extração por líquido pressurizado e extração por fluido supercrítico podem reduzir e/ou eliminar o uso de solventes orgânicos tóxicos, diminuir o tempo de extração, além de permitir o uso de condições operacionais mais brandas, a fim de prevenir a degradação de compostos de interesse. Estas tecnologias também permitem o escalonamento para implementação comercial (SELVAMUTHUKUMARAN; SHI, 2017).

A extração assistida por ultrassom (EAU) tem sido considerada uma alternativa aos métodos clássicos devido a seu potencial para uso em larga escala, uma vez que requer uma menor quantidade de solvente e tempos reduzidos de extração. O uso do ultrassom de sonda para EAU é um método promissor, uma vez que as ondas ultrassônicas são aplicadas diretamente na amostra, o que reduz o tempo de extração quando comparado ao ultrassom de banho (CHEMAT et al., 2017). A EAU tipo sonda de compostos bioativos da goiaba vermelha ainda não foi reportada na literatura até o presente momento.

Dependendo do tipo de técnica de extração empregada e dos métodos de preparação e análise das amostras, os resultados reportados na literatura para compostos bioativos em goiaba vermelha podem ser muito discrepantes. Neste estudo, extratos ricos em compostos fenólicos foram obtidos a partir da polpa e do resíduo de processamento de goiaba

em pó por meio da extração assistida por ultrassom de sonda. Além disso, o perfil fenólico, a composição fitoquímica e a atividade antioxidante dos extratos foram determinadas. Com a finalidade de se avaliar como o processo de extração interfere no teor dos compostos analisados, os perfis fenólicos da polpa e do resíduo de goiaba em pó foram analisados.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Amostras

Goiabas vermelhas frescas (*Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato) foram adquiridas em um mercado local em outubro de 2017. Ao atingirem o estágio III de maturação (teor de sólidos solúveis = 8,23%), de acordo com a classificação proposta por Azzolini et al. (2004), as goiabas foram sanitizadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 4% por 30 min. Em seguida, as mesmas foram processadas em uma despolpadeira (Brameitar, Campinas-SP, Brasil) e a polpa e o resíduo de processamento (sementes, casca e polpa residual) foram coletados separadamente. A polpa e o resíduo de goiaba foram desidratados, seguindo o protocolo sugerido por Nunes et al. (2016), com modificações, à temperatura de 55 °C por 10 h em uma estufa com circulação forçada de ar (TE – 394/2, Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil). A umidade final das amostras desidratadas foi de 17% para a polpa e de 10% para o resíduo. As amostras foram moídas em um moinho de martelos (TE – 090, Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil) e o tamanho médio de partícula da polpa (PGP) e do resíduo (RGP) de goiaba em pó foi ajustado para 0,500-0,550 mm. O PGP e o RGP foram mantidos em frascos âmbar, inertizados com nitrogênio e armazenados a -24 °C para análises futuras.

2.2.2 Materiais

Os reagentes Folin-Ciocalteu, ácido gálico, vanilina, (+)-catequina hidratada, ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), TPTZ (2,2'- 2,4,6-tripiridiltriazina), Trolox e os padrões fenólicos ultrapuros foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os padrões foram preparados como solução-estoque (100 mg L⁻¹ em 100% metanol grau cromatográfico), mantidos a -24 °C e usados na preparação das curvas de calibração por diluições apropriadas. Todos os outros reagentes químicos e solventes usados nos experimentos eram de grau analítico (P.A.), obtidos das empresas Neon e Sigma-Aldrich.

2.2.3 Extração assistida por ultrassom (EAU)

As amostras de PGP e RGP (1 g) foram misturadas a 15 mL do solvente de extração, composto por etanol:água (30:70, v/v). Em seguida, a mistura foi levada a um ultrassom de sonda (QR500, Eco-Sonics, Indaiatuba-SP, Brasil) a uma frequência de 20 kHz e potência de 500 W, onde a extração foi conduzida por 2 min a 25 °C. As condições experimentais para o procedimento de extração foram determinadas em testes preliminares (resultados não apresentados). Os extratos foram centrifugados por 10 min a 4000 rpm e filtrados a vácuo em funil de Büchner. Os extratos da polpa (EPG) e do resíduo (ERG) de goiaba foram concentrados em rotavapor (modelo 558, Fisatom, São Paulo-SP, Brasil) a 40 °C para a evaporação do solvente, inertizados com nitrogênio e armazenados a -24 °C para análises futuras.

2.2.4 Caracterização dos extratos

2.2.4.1 Determinação do teor de fenólicos totais (TFT) por Folin-Ciocalteu

O teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu foi determinado seguindo-se o protocolo de Singleton e Rossi (1965), com modificações. Brevemente, 25 µL das amostras de EPG e ERG diluídas com água ultrapura (1:50, v/v) foram misturadas a 25 µL de reagente fenólico Folin-Ciocalteu, anteriormente diluído com água ultrapura (1:3, v/v) e dispostas em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, 200 µL de água ultrapura foram adicionados e a mistura foi deixada em repouso por 5 min. Posteriormente, 25 µL de uma solução de carbonato de sódio a 10% foram adicionados e a microplaca foi mantida no escuro por 60 min a 25 °C. O branco foi composto por água ultrapura no lugar dos extratos. A absorbância das amostras foi medida em $\lambda = 725$ nm com o uso de um leitor de microplacas (Spectramax Paradigm, Molecular Devices, San Jose-CA, EUA). Para a construção de uma curva de calibração, ácido gálico (98% de pureza) foi diluído em etanol (concentração final de 0,2 mg mL⁻¹) e usado em concentrações variando de 0 a 136 mg L⁻¹. Os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalente por 100 g de amostra (mg AGE 100 g⁻¹ de EPG ou ERG).

2.2.4.2 Determinação do teor de fenólicos totais (TFT) por Prussian Blue

O teor de fenólicos totais por Prussian Blue foi determinado pelo método de Price e Butler (1977), modificado por Margraf et al. (2015). 100 µL de amostras de EPG e ERG diluídas (1:50, v/v), juntamente com 100 µL de uma solução de cloreto férrico hexahidratado a 0,5 mM, foi adicionada a uma microplaca, que foi deixada em repouso por 2 min. Em seguida, 100 µL de uma solução de ferricianeto de potássio a 0,5 mM foi adicionada à microplaca. O branco foi composto por água ultrapura no lugar dos extratos. A absorbância foi lida em $\lambda = 725$ nm. Uma curva de calibração foi construída com uma solução de ácido gálico a 100 mg L⁻¹, utilizando-se concentrações de 0 a 40 mg L⁻¹. Os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalente por 100 g de amostra (mg AGE 100 g⁻¹ de EPG ou ERG).

2.2.4.3 Determinação de flavonoides

Os flavonoides foram analisados de acordo com Lee e Francis (1972). As amostras foram diluídas com água ultrapura (1:20, v/v para EPG e 1:30, v/v para ERG) e a absorbância foi medida em $\lambda = 374$ nm em um espectrofotômetro (SP 2000, Belphtonics, Piracicaba-SP, Brasil). As Eq. 1 e 2 foram usadas para o cálculo da concentração de flavonoides totais das amostras.

$$\text{Fator de diluição} = \frac{\text{vol}_{\text{extrato não-diluído}} \times \text{vol}_{\text{extrato diluído}}}{\text{Aliquota usada para diluir a amostra}} \quad (1)$$

$$\text{Flavonoides totais} = \frac{\text{Absorbância a 374 nm} \times \text{fator de diluição}}{76.6} \quad (2)$$

Os resultados foram expressos como mg de quercetina equivalente por 100 g de amostra (mg QE 100 g⁻¹ de EPG ou ERG).

2.2.4.4 Determinação de flavonóis

Os flavonóis foram determinados pelo método descrito por Yermakov et al. (1987), com modificações. Uma alíquota de 80 µL de amostras diluídas de EPG e ERG (1:50, v/v) foi disposta em uma microplaca e misturada a 80 µL de uma solução etanólica de cloreto de alumínio (III) hexahidratado juntamente a 120 µL de uma solução de acetato de sódio a 50 g L⁻¹. A microplaca foi incubada no escuro por 2,5

h a 25 °C. O branco foi composto por água ultrapura ao invés dos extratos. A absorbância foi medida em $\lambda = 440$ nm. Uma curva de calibração foi preparada com uma solução estoque de quercetina, com concentrações variando entre 0 e 80 mg L⁻¹. Os resultados foram expressos como mg de quercetina equivalente por 100 g de amostra (mg QE 100 g⁻¹ de EPG ou ERG).

2.2.4.5 Determinação de taninos condensados

Os taninos condensados foram determinados de acordo com o protocolo descrito por Horszwald e Andlauer (2011). Primeiramente, amostras de EPG e ERG foram diluídas com metanol (1:50, v/v). Em seguida, uma alíquota de 25 µL das amostras diluídas foi colocada em uma microplaca juntamente a uma mistura de 150 µL de uma solução metanólica de vanilina a 4% e 25 µL de uma solução metanólica de ácido sulfúrico a 32%. A microplaca foi incubada no escuro por 15 min a temperatura ambiente. O branco foi composto por metanol ao invés dos extratos. A absorbância foi medida em $\lambda = 500$ nm. Uma solução metanólica de catequina (concentração final de 300 mg L⁻¹) foi usada em concentrações variando de 0 a 240 mg L⁻¹ para a curva de calibração. Os resultados foram expressos como mg de catequina equivalente por 100 g de amostra (mg CE 100 g⁻¹ de EPG ou ERG).

2.2.4.6 DPPH

O teste DPPH seguiu a metodologia desenvolvida por Brand-Williams et al. (1995), com modificações. Brevemente, 40 µL de amostras diluídas de EPG e ERG (1:50, v/v) foram adicionados em uma microplaca. Em seguida, 260 µL de uma solução metanólica de DPPH a 0,10 mM foi adicionada às amostras. A microplaca foi mantida no escuro por 30 min a 25 °C e o decaimento da absorbância foi medido em $\lambda = 517$ nm. O branco foi composto por água ultrapura ao invés dos extratos. O poder antioxidante foi calculado pela Eq. 3.

$$\% \text{ Inibição} = \left[1 - \left(\frac{A_{517 \text{ amostra}}}{A_{517 \text{ branco}}} \right) \right] \times 100 \quad (3)$$

2.2.4.7 DPPH modificado

A metodologia usada foi desenvolvida por Brand-Williams et al. (1995) e modificada por Staško et al. (2007). 40 µL de amostras diluídas

de EPG e ERG (1:50, v/v) foram transferidas para uma microplaca, onde 260 μL de uma solução etanólica de DPPH foi adicionada, juntamente a 260 μL de uma solução tampão de fosfato de sódio monobásico a 50 mM pH 6,0. A microplaca foi mantida no escuro por 30 min a 25 °C. O decaimento da absorbância foi medido em $\lambda = 525$ nm. O branco foi composto por água ultrapura no lugar dos extratos. A atividade antioxidante foi calculada usando-se a Eq. 4.

$$\% \text{ Inibição} = \left[1 - \left(\frac{A_{525 \text{ amostra}}}{A_{525 \text{ branco}}} \right) \right] \times 100 \quad (4)$$

2.2.4.8 ABTS

O protocolo usado para esta determinação foi reportado por Rufino et al. (2007). Primeiramente, amostras de EPG e ERG foram diluídas em etanol (1:20, v/v). Uma alíquota de 10 μL de amostra diluída foi adicionada a uma microplaca juntamente a 290 μL de uma solução do radical ABTS^+ . Em seguida, a microplaca foi mantida no escuro por 6 min. O branco foi composto por etanol ao invés dos extratos. O decaimento da absorbância foi medido em $\lambda = 734$ nm. Uma curva de calibração foi construída utilizando-se uma solução estoque de ácido ascórbico a 300 mg L^{-1} . As concentrações da curva variaram entre 30 e 300 mg L^{-1} . Os resultados foram expressos como mmol de equivalente de ácido ascórbico por 100 g de amostra (mmol EAA 100 g^{-1} de EPG ou ERG).

2.2.4.9 FRAP

O método para este ensaio foi descrito por Pulido et al. (2000). Primeiramente, o reagente FRAP foi preparado por meio da mistura de 2,5 mL de uma solução de TPTZ a 10 mmol/L (3,12 g de TPTZ diluído com 50 mL de uma solução de ácido clorídrico a 40 mmol/L) com 25 mL de uma solução tampão de acetato de sódio pH 3,6 e 2,5 mL de uma solução de cloreto férrico hexahidratado a 20 mmol/L. Em seguida, 20 μL de amostras de EPG e ERG diluídas (1:50, v/v) foram misturadas com 280 μL de reagente FRAP em uma microplaca. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min. O branco foi composto por água ultrapura ao invés dos extratos. O decaimento da absorbância foi medido em $\lambda = 593$ nm. Uma curva de calibração foi construída com uma solução estoque de ácido ascórbico a 150 mg L^{-1} , com concentrações variando entre 15 e

150 mg L⁻¹. Os resultados foram expressos como mmol de equivalente de ácido ascórbico por 100 g de amostra (mmol EAA 100 g⁻¹ de EPG ou ERG).

2.2.5 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS

2.2.5.1 Preparação das amostras

A preparação das amostras seguiu o protocolo sugerido por Schulz et al. (2015), com modificações. Brevemente, as amostras de pós e extratos de polpa e resíduo de goiaba (PGP, RGP, EPG, ERG, respectivamente) foram submetidas a uma hidrólise ácida adicionando-se 5,0 mL de metanol e 5,0 mL de uma solução de ácido clorídrico a 6,0 mol L⁻¹ a 1 g de amostra em pó ou extrato. A mistura foi encubada em uma estufa (400/D200 °C, New Ethics, São Paulo-SP, Brasil) a 85 °C por 30 min. Na sequência, o pH das amostras foi ajustado para 2,0 utilizando-se uma solução de hidróxido de sódio a 6 mol L⁻¹. As amostras acidificadas foram misturadas a 10 mL de éter dietílico em um tubo Falcon e levadas a uma centrífuga (Z 200 A, Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemanha) a 4000 rpm por 10 min. Este processo foi repetido duas vezes para cada amostra. Os sobrenadantes foram combinados em um balão de fundo redondo e o solvente foi removido em rotavapor a 40 °C até a secagem completa. Em seguida, as amostras secas foram ressuspensas em 1 mL de metanol grau cromatográfico e diluídas 10 vezes com metanol:água (70:30, v/v) para a injeção no sistema de LC-ESI-MS/MS.

2.2.5.2 Análise por LC-ESI-MS/MS

A identificação e a quantificação dos compostos fenólicos foram conduzidas em um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC, 1200 Series, Agilent Technologies, Waldbronn-BW, Alemanha), seguindo a metodologia descrita por Schulz et al. (2015). Uma coluna Synergi (4,0 µm, 2,0 x 150 mm d. i.; Phenomenex, Torrance-CA, EUA) foi usada para a separação cromatográfica, sob condição de gradiente de eluição. As fases móveis foram compostas por misturas de metanol 95 % e água 5% (v/v), canal A, e água e ácido fórmico 0,1% (v/v), canal B. A separação foi conduzida a 30 °C usando-se gradiente de eluição segmentado, do seguinte modo: 0-5 min, 10% A; 5-7 min, 90% A; 7-10 min, 90% A; 10-17 min, 10% A. Entre as análises, a coluna foi condicionada por 5 min com uma proporção da fase móvel inicial da separação. A taxa de fluxo foi de 150 µL.min⁻¹. Amostras de 10 µL foram injetadas ao equipamento.

O sistema de HPLC foi conectado a um sistema de espectrofotometria de massa composto por espectrofotômetro de massa quadrupole triplo híbrido/armadilha de íons linear (Q Trap 3200 Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord-ON, Canada). O espectrofotômetro de massa foi operado em modo de ionização eletrospray negativo (TurboIonSpray, Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord-ON, Canada). Os parâmetros MS/MS foram: agulha capilar mantida a -4500 V; cortina de gás a 10 psi; temperatura a 400 °C; gás 1 a 45 psi; gás 2 a 45 psi e CAD gás médio. O software Analyst versão 1.5.1 foi usado para o controle do sistema de HPLC-ESI-MS/MS e análise de resultados.

2.2.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi conduzida utilizando-se o software *R-project* 3.4.3 (2017). Os resultados foram submetidos à análise de variância one-way (ANOVA) e as médias foram comparadas através do teste de Tukey ($p < 0,05$). Todas as análises foram conduzidas em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização dos extratos

A Tabela 2.1 mostra os resultados de TFT, flavonoides, flavonóis, taninos condensados e atividade antioxidante (DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP) para os extratos da polpa e do resíduo de goiaba.

Tabela 2.1 – Teor de fenólicos totais, flavonoides, flavonóis, taninos condensados e atividade antioxidante (DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP) dos extratos de polpa e resíduo de goiaba (EPG e ERG, respectivamente)

Determinação	EPG	ERG
Teor de Fenólicos Totais – Folin-Ciocalteu (mg AGE 100 g ⁻¹)	2348.3 ± 0.0014	1578.9 ± 0.0023
Teor de Fenólicos Totais – Prussian Blue (mg AGE 100 g ⁻¹)	518.00 ± 0.0016	399.07 ± 0.0016
Flavonoides (mg QE 100 g ⁻¹)	506.79 ± 0.0012	1006.08 ± 0.0244
Flavonóis (mg QE 100 g ⁻¹)	112.09 ± 0.0060	352.59 ± 0.0059
Taninos Condensados (mg CE 100 g ⁻¹)	1081.5 ± 0.0095	1466.9 ± 0.0226
DPPH (% scavenging activity)	58.82 ± 0.0062	42.03 ± 0.0271
DPPH Modificado (% inibição)	51.00 ± 0.0099	31.65 ± 0.0077
ABTS (mmol AAE 100 g ⁻¹)	21.21 ± 0.0399	12.77 ± 0.0515
FRAP (mmol AAE 100 g ⁻¹)	17.23 ± 0.0790	16.23 ± 0.0040

Os resultados para todos os parâmetros determinados apresentaram diferença significativa (*t*-teste, $p < 0,05$). O EPG apresentou o maior teor

de fenólicos totais, tanto pelo teste de Folin-Ciocalteu quanto pelo teste de Prussian Blue. A discrepância entre os resultados pode ser explicada pelas limitações de cada técnica. O método de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução de molibdênio de tungstênio por substâncias como polifenóis, ácido ascórbico, açúcares redutores e aminoácidos. Esta redução é registrada pelo decaimento da absorbância da amostra. Portanto, este ensaio pode superestimar o teor de fenólicos totais, caso a amostra contenha estes outros agentes redutores (EVERETTE et al., 2010). Por outro lado, o ensaio de Prussian Blue é menos afetado por outras substâncias que não sejam compostos fenólicos. Assim, este método promove uma estimativa de fenólicos totais mais próxima do valor real que a amostra contém (BERKER et al., 2012).

Outros estudos investigaram o teor de fenólicos totais (TFT) de *Psidium guajava* pelo método de Folin-Ciocalteu, obtendo resultados significativamente menores que aqueles obtidos no presente trabalho. Isabelle et al. (2010) encontraram um TFT de 1,75 mg AGE g⁻¹ (ou 175 mg AGE 100 g⁻¹) para polpa de goiaba liofilizada. Vasco et al. (2008) reportaram um TFT de 462 mg AGE 100 g⁻¹ para goiaba liofilizada, com o uso de metanol seguido de acetona como solventes. Ademiluyi et al. (2016) obtiveram um TFT de 66,1 mg AGE 100 g⁻¹ para goiaba vermelha usando-se maceração com uma solução de metanol:HCl (20:1, v/v) como solvente. Souza et al. (2011) reportaram um TFT de 24,63 mg AGE 100 g⁻¹ para resíduo industrial de goiaba, com o uso de maceração com água como solvente. El Anany et al. (2013) extraiu os compostos fenólicos de sementes de goiaba utilizando-se um *shaker* com um solvente composto por uma solução etanólica 70% e encontrou um TFT de 973,80 mg AGE 100 g⁻¹. O uso de diferentes técnicas de extração com parâmetros de operação distintos pode ter ocasionado esta variação nos resultados, incluindo aqueles reportados no presente artigo.

Uma alta concentração de flavonoides foi encontrada em ambas amostras estudadas. O ERG apresentou 50% mais flavonoides e três vezes mais flavonóis quando comparado ao EPG. Kong et al. (2010) encontraram um teor total de flavonoides de 427,35 mg QE 100 g⁻¹ para resíduo industrial de goiaba, um resultado significativamente menor que o encontrado no presente trabalho. Os autores conduziram a extração de fenólicos em um *shaker* orbital por 5 h sob uma temperatura de 60 °C e pH 2,0 na condição otimizada. A exposição da amostra a uma alta temperatura por um tempo prolongado pode ter levado a um teor reduzido de flavonoides quando comparado ao teor determinado neste estudo, que utilizou temperatura ambiente por apenas 2 min no procedimento de extração.

Os taninos condensados, assim como os flavonoides e os flavonóis, também se apresentaram mais concentrados na fração residual da goiaba (1081,5 mg CE 100 g⁻¹ para EPG e 1466,9 mg CE 100 g⁻¹ para ERG). Moreno et al. (2014) analisaram os polifenóis de farinha de goiaba (*Psidium guajava*) liofilizada e também da fruta *in natura*. Os autores encontraram um teor total de taninos condensados de 8,51 mg CE 100 g⁻¹ para goiaba *in natura* e 208,02 mg CE 100 g⁻¹ para a farinha de goiaba. A quantidade encontrada em ambas as amostras é menor que os valores obtidos no presente estudo.

Em relação à determinação da atividade antioxidante, os resultados para DPPH modificado foram menores comparados àqueles obtidos quando o DPPH clássico foi utilizado. Esta diferença era esperada, uma vez que o ensaio de DPPH tradicional mede o decaimento da absorbância quando um antioxidante diluído em metanol ou etanol reduz o radical DPPH* a DPPHH. Porém, este teste pode ser afetado pela desprotonação do DPPHH. Dessa forma, o DPPH modificado tem por objetivo a redução deste efeito, o que pode ser obtido pelo aumento da solubilidade dos antioxidantes presentes na amostra por meio da condução do experimento em uma solução de etanol:água (1:1, v/v).

O EPG apresentou uma atividade antioxidante mais alta que o ERG em todas as quatro determinações. Este resultado pode estar relacionado ao fato de que o EPG possui um maior TFT comparado ao ERG, indicando que a capacidade antioxidante possui uma relação direta com o teor de fenólicos totais e não está relacionada a grupos específicos de fenólicos. Por outro lado, a polpa de goiaba também é rica em outros compostos, como carotenoides, o que também pode ter interferido neste resultado (VERMA et al., 2015; SANTOS et al., 2018).

Outros autores reportaram uma menor capacidade antioxidante determinada pelos mesmos métodos. Ongphimai et al. (2013) encontraram uma atividade antioxidante de 22% pelo método clássico do DPPH para extrato de fenólicos insolúveis e 20% para extrato de fenólicos solúveis obtidos a partir de *Psidium guajava*. Contreras-Calderón et al. (2011) analisaram goiabas brasileiras inteiras e encontram 44,8 μmol TE g⁻¹ (ou 4,48 mmol TE 100 g⁻¹) no ensaio ABTS e 39,9 μmol TE g⁻¹ (ou 3,39 mmol TE 100 g⁻¹) no ensaio FRAP. Nunes et al. (2016) analisaram *Psidium guajava* cv. 'Pedro Sato' e encontram 4,2 mmol Fe²⁺ 100 g⁻¹ no ensaio FRAP. Thaipong et al. (2006) estudaram quatro diferentes genótipos de goiaba. O teste ABTS apresentou resultados que variaram entre 29,6 e 37,9 μmol TE g⁻¹ (ou 2,96 e 3,79 mmol TE 100 g⁻¹)

enquanto os resultados do FRAP variaram de 15,5 a 33,3 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (ou 1,55 a 3,33 $\text{mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$).

2.3.2 Perfil fenólico

A Tabela 2.2 apresenta o perfil de fenólicos das amostras de PGP, RGP, EPG E ERG. Os parâmetros de identificação e quantificação dos compostos fenólicos, como tempo de retenção, íon parente, íon quantitativo e limites de identificação e quantificação podem ser encontrados no Anexo A.

Tabela 2.2 – Perfil fenólico dos pós de polpa (PGP, mg g^{-1} de amostra) e resíduo (RGP, mg g^{-1} de amostra) de goiaba e dos extratos de polpa (EPG, mg g^{-1} de amostra) e de resíduo (ERG, mg g^{-1} de amostra) de goiaba

	Composto fenólico	PGP	RGP	EPG	ERG
<i>Ácidos Fenólicos</i>					
1	Ácido Salicílico*	nd ²	nd	nd	0,0108 ± 0,0018
2	Ácido Cinâmico	0,4884 ± 0,1222 ^{a,b}	0,2613 ± 0,0205 ^{b,c}	0,5457 ± 0,0837 ^a	0,1790 ± 0,0166 ^c
3	Ácido Mandélico*	0,0443 ± 0,0193	<LOQ	<LOQ	<LOQ
4	Ácido 4-Hidroximetilbenzóico*	0,0354 ± 0,0052 ^a	<LOQ	0,0092 ± 0,0029 ^b	<LOQ
5	Ácido Protocatecúico	<LOQ	0,1196 ± 0,0423 ^a	<LOQ	0,0924 ± 0,0710 ^a

6	Ácido p-cumárico	0,0556 ± 0,0104 ^a	0,0176 ± 0,0017 ^c	0,0274 ± 0,0013 ^b	0,0150 ± 0,004 ^{b,c}
7	Ácido Metoxifenilacético*	0,1091 ± 0,0098 ^a	<LOQ	nd	0,1021 ± 0,0144 ^a
8	Ácido Vanílico	0,7730 ± 0,1682 ^b	0,9732 ± 0,1532 ^{a,b}	0,1899 ± 0,0169 ^c	1,2346 ± 0,2363 ^a
9	Ácido Gálico	4,1576 ± 0,2223 ^a	0,2720 ± 0,0433 ^c	1,5014 ± 0,6181 ^b	0,3504 ± 0,0160 ^c
10	Ácido Ferúlico	0,1509 ± 0,0937 ^a	0,0543 ± 0,0123 ^a	0,0771 ± 0,0397 ^a	0,0254 ± 0,0078 ^a
11	Ácido Siríngeo	0,4308 ± 0,011 ^a	0,0870 ± 0,0118 ^c	0,2441 ± 0,0079 ^b	0,0320 ± 0,0329 ^d
12	Ácido Sinápico	0,0459 ± 0,0069 ^b	0,0452 ± 0,0049 ^b	0,1067 ± 0,0109 ^a	0,0406 ± 0,0044 ^b
13	Ácido Elágico	7,547 ± 0,2183 ^a	7,618 ± 1,227 ^a	2,773 ± 0,3642 ^b	1,600 ± 0,0667 ^c
14	Ácido Clorogênico	0,0149 ± 6,873 ^{-4 a}	0,0115 ± 0 ^b	0,0114 ± 1,376 ^{-4 b}	0,0124 ± 4,122 ^{-4 b}
15	Ácido Rosmarínico	0,0031 ± 0,0012 ^b	0,0034 ± 2,315 ^{-4 b}	<LOQ	0,0074 ± 0,0053 ^a

Flavonoides

16	Crisina	<LOQ	nd	nd	nd
17	Pinocebrina	0,1062 ± 0,0132 ^a	0,0065 ± 5,998 ^{-4 b}	nd	nd
18	Apigenina	0,0051 ± 2,688 ⁻⁴ a,b	0,0056 ± 2,350 ^{-4 a}	0,0050 ± 3,357 ⁻⁵ b	0,0053 ± 4,031 ⁻⁴ a,b
19	Galangina*	0,0152 ± 4,370 ^{-4 c}	0,0151 ± 3,567 ⁻⁴ b,c	0,0292 ± 0,0057 ^a	0,0224 ± 0,0012 ^{a,b}
20	Naringenina	0,0194 ± 0 ^a	0,0151 ± 0,0019 ^b	0,0124 ± 1,744 ⁻⁴ c	0,0164 ± 0 ^b
21	Kaempferol	nd	<LOQ	nd	<LOQ
22	Eriodictiol*	0,0031 ± 4,352 ^{-4 a}	0,0031 ± 6,523 ^{-4 a}	0,0030 ± 5,172 ⁻⁸ a	0,0035 ± 9,766 ^{-4 a}
23	Aromadendrina*	0,0686 ± 0,0062 ^a	0,0265 ± 0,0050 ^b	0,0193 ± 0,0035 ^b	0,0283 ± 0,0015 ^b
24	Fustina*	nd	nd	nd	<LOQ

25	Catequina	0,0304 ± 3,932 ⁻⁴ b	0,0239 ± 2,409 ⁻⁴ b	0,1241 ± 0,0094 ^a	0,0256 ± 7,228 ⁻⁴ b
26	Epicatequina	0,0312 ± 0,0044 ^b	nd	0,1759 ± 0,0181 ^a	<LOQ
27	Hispidulina*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
28	Quercetina	0,1920 ± 0,1046 ^b	0,7801 ± 0,1798 ^a	0,7813 ± 0,0434 ^a	0,2363 ± 0,0279 ^b
29	Taxifolina*	0,0693 ± 0,0112 ^a	0,0382 ± 0,0015 ^{b,c}	0,0256 ± 0,0059 ^c	0,0482 ± 0,0112 ^{a,b}
30	Miricetina	0,1088 ± 0,0048 ^b	0,1815 ± 0,0386 ^a	0,1139 ± 0,0158 ^b	0,1575 ± 0,0091 ^a
31	Isoquercetina	0,0353 ± 0,0036 ^a	<LOQ	0,0227 ± 0,0025 ^b	<LOQ
<i>Aldeídos Fenólicos</i>					
32	Vanilina	0,0716 ± 0,0469 ^b	0,0410 ± 6,531 ⁻⁴ c	0,6015 ± 0,5258 ^a	0,0441 ± 0,0019 ^c
33	Coniferaldeído*	nd	nd	0,0503 ± 0,0135	nd
34	Siringaldeído*	0,0380 ± 0,0053 ^b	<LOQ	0,0710 ± 0,0413 ^a	<LOQ

35	Sinapaldeído	0,0111 ± 3,819 ^{-4 b}	0,0100 ± 3,281 ^{-4 b}	0,0171 ± 3,820 ^{-4 a}	0,0141 ± 0,0031 ^a
<i>Cumarina</i>					
36	Umbeliferona*	0,0066 ± 1,324 ^{-4 b}	0,0078 ± 1,334 ^{-4 a}	0,0065 ± 0 ^b	0,0084 ± 0,0020 ^a
<i>Diterpeno Fenólico</i>					
37	Carnosol*	0,0436 ± 0 ^a	0,0148 ± 3,197 ^{-8 b}	0,0146 ± 0 ^b	0,0146 ± 2,131 ^{-8 b}
Teor de Fenólicos Totais (mg g⁻¹)		14,71	10,63	7,559	4,327

<LOQ – não quantificado. Resultados seguidos pela mesma letra na linha não diferem significativamente (*t*-teste, $p < 0,05$)

² Não detectado

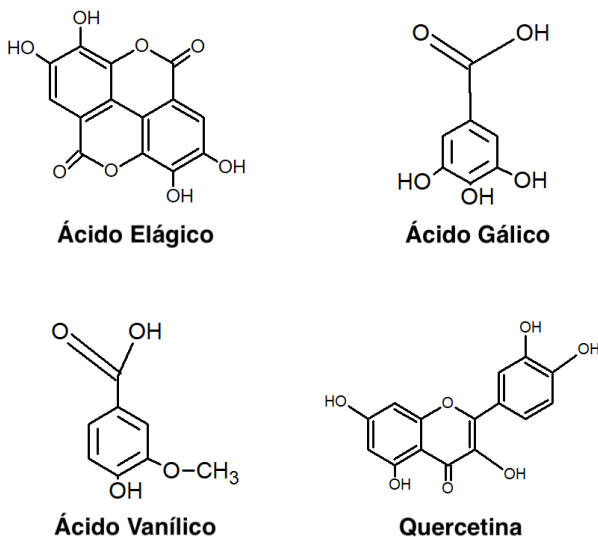
* Reportado pela primeira vez

Dentre os 47 fenólicos testados, um total de 37 foram detectados nas quatro amostras analisadas (Tabela 2.2). Os pós e extratos de goiaba são predominantemente compostos por ácidos fenólicos e flavonoides, porém, outros grupos fenólicos também foram detectadas. O ERG mostrou-se a amostra mais rica, com um total de 34 compostos identificados, seguida pelo PGP com 33 compostos, EPG com 32 e RGP com 31 fenólicos.

O ácido elágico (**13**) foi o principal fenólico encontrado em todas as amostras (7,6179 mg g⁻¹ em EPG, 7,5466 mg g⁻¹ em PGP, 2,7725 mg g⁻¹ em RGP e 1,6000 mg g⁻¹ em ERG). Analisando-se a concentração deste composto, é possível notar que o ácido elágico encontra-se majoritariamente presente na polpa da goiaba. Este fenólico é extensivamente investigado em estudos clínicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, uma vez que o mesmo é relacionado a propriedades anti-carcinogências (NÚÑEZ-SÁNCHEZ et al., 2016; CECI et al., 2016) e anti-diabetes (MEHTA et al., 2017; NANKAR;

DOBLE, 2017). O ácido vanílico (8), o ácido gálico (9) e a quercetina (28) também estão entre os compostos majoritariamente encontrados nesta matéria-prima. As estruturas químicas dos principais compostos fenólicos identificados nas amostras são mostradas na Figura 2.1.

Figura 2.1 – Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos identificados nas amostras de pó e extrato de polpa de goiaba (PGP e EPG) e pó e extrato de resíduo de goiaba (RGP e ERG)



A maioria dos estudos que analisaram o perfil fenólico da *Psidium guajava* reportaram o ácido gálico (ZULKIFLI et al., 2012) e a quercetina (FLORES et al., 2015; LIN; YIN, 2012) como os principais fenólicos da goiaba em termos quantitativos. Apesar destes compostos também terem sido encontrados em grande quantidade no presente estudo, o ácido elágico foi o majoritário. Este resultado pode ter sido causado principalmente por diferenças na técnica e no solvente de extração, assim como a metodologia usada para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos.

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é relacionada às suas estruturas químicas e capacidade em neutralizar radicais livres (CHEN et al., 2017). Os perfis fenólicos das amostras de EPG e ERG podem ter sido responsáveis pela alta atividade antioxidante exibida pelos extratos. Tanto o EPG quanto o ERG apresentaram uma grande variedade de flavonoides, que atuam na capacidade de doação de átomos de hidrogênio a radicais livres com

o objetivo de interromper reações em cadeia. A quercetina, principal flavonoide encontrado no EPG e no ERG, apresenta em sua estrutura uma substituição orto-dihidroxi no anel B, o que garante a estabilização do radical e participa da deslocalização eletrônica; uma insaturação -2,3 e um grupo 4-carbonil no anel C. Estas características estruturais são necessárias para se atingir o potencial máximo de neutralização de radicais para flavonoides (CHEN et al., 2017; RICE-EVANS et al., 1996).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos depende do número de grupamentos hidroxila sem impedimento estérico disponíveis na molécula. Dessa forma, o composto é capaz de doar um átomo de hidrogênio para a estabilização de radicais livres. O ácido gálico, presente no EPG e no ERG, contém três grupos hidroxila disponíveis em sua estrutura, o que contribui para uma maior atividade antioxidante (CHEN et al., 2017; RICE-EVANS et al., 1996). Similarmente, a reatividade química do ácido elágico, o principal fenólico em EPG e ERG, se dá em decorrência da presença de múltiplos grupamentos hidroxila. Além disso, a substituição aromática eletrofílica dos anéis aromáticos do ácido elágico possuem uma função importante na estabilização de radicais livres (AHMED et al., 2016).

O ácido elágico e o ácido gálico já demonstraram ação farmacológica anteriormente. Fahmy et al. (2015) estudaram os efeitos de extratos fenólicos contendo ácido elágico e ácido gálico, obtidos a partir de *Terminalia muelleri* contra danos hepáticos. O extrato (400 mg kg⁻¹) foi capaz de reduzir a elevação de tetracloreto de carbono (CCl₄), uma hepatoxina/nefrotoxina presente em humanos e animais que gera radicais livres devido a seu caminho de conversão metabólica. O mesmo efeito também foi observado por Al-Sayed et al. (2015) para um extrato fenólico de *Bauhinia hookeri*. A ação protetiva da *Bauhinia hookeri* foi atribuída à presença de polifenóis, responsáveis pela atividade antioxidante, o que diminui a peroxidação lipídica.

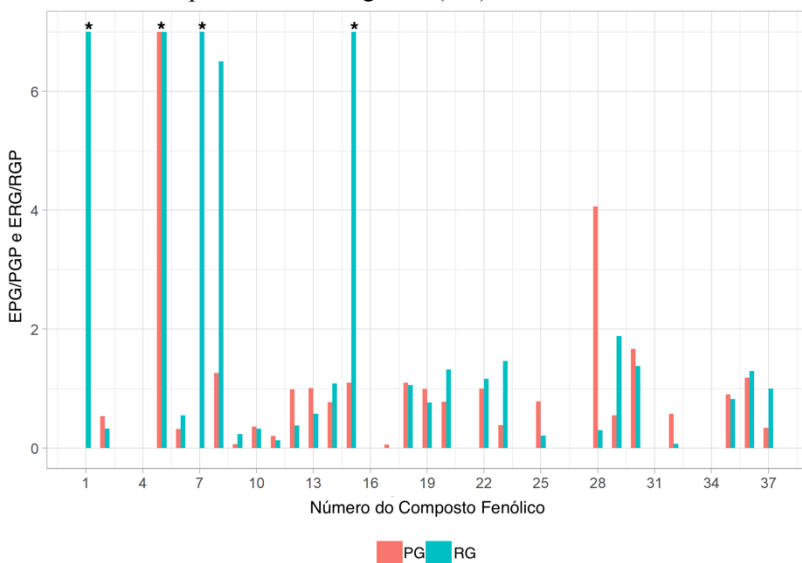
A técnica de extração usada no presente trabalho, juntamente à análise LC-ESI-MS/MS, permitiu a identificação de 14 fenólicos que estão sendo reportados pela primeira vez em goiaba vermelha. São eles: ácido 4-hidroximetilbenzóico (**4**), umbeliferona (**36**), ácido mandélico (**3**), seringaldeído (**34**), galangina (**19**), eriodictiol (**22**), aromadendrin (**23**), hispidulina (**27**), taxifolina (**29**) e carnosol (**37**), detectados em todas as amostras. Além disso, ácido metoxifenilacético (**7**) foi detectado em EPG, ERG e PGP. Ácido salicílico (**1**) e fustina (**24**) foram detectados em ERG e coniferaldeído (**33**) foi identificado apenas em ERG. Estes compostos já foram associados na literatura a potenciais efeitos na prevenção e no tratamento de doenças degenerativas. A umbeliferona já foi relacionada a efeitos anti-carcinogênicos (MUTHU et al., 2013), cardioprotetivos (LOU et al., 2017) e anti-diabéticos (NOAWABOOT et al., 2015). O ácido salicílico

e o coniferaldeído já foram relacionados a um potencial anti-carcinogênico (AI et al., 2015; KIM et al., 2016).

Uma vez que a polpa e o resíduo de goiaba foram analisados separadamente, foi possível identificar em que fração da fruta cada fenólico encontra-se localizado após o processamento. Além disso, para a maioria dos fenólicos detectados suas quantidades variaram significativamente entre as amostras em pó e os extratos. Este fato pode estar relacionado ao processo de extração que antecedeu a análise de LC-ESI-MS/MS, uma vez que as amostras de extrato foram primeiramente submetidas à extração por ultrassom, o que não aconteceu para as amostras em pó, como descrito no item 2.2.5.1.

Os resultados da Tabela 2.2 mostram que as amostras em pó apresentaram TFT maiores que os extratos, tanto para a polpa (PGP = 14,71 mg g⁻¹, EPG = 10,63 mg g⁻¹) quanto para o resíduo (RGP = 7,559 mg g⁻¹, ERG = 4,327 mg g⁻¹) de goiaba. Com relação aos extratos, é interessante observar que os resultados de TFT obtidos pela análise de LC-ESI-MS/MS foram mais próximos aos resultados de TFT estimados pelo ensaio de Prussian Blue (EPG = 5,180 mg g⁻¹, ERG = 3,990 mg g⁻¹) do que pelo ensaio de Folin-Ciocalteu (EPG = 23,48 mg g⁻¹, ERG = 15,78 mg g⁻¹). Assim, o presente estudo reafirma o potencial do ensaio de Prussian Blue para ser utilizado com uma ferramenta para a estimativa do TFT. A razão entre o teor de fenólicos dos extratos e dos pós de goiaba foi calculada e a Figura 2.2 mostra que os compostos ácido salicílico (**1**), ácido 4-hidroximetilbenzóico (**5**) e umbeliferona (**7**) foram quantificados apenas nas amostras de extrato de goiaba.

Figura 2.2 – Taxa de fenólicos entre o extrato e o pó de polpa de goiaba (PG) e entre o extrato e o pó de resíduo de goiaba (RG)



**O número do composto fenólico correspondente pode ser observado na Tabela 1. *Taxa = ∞. *Valores > 1,0 significam que determinado fenólico foi encontrado em maior quantidade no extrato do que no pó correspondente

Estes resultados indicam que a EAU foi capaz de liberar fenólicos específicos que não poderiam ser isolados em uma quantidade significativa durante a preparação da amostra em pó antes da análise de LC-ESI-MS/MS. A presença de alguns fenólicos apenas nos pós foi, na maioria dos casos, similar para a polpa e para o resíduo. Entretanto, as diferenças quantitativas entre as amostras de polpa e resíduo foram substanciais para o ácido p-cumárico (8), ácido siríngico (15), kaempferol (23), epicatequina (28) e hispidulina (29).

O Quadro 2.1 mostra que os estudos sobre o perfil fenólico da goiaba, suas frações e seus resíduos são escassos.

Quadro 2.1 – Perfil fenólico da goiaba reportado em diferentes estudos

Estudo	Amostra	Processo de Extração	Método de Identificação	Número de Fenólicos Identificados
ADEMILUYI et al., 2016	<i>P. guajava</i> L. (branca gigante, branca pequena, listrada e vermelha) seca em estufa a 35 °C	Maceração com metanol:HCL (20:1, v/v) por 24 h à temperatura ambiente	Cromatografia gasosa	14
ZULKIFLI et al., 2012	Cascas frescas de <i>P. guajava</i> L.	Amostras fervidas em água a uma proporção de 1:20 de cascas para água	Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	8
FLORES et al., 2015	Polpa liofilizada de <i>P. guajava</i> L. (Homestead, Barbie Pink, Thai Maroon, Sardina 1, Sardina 2, Yen, 2 e Sayla)	Extração em <i>blender</i> com CH ₃ OH/H ₂ O/ácido fórmico (75:25:5) por 5 min à temperatura ambiente	HPLC-PDA	21
ROJAS-GARBANZO et al., 2017	Casca e polpa liofilizadas de <i>P. guajava</i> L. cv ‘Criolla’	Extração em vortex por 1 min e extração assistida por ultrassom (20 min) com metanol + água (9 + 1, v+ v)	UHPLC-DAD-MS/MS	29 fenólicos e 34 compostos polares
NUNES et al., 2016	<i>P. guajava</i> L. cv. ‘Pedro Sato’ seca em estufa a 55 °C	Extraído com etanol:água (80:20, v/v) por 10 min	HPLC-DAD	13
ONGPHIMAI et al., 2013	<i>P. guajava</i> L. liofilizada fresca	Extração por Soxhlet com acetato de etila por 10 h	HPLC	8 ácidos fenólicos solúveis e 6 ácidos fenólicos insolúveis
LIN; YIN, 2012	<i>P. guajava</i> L. cv. ‘Pearl’ fresca inteira	Extração em <i>blender</i> com 100% água ou água:etanol (50:50, v/v) por 24 h a 25 °C	HPLC	9 no extrato aquoso e 10 no extrato etanólico

<p>FLORES ET AL., 2013</p>	<p><i>P. friedrichsthalianum</i> liofilizada inteira</p>	<p>Extração em <i>blender</i> com metanol:água (70:30, v/v) por 5 min à temperatura ambiente</p>	<p>HPLC-PDA</p>	<p>9</p>
-----------------------------------	--	--	-----------------	----------

O maior número de compostos fenólicos em goiaba vermelha foi encontrado no presente trabalho quando comparado aos estudos existentes. Os resultados podem ser explicados pelas diferenças no tipo de solvente, na preparação das amostras para a extração de fenólicos, condições variáveis de extração (técnica, temperatura, tempo) e metodologias distintas de análise.

No geral, o perfil fenólico dos pós (PGP e RGP) e extratos (EPG e ERG) de goiaba mostraram uma grande variedade de compostos em todas as amostras. A concentração e a presença de compostos diferentes podem explicar o alto teor de fitoquímicos encontrado, assim como a atividade antioxidante demonstrada pelos extratos de goiaba. Além disso, baseado no número de compostos fitoquímicos identificados em grande quantidade nesse estudo, sugere-se que a goiaba se encaixa nos critérios para ser denominada como uma superfruta.

2.3 CONCLUSÃO

A composição fitoquímica dos extratos de polpa e resíduo de goiaba mostraram que esta fruta é uma fonte rica em substâncias com propriedades antioxidantes, como flavonoides, flavonóis e taninos condensados. O resíduo de processamento da goiaba apresenta uma alta concentração nestes compostos quando comparado à polpa. Este fato destaca a importância em se destinar apropriadamente o resíduo de goiaba, que deveria ser considerado um valioso coproduto ao invés de um resíduo. Dessa forma, sugere-se que o ERG pode ser usado como um ingrediente em diferentes formulações alimentícias.

O método de Prussian Blue para EPG e ERG exibiu valores muito próximos àqueles obtidos pela análise de LC-ESI-MS/MS quando comparado ao método de Folin-Ciocalteu. Este ensaio, devido à superestimação dos resultados, não é recomendado para ser utilizado como uma ferramenta para a estimativa do teor de fenólicos totais.

Portanto, o ensaio de Prussian Blue deve ser adotado para este propósito, seguido pela análise de LC-ESI-MS/MS.

O alto teor de fenólicos totais, flavonoides, flavonóis, taninos condensados e atividade antioxidante comparados aos outros estudos da literatura pode ser atribuído ao uso de EAU por ultrassom de sonda. Ao contrário dos métodos clássicos, a extração por ultrassom possui dois importantes fenômenos físicos, a quebra das paredes celulares do material e a difusão do solvente pela matriz, dissolvendo os compostos-alvo. Dessa forma, a EAU por ultrassom de sonda promove uma liberação das substâncias bioativas de forma muito mais eficiente quando comparada a outros métodos.

A escolha do solvente, a preparação da amostra e os diferentes protocolos de análise podem ter contribuído para a discrepância dos resultados obtidos no presente estudo com relação àqueles encontrados na literatura. Dessa forma, a comparação de resultados entre diferentes estudos somente é possível quando os parâmetros usados foram os mesmos.

Por fim, a goiaba pode ser considerada uma superfruta com uma rica variedade de compostos fenólicos. Os futuros trabalhos explorando esta matéria-prima investigarão outras técnicas não-convencionais de extração para a obtenção de extratos ricos em compostos bioativos; a identificação e quantificação dos carotenoides da goiaba; e a aplicação dos pós e extratos de goiaba para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

Referências bibliográficas

ADEMILUYI, A. O., OBOH, G., OGUNSUYI, O. B., OLORUNTOBA, F. M. A comparative study on antihypertensive and antioxidant properties of phenolic extracts from fruit and leaf of some guava (*Psidium guajava* L.) varieties. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, p. 363–374, 2016.

AHMED, T., SETZER, W. N., NABAVI, S. F., ORHAN, I. E., BRAIDY, N., SORBANZO-SANCHEZ, E., NABAVI, S. M. Insights into effects of ellagic acid on the nervous system: A mini review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 10, p. 1350–1360, 2016.

AI, G., DACHINENI, R., MULEY, P., TUMMALA, H., GUNAJE, J. B. Abstract 2093: Regulation of c-Myc expression by aspirin and salicylic

acid in colon cancer cells through a novel pathway. **American Association for Cancer Research**, v. 75, n. 15, 2015.
DOI: 10.1158/1538-7445.AM2015-2093.

AL-SAYED, E., ABDEL-DAIM, M. M., KILANY, O. E., KARONEN, M., SINKKONEN, J. Protective role of polyphenols from *Bauhinia hookeri* against carbon tetrachloride- induced hepato- and nephrotoxicity in mice. **Renal Failure**, 2015.
DOI: 10.3109/0886022X.2015.1061886.

AZZOLINI, M., JACOMINO, A. P., BRON, I. U. Índices para avaliar qualidade pós- colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 2, p. 139–145, 2004.

BERKER, K. I., DEMIRATA, B., APAK, R. Determination of total antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same solution by using ferric-ferri- cyanide assay. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 1150–1158, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of free-radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.

CECI, C., TENTORI, L., ATZORI, M. G., LACAL, P. M., BONANNO, E., SCIMECA, M., CICCONI, R., MATTEI, M., MARTINO, M.G., VESPASIANI, G., MIANO, R., GRAZIANI, G. Ellagic acid inhibits bladder cancer invasiveness and in vivo tumor growth. **Nutrients**, v. 8, n. 11, 2016.
DOI:10.3390/nu8110744.

CHANG, S. K., ALASALVAR, C., SHAHIDI, F. (2018). Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects – A comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2018.
DOI: 10.1080/10408398.2017.1422111.

CHEMAT, F., ROMBAUT, N., SICAIRE, A.-G., MUELLE-MIESTRE, A., FABIANO-TIXIER, A.-S., ALBERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products – Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications, a review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 2017.

CHEN, L., TENG, H., XIE, Z., CAO, H., CHEANG, W. S., SKALICKA-WONIAK, K., GEORGIEV, M. I., XIAO, J. (2017). Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure-activity relationship. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 4, p. 513–527, 2017.

CLERICI, M. T. P. S., CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 1658–1670, 2011.

CONTRERAS-CALDERÓN, J., CALDERÓN-JAIMES, L., GUERRA-HERNÁNDEZ, E., GARCÍA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, p. 2047–2053, 2011.

EL ANANY, A. M. Nutritional composition, antinutritional factors, bioactive compounds and antioxidant activity of guava seeds (*Psidium Myrtaceae*) as affected by roasting processes. *Journal of Food Science and Technology*, 2013.

DOI: 10.1007/s13197-013-1242-1.

EVERETTE, J. D., BRYANT, Q. M., GREEN, A. M., ABBEY, Y. A., WANGILA, G. W., WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139–8144, 2010.

FAHMY, N. M., AL-SAYED, E., ABDEL-DAIM, M. M., KARONEN, M., SINGAB, A. N. Protective effect of *Terminalia muelleri* against carbon tetrachloride-induced hepato and nephron-toxicity in mice and characterization of its bioactive constituents. **Pharmacological Biology**, 2015.

DOI: 10.3109/13880209.2015.1035794.

FAHMY, N. M., AL-SAYED, E., ABDEL-DAIM, M. M., SINGAB, A. N. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Terminalia Muelleri* Benth. (*Combretaceae*). **Drug Development Research**, v. 78, n. 3–4, p. 146–154, 2017.

FLORES, G., DASTMALCHI, K., WU, S-B, WHALEN, K., DABO, A. J., REYNERTSON, K. A, FORONJY, R. F., KENNELLY, E. J. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 889–895, 2013.

FLORES, G., WU, S.-B., NEGRIN, A., KENNELLY, E. J. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. **Food Chemistry**, v. 170, p. 327–335, 2015.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345–391, 2012.

HORSZWALD, A., ANDLAUER, W. Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. **Journal of Berry Research**, v. 1, p. 189–199, 2011.

HOSSEN, M. S., ALI, M. Y., JAHURUL, M. H. A., ABDEL-DAIM, M. M., GAN, S. H., KHALIL, M. I. (2017). Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review. **Pharmacological Reports**, 2017.
DOI: 10.1016/j.pharep.2017.07.002.

ISABELLE, M., LEE, B. L., LIM, M. T., KOH, W.-P., HUANG, D., ONG, C. N. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. **Food Chemistry**, v. 123, n. 1, p. 77–84, 2010.

KIM, K. M., HEO, D. R., KIM, Y.-A., LEE, J., KIM, N. S., BANG, O.-S. Coniferaldehyde inhibits LPS-induced apoptosis through the PKC α/β II/Nrf-2/HO-1 dependent pathway in RAW264.7 macrophage cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 85–93, 2016.

KONG, K.-W., ISMAIL, A. R., TAN, S.-T., PRASAD, K. M. N., ISMAIL, A. Response surface optimization for the extraction of phenolics and flavonoids from a pink guava puree industrial by-product. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, p. 1739–1745, 2010.

LEE, D. H., FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **Hortscience**, v. 7, p. 83–84, 1972.

LIN, C.-Y., YIN, M.-C. Renal protective effects of extracts from guava fruit (*Psidium guajava* L.) in Diabetic mice. **Plant Foods and Human Nutrition**, v. 67, p. 303–308, 2012.

LOU, H., FAN, Z., XIANG, D., JIANG, Z., ZHANG, W., GAO, L., FENG, C. The protective effect of umbelliferone ameliorates myocardial injury following ischemia-reperfusion in the rat through suppression NLRP3 inflammasome and upregulating the PPAR- γ . **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 2, p. 3404–3410, 2017.

MARGRAF, T., KARNOPP, A. R., ROSSO, N. D., GRANATO, D. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-well microplates. **Journal of Food Science**, v. 80, p. 2397–2403, 2015.

MEHTA, V., VERMA, P., SHARMA, N., SHARMA, A., THAKUR, A., MALAIRAMAN, U. Quercetin, ascorbic acid, caffeine and ellagic acid are more efficient than rosiglitazone, metformin and glimepiride in interfering with pathways leading to the development of neurological complications associated with diabetes: A comparative in-vitro study. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, v. 55, n. 1, p. 115–121, 2017.

MORENO, M. A., ZAMPINI, I. C., COSTAMAGNA, M., SAYAGO, J. E., ORDOÑEZ, R. M., ISLA, M. I. Phytochemical composition and antioxidant capacity of *Psidium guajava* fresh fruits and flour. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 725–732, 2014.

MUSA, K. H., ABDULLAH, A., JUSOH, K., SUBRAMANIAM, V. Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): Effect of extraction techniques and solvents. **Food Analytical Methods**, v. 4, p. 100–107, 2011.

MUTHU, R., THANGAVEL, P., SELVARAJ, N., RAMALINGAM, R., VAIYAPURI, M. Synergistic and individual effects of umbelliferone with 5-fluorouracil on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against 1,2-dimethylhydrazine induced rat carcinogenesis. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 74–82, 2013.

NANKAR, R. P., DOBLE, M. Hybrid drug combination: Anti-diabetic treatment of type 2 diabetic Wistar rats with combination of ellagic acid and pioglitazone. **Phytomedicine**, v. 37, p. 4–9, 2017.

NAOWABOOT, J., SOMPARN, N., SAENTAWESUK, S., PANNANGPETCH, P. Umbelliferone improves an impaired glucose and lipid metabolism in high-fat diet/ Streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. **Phytotherapy Research**, 2015.
DOI: 10.1002/ptr.5392.

NUNES, J. C., LAGO, M. G., CASTELO-BRANCO, V. N., OLIVEIRA, F. R., TORRES, A. G., PERRONE, D., MONTEIRO, M. Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders. **Food Chemistry**, v. 197, p. 881–890, 2016.

NÚÑEZ-SÁNCHEZ, M. A., KARMOKAR, A., GONZÁLEZ-SARRÍAS, A., GARCÍA-VILLALBA, R., TOMÁS-BARBERÁN, F. A., GARCÍA-CONESA, M. T., TOMÁS-BARBERÁN, F. A., GARCÍA-CONESA, M. T., BROWN, K., ESPÍN, J. C. In vivo relevant mixed urolithins and ellagic acid inhibit phenotypic and molecular colon cancer stem cell features: A new potentially for ellagitannin metabolites against cancer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 92, p. 8–16, 2016.

ONGPHIMAI, N., LILITCHAN, S., ARYUSUK, K., BUMRUNGPET, A., KRISNANGKURA, K. Phenolic acids content and antioxidant capacity of fruit extracts from Thailand. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 40, n. 4, p. 636–642, 2013.

PEIXOTO, H., ROXO, M., KRSTIN, S., WANG, X., WINK, M. Anthocyanin-rich extract of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) mediates neuroprotective activities in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 385–393, 2016.

POPRAC, P., JOMOVA, K., SIMUNKOVA, M., KOLLAR, V., RHODES, C. J., VALKO, M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 592–607, 2017.

PRICE, M. L., BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain.

Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 25, p. 1268–1273, 1977.

PULIDO, R., BRAVO, L., SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary poly-phenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396–3402, 2000.

RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

ROJAS-GARBANZO, C., ZIMMERMANN, B. F., SCHULZE-KAYSERS, N., SCHIEBER, A. Characterization of phenolic and other polar compounds in peel and flesh of pink guava (*Psidium guajava* L. cv. 'Criolla') by ultra-high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. **Food Research International**, v. 100, p. 445–453, 2017.

RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. **Comunicado Técnico Online Embrapa**, v. 128, 2007.

SANTOS, R. C., OMBREDANE, A. S., SOUZA, J. M. T., VASCONCELOS, A. G., PLÁCIDO, A., AMORIM, A. D. G. N., BARBOSA, E. A., LIMA, F. C. D. A., ROPKE, C. D., ALVES, M. M. M., ARCANJO, D. D. R., CARVALHO, F. A. A., DELERUE-MATOS, C., JOANITTI, G. A., LEITE, J. R. S. A. Lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays cytotoxic effect against human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 via the apoptotic-like pathway. **Food Research International**, v. 105, p. 184–196, 2018.

SCHRECKINGER, M. E., LOTTON, J., LILA, M. A., DE MEJIA, E. G. Berries from South America: A comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 233–246, 2010.

SCHULZ, M., BORGES, G. S. C., GONZAGA, L. V., SERAGLIO, S. K. T., OLIVO, I. S., AZEVEDO, M. S., NEHRING, P., GOIS, J. S.,

ALMEIDA, T. S., VITALI, L., SPUDEIT, D. A., MIKE, G. A., BORGES, D. L. G., FETT, R. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe deluis Martius*) during ripening. **Food Research International**, v. 77, n. 2, p. 125–131, 2015.

SELVAMUTHUKUMARAN, M., SHI, J. Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. **Food Quality and Safety**, v. 1, n. 1, p. 61–81, 2017.

SHI, J., NAWAZ, H., POHORLY, J., MITTAL, G., KAKUDA, Y., JIANG, Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods – Engineering and technology. **Food Reviews International**, v. 21, n. 1, p. 139–166, 2005.

SINGLETON, V. L., ROSSI, J. A., JR. Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic-phosphotungstic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SOUZA, F. A. L., ALBANEZ, J. R., SILVA, M. A. D. P. Perfil da Fruticultura 2014. Belo Horizonte: Governo do Estado de Minas Gerais – Secretaria de estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014, 85p.

SOUZA, M. S. B., VIEIRA, L. M., SILVA, M. J., LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554–559, 2011.

STAŠKO, A., BREZOVÁ, V., BISKUPIČ, S., MIŠKI, V. The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. **Free Radical Research**, v. 41, n. 4, p. 379–390, 2007.

THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L., BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 669–675, 2006.

TRIECHEL, M. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 88p.

TUHIN, R. H., BEGUM, M. M., RAHMAN, M. S., KARIM, R., BEGUM, T., AHMED, S. U., MOSTOFA, R., HOSSAIN, A., ABDEL-DAIM, M., BEGUM, R. Wound healing effect of *Euphorbia hirta* linn. (Euphorbiaceae) in alloxan induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 423, 2017.

VASCO, C., RUALES, J., KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and anti-oxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816–823, 2008.

VERMA, M., SINGH, J., KAUR, D., MISHRA, V., RAI, G. K. Effect of various dehydration methods and storage on physicochemical properties of guava powder. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 528–534, 2015.

YADAVA, U. L. Guava (*Psidium guajava* L.): An exotic tree fruit with potential in the Southeastern United States. **Hortscience**, v. 31, n. 5, p. 789–794, 1996.

YERMAKOV, A. I., ARASIMOV, V. V., YAROSH, N. P. (1987). Methods of biochemical analysis of plants. Leningrad: Agropromizdat 1987.

ZULKIFLI, K. S., ABDULLAH, N., ABDULLAH, A., AZIMAN, N., KAMARUDIN, W. S. S. W. Bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of selected fruit peels. International conference on environment, chemistry and biology IPCBEE Singapore: IACSIT Press, 2012.

DOI: 10.7763/IPCBEE.

CAPÍTULO 3: MÉTODOS VERDES DE EXTRAÇÃO COMO UMA FERRAMENTA PARA A OBTENÇÃO DE EXTRATOS RICOS EM FENÓLICOS A PARTIR DA POLPA E DO RESÍDUO DE PROCESSAMENTO DA GOIABA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.)

A polpa e o resíduo de goiaba se mostraram matérias-primas ricas em compostos fenólicos. Tanto os pós produzidos com estas matérias-primas, quanto os extratos obtidos a partir dos mesmos, apresentaram uma grande variedade de compostos, como ácidos fenólicos, flavonoides, aldeídos fenólicos, dentre outros. No extrato do resíduo de goiaba foi identificado, através da técnica LC-ESI-MS/MS, um total de 34 diferentes fenólicos, sendo o ácido elágico o composto majoritário em todas as amostras. Além disso, tanto o extrato da polpa quanto do resíduo apresentou uma alta atividade antioxidante, o que se deve à grande quantidade de fenólicos totais quantificada. Estas características conferem à goiaba o status de superfruta. Ademais, a técnica de extração assistida por ultrassom de sonda, usando-se uma mistura de etanol:água (30:70, v/v), se mostrou adequada para a recuperação de fenólicos a partir da goiaba e de seus subprodutos. Diante disso, o presente capítulo teve como foco investigar outros métodos emergentes de extração (extração por ultra-turrax, por banho ultrassônico e por líquido pressurizado) para recuperar os compostos fenólicos da polpa e do resíduo de goiaba. Para comparar a eficiência de cada técnica, foi determinada a composição fitoquímica, o perfil fenólico e a atividade antioxidante de cada extrato obtido. Dessa forma, objetivou-se propor métodos de extração menos prejudiciais ao meio ambiente e que tenham o potencial de serem aplicados comercialmente.

O conteúdo deste capítulo faz parte de um artigo submetido para publicação:

LIMA, R. S., DANIELSKI, G. C., MAZZUTTI, S., FERREIRA, S. R. S., VITALI, L., BLOCK, J. M. Green extraction methods as a tool to obtain phenolic-rich extracts from guava (*Psidium guajava* L.) pulp and processing waste. (Anexo D)

RESUMO

A goiaba (*Psidium guajava* L.) já foi anteriormente denominada como uma “superfruta” rica em compostos fenólicos. A polpa e o resíduo de processamento da goiaba podem ser uma fonte para a extração destes compostos. No entanto, as técnicas convencionais de extração são usualmente trabalhosas, demandam muito tempo e são prejudiciais ao meio ambiente devido ao uso de solventes tóxicos. Dessa forma, três métodos verdes de extração (extração por ultra-turrax, extração assistida por ultrassom de banho e extração por líquido pressurizado) foram estudados para a obtenção de extratos ricos em fenólicos a partir de pós de polpa e de resíduo de processamento da goiaba. Uma mistura de etanol:água (30:70, v/v) foi usada como solvente e os extratos foram analisados quanto ao teor total de fenólicos, flavonoides, flavonóis e taninos condensados. A atividade antioxidante foi avaliada pelos ensaios de DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP. O perfil fenólico das amostras foi determinado por LC-ESI-MS/MS. Os maiores teores de fenólicos (22,168 mg AGE g⁻¹), flavonoides (2,170 mg QE g⁻¹) e flavonóis (1,180 mg QE g⁻¹) dentre todos os extratos de polpa de goiaba foram obtidos com o uso da extração por ultra-turrax a 25 °C por 1 h. A extração por líquido pressurizado (PLE) por 30 min a 60°C/10 Mpa apresentou a melhor performance para a extração de flavonoides (9,196 mg QE g⁻¹), flavonóis (2,504 mg QE g⁻¹) e taninos condensados (11,498 mg CE g⁻¹) a partir do resíduo de goiaba. Esta é a primeira vez que a PLE é reportada para a extração de compostos fenólicos a partir de goiaba vermelha e seus subprodutos. Dentre os 39 compostos fenólicos identificados, escopoletina, resveratrol e naringina estão sendo reportados pela primeira vez nesta matéria-prima. Os principais fenólicos identificados nas amostras foram ácido elágico, ácido vanílico, ácido gálico e isoquercetina. Estes resultados indicam que extratos ricos em

compostos bioativos extraídos a partir de pós de goiaba podem ser utilizados como ingredientes para a formulação de alimentos funcionais.

Palavras-chave: compostos bioativos; extração por líquido pressurizado; ultra-turrax; extração assistida por ultrassom; LC-ESI-MS/MS.

3.1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais são definidos como aqueles que, além de cumprirem a função básica de nutrir, também carregam compostos específicos responsáveis por promover efeitos benéficos ao organismo (DIPLOCK et al., 1998). O termo foi originado no Japão nos anos 1980, quando o Ministério da Saúde e do Bem-Estar japonês estava estudando a possibilidade de estabelecer um sistema regulatório para alimentos que apresentassem benefícios à saúde (KAUR; SINGH, 2017).

Nos últimos anos, novas descobertas indicaram que a dieta impacta diretamente a saúde humana (LOBO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2010). Portanto, a demanda por alimentos funcionais tem crescido em todo o mundo, com um potencial de mercado estimado em \$192 milhões até o ano de 2020 (KAUR; SINGH, 2017). Além disso, o número de artigos científicos abordando este tópico têm crescido ao longo dos anos. De acordo com a plataforma Scopus, o número de publicações sobre alimentos funcionais saltou de 5.000 em 1998 para 35.000 em 2017 (GRANATO et al., 2017).

A incorporação de compostos bioativos em alimentos é uma das possíveis formas de se desenvolver um alimento funcional. Compostos bioativos são substâncias extra-nutricionais presentes em quantidades minoritárias em alimentos (KRIS-ETHERTON et al., 2002). Os mesmos são relacionados a diversos efeitos benéficos à saúde devido às suas propriedades antioxidantes, como a redução de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, Alzheimer, dentre outros (SKROVANKOVA et al., 2015).

Um procedimento de extração deve ser conduzido para separar os compostos bioativos de suas fontes naturais e, posteriormente, incorporá-los em alimentos funcionais. Diversos métodos de extração já foram reportados na literatura, tanto as técnicas convencionais (maceração e Soxhlet) quanto as não-convencionais (extração assistida por ultrassom – EAU, extração por líquido pressurizado – PLE e extração por fluido supercrítico – SFE). Os métodos convencionais de extração estão sendo substituídos pelos não-convencionais, com o objetivo de

reduzir e/ou eliminar o uso de solventes orgânicos tóxicos, reduzir o tempo de extração, assim como permitir a utilização de condições brandas de extração para prevenir a degradação dos compostos-alvo. As metodologias não-convencionais também são conhecidas como métodos de extração verdes ou ambientalmente amigáveis, uma vez que podem reduzir o consumo de energia, permitir o uso de solventes alternativos e produtos naturais renováveis, além de assegurar um extrato/produto seguro e de alta qualidade (CHEMAT et al., 2012). Um outro foco é o desenvolvimento de processos de extração que possam ser usados em escala industrial, o que não é possível com alguns dos métodos convencionais, como a maceração, por exemplo (SELVAMUTHUKUMARAN; SHI, 2017).

A EAU combinada a solventes GRAS (*Generally recognized as safe*) é uma das tecnologias verdes de extração mais populares e já foi utilizada para extrair os compostos bioativos de uma grande variedade de fontes vegetais, incluindo *Nephelium lappaceum* L., romã e amora (MARAN et al., 2017; GOULA et al., 2017; ESPADA-BELLIDO et al., 2017). O princípio da EAU está relacionado ao conceito de cavitação acústica, um fenômeno físico onde, em um meio líquido e sob frequências variando entre 20 kHz e 10 MHz, microbolhas são formadas, aumentam de tamanho e colapsam (MCCLEMENTS, 1995). A implosão destas bolhas gera um ponto de acesso transitório com elevada temperatura e pressão, o que aumenta a velocidade das reações químicas no meio. A cavitação acústica também causa a ruptura da parede celular, facilitando a penetração do solvente na matriz, o que permite a redução do tempo de extração e da quantidade de solvente utilizado (PINGRET et al., 2013).

Na técnica PLE, um solvente líquido é usado a elevadas temperaturas (até 200 °C) e pressões (de 35 a 200 bar) de forma a melhorar as propriedades de extração. As altas temperaturas promovem o decaimento da viscosidade do solvente, o que melhora sua habilidade de penetrar a amostra e solubilizar os compostos de interesse. Além disso, a temperatura também ajuda no rompimento das interações entre os compostos-alvo e a matriz, permitindo a difusão dos mesmos no solvente (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005). A pressão elevada também ajuda no rompimento de tais interações e no aumento da transferência de massa da substância-alvo para o solvente (ROSTAGNO et al., 2009). A PLE pode ser conduzida tanto em modo estático quanto dinâmico. No modo estático, a quantidade de solvente permanece constante ao longo do processo. Em contrapartida, no modo dinâmico, o solvente é constantemente bombeado e atravessa a amostra a uma taxa pré-estabelecida (MAZZUTTI et al., 2018).

Entretanto, equipamentos menos sofisticados também podem ser usados para a extração de compostos bioativos. O ultra-turrax é um dispositivo de homogeneização que fornece rotação de alta velocidade e ação de força propulsiva na amostra. Estas forças promovem um aumento da transferência de massa, expandindo o fluxo dos compostos de interesse para o solvente de extração (XU et al., 2016). A extração por ultra-turrax (UTE) já foi usada para a extração de compostos bioativos de diversas fontes naturais, como madressilva (XU et al., 2016) e *Olea europaea* (RYAN et al., 2001).

As frutas estão entre as fontes vegetais mais usadas para a extração de bioativos, uma vez que as mesmas são fontes ricas neste tipo de substância (LIU, 2003). A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma fruta popular em países tropicais. A mesma pode ser consumida *in natura* ou transformada em uma grande variedade de produtos, como sucos, geleias, doces, dentre outros. No Brasil, aproximadamente 30% do volume total processado de goiabas é perdido na forma de resíduo de processamento, composto por sementes, cascas e polpa residual (TRIECHEL, 2016). Entretanto, a goiaba e seus subprodutos apresentam um alto teor de substâncias antioxidantes, como carotenoides e compostos fenólicos (VERMA et al., 2015; LIMA et al., 2019). Lima et al. (2019) obtiveram extratos fenólicos a partir da polpa e do resíduo de goiaba usando-se extração assistida por ultrassom de sonda, com uma mistura de etanol:água (30:70, v/v) como solvente. Os autores encontram um teor de fenólicos totais (TFT) de 23,48 mg AGE g⁻¹ para polpa e 15,79 mg AGE g⁻¹ para o resíduo. Além disso, 37 compostos fenólicos foram identificados dentre as amostras analisadas, sendo o ácido elágico o majoritário. Porém, outras técnicas verdes de extração, como a PLE, ainda não foram reportadas para a extração de compostos fenólicos a partir da polpa e do resíduo de goiaba.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito das técnicas EAU de banho, PLE e UTE para a recuperação de fitoquímicos da polpa e do resíduo de processamento da goiaba, além de avaliar a atividade antioxidante dos diferentes extratos obtidos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Amostras

Goiabas vermelhas (*Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato) foram obtidas em um mercado local em outubro de 2017. As goiabas foram sanitizadas em uma solução de hipoclorito de sódio a 4% por 30 min e processadas ao atingirem grau III de maturação – Sólidos Solúveis Totais = 8,23% (AZZOLINI et al., 2004). Primeiramente, a polpa e o resíduo da fruta (sementes, cascas e resíduos de polpa) foram separadas usando-se uma despulpadeira (Brameitar peneira 2 mm, Campinas, Brasil). Em seguida, tanto a fração de polpa quanto a fração residual foram desidratadas de acordo com Nunes et al. (2016), com modificações. As amostras foram mantidas a 55 °C por 10 h em uma estufa com circulação forçada de ar (TE – 394/2 Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil). A polpa de goiaba em pó (PGP) e o resíduo de goiaba em pó (RGP) tiveram seus tamanhos de partícula ajustados para 0,500-0,550 mm e foram armazenados em frascos âmbar, inertizados com nitrogênio e mantidos a -24 °C para análises futuras.

3.2.2 Materiais

O reagente fenólico Folin-Ciocalteu, o ácido gálico, a vanilina, a (+)-catequina hidratada, o ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), o TPTZ (2,2'-2,4,6-tripiridiltriazina), o Trolox e os padrões fenólicos ultrapuros foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os padrões foram preparados como solução estoque (1000 mg L⁻¹ em 100% metanol de grau cromatográfico), armazenados a -24 °C e usados para o preparado de curvas de calibração por diluições apropriadas a partir da mistura. Todos os outros reagentes químicos e solvente utilizados nos experimentos foram de grau analítico (P.A.), adquiridos da Neon e da Sigma-Aldrich.

3.2.3 Extração de compostos fenólicos

Com a finalidade de se verificar o efeito de cada técnica de extração estudada, o solvente (etanol:água – 30:70, v/v) foi mantido o mesmo para todas as técnicas. A composição do solvente, assim como as condições experimentais de cada método de extração, fora determinada

em testes preliminares (resultados não apresentados). Ao final de cada processo de extração, os extratos obtidos foram filtrados a vácuo, concentrados em rotavapor a 40 °C (modelo 558, Fisatom, São Paulo-SP, Brasil), inertizados com nitrogênio e armazenados a -24 °C para análises futuras. Todas as extrações foram conduzidas em duplicata.

O rendimento das extrações (%) para cada técnica foi calculado dividindo-se a massa de extrato pela massa da amostra usada no processo.

3.2.3.1 Extração por ultra-turrax (UTE)

Em um béquer, amostras de PGP e RGP (1 g) foram diluídas em 15 mL do solvente de extração. Em seguida, o béquer foi levado a um homogeneizador ultra-turrax (modelo T25, IKA-Works, Staufen, Alemanha). O dispositivo foi ajustado a uma velocidade de rotação de 4.000 rpm e potência de 800 W. A extração foi conduzida a 25 °C por 1 h.

3.2.3.2 Extração assistida por ultrassom de banho (BEAU)

Em um Erlenmeyer, 1 g de PGP/RGP foi misturado a 15 mL de solvente de extração. O Erlenmeyer foi levado a um banho ultrassônico (modelo EGS 5HD, Enge Solutions, São Paulo-SP, Brasil) a uma frequência de 40 kHz e potência de 300 W. A extração foi conduzida a 25 °C por 30 min.

3.2.3.3 Extração por líquido pressurizado (PLE)

Um equipamento customizado multitarefas foi montado para a PLE, como descrito por Mazzutti et al. (2018). O equipamento consistia em um reservatório de solvente, do qual o solvente de extração era bombeado por uma bomba de HPLC (modelo 515, Waters, EUA, taxa de fluxo de 0,001 a 10 mL min⁻¹). O solvente foi aquecido a 60 °C por um banho de aquecimento (modelo MQBMP-01, Microquímica, Palhoça-SC, Brasil) e pressurizado a 10 MPa. Amostras de 4 g de PGP/RGP foram alocadas no compartimento de extração encamisado juntamente com miçangas de vidro (agente dispersante), onde o solvente foi bombeado em modo dinâmico a uma taxa de 2 mL/min. O processo foi conduzido por 30 min.

3.2.4 Caracterização dos extratos

Para a caracterização, os extratos foram apropriadamente diluídos com água ultrapura, metanol (para a análise de taninos condensados) ou etanol (para a análise de ABTS), como se segue: 1:30, v/v para os extratos de BEAU, 1:50, v/v para os extratos de UTE e 1:10, v/v para os extratos de PLE. A absorbância das amostras (com exceção da determinação de flavonoides) foi lida em um leitor de microplacas (Spectramax Paradigm, Molecular Devices, San Jose-CA, EUA).

3.2.4.1 Determinação do teor de fenólicos totais (TFT) por Folin-Ciocalteu

O protocolo para este ensaio foi desenvolvido por Singleton e Rossi (1965), com algumas modificações. Uma alíquota de 25 μL de extrato diluído foi colocada em uma microplaca, juntamente com 25 μL de reagente fenólico Folin-Ciocalteu, diluído em água ultrapura (1:3, v/v). Em seguida, 200 μL de água ultrapura foi adicionada. Após 5 min, foram adicionados 25 μL de uma solução de carbonato de sódio a 10% à microplaca, sendo essa mantida no escuro por 60 min a 25 °C. Em seguida, a absorbância foi lida em $\lambda = 725$ nm. Água ultrapura foi utilizada para o branco no lugar dos extratos. Uma curva de calibração foi preparada usando-se ácido gálico (98% de pureza) dissolvido em etanol (concentração final de 0,2 mg mL^{-1}), com concentrações variando entre 0 e 136 mg L^{-1} . Os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalente por g de amostra (mg AGE g^{-1} de amostra).

3.2.4.2 Determinação do teor de fenólicos totais (TFT) por Prussian Blue

A metodologia seguida foi desenvolvida por Price & Butler (1977) e modificada por Margraf et al. (2015). Brevemente, 100 μL de amostra diluída foram misturados a 100 μL de uma solução de cloreto férrico (III) hexahidratado a 0,5 mM em uma microplaca, reagindo por 2 min. Então, 100 μL de uma solução de ferricianeto de potássio a 0,5 mM foram adicionados à microplaca, sendo a absorbância lida a $\lambda = 725$ nm. Água ultrapura foi utilizada para o branco no lugar dos extratos. Uma solução de ácido gálico a 100 mg L^{-1} foi usada para o preparo de uma curva de calibração, com concentrações variando de 0 a 40 mg L^{-1} . Os resultados

foram expressos como mg de ácido gálico equivalente por g de amostra (mg AGE g⁻¹ de amostra).

3.2.4.3 Determinação de flavonoides

O protocolo reportado por Lee e Francis (1972) foi usado. Os extratos diluídos tiveram suas absorvâncias medidas em $\lambda = 374$ nm em um espectrofotômetro (SP 2000, Belphotonics, Piracicaba-SP, Brasil). A concentração de flavonoides foi calculada usando-se as Eq. 1 e 2.

$$Fator\ de\ diluição = \frac{vol_{extrato\ não-diluído} \times vol_{extrato\ diluído}}{Alíquota\ usada\ para\ diluir\ a\ amostra} \quad (1)$$

$$Flavonoides\ totais = \frac{Absorbância\ a\ 374\ nm \times fator\ de\ diluição}{76.6} \quad (2)$$

Os resultados foram expressos como mg de quercetina equivalente por g de amostra (mg QE g⁻¹ de amostra).

3.2.4.4 Determinação de flavonóis

A metodologia usada nesta determinação foi desenvolvida por Yermakov et al. (1987), com modificações. Brevemente, 80 μ L das amostras diluídas foram adicionados à microplaca, juntamente com 80 μ L de uma solução etanólica de cloreto de alumínio III hexahidratado a 2% e 120 μ L de uma solução de acetato de sódio 50 g L⁻¹. A microplaca foi mantida na ausência de luz por 2,5 h a 25 °C. A absorvância foi lida a $\lambda = 440$ nm. Água ultrapura foi usada como branco no lugar das amostras. Uma curva de calibração foi preparada com uma solução estoque de quercetin, com concentrações variando entre 0 e 80 mg L⁻¹. Os resultados foram expressos como mg de quercetina equivalente por g de amostra (mg QE g⁻¹ de amostra).

3.2.4.5 Determinação de taninos condensados

Os taninos condensados foram determinados de acordo com o protocolo descrito por Horszwald e Andlauer (2011). Primeiramente, amostras foram diluídas com metanol (1:50, v/v). Em seguida, uma alíquota de 25 μ L das amostras diluídas foi colocada em uma microplaca juntamente a uma mistura de 150 μ L de uma solução metanólica de vanilina a 4% e 25 μ L de uma solução metanólica de ácido sulfúrico a

32%. A microplaca foi incubada no escuro por 15 min a temperatura ambiente. O branco foi composto por metanol ao invés dos extratos. A absorbância foi medida em $\lambda = 500$ nm. Uma solução metanólica de catequina (concentração final de 300 mg L^{-1}) foi usada em concentrações variando de 0 a 240 mg L^{-1} para a curva de calibração. Os resultados foram expressos como mg de equivalente de catequina por 100 g de amostra ($\text{mg CE } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra).

3.2.4.6 DPPH

Este ensaio seguiu o método descrito por Brand-Williams et al. (1995), com modificações. As amostras diluídas ($40 \mu\text{L}$) foram colocadas em uma microplaca com $260 \mu\text{L}$ de uma solução metanólica de DPPH a $0,10 \text{ mM}$. A microplaca foi mantida no escuro por 30 min a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. O decaimento na absorbância foi registrando em $\lambda = 517$ nm. Água ultrapura foi usada para o branco. O poder antioxidante foi calculado usando-se a Eq. 3:

$$\% \text{ Inibição} = \left[1 - \left(\frac{A_{517 \text{ amostra}}}{A_{517 \text{ branco}}} \right) \right] \times 100 \quad (3)$$

3.2.4.7 DPPH modificado

O protocolo usado para esta determinação foi desenvolvido por Brand-Williams et al. (1995) e modificado por Staško et al. (2017). Brevemente, $40 \mu\text{L}$ de extrato diluído foram colocados em uma microplaca, juntamente com $260 \mu\text{L}$ de uma solução etanólica de DPPH a $0,10 \text{ mM}$ e $260 \mu\text{L}$ de uma solução tampão de fosfato de sódio monobásico a 50 mM pH 6,0. A mistura foi mantida em ausência de luz por 30 min a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. O decaimento na absorbância foi medido em $\lambda = 525$ nm. Água ultrapura foi usada como branco. O poder antioxidante foi calculado com a Eq. 4:

$$\% \text{ Inibição} = \left[1 - \left(\frac{A_{525 \text{ amostra}}}{A_{525 \text{ branco}}} \right) \right] \times 100 \quad (4)$$

3.2.4.8 ABTS

A metodologia descrita por Rufino et al. (2007) foi usada. $10 \mu\text{L}$ de amostras diluídas em etanol foram colocados em uma microplaca. Em

seguida, 290 μL de uma solução de radical ABTS^+ foi adicionada, e a microplaca foi mantida no escuro por 6 min. A absorbância das amostras foi lida em $\lambda = 734 \text{ nm}$. Etanol foi usado como branco. Uma solução estoque de ácido ascórbico 300 mg L^{-1} foi usada para o preparo de uma curva de calibração, com concentrações variando entre 30 e 300 mg L^{-1} . Os resultados foram expressos como mmol de ácido ascórbico equivalente por g de amostra (mmol AAE g^{-1} de amostra).

3.2.4.9 FRAP

Esta determinação seguiu o protocolo sugerido por Pulido et al. (2000). Amostras diluídas ($20 \mu\text{L}$) foram colocadas em uma microplaca juntamente com $280 \mu\text{L}$ de reagente FRAP recentemente preparado. AS amostras foram incubadas a 37°C por 30 min em um banho ultrassônico (modelo EGS 5HD, Enge Solutions, São Paulo-SP, Brasil). Em seguida, o decaimento na absorbância foi medido em $\lambda = 593 \text{ nm}$. Água ultrapura foi usada para o branco. Uma solução estoque de ácido ascórbico a 150 mg L^{-1} foi usada para preparar uma curva de calibração, com concentrações variando entre 15 e 150 mg L^{-1} . Os resultados foram expressos como mmol de ácido ascórbico equivalente por g de amostra (mmol AAE g^{-1} de amostra).

3.2.5 Identificação e quantificação de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS

3.2.5.1 Preparação das amostras

O protocolo seguido para a preparação das amostras foi sugerido por Schulz et al. (2015), com modificações. Uma alíquota de 1 mL de cada extrato foi adicionada a um tubo de ensaio com 5 mL de metanol e 5 mL de uma solução de ácido clorídrico 6 mol L^{-1} . Os tubos foram levados a uma estufa ($400/\text{D}200^\circ$, New Ethics, São Paulo-SP, Brasil) a 85°C , onde foram mantidos por 30 min para que ocorresse a hidrólise ácida. Em seguida, o pH das amostras foi ajustado para 2,0, usando-se uma solução de hidróxido de sódio 6 mol L^{-1} . A mistura foi transferida para um funil de separação com 10 mL de éter etílico, onde permaneceu em repouso até que ocorresse uma separação de fases. A fase inferior foi descartada e a fase éter foi transferida para um rotavapor (modelo 558, Fisatom, São Paulo-SP, Brasil) a 40°C , sendo o solvente removido até a secagem completa da amostra. 1 mL de metanol grau cromatográfico foi usado para ressuspender o resíduo seco. Esta fração foi diluída 10 vezes

com metanol:água (70:30, v/v) para a injeção no sistema de LC-ESI-MS/MS.

3.2.5.2 Análise de LC-ESI-MS/MS

Um total de 47 padrões fenólicos foram usados para esta análise. A identificação e a quantificação dos compostos fenólicos seguiram a metodologia descrita por Schulz et al. (2015) e foi conduzida em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC, 1200 Series, Agilent Technologies, Waldbronn-BW, Alemanha). A separação cromatográfica líquida foi conduzida com o uso de uma coluna Synergi (4,0 μm , 2,0 x 150 mm d.i.; Phenomex, Torrance-CA, EUA), sob gradiente de eluição. Dois tipos de misturas formaram a fase móvel, com a primeira consistindo em metanol (95%) e água (5%) – Canal A, e a segunda consistindo de água e ácido fórmico (0,1%, v/v) – Canal B. A separação aconteceu sob a temperatura de 30 °, usando-se gradiente de eluição segmentado, como se segue: 0-5 min, 10% A; 5-7 min, 90% A; 7-10 min, 90% A; 10-17 min, 10% A. A coluna foi condicionada com uma proporção da fase móvel inicial de separação por 5 min entre as análises. A taxa de fluxo foi de 150 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e 10 μL de cada amostra foram injetados no equipamento.

Um sistema de espectrofotômetro de massas foi acoplado com o sistema de HPLC. O MS consistiu-se de um espectrofotômetro de massa quadrupole triplo híbrido/armadilha de íons linear (Q Trap 3200 Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord-ON, Canada). O espectrofotômetro de massa foi operado em modo de ionização eletrospray negativo (TurboIonSpray, Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord-ON, Canada). Os parâmetros MS/MS foram: agulha capilar mantida a -4500 V; cortina de gás a 10 psi; temperatura a 400 °C; gás 1 a 45 psi; gás 2 a 45 psi e CAD gás médio. O software Analyst versão 1.5.1 foi usado para o controle do sistema de HPLC-ESI-MS/MS e análise de resultados.

3.2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas no software *R-project* 3.4.3 (2017). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), enquanto as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todas as extrações foram conduzidas em duplicata e todas as análises foram realizadas em triplicata e expressas como média \pm desvio padrão (SD).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização dos extratos

A Tabela 3.1 apresenta os resultados das determinações de fitoquímicos (TFT, flavonoides, flavonóis e taninos condensados), atividade antioxidante (DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP) dos extratos de polpa (EPG) e resíduo (ERG) de goiaba, obtidos por UTE, BEAU e PLE.

Tabela 3.1 – Teor de fenólicos totais, flavonoides, flavonóis, taninos condensados e atividade antioxidante (DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP) dos extratos de polpa e resíduo de goiaba (EPG e ERG, respectivamente) obtidos por extração por ultra-turrax, extração assistida por ultrassom de banho e extração por líquido pressurizado

Determinação	UTE		BEAU		PLE	
	EPG	ERG	EPG	ERG	EPG	ERG
Teor de Fenólicos Totais	22.168	12.268	8.750	10.290	14.878	22.660
–	±	±	±	±	±	±
Folin-Ciocalteu (mg AGE g⁻¹)	0.0217 ^a	0.0053 ^b	0.0076 ^c	0.0176 ^c	0.0716 ^b	0.0425 ^a
Teor de Fenólicos Totais	8.691	6.176	5.957	5.579	6.846	6.947
–	±	±	±	±	±	±
Prussian Blue (mg AGE g⁻¹)	0.0049 ^a	0.0332 ^b	0.0147 ^c	0.0011 ^c	0.0198 ^b	0.0210 ^b
Flavonoides (mg QE g⁻¹)	2.170	3.756	1.660	4.292	2.091	9.196
–	±	±	±	±	±	±
	0.0010 ^d	0.0050 ^c	0.0017 ^c	0.0040 ^b	0.0034 ^d	0.0045 ^a
Flavonóis (mg QE g⁻¹)	1.180	1.981	1.041	1.795	0.837	2.504
–	±	±	±	±	±	±
	0.0045 ^d	0.0020 ^b	0.0064 ^c	0.0310 ^b	0.0039 ^c	0.0059 ^a
Taninos Condensados (mg CE g⁻¹)	5.528	6.258	5.405	5.579	6.233	11.498
–	±	±	±	±	±	±
	0.0099 ^b	0.0050 ^b	0.0069 ^b	0.0134 ^b	0.0113 ^b	0.0170 ^a

DPPH (% inibição)	48.46 ± 0.0030 ^a	40.54 ± 0.0098 ^d	32.32 ± 0.0066 ^f	35.72 ± 0.0080 ^e	41.23 ± 0.0037 ^c	42.90 ± 0.0114 ^b
DPPH Modificado (% inibição)	41.34 ± 0.0092 ^a	25.43 ± 0.01199 ^d	21.65 ± 0.0278 ^f	25.15 ± 0.0155 ^e	29.12 ± 0.0094 ^c	32.77 ± 0.0156 ^b
ABTS (mmol AAE 100 g⁻¹)	37.41 ± 0.0215 ^a	12.93 ± 0.0195 ^d	10.28 ± 0.0533 ^e	12.88 ± 0.0032 ^d	17.56 ± 0.0329 ^e	36.20 ± 0.0239 ^b
FRAP (mmol AAE 100 g⁻¹)	32.21 ± 0.0099 ^a	17.15 ± 0.0421 ^d	16.55 ± 0.0206 ^f	16.95 ± 0.0078 ^e	17.62 ± 0.0346 ^e	31.67 ± 0.0243 ^b

*Resultados expressos como média ± desvio padrão. Resultados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$)

*Abreviações: FC = teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu, PB = teor de

O maior TFT dentre os EPGs foi alcançando para os extratos obtidos por UTE, seguidos daqueles obtidos por PLE e por BEAU. Este resultado foi observado tanto pelo ensaio de Folin-Ciocalteu quanto para o de Prussian Blue. Os menores valores obtidos pelo método de Prussian Blue podem ser explicados pelo fato de que o teste de Folin-Ciocalteu pode superestimar o conteúdo de fenólicos. Amostras de goiaba são especialmente susceptíveis a este tipo de efeito, pois esta fruta é rica em ácido ascórbico e açúcares redutores (BASHIR; ABU-GOUKH, 2003; EVERETTE et al., 2010). Lima et al. (2010) reportaram que os extratos de goiaba obtidos por EAU de sonda também apresentaram resultados discrepantes para TFT quando usando-se os ensaios de Folin-Ciocalteu (EPG = 23,48 mg AGE g⁻¹, ERG = 15,79 mg AGE g⁻¹) e de Prussian Blue (EPG = 5,18 mg AGE g⁻¹, ERG = 3,99 mg AGE g⁻¹).

Os ERGs obtidos por PLE e UTE apresentam os maiores TFTs, tanto pelo ensaio de Folin-Ciocalteu quanto pelo de Prussian Blue. Por outro lado, a BEAU mostrou-se menos eficiente, uma vez que os extratos obtidos por esta técnica apresentaram os menores níveis de TFT. Esses resultados podem ser explicados pela forma como a potência foi aplicada à amostra. Em banhos ultrassônicos, a potência não é completamente absorvida pela amostra, uma vez que a mesma é dissipada na água e atenuada pelas paredes da vidraria que contém a matriz. Em contrapartida, na UTE, o agitador é diretamente imerso na amostra, reduzindo a dissipação de energia e aumentando a eficiência de extração (CHEMAT et al., 2017a). Além disso, a UTE foi conduzida sob potência de 800 W,

enquanto a BEAU tinha uma potência de 300 W, o que também pode ter contribuído para tais resultados. Lima et al. (2019) usaram EAU de sonda com uma potência de 500 W para a extração de fenólicos a partir de PGP e RGP e reportaram um TFT de 23,483 mg g⁻¹ para EPG e 15,789 mg g⁻¹ em ERG. Este resultado é próximo do que foi encontrado para os extratos de goiaba obtidos por UTE no presente estudo.

A PLE pode ter superado a BEAU devido à sua combinação entre alta temperatura (60 °C) e pressão (10 Mpa). Na PLE, o solvente, com viscosidade reduzida, banha a amostra. Além disso, a temperatura minimiza a tensão superficial entre a interface da amostra, o solvente e os compostos-alvo, o que permite a formação de cavidades no material e a dissolução dos analitos no solvente (WANG, WELLER, 2006). A PLE já foi usada anteriormente para a extração de fenólicos de diversas matrizes vegetais, como casca de uva roxa, usando-se uma mistura acidificada de metanol:acetona:água (40:40:20) como solvente na condição otimizada (JU; HOWARD, 2003); maçã, com uma mistura de metanol:água (75:25) como solvente de extração na condição otimizada e amora, usando-se etanol:água (50:50) como solvente de extração na condição otimizada (MACHADO et al., 2015). Nestes estudos, a PLE permitiu a obtenção de maiores teores de fenólicos totais comparado às técnicas convencionais.

A UTE foi anteriormente utilizada para a extração de compostos fenólicos de goiaba fresca (polpa e casca) usando-se metanol como solvente (THAIPONG et al., 2006). Os autores reportaram TFTs entre 1,70 mg g⁻¹ e 3,449 mg g⁻¹ pelo ensaio de Folin-Ciocalteu. Musa et al. (2011) obtiveram resultados similares. Os autores usaram a UTE a 24.000 rpm por 1 min para extrair os compostos fenólicos a partir de goiabas inteiras frescas com uma mistura de etanol:água (50:50, v/v) como solvente, obtendo-se um TFT de 3,83 mg g⁻¹. Os autores também realizaram extração assistida por ultrassom de banho por 1 h, obtendo-se um TFT de 3,86 mg g⁻¹, não diferindo significativamente dos resultados obtidos usando-se UTE. Ambos estudos conseguiram TFTs menores que aqueles reportados no presente estudo. As diferenças entre os resultados podem ser atribuídas aos diferentes tipos de solventes e condições experimentais usadas, assim como a variedade da goiaba e as condições de cultivo.

O ERG obtido por PLE foi a amostra que apresentou a maior concentração de flavonoides, flavonóis e taninos condensados. Independentemente do método de extração, todos os extratos de resíduo de goiaba apresentaram maiores teores de flavonoides e flavonóis comparados aos extratos de polpa de goiaba. O teor de flavonoides totais em ERG foi 73% maior quando comparado ao EPG no UTE, 158% maior

no BEAU e 339% no PLE. O teor de flavonóis totais foi 68% maior no ERG obtido por UTE, 72% maior no obtido por BEAU e 199% maior no obtido por PLE comparados aos extratos de polpa de goiaba. Esta tendência também foi observada por Lima et al. (2019) para os extratos obtidos por EAU de sonda a partir de PGP e RGP, onde o ERG apresentou um teor de flavonoides totais 1,98 vezes maior que o EPG e um teor de flavonóis totais 3,15 vezes maior que o EPG. Tais dados indicam que, na goiaba, os flavonoides e flavonóis concentram-se majoritariamente na fração residual. Estes tipos de compostos já foram usados como substâncias antioxidantes em estudos clínicos e foram relacionados a propriedades anti-câncer (GEORGE et al., 2017; SAK, 2014) e anti-inflamatória (CASSIDY et al., 2015; ORTEGA et al., 2017), dentre outros benefícios à saúde. Tais evidências demonstram o potencial desta fração para ser usada como um ingrediente na formulação de alimentos funcionais.

Musa et al. (2015) analisaram o teor de flavonoides de duas variedades de goiaba vermelha, a Sungkai e a Semenyih. As amostras foram liofilizadas e os flavonoides foram extraídos usando-se metanol com um equipamento ultra-turrax a 90 °C por 2 h. Tanto a fruta inteira como a polpa (casca e sementes removidas) das duas variedades estudadas obtiveram um teor de flavonoides totais em torno de 0,5 mg g⁻¹, uma quantidade menor quando comparada aos resultados alcançados por todos os métodos de extração testados no presente trabalho. O uso de altas temperaturas por um tempo prolongado usadas por Musa et al. (2015) pode ter contribuído para a obtenção de resultados abaixo dos obtidos neste estudo.

Os resultados de taninos condensados em amostras de EPG mostraram que os métodos testados apresentam a mesma eficiência de extração para esta classe específica de fenólicos. Por outro lado, para as amostras de ERG, a PLE permitiu uma maior extração de taninos condensados quando comparada à BEAU e à UTE. Moreno et al. (2014) reportaram um menor teor de taninos condensados para goiaba liofilizada (2,0802 mg g⁻¹) em comparação ao presente trabalho (5,405 mg g⁻¹ e 5,579 mg g⁻¹ para EPG e ERG, respectivamente). Uma solução de acetona:água (70:30, v/v) foi usada como solvente em um banho ultrassônico por 30 min à temperatura ambiente (potência e frequência ultrassônicas não mencionadas). A diferença nos resultados pode ser atribuída ao tipo de solvente. Misturas de etanol são largamente conhecidas pela eficiência na extração de diferentes classes de compostos fenólicos (MUSTAFA; TURNER, 2011).

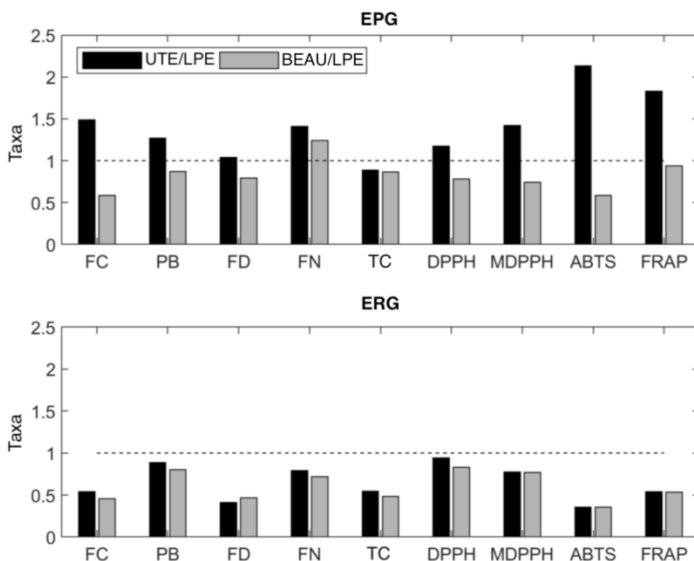
A atividade antioxidante medida por DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP seguiram a mesma tendência. Dentre as amostras de EPG, aqueles obtidos por UTE exibiram a maior atividade antioxidante, seguidos pelos extratos da PLE e da BEAU, respectivamente. Estes resultados estão em concordância com os resultados de TFT. Em outras palavras, os extratos com TFT mais altos exibiram maior atividade antioxidante. Lima et al. (2019) reportaram este mesmo comportamento para EPG e ERG extraídos por EAU de sonda, onde as amostras de EPG apresentaram maior TFT e atividade antioxidante por todos os ensaios testados.

Os resultados de atividade antioxidante medidos por DPPH modificado foram mais baixos que aqueles medidos pelo DPPH clássico em todas as amostras. Isto pode ser explicado pelo fato de que o DPPH clássico é afetado pela desprotonação do DPPHH (a forma reduzida do radical DPPH*), o que leva a uma superestimação dos resultados (STAŠKO et al., 2007).

Musa et al. (2015) analisaram a atividade antioxidante da *Psidium guajava* L. cv. Sungkai e Semenyih pelo ensaio FRAP. O extrato obtido da casca da variedade Semenyih com o maior teor de TFT também apresentou maior atividade antioxidante (841 μM Trolox g^{-1} b.u.). O mesmo efeito foi previamente observado por Musa et al. (2011) ao comparar diferentes técnicas de extração de fenólicos para a goiaba vermelha. Os extratos obtidos pela ultrasonicação por 1 h e a extração por ultra-turrax por 1 min foram responsáveis pelas maiores atividades antioxidantes pelo teste de FRAP (42,90 mg TE g^{-1} b.u. e 41,60 mg TE g^{-1} b.u., respectivamente). Ambas amostras corresponderam aos extratos com maiores teores de fenólicos totais. Rojas-Barquera e Narváez-Cuenca (2009) avaliaram a atividade antioxidante de extratos fenólicos obtidos a partir da goiaba, usando-se uma solução de metanol:água (50:50, v/v) sob constante agitação por 30 min a 50 °C. A amostra com a maior atividade antioxidante obteve 107,3 μmol Trolox g^{-1} , com um TFT de 5,08 mg g^{-1} , o maior dentre todas as amostras.

A Figura 3.1 mostra a taxa entre UTE e PLE para cada classe de compostos fenólicos e determinação de atividade antioxidante em EPG e ERG, com o objetivo de demonstrar quais os métodos mais eficientes na liberação de substâncias de interesse da matriz.

Figura 3.1 – Taxa entre UTE e PLE e entre BEAU e PLE para cada determinação fitoquímica e ensaio de atividade antioxidante nos extratos de polpa (EPG) e de resíduo de goiaba (ERG)



*Abreviações: FC = teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu, PB = teor de fenólicos totais por Prussian Blue, FD = flavonoides, FN = flavonóis, TC = taninos condensados, MDPPH = DPPH modificado. Valores maiores que 1 demonstram que o outro método exibiu uma melhor performance que o PLE para um parâmetro específico

A UTE foi o método mais efetivo para a extração dos compostos fenólicos da polpa de goiaba em pó, exceto para taninos condensados. Além disso, o EPG extraído por UTE demonstrou a mais alta atividade antioxidante em todos os ensaios. Contrariamente, a PLE foi a técnica mais efetiva para a extração de fenólicos a partir do resíduo de goiaba em pó, o que foi confirmado por todas as análises fitoquímicas e antioxidantes.

3.3.1 Perfil fenólico

A Tabela 3.2 apresenta os compostos fenólicos identificados e quantificados pela análise de LC-ESI-MS/MS para as amostras de EPG e ERG obtidas por UTE, BEAU e PLE. Os parâmetros de identificação e

quantificação dos compostos fenólicos, assim como o tempo de retenção, íon parente, íon quantitativo e os limites de identificação e quantificação podem ser encontrados no Material Suplementar (Anexo B).

Tabela 3.2 – Perfil fenólico dos extratos de polpa (EPG, mg g⁻¹ de amostra) e resíduo (ERG, mg g⁻¹ de amostra) de goiaba obtidos por extração por ultra-turrax (UTE), extração assistida por ultrassom de banho (BUAE) e extração por líquido pressurizado (PLE)

Composto fenólico	UTE		BEAU		PLE		
	EPG	ERG	EPG	ERG	EPG	ERG	
<i>Ácidos Fenólicos</i>							
1	Ácido Salicílico	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,0056 ± 0,0009
2	Ácido Cinâmico	0,1357 ± 0,0213 ^a	0,0578 ± 0,0107 ^a	0,0991 ± 0,0076 ^a	0,0876 ± 0,0165 ^a	0,1148 ± 0,0203 ^a	0,0907 ± 0,0160 ^a
3	Ácido Mandélico	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,0243 ± 0,0162
4	Ácido 4-Hidroximetilbenzóiico	0,0087 ± 0,0012 ^a	0,0074 ± 0,0006 ^a	0,0073 ± 0,001 ^a	0,0084 ± 0,0005 ^a	0,0120 ± 0,0065 ^a	0,0074 ± 0,0018 ^a
5	Ácido Protocatecúico	0,2292 ± 0,0442 ^a	0,0665 ± 0,0121 ^b	0,1426 ± 0,0388 ^b	0,1273 ± 0,0255 ^b	0,1098 ± 0,0162 ^b	0,1015 ± 0,0252 ^b
6	Ácido p-cumárico	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,0098 ± 0,0007 ^b	0,0146 ± 0,0025 ^a
7	Ácido Caféico	nd ²	nd	nd	nd	nd	0,0901 ± 0,0079
8	Ácido Vanílico	2,377 ± 0,2387 ^a	0,7377 ± 0,2252 ^b	1,548 ± 0,5212 ^a b	1,876 ± 0,3433 ^{a,b}	0,9631 ± 0,3099 ^{b,c}	0,9009 ± 0,0809 ^{b,c}

9	Ácido Gálico	0,9092 ± 0,1634 ^a	0,1980 ± 0,0369 ^b	0,7766 ± 0,0930 ^a	0,3337 ± 0,0803 ^b	0,0464 ± 0,0068 ^c	0,3364 ± 0,0668 ^b
10	Ácido Ferúlico	0,1827 ± 0,0817 ^b	0,0173 ± 0,0055 ^b	0,1545 ± 0,0228 ^b	0,0387 ± 0,0076 ^b	0,5173 ± 0,0258 ^b	1,765 ± 0,5555 ^a
11	Ácido Siringico	0,1305 ± 0,0264 ^a	0,0463 ± 0,0115 ^b	0,1155 ± 0,0264 ^a	0,0729 ± 0,0067 ^{a,b}	0,0882 ± 0,0415 ^{a,b}	0,0463 ± 0,0101 ^b
12	Ácido Sinápico	0,0504 ± 0,0088 ^a	0,0126 ± 0,0037 ^b	0,0200 ± 0,0029 ^b	0,0140 ± 0,0058 ^b	0,0058 ± 0,0025 ^b	0,0232 ± 0,0099 ^b
13	Ácido Elágico	5,126 ± 0,1380 ^a	0,6968 ± 0,0945 ^c	3,774 ± 0,7371 ^b	1,314 ± 0,1299 ^{d,e}	2,362 ± 0,3454 ^c	1,877 ± 0,3139 ^d
14	Ácido Clorogênico	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,0448 ± 0,0007
15	Ácido Rosmarínico	<LOQ	nd	nd	nd	<LOQ	<LOQ
Flavonoides							
16	Crisina	nd	nd	nd	nd	0,0161 ± 0,0040 ^b	0,1258 ± 0,0188 ^a
17	Pinocebrina	0,0099 ± 0,0013 ^c	0,0166 ± 0,0057 ^c	0,0114 ± 0,0029 ^c	0,0315 ± 0,0062 ^b	0,0053 ± 0,0026 ^c	0,0684 ± 0,0129 ^a
18	Apigenina	0,0160 ± 0,0005 ^b	0,0157 ± 0,0003 ^b	0,0156 ± 0,0007 ^b	0,0157 ± 0,0003 ^b	0,0558 ± 0,0159 ^b	0,8297 ± 0,3749 ^a
19	Galangina	<LOQ	0,0104 ± 0,0019 ^b	<LOQ	0,0264 ± 0,0159 ^a	<LOQ	0,0163 ± 0,0043 ^b

20	Naringenina	0,0112 ± 0,0006 ^b	0,0066 ± 0,0009 ^b	0,0122 ± 0,0018 ^b	0,0128 ± 0,0009 ^b	0,0167 ± 0,0045 ^b	0,0774 ± 0,0169 ^a
21	Kaempferol	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,2994 ± 0,0459
22	Eriodictiol	0,0033 ± 0,0009 ^c	<LOQ	0,0033 ± 0,0006 ^c	0,0031 ± 0,0002 ^c	0,0135 ± 0,0006 ^b	0,0390 ± 0,0044 ^a
23	Aromadendrina	0,1791 ± 0,0166 ^a	0,0520 ± 0,0243 ^b	0,1498 ± 0,0305 ^a	0,0762 ± 0,0179 ^b	0,1190 ± 0,0202 ^a	0,1889 ± 0,0433 ^a
24	Fustina	<LOQ	0,0065 ± 0,0007 ^b	<LOQ	<LOQ	0,0144 ± 0,0020 ^a	0,0075 ± 0,0004 ^b
25	Catequina	<LOQ	0,0074 ± 0,0048 ^a	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,0057 ± 0,0017 ^a
26	Epicatequina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
27	Hispidulina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,0286 ± 0,0079 ^a	0,0865 ± 0,0216 ^a
28	Quercetina	<LOQ	nd	nd	<LOQ	nd	1,521 ± 0,6803
29	Taxifolina	0,0782 ± 0,0064 ^a	0,0353 ± 0,0078 ^b	0,0499 ± 0,0068 ^b	0,0488 ± 0,0082 ^b	0,0391 ± 0,0074 ^b	0,0559 ± 0,0144 ^a
30	Miricetina	0,0927 ± 0,0048 ^b	0,0672 ± 0,0077 ^b	0,0702 ± 0,0069 ^b	0,1171 ± 0,0105 ^b	0,0630 ± 0,118 ^b	0,2451 ± 0,0541 ^a
31	Isoquercetina	0,7179 ± 0,2861 ^b	0,1597 ± 0,0563 ^b	0,2021 ± 0,1837 ^b	0,9073 ± 0,0996 ^b	0,0881 ± 0,0275 ^b	3,239 ± 1,072 ^a
32	Naringina	nd	nd	nd	nd	<LOQ	nd

<i>Aldeídos Fenólicos</i>							
33	Vanilina	0,0457 ± 0,0187 ^a	0,0539 ± 0,0107 ^a	0,0844 ± 0,0276 ^a	0,0582 ± 0,0149 ^a	0,0676 ± 0,0294 ^a	0,0698 ± 0,0160 ^a
34	Coniferaldeído	0,0115 ± 0,0019 ^b	0,0097 ± 0,0018 ^b	0,0106 ± 0,0022 ^b	0,0174 ± 0,0057 ^b	0,1055 ± 0,0052 ^a	0,0292 ± 0,0188 ^b
35	Siringaldeído	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
36	Sinapaldeído	0,0076 ± 0 ^c	0,0042 ± 0 ^d	0,0048 ± 0,0010 ^d	<LOQ	0,0290 ± 0,0048 ^a	0,0113 ± 0,0050 ^b
<i>Cumarina</i>							
37	Umbeliferona	0,0064 ± 0,0006 ^c	<LOQ	0,0060 ± 0,0018 ^c	<LOQ	0,0142 ± 0,0027 ^b	0,0241 ± 0,0039 ^a
38	Escopoletina	0,0104 ± 0,0018 ^a	0,0044 ± 0,0001 ^b	0,0075 ± 0,0028 ^b	0,0046 ± 0,0004 ^b	0,0149 ± 0,0037 ^a	0,0093 ± 0,0009 ^b
<i>Diterpeno Fenólico</i>							
39	Carnosol	<LOQ	nd	<LOQ	nd	0,0121 ± 0,0023 ^b	0,3912 ± 0,0073 ^a
<i>Estilbenóide</i>							
40	Resveratrol	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Teor de Fenólicos Totais (mg g⁻¹)		10,34	2,290	7,265	5,192	4,911	12,67

² Não detectado, <LOQ – não quantificado. Os resultados seguidos pela mesma letra na linha não diferem significativamente (teste *t*, *p* < 0,05)

O ERG obtido por PLE apresentou o maior número de fenólicos identificados (39), seguido pelo EPG obtido por PLE, EPG obtido por BEAU, ERG obtido por BEAU e, finalmente, ERG obtido por UTE (38, 37, 35, 35 e 33 compostos identificados, respectivamente). Todas as amostras de extratos foram majoritariamente compostas por ácido elágico (13), ácido vanílico (8), ácido gálico (9) e isoquercetina (31). Os extratos

da PLE também apresentaram teores significativos de ácido ferúlico (**10**, EPG e ERG), aromadendrina (**23**, EPG) e quercetina (**28**, ERG).

Ácido elágico (**13**), ácido vanílico (**8**), ácido gálico (**9**), ácido ferúlico (**10**), quercetina (**28**), isoquercetina (**31**) e aromadendrina (**23**) já foram reportados anteriormente em goiaba e seus subprodutos (LIMA et al., 2019; ADEMILUYI et al., 2016; ZULKIFLI et al., 2012; FLORES et al., 2015; ROJAS-GARBANZO et al., 2017; NUNES et al., 2016; ONGPHIMAI et al., 2013; LIN; YIN, 2012; FLORES et al., 2013). Dentre eles, ácido elágico (**13**), quercetina (**28**) e ácido gálico (**9**) já foram reportados como os compostos majoritários encontrados nesta matéria-prima (LIMA et al., 2019; FLORES et al., 2013; ZULKIFLI et al., 2012; NUNES et al., 2016; ONGPHIMAI et al., 2013; LIN; YIN, 2012).

Escopoletina (**38**, presente em todas as amostras), resveratrol (**40**, presente em todas as amostras) e naringina (**32**, presente em EPG obtido por PLE) foram identificados pela primeira vez em goiaba vermelha. A escopoletina já foi associada à inibição de células carcinogênicas (LIU et al., 2001), à proteção contra hiperglicemia (CHANG et al., 2015; KALPANA et al., 2018), dentre outros benefícios à saúde. O resveratrol já foi reportado como parte dos mecanismos protetivos em doença renal (ALBERTONI; SCHOR, 2015), enquanto a naringina já demonstrou atividade anti-câncer (KUMAR; VERMA, 2017) e anti-inflamatória (CHTOUROU et al., 2016).

Lima et al. (2019) identificaram um total de 37 fenólicos dentre as amostras de PGP, RGP, EPG e ERG, onde os compostos foram extraídos por EAU de sonda. Entretanto, no presente estudo, 39 compostos foram identificados no ERG obtido por PLE, o que representa o maior número de compostos fenólicos já reportado para esta matéria-prima.

O teor de fenólicos totais quantificado por LC-ESI-MS/MS confirmou que o ERG obtido por PLE, juntamente com o EPG obtido por UTE apresentaram os maiores teores de fenólicos (12,67 mg g⁻¹ e 10,34 mg g⁻¹, respectivamente). Isto também foi detectado pelos ensaios de Folin-Ciocalteu e Prussian Blue.

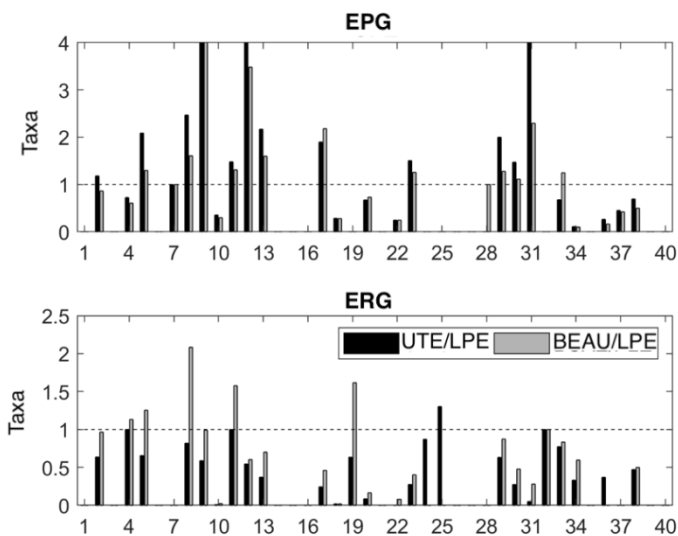
É interessante notar que, em todas as amostras o TFT determinado por LC-ESI-MS/MS foi menor que o TFT estimado por Folin-Ciocalteu. Já os resultados para o TFT estimado por Prussian Blue foram mais próximos àqueles estimados por LC-ESI-MS/MS. Assim sendo, o Prussian Blue se confirma mais uma vez como um método mais adequado para a estimada do teor de fenólicos totais em uma amostra, em detrimento do ensaio de Folin-Ciocalteu.

Lima et al. (2019) identificaram, por meio da análise de LC-ESI-MS/MS, um total de 34 fenólicos em ERG e 32 fenólicos em EPG usando-

se EAU de sonda. A quantificação dos compostos fenólicos mostrou que o EPG obteve um TFT de $10,63 \text{ mg g}^{-1}$, próximo ao que foi encontrado no presente estudo para o EPG obtido por UTE. Apesar de o UTE ter apresentado um maior número de compostos identificados (37 fenólicos) em comparação ao EAU de sonda, ambos os métodos podem ser considerados equivalentes em termos de TFT quantificado por LC-ESI-MS/MS. Contrariamente, o PLE mostrou-se uma técnica mais eficiente que o EAU de sonda para a recuperação de fenólicos a partir de RGP. Com o uso de LC-ESI-MS/MS, foi possível quantificar um TFT de $4,327 \text{ mg g}^{-1}$ em ERG extraído por UAE de sonda, um resultado inferior ao que foi encontrado para o ERG extraído por PLE ($12,67 \text{ mg g}^{-1}$). Além disso, o número de fenólicos identificados em ERG obtido por PLE também ultrapassou o número de compostos identificados no ERG obtido por EAU de sonda.

A Figura 3.2 mostra como a técnica de extração afetou cada fenólico quantificável.

Figura 3.2 – Taxa entre UTE e PLE e entre BEAU e PLE para cada composto fenólico quantificado no extrato de polpa de goiaba (EPG) e no extrato de resíduo de goiaba (ERG)*



* O número do fenólico correspondente pode ser encontrado na Tabela 3.1. Valores maiores que 1 demonstram que o outro método obteve uma melhor

performance no que diz respeito à preservação de um fenólico específico que o PLE

No EPG, as relações UTE/PLE e BEAU/PLE mostram que a BEAU e a UTE preservaram um maior número de compostos quando comparado ao PLE. Este último exibiu um decaimento significativo no teor de ácido gálico (9) e isoquercetina (31), dois dos principais compostos encontrados em goiaba vermelha. O mesmo efeito foi também observado para ácido sinápico (12). Em contrapartida, na amostra de ERG, a PLE demonstrou ser capaz de extrair uma maior quantidade da maioria dos compostos, especialmente flavonoides e aldeídos fenólicos. O perfil fenólico confirmou os resultados obtidos pela determinação fitoquímica e pelos ensaios de atividade antioxidante.

3.4 CONCLUSÕES

A polpa e o resíduo de processamento da goiaba demonstraram ser fontes ricas em compostos fenólicos com propriedade antioxidante. O uso de LC-ESI-MS/MS permitiu a identificação de escopoletina, resveratrol e naringina, que não haviam sido reportados anteriormente para goiaba vermelha.

A extração por ultra-turrax demonstrou ser o método mais eficaz para a extração de fenólicos a partir da polpa de goiaba em pó, o que pôde ser confirmado pelo perfil fenólico, pelo maior teor de fitoquímicos e pela maior atividade antioxidante dentre os extratos de polpa de goiaba. Esta é uma técnica econômica e fácil de ser conduzida. Porém, o procedimento de extração é mais demorado que outros métodos e apenas uma amostra pode ser conduzida por vez.

A extração por líquido pressurizado foi aplicada pela primeira vez em goiaba vermelha e seus subprodutos, demonstrando ser a técnica mais efetiva para a extração de fenólicos do resíduo de goiaba em pó. Este resultado foi confirmado por todas as determinações fitoquímicas e pelos ensaios de atividade antioxidante. Além disso, 39 compostos fenólicos foram identificados no ERG obtido por PLE. Este é o maior número de fenólicos identificados já reportado para esta matéria-prima. A PLE requer um menor tempo de extração que a UTE sob as condições exploradas neste trabalho e pode ser escalonada. O custo do equipamento permanece como sua maior desvantagem.

A extração assistida por ultrassom de banho mostrou ser um meio-termo entre a PLE e a UTE, obtendo resultados melhores que o PLE,

porém, sendo menos efetivo que o UTE para PGP. Para RGP, a BEAU apresentou melhores resultados que a UTE. Por outro lado, a PLE se mostrou mais eficiente, especialmente na preservação de compostos fenólicos. Uma das vantagens da BEAU é seu baixo custo, baixo tempo de extração e possibilidade de condução de vários experimentos de uma única vez.

Os métodos verdes de extração apresentados neste trabalho, juntamente com o solvente escolhido, foram capazes de gerar extratos ricos em fenólicos a partir da polpa e do resíduo de goiaba, com uma grande variedade de compostos e alta atividade antioxidante *in vitro*. Pesquisas futuras devem investigar o uso de tecnologias verdes de extração para outros tipos de compostos bioativos presentes nesta matriz vegetal, assim como a aplicação destes extratos em formulações de alimentos funcionais.

Referências bibliográficas

ADEMILUYI, A. O., OBOH, G., OGUNSUYI, O. B., OLORUNTOBA, F. M. A comparative study on antihypertensive and antioxidant properties of phenolic extracts from fruit and leaf of some guava (*Psidium guajava* L.) varieties. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, p. 363-374, 2016.

ALBERTONI, G., SCHOR, N. Resveratrol desempenha importante papel no mecanismo de proteção na doença renal – mini revisão. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 37, n. 1, 2015.
DOI: 10.5934/0101-2800.20150015.

ALONSO-SALCES, R. M., KORTA, E., BARRANCO, A., BERRUETA, L. A., GALLO, B., VICENTE, F. Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. **Journal of Chromatography A**, v. 933, n. 1-2, p. 37-43, 2001.

AZZOLINI, M., JACOMINO, A. P., BRON, I. U. Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n.2, p. 139-145, 2004.

BASHIR, H. A., ABU-GOUKH, A-B. A. Compositional changes during guava fruit ripening. **Food Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 557-563, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of free-radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R., RODRÍGUEZ-GONZALO, E., REVILLA-RUIZ, P., HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1-2, p. 1-17, 2005.

CASSIDY, A., ROGERS, G., PETERSON, J. J., DWYER, J. T., LIN, H., JACQUES, P. F. Higher dietary anthocyanin and flavonol intakes are associated with anti-inflammatory effects in a population of US adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 172-181, 2015.

CHANG, W-C., WU, S-C., XU, K-D., LIAO, B-C., WU, J-F., CHENG, A-S. Scopoletin protects against methylglyoxal-induced hyperglycemia and insulin resistance mediated by suppression of advanced glycation endproducts (AGEs) generation and anti-glycation. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2786-2801, 2015.

CHEMAT, F., VIAN, M. A., CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 8615-8627, 2012.

CHEMAT, F., ROMBAUT, N., MEULLEMIESTRE, A., TURK, M., PERINO, S., FABIANO-TIXIER, A-S., ABERT-VIAN, M. Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 41, p. 357-377, 2017a.

CHEMAT, F., ROMBAUT, N., SICAIRES, A-G., MUELLE-MIESTRE, A., FABIANO-TIXIER, A-S., ALBERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products – Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications, a review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540-560, 2017b.

CHTOUROU, Y., AOUEY, B., AROUI, S., KEBIECHE, M., FETOUI, H. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of naringin on cisplatin-induced renal injury in the rat. **Chemico-Biological Interactions**, v. 243, p. 1-9, 2016.

CZECHOWSKA-BISKUP, R., ROKITA, B., LOTFY, S., ULANSKI, P., ROSIAK, J. M. Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 2, p. 175-184, 2005.

DIPLOCK, A. T., CHARULEUX, J-L., CROZIER-WILLI, G., KOK, F. J., RICE-EVANS., ROBERFROID, M., STAHL, W., VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. S1, p. S77-S112, 1998.

ESPADA-BELLIDO, E., FERREIRO-GONZÁLEZ, M., CARRERA, C., PALMA, M., BARROSO, C. G., BARBERO, G. F. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. **Food Chemistry**, v. 219, p. 23-32, 2017.

EVERETTE, J. D., BRYANT, Q. M., GREEN, A. M., ABBEY, Y. A., WANGILA, G. W., WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14), p. 8139-8144, 2010.

FENG, H., BARBOSA-CANOVAS, G., WEISS, J. **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. 2011th ed. Springer, 2010.

FLORES, G., DASTMALCHI, K., WU, S-B., WHALEN, K., DABO, A. J., REYNERTSON, K. A., FORONJY, R. F., D'ARMIENTO, J. M., KENNELLY, E. J. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 889-895, 2013.

FLORES, G., WU, S-B., NEGRIN, A., KENNELLY, E. J. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. **Food Chemistry**, v. 170, p. 327-335, 2015.

GEORGE, V. C., DELLAIRE, G., RUPASINGHE, V. Plant flavonoid in cancer chemoprevention: role in genome stability. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 45, p. 1-14, 2017.

GOULA, A. M., VERVERI, M., ADAMOPOULOU, A., KADERIDES, K. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate

wastes using vegetable oils. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 821-830, 2017.

GRANATO, D., NUNES, D. S., BARBA, F. J. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: proposal. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 13-22, 2017.

HORSZWALD, A., ANDLAUER, W. Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. **Journal of Berry Research**, v. 1, p. 189-199, 2011.

JU, Z. Y., HOWARD, L. R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5207-5213, 2003.

KALPANA, K., PRIYA, C. S., DIPTI, N., VIDHYA, R., ANURADHA, C. V. Supplementation of scopoletin improves insulin sensitivity by attenuating the derangements of insulin signaling through AMPK. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2018.

DOI: 10.1007/s11010-018-3432-7.

KAUR, N., SINGH, D. P. Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. **Appetite**, v. 112, p. 167-187, 2017.

KRIS-ETHERTON, P. M., HECKER, K. D., BONANOME, A., COVAL, S. M., BINKOSKI, A. E., HILPERT, K. F., GRIEL, A. E., ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**, v. 113, p. 71S-88S, 2002.

KUMAR, V., VERMA, A. Naringin: a novel anticancer candidate against chemically induced hepatocellular carcinoma in rats. **European Journal of Cancer**, v. 72, p. S77, 2017.

LEE, D. H., FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **Hortscience**, v. 7, p. 83-84, 1972.

LIMA, R. S., FERREIRA, S. R. S., VITALI, L., BLOCK, J. M. May the superfruit red guava and its processing waste be a potential ingredient in

functional foods?. **Food Research International**, v. 115, p. 451-459, 2019.

LIN, C-Y., YIN, M-C. Renal protective effects of extracts from guava fruit (*Psidium guajava* L.) in Diabetic Mice. **Plant Foods and Human Nutrition**, v. 67, p. 303-308, 2012.

LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 517S-520S, 2003.

LIU, X. L., ZHANG, L., FU, X. L., CHEN K., QIAN, B. C. Effect of scopoletin on PC3 cell proliferation and apoptosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 22, n. 10, p. 929-933, 2001.

LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A., CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacognosy Review**, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

MACHADO, A. P. F., PASQUEL-REÁTEGUI, J. L., BARBERO, G. F., MARTÍNEZ, J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. **Food Research International**, v. 77, n. 3, p. 675-683, 2015.

MAKINO, K., MOSSOBA, M. M., RIESZ, P. Chemical effects of ultrasound on aqueous solutions. Formation of hydroxyl radicals and hydrogen atoms. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 87, n. 8, p. 1369-1377, 1983.

MARAN, J. P., MANIKANDAN, S., NIVETHA, C. V., DINESH, R. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 1, p. S1145-S1157, 2017.

MARGRAF, T., KARNOPP, A. R., ROSSO, N. D., GRANATO, D. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-well microplates. **Journal of Food Science**, v. 80, p. 2397-2403, 2015.

MAZZUTTI, S., RODRIGUES, L. G. G., MEZZOMO, N., VENTURI, V., FERREIRA, S. R. S. Integrated green-based processes using supercritical CO₂ and pressurized ethanol applied to recover antioxidant compounds from cocoa (*Theobroma cacao*) bean hulls. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 135, p. 52-59, 2018.

MCCLEMENTS, D. J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 9, p. 293-299, 1995.

MONTEIRO, C. A., LEVY, R. B., CLARO, R. M., CASTRO, I. R. R. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. **Public Health Nutrition**, v. 14, n. 1, p. 5-13, 2010.

MORENO, M. A., ZAMPINI, I. C., COSTAMAGNA, M., SAYAGO, J. E., ORDOÑEZ, R. M., ISLA, M. I. Phytochemical composition and antioxidant capacity of *Psidium guajava* fresh fruits and flour. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 725-732, 2014.

MUSA, K. H., ABDULLAH, A., JUSOH, K., SUBRAMANIAM, V. Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): effect of extraction techniques and solvents. **Food Analytical Methods**, v. 4, p. 100-107, 2011.

MUSA, K. H., ABDULLAH, A., SUBRAMANIAM, V. Flavonoid profile and antioxidant activity of pink guava. **ScienceAsia**, v. 41, p. 149-154, 2015.

MUSTAFA, A., TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8-18, 2011.

NUNES, J. C., LAGO, M. G., CASTELO-BRANCO, V. N., OLIVEIRA, F. R., TORRES, A. G., PERRONE, D., MONTEIRO, M. Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders. **Food Chemistry**, v. 197, p. 881-890, 2016.

ONGPHIMAI, N., LILITCHAN, S., ARYUSUK, K., BUMRUNGPET, A., KRISNANGKURA, K. Phenolic acids content and antioxidant

capacity of fruit extracts from Thailand. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 40, n. 4, p. 636-642, 2013.

ORTEGA, Y. H., FOUBERT, K., BERGHE, W. V., CHIRUMAMILLA, C. S., MOSQUERA, D. M. G., APERS, S. Flavonol glycosides from the leaves of *Boldoa purpurascens* and their anti-inflammatory properties. **Phytochemistry Letters**, v. 19, p. 71-76, 2017.

PINGRET, D., FABIANO-TIXIER, A-S., CHEMAT, F. Degradation during application of ultrasound in food processing: a review. **Food Control**, v. 31, p. 593-606, 2013.

PRICE, M. L., BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 25, p. 1268-1273, 1977.

PULIDO, R., BRAVO, L., SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RIESZ, P., BERDAHL, D., CHRISTMAN, C. L. Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions. **Environmental Health Perspectives**, v. 64, p. 233-252, 1985.

ROJAS-BARQUERA, D., NARVÁEZ-CUENCA, C-E. Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas en Colombia. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2336-2340, 2009.

ROJAS-GARBANZO, C., ZIMMERMANN, B. F., SCHULZE-KAYSERS, N., SCHIEBER, A. Characterization of phenolic and other polar compounds in peel and flesh of pink guava (*Psidium guajava* L. cv. 'Criolla') by ultra-high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. **Food Research International**, v. 100, p. 445-453, 2017.

ROSTAGNO, M. A., VILLARES, A., GUILLAMON, E., GARCIA-LAFUENTE, A., MARTINEZ, J. A. Sample preparation for the analysis

of isoflavones from soybean and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 1, p. 2-29, 2009.

RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidant total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. **Comunicado Técnico Online Embrapa**, v. 128, 2007.

RYAN, D., LAWRENCE, H., PRENZLER, P. D., ANTOLOVICH, M., ROBARDS, K. Recovery of phenolic compounds from *Olea europaea*. **Analytica Chimica Acta**, v. 445, n. 1, p. 67-77, 2001.

SAK, K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. **Pharmacognosy Review**, v. 8, n. 16, p. 122-146, 2014.

SCHULZ, M., BORGES, G. S. C., GONZAGA, L. V., SERAGLIO, S. K. T., OLIVO, I. S., AZEVEDO, M. S., NEHRING, P., GOIS, J. S., ALMEIDA, T. S., VITALI, L., SPUDEIT, D. A., MICKE, G. A., BORGES, D. L. G., FETT, R. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe deluis Martius*) during ripening. **Food Research International**, v. 77, n. 2, p. 125-131, 2015.

SELVAMUTHUKUMARAN, M., SHI, J. Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. **Food Quality and Safety**, v. 1, n. 1, p. 61-81, 2017.

SINGLETON, V. L., ROSSI JR., J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SKROVANKOVA, S., SUMCZYNSKI, D., MICEK, J., JURIKOVA, T., SOCHOR, J. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. **International Journal of Molecular Science**, v. 16, n. 10, p. 24673-24706, 2015.

STAŠKO, A., BREZOVÁ, V., BISKUPIČ, S., MIŠKI, V. The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. **Free Radical Research**, v. 41, n. 4, p. 379-390, 2007.

THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L., HAWKINS BYRNE, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 669-675, 2006.

TRIECHEL, M. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 88p.

VERMA, M., SINGH, J., KAUR, D., MISHRA, V., RAI, G. K. Effect of various dehydration methods and storage on physicochemical properties of guava powder. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 528-534, 2015.

WANG, L., WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.

XU, W-J., ZHAI, J-W., CUI, Q., LIU, J-Z., LUO, M., FU, Y-J., ZU, Y-G. Ultra-turrax based ultrasound-assisted extraction of five organic acids from honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) and optimization of extraction process. **Separation and Purification Technology**, v. 116, p. 73-82, 2016.

YERMAKOV, A. I., ARASIMOV, V. V., YAROSH, N. P. **Methods of Biochemical Analysis of Plants**. Agropromizdat, Leningrad, 1987.

ZULKIFLI, K. S., ABDULLAH, N., ABDULLAH, A., AZIMAN, N., KAMARUDIN, W. S. S. W. Bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of selected fruit peels. International Conference on Environment, Chemistry and Biology IPCBEE: IACSIT Press, Singapore, 2012.

DOI: 10.7763/IPCBEE.

CAPÍTULO 4: EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA A OBTENÇÃO DE EXTRATOS RICOS EM LICOPENO E β -CAROTENO A PARTIR DE POLPA E RESÍDUO DE GOIABA VERMELHA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.)

Os compostos fenólicos, um grupo de substâncias com propriedades antioxidantes, são encontrados em abundância tanto na polpa quanto no resíduo de processamento da goiaba. Isto permitiu a obtenção de extratos ricos em fenólicos, com alta atividade antioxidante *in vitro* a partir destas matérias-primas. Para isso, foram conduzidos diferentes métodos não-convencionais de extração (ultra-turrax, banho ultrassônico e líquido pressurizado), com o objetivo de reduzir o uso de solvente orgânico e de conferir maior praticidade e redução do tempo de extração. Todos os processos apresentaram resultados satisfatórios, com destaque para a extração por ultra-turrax, capaz de extrair a maior quantidade de fenólicos e partir da polpa de goiaba, e para a extração por líquido pressurizado, que se mostrou ideal para a extração de fenólicos a partir do resíduo da goiaba. No presente capítulo, continuamos a explorar técnicas não-convencionais de extração, porém, com foco em um outro grupo de compostos antioxidantes: os carotenoides.

O conteúdo deste capítulo faz parte de um artigo submetido para publicação:

LIMA, R. S., NUNES, I. L., BLOCK, J. M. Ultrasound-assisted extraction of lycopene and β -carotene from red guava (*Psidium guajava* L.) pulp and processing waste. (Anexo E)

RESUMO

Licopeno e β -caroteno são pigmentos antioxidantes naturais majoritariamente encontrados em frutas e vegetais. Além da capacidade de retardar a oxidação de alimentos, o β -caroteno apresenta atividade de vitamina A, enquanto o licopeno é relacionado a efeitos anticarcinogênicos. A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma das principais fontes de licopeno. No Brasil, seu processamento gera 68.468 ton de resíduos (sementes, cascas e polpa residual) anualmente. Além disso, evidências mostram que a polpa e o resíduo de goiaba são fontes ricas em carotenoides. A extração assistida por ultrassom (EAU), uma tecnologia verde, pode ser usada para a extração de carotenoides em substituição às técnicas convencionais, que são danosas ao meio ambiente. A EAU nunca foi utilizada para a extração de carotenoides da goiaba e de seus subprodutos. Portanto, este trabalho obteve extratos ricos em licopeno e β -caroteno a partir de polpa e resíduo de goiaba em pó (PGP e RGP, respectivamente) usando-se maceração (ME), extração assistida por ultrassom de banho (BEAU, 25 °C por 30 min) e de sonda (PEAU, 25 °C por 5 min). O acetato de etila foi usado como solvente. Os extratos foram avaliados quanto ao teor de carotenoides totais (TCT), atividade antioxidante *in vitro* por DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP, além da análise do teor de licopeno e β -caroteno por HPLC-DAD. A BEAU demonstrou ser a melhor técnica para a extração de licopeno a partir da polpa (135,0 mg 100 g⁻¹) e do resíduo (76,64 de goiaba mg 100 g⁻¹), seguido por maceração (107,6 para EPG e 43,57 mg 100 g⁻¹ para ERG) e PEAU (44,19 para EPG e 33,83 mg 100 g⁻¹ para ERG). Os extratos obtidos por BEAU também apresentaram os maiores teores de TCT, atividade antioxidante e coloração mais expressiva. Os resultados de licopeno e β -caroteno apresentados neste trabalho são os maiores já reportados para esta matéria-prima dentre todos os estudos disponíveis sobre este tópico. Este resultado pode ser devido à desidratação da polpa e do resíduo de goiaba antes da condução dos processos de extração, que

levou a um aumento da disponibilidade dos carotenoides. A EAU se provou uma técnica adequada para a obtenção de extratos ricos em carotenoides a partir da goiaba e de seus subprodutos.

Palavras-chave: carotenoides; extração verde; atividade antioxidante; HPLC-DAD; pós de goiaba.

4.1 INTRODUÇÃO

Os carotenoides são uma das mais estudadas classes de antioxidantes de ocorrência natural. Os mesmos são um grupo de pigmentos responsáveis por conferir colorações variando do amarelo ao vermelho em frutas, vegetais, peixes e alguns crustáceos. Na natureza, os carotenoides existem primariamente na configuração *trans*, que apresenta maior estabilidade. Quando expostos a fatores oxidantes, eles podem sofrer isomerização e degradação (OROIAN; ESCRICHE, 2015).

Os carotenoides podem exercer sua atividade antioxidante por meio da inativação do oxigênio singlete ou pela eliminação de radicais livres. O oxigênio singlete (1O_2) é formado quando sensibilizadores presentes em alimentos (clorofila, mioglobina, dentre outros) absorvem a energia da luz, o que promove a transformação do oxigênio triplete (3O_2 , forma estável) para o estado altamente reativo (1O_2). Os carotenoides interagem com o oxigênio singlete a fim de impedir a formação de radicais livres. Esta inativação pode ocorrer tanto pelo mecanismo físico quanto pelo químico. Na inativação química, o carotenoide reage com o 1O_2 e é destruído ao final da reação. Contrariamente, na inativação física, o 1O_2 transfere sua energia para o carotenoide, que a dissipa através de interações rotacionais e vibracionais com o meio, gerando calor. Por outro lado, a eliminação de radicais livres pode ocorrer pela transferência dos mesmos para o carotenoide; pela doação de um átomo de hidrogênio ao radical livre, estabilizando-o; ou pela adição do carotenoide ao radical livre, o que também promove a estabilização do mesmo (SAINI et al., 2015).

O licopeno e o β -caroteno são exemplos de carotenos, carotenoides hidrocarbonetos lipofílicos, que são conhecidos por seu eficiente mecanismo de inativação do oxigênio singlete, devido a seus sistemas de duplas ligações conjugadas. Além disso, o β -caroteno possui em sua estrutura química dois anéis β -ionona, que conferem proatividade de vitamina A ao composto. Este é o carotenoide mais abundante em

alimentos e pode ser encontrado em cenouras, azeite de dendê, abóbora, damasco, dentre outras diversas fontes. Por outro lado, o licopeno apresenta uma estrutura acíclica com 11 ligações duplas conjugadas (OROIAN; ESCRICHE, 2015). Nas últimas décadas, um grande número de estudos *in vitro* e *in vivo* associaram a ingestão de licopeno com uma diminuição no risco de desenvolvimento de certos tipos de câncer, como o de próstata (GRAFF et al., 2016; LANE et al., 2018; WANG et al., 2016). Acredita-se que este efeito está relacionado com a capacidade antioxidante do licopeno. Este composto é majoritariamente encontrado em frutas vermelhas, como tomate, tangerina e mamão papaya (OROIAN; ESCRICHE, 2015). De acordo com Rodriguez-Amaya et al. (2008), a pitanga é a fruta mais rica em licopeno, com $72 \mu\text{g g}^{-1}$, seguida pela goiaba vermelha, com $52 \mu\text{g g}^{-1}$.

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma fruta popular em países tropicais. A China, a Índia e o Brasil são os maiores produtores de goiaba no mundo. No Brasil, 55% do volume total de goiaba produzido no país (228.228 ton) é destinado à produção de polpa, suco, geleias e outros produtos. Estima-se que durante o processamento da goiaba, aproximadamente 30% da fruta é perdida na forma de resíduos, composto por sementes, casca e polpa residual. Esta porcentagem corresponde a um total de 68.468 ton de resíduo de goiaba gerado anualmente, que não deveria ser descartado devido aos problemas ambientais ocasionados (TRIECHEL, 2016). Além disso, evidências mostram que este resíduo é rico em antioxidantes, como compostos fenólicos e carotenoides. Lima et al. (2019) concluíram que a quantidade de compostos fenólicos encontrada na goiaba vermelha a classifica como uma superfruta, ou seja, uma fruta exótica com alta concentração de antioxidantes. Os autores também concluíram que a polpa e o resíduo de goiaba em pó podem ser usados como um ingrediente em alimentos funcionais.

Alguns estudos também mostraram que o resíduo de goiaba possui uma quantidade significativa de carotenoides. Uchôa-Thomaz et al. (2014) extraíram os carotenoides a partir de sementes de goiaba em pó usando-se álcool isopropílico:hexano (3:1) como solvente. Os autores reportaram um teor de carotenoides totais de $1,25 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. King e Ismail (2011) avaliaram o teor de licopeno de três tipos de resíduos provenientes do processamento de purê de goiaba. Os autores usaram uma mistura de acetona, etanol e hexano como solvente de extração e obtiveram teores de licopeno variando de $8,74 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (sementes e polpa residual) a $17,07 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (esclereídeo). Estes estudos confirmaram que a goiaba vermelha e seus subprodutos podem ser uma

potencial fonte para a recuperação de carotenoides, especialmente licopeno, para que os mesmos sejam usados como antioxidantes em uma grande variedade de produtos alimentícios e também para o desenvolvimento de ingredientes funcionais.

Entretanto, os métodos convencionais para a extração de carotenoides apresentam diversas limitações que não permitem que os mesmos sejam usados em escala comercial. A maceração, o procedimento padrão, é uma técnica de extração exaustiva usada, principalmente, para amostras que possuem uma composição desconhecida de carotenoides. Apesar de ser econômica e relativamente simples de se conduzir, a maceração é demorada, trabalhosa e utiliza uma grande quantidade de solventes orgânicos. A extração por Soxhlet é também altamente usada para a extração de carotenoides, porém, o uso de altas temperaturas no processo pode degradar os compostos termolábeis. Este método também usa uma quantidade considerável de solventes orgânicos. Com isto em mente, extrações não-convencionais, também conhecidas como técnicas verdes de extração, estão sendo estudadas para substituir os métodos convencionais. As mesmas têm o objetivo de reduzir ou eliminar o uso de solventes orgânicos que podem danificar o meio ambiente e a saúde humana. Além disso, estes métodos objetivam uma redução do tempo de extração, maior recuperação de compostos bioativos e a possibilidade de aplicação comercial (SELVAMUTHUKUMARAN; SHI, 2017).

A extração assistida por ultrassom (EAU) pode ser usada para a condução de um processo verde de extração. O mecanismo da EAU é relacionado ao fenômeno da cavitação acústica, onde microbolhas são formadas e colapsam, gerando uma pressão localizada que rompe os tecidos vegetais. Isto aumenta a penetração do solvente na matriz, maximizando a eficiência da extração. Existem duas formas que as ondas ultrassônicas podem ser aplicadas à amostra: diretamente ou indiretamente. No ultrassom de sonda, a sonda é imersa na amostra, transmitindo as ondas ultrassônicas diretamente, o que garante uma potência até 100 vezes maior que aquela fornecida pelos banhos ultrassônicos. Esta maior eficiência é responsável por tempos menores de extração, usualmente em torno de 5 min ou menos. Na EAU de banho, as ondas ultrassônicas são aplicadas no banho que fica em contato com os recipientes contendo as amostras. As vantagens deste método incluem o preço mais econômico de seu aparato e a possibilidade de conduzir a extração de diversas amostras ao mesmo tempo (GOULA et al., 2017).

A EAU já foi usada anteriormente para a extração de carotenoides de cenoura (SUN; TEMELLI, 2006), resíduos de tomate (LADOLE et al., 2018), melancia (OBEROI; SOGI, 2017), dentre outras fontes. Porém,

esta técnica nunca foi reportada para a extração de carotenoides da goiaba vermelha e de seus subprodutos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o uso da extração assistida por ultrassom (de banho e de sonda) para a obtenção de extratos ricos em β -caroteno e licopeno da polpa e do resíduo de processamento da goiaba, e comparar a eficiência desta técnica com a maceração. Os extratos foram comparados quanto aos teores de β -caroteno e licopeno, carotenoides totais, cor e atividade antioxidante.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Amostras

Um lote de 5 kg de goiabas vermelhas frescas (*Psidium guajava* L. cv. 'Pedro Sato') foi adquirido em um mercado local em outubro de 2017. Ao atingirem o estágio III de maturação (teor de sólidos solúveis = 8,23%), de acordo com Azzolini et al. (2004), as frutas foram sanitizadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 4% por 30 min, e processadas em uma despoldadeira (Brameitar peneira 2 mm, Campinas-SP, Brasil). A polpa (3 kg, teor de água = 92%) e a fração residual (2 kg, teor de água = 65%, composta por sementes, cascas e polpa residual) foram coletadas separadamente e desidratadas em uma estufa com circulação forçada de ar (TE-394/2, Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil) a 55°C por 10 h. Em seguida, as amostras desidratadas foram moídas em um moinho de martelos (TE-090, Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil) e o tamanho médio de partícula foi ajustado para 0,50-0,55 mm. A polpa de goiaba em pó (PGP, 750 g) e o resíduo de goiaba em pó (RGP, 900 g) apresentaram uma umidade final de 17% e 10%, respectivamente. As amostras em pó foram armazenadas em frascos âmbar, inertizadas com nitrogênio e mantidas a -24 °C até análises futuras.

4.2.2 Materiais

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), o TPTZ (2,2'-2,4,6-tripiridiltriazina), o Trolox, o ABTS (2,2-azion-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e o padrão de β -caroteno foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para a produção do padrão de licopeno, o licopeno foi isolado a partir de polpa de tomate liofilizada, seguindo-se a metodologia proposta por Alves et al. (2010). Todos os

outros reagentes químicos e solventes usados nos experimentos eram de grau analítico (P.A.) obtidos das empresas Neon e Sigma-Aldrich.

4.2.3 Morfologia dos pós de goiaba

A morfologia da PGP e do RGP foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio e revestidas com uma camada de ouro (espessura de 350 Å). Em seguida, as amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM-6390LV, Tóquio, Japão).

4.2.4 Extração por maceração (ME)

A maceração foi conduzida de acordo com Rodriguez-Amaya (1999). Amostras de PGP (0,3 g) e RGP (0,5 g) foram colocadas em um almofariz, adicionadas de celite e acetato de etila e maceradas. Este processo foi repetido até que a amostra perdesse toda sua coloração, o que levou aproximadamente 1 h para cada amostra, onde foram gastos aproximadamente 150 mL de solvente para cada amostra. Então, os extratos foram filtrados a vácuo, armazenados em frascos âmbar, inertizados com nitrogênio e mantidos a -24 °C para futuras análises.

4.2.5 Extração assistida por ultrassom de banho (BEAU)

Amostras de PGP e RGP (1 g) foram misturadas com acetato de etila (30 mL) e levadas a um banho ultrassônico (EGS-5HD, EngeSolutions, São Paulo-SP, Brasil). O ultrassom foi ajustado a uma frequência de 40 kHz e potência de 300 W. A extração foi conduzida a 25 °C por 30 min. As condições experimentais foram determinadas em testes preliminares (resultados não mostrados). Os extratos foram filtrados a vácuo, transferidos para frascos âmbar, inertizados com nitrogênio e armazenados a -24 °C para análises futuras.

4.2.6 Extração assistida por ultrassom de sonda (PEAU)

A extração foi conduzida em um ultrassom de sonda (UP200S, Hielscher, Teltow, Alemanha) a uma frequência de 24 kHz, potência de 200 W, *duty cycle* de 0,5 e amplitude de 70%. As amostras de PGP e RGP (1 g) foram misturadas com 30 mL de acetato de etila e levadas ao ultrassom, onde a extração foi realizada a 25 °C por 5 min. As condições experimentais foram determinadas em testes preliminares (resultados não

mostrados). Em seguida, os extratos foram filtrados a vácuo, armazenados em frascos âmbar, inertizados com nitrogênio e mantidos a -24 °C para futuras análises.

4.2.7 Caracterização dos extratos

4.2.7.1 Teor de carotenoides totais (TCT)

O teor de carotenoides totais foi determinado de acordo com Rodriguez-Amaya (1999). Os extratos de polpa (EPG) e de resíduo (ERG) de goiaba foram transferidos para o éter de petróleo em um funil de separação. Em seguida, um processo de saponificação foi conduzido através da adição de uma solução metanólica de hidróxido de potássio a 10% às amostras. A reação aconteceu durante 16 h. Então, os extratos foram lavados com água ultrapura em um funil de separação até que a solução de saponificação fosse completamente removida. Os extratos foram secos com sulfato de sódio para eliminar a água residual, transferidos para balões volumétricos e tiveram sua absorvância lida em $\lambda = 470$ nm em um espectrofotômetro (SP 2000, Belphotonics, Piracicaba-SP, Brasil). As equações 1 e 2 foram usadas para o cálculo do teor de carotenoides totais.

$$x (\mu g) = \frac{A \cdot v (mL) \cdot 10^6}{A_1^{1\%} \text{ cm} \cdot 100} \quad (1)$$

$$x (\mu g/g) = \frac{x (\mu g)}{P (g)} \quad (2)$$

onde x é a concentração de carotenoides, A é a absorvância, v é o volume da solução, P é o peso da amostra, $A_1^{1\%}$ é o coeficiente de absorção do carotenoide no solvente usado ($A_1^{1\%} = 3450$ para licopeno em éter de petróleo).

4.2.7.2 DPPH

A análise de DPPH seguiu o protocolo sugerido por Brand-Williams et al. (1995), com modificações. As amostras de EPG e ERG foram ressuspensas com acetato de etila, o solvente de extração, e diluídas em água ultrapura (1:50, v/v) e uma alíquota de 40 μ L de cada amostra foi adicionada à microplaca, juntamente com 260 μ L de uma solução metanólica de DPPH a 0,10 mM. A microplaca foi incubada no

escuro por 30 min a 25 °C. O decaimento da absorbância foi registrado em $\lambda = 517$ nm com um leitor de microplacas (Spectramax Paradigm, Molecular Devices, San Jose-CA, EUA). O branco foi composto por água ultrapura. O poder antioxidante (% de inibição do radical) foi calculado pela Equação 3.

$$\% \text{ Inibição} = \left[1 - \left(\frac{A_{517 \text{ amostra}}}{A_{517 \text{ branco}}} \right) \right] \times 100 \quad (3)$$

4.2.7.3 DPPH modificado

O DPPH modificado seguiu a metodologia desenvolvida por Brand-Williams et al. (1995), modificada por Staško et al. (2007). Aliquotas de 40 μL de EPG e ERG previamente ressuspensas com acetato de etila e diluídas com água ultrapura (1:50, v/v) misturadas a 260 μL de uma solução etanólica de DPPH a 0,10 mM e 260 μL de uma solução tampão de fosfato de sódio monobásico a 50 mM (pH 6) em uma microplaca. A microplaca foi deixada no escuro por 30 min e a absorbância foi medida em $\lambda = 525$ nm. O branco foi composto por água ultrapura. O poder antioxidante (% de inibição do radical) foi calculada pela Equação 4.

$$\% \text{ Inibição} = \left[1 - \left(\frac{A_{525 \text{ amostra}}}{A_{525 \text{ branco}}} \right) \right] \times 100 \quad (4)$$

4.2.7.4 ABTS

O ensaio do ABTS seguiu o método proposto por Rufino et al. (2007). EPG e ERG foram ressuspensos com acetato de etila antes da análise. Aliquotas de 10 μL de EPG e ERG diluídas em etanol (1:10, v/v) foram adicionadas à microplaca. Em seguida, 290 μL de solução de ABTS⁺ (5 mL de solução estoque ABTS com 88 μL de persulfato de potássio 140 mM, absorbância 0,7000 em $\lambda = 734$ nm) foi adicionada também à microplaca. A mistura reagiu no escuro por 6 min. Então, a absorbância foi medida em $\lambda = 734$ nm. Uma solução estoque de ácido ascórbico a 300 mg L⁻¹ foi usada para a construção de uma curva de calibração (concentrações variando entre 30 e 300 mg L⁻¹). O branco foi composto por etanol. Os resultados foram expressos como mmol de ácido ascórbico equivalente por 100 g de amostra. (mmol AAE 100 g⁻¹ de EPG ou ERG).

4.2.7.5 FRAP

A determinação de FRAP seguiu o protocolo proposto por Pulido e Saura-Calixto (2000). O reagente FRAP foi preparado por meio da mistura de 2,5 mL de uma solução de TPTZ a 10 mmol L^{-1} , 25 mL de uma solução tampão de acetato de sódio a 300 mmol L^{-1} (pH 3,6) e 2,5 mL de cloreto férrico hexahidratado a 20 mmol L^{-1} . EPG e ERG foram ressuspendidos em acetato de etila antes das análises. 20 μL de amostras de EPG e ERG diluídas em água ultrapura (1:50, v/v) foram adicionadas a uma microplaca juntamente com 280 μL de reagente FRAP recentemente preparado, e a microplaca foi incubada a 37°C por 30 min. O branco foi composto por água ultrapura. Uma solução estoque de ácido ascórbico a 150 mg L^{-1} foi usada para a construção de uma curva de calibração (concentrações variando de 15 a 150 mg L^{-1}). Os resultados foram expressos como mmol de ácido ascórbico equivalente por 100 g de amostra ($\text{mmol AAE } 100 \text{ g}^{-1}$ de EPG ou ERG).

4.2.8 Análise de licopeno e β -caroteno por HPLC

4.2.8.1 Preparação das amostras

Para a análise em HPLC, as amostras foram preparadas de acordo com o item 4.2.7.1. Em seguida, os extratos foram suspendidos na fase móvel e apropriadamente diluídos para a injeção no sistema de HPLC.

4.2.8.2 Análise de HPLC

A análise de licopeno e β -caroteno nos extratos foi conduzida de acordo com Carvalho et al. (1992), em um sistema de HPLC (modelo Class LC 10, Shimadzu, Tóquio, Japão), composto por uma bomba binária (modelo LC-10-AD, Shimadzu, Tóquio, Japão) com detector de diodo (modelo SPD-M10A, Shimadzu, Tóquio, Japão) e um injetor tipo reodino com uma alça de amostra de 200 μL .

A separação ocorreu em uma coluna de fase reversa C_{18} (LiChrospher 100-RP-18, Merck, Alemanha), com dimensões de 125 x 4 mm, 5 μm . A fase móvel foi composta por acetonitrila:metanol:acetato de etila:triethylamina (72,95:20:7:0,05, v/v/v/v), com um fluxo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ em um sistema isocrático à temperatura ambiente, com monitoramento a 450 nm para o β -caroteno (tempo de retenção de 9,7 min) e 470 nm para o licopeno (tempo de retenção de 5,2 min).

Os padrões de licopeno e β -caroteno foram diluídos em éter de petróleo para a injeção no sistema de HPLC. O β -caroteno foi injetado a uma concentração de $0,58 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto o licopeno foi injetado a uma concentração de $1,72 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.9 Análise de cor

A análise de cor foi conduzida de acordo com Kohl et al. (2006). Amostras de PGP, RGP, EPG e ERG foram colocadas em placas de petri e levadas a uma câmara com fundo branco, onde as amostras foram fotografadas contra uma luz fluorescente branca usando-se uma câmera digital (D3400, Nikon). O software ImageJ 1.8.0 foi usado para criar imagens a partir das fotografias originais, convertendo os parâmetros de cor para a escala CIELAB (L^* , a^* , b^*). Hue (h) e croma (C^*) foram calculados usando-se as Equações 5 e 6, respectivamente.

$$h = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (5)$$

$$C^* = \sqrt{b^{*2} + a^{*2}} \quad (6)$$

4.2.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas usando-se o software R-project 3.4.3 (2017). Os resultados foram submetidos à análise de variância *one-way* (ANOVA) e o teste de Tukey ($p < 0,05$) foi usado para a comparação de médias. A correlação de Pearson foi usada para correlacionar alguns dos parâmetros. As análises e extrações foram conduzidas em triplicata e expressas como média \pm desvio padrão (SD).

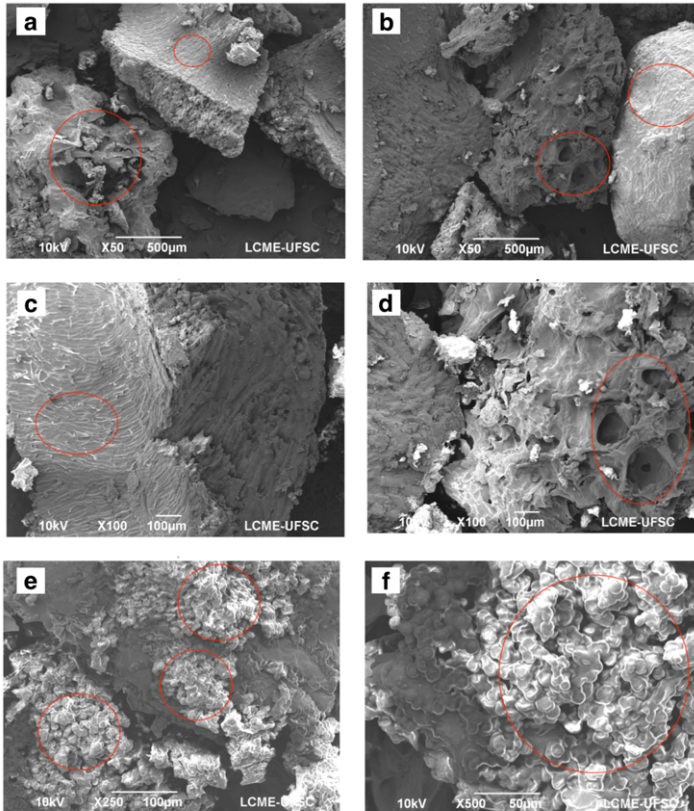
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Morfologia dos pós de goiaba

Para aumentar a eficiência dos processos de extração de carotenoides, as amostras devem ser primeiramente desidratadas, uma vez que a água age como uma barreira para a penetração de solventes orgânicos. Neste estudo, as amostras de polpa e resíduo de goiaba foram secas em estufa (item 4.2.1) e a morfologia dos pós foi observada em um

microscópio de varredura eletrônico. A estrutura da PGP é mostrada na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Morfologia da polpa de goiaba em pó (PGP), magnificação de: a) e b) 50x, c) e d) 100x, e) 250x e f) 500x

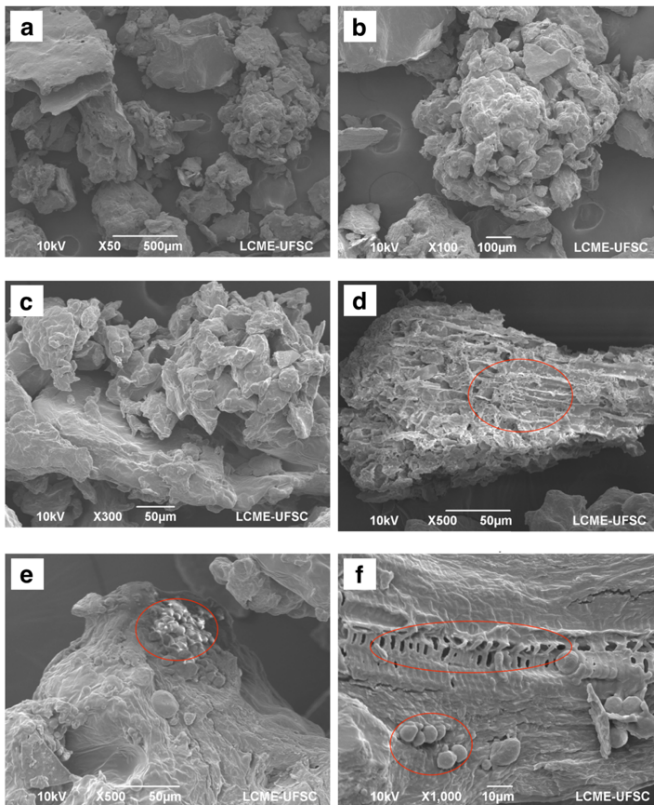


A PGP apresentou um aspecto granular e rugoso, o que pode ser observado na micrografia a (Figura 4.1). Os grânulos de PGP foram observados mais de perto nas micrografias b e d, que mostram que este material apresenta porosidade. Outras estruturas também podem ser vistas. De acordo com Costa (2004), formas finas e alongadas identificam a presença de fibra dietética. Estas estruturas podem ser observadas nas micrografias b e c. A polpa de goiaba é uma fonte de fibra, com este nutriente representando 49,42% da matéria seca nesta fração da fruta (JIMÉNEZ-ESCRIG et al., 2001). Portanto, a visualização de fibras neste

material já era esperada. As micrografias e e f mostram uma aglomeração de pequenas e numerosas formas esféricas. O formato destas estruturas pode identifica-las como grânulos de amido. De acordo com Jain et al. (2001), a goiaba vermelha madura apresenta aproximadamente 2% de amido em base úmida, com a maioria dos grânulos localizados na polpa.

A morfologia do RGP (Figura 4.2) é similar ao que foi observado para a PGP (Figura 4.1).

Figura 4.2 – Morfologia do resíduo de goiaba em pó (RGP), magnificação de: a) 50x, b) 100x, c) 300x, d) e e) 500x e f) 1000x



Nas micrografias a, b e c é possível observar que a amostra é composta por grânulos de formato irregular com estruturas porosas. A presença de fibras (micrografia d) em RGP pode ser explicada por sua composição, que apresenta polpa residual e cascas. As cascas de goiaba podem apresentar uma quantidade significativa de fibras (48,55% da matéria seca), de acordo com Jiménez-Escrig et al. (2001). Possíveis grânulos de amido foram observados nas micrografias e e f, porém, em menor número quando comparado à PGP.

A morfologia observada para o RGP também foi reportada por Farias et al. (2016), que conduziu a desidratação de resíduo de goiaba em estufa com circulação forçada de ar, testando-se diferentes temperaturas, incluindo a temperatura de 55 °C, a mesma usada neste estudo. Os autores

puderam observar uma estrutura rugosa com aglomeração de formas esféricas e também de estruturas finas e alongadas.

A morfologia porosa e rugosa da PGP e do RGP pode ajudar na penetração do solvente para a extração dos carotenoides, tornando possível o acesso e a dissolução dos compostos-alvo no mesmo. Outra vantagem deste tipo de morfologia é a facilitação da dissolução dos pós, de forma que os mesmos possam ser usados como ingrediente funcional em aplicações futuras.

4.3.2 Caracterização dos extratos

Os resultados de carotenoides totais, DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP para EPG e ERG obtidos pelos métodos de extração estudados estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Teor de carotenoides totais e atividade antioxidante (DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP) dos extratos de polpa e resíduo de goiaba (EPG e ERG, respectivamente) obtidos por maceração (ME), extração assistida por ultrassom de banho (BEAU) e de sonda (PEAU)

Determinação	ME		BEAU		PEAU	
	EPG	ERG	EPG	ERG	EPG	ERG
Teor de Carotenoides Totais (mg 100 g⁻¹)	135,6 ± 24,54 ^{a,b}	79,04 ± 3,32 ^c	160,4 ± 16,62 ^a	130,6 ± 1,34 ^b	89,35 ± 1,63 ^c	65,09 ± 7,92 ^d
DPPH (% de inibição)	65,79 ± 0,02 ^c	53,79 ± 0,05 ^d	86,86 ± 0,05 ^a	80,78 ± 0,04 ^b	22,33 ± 0,01 ^e	19,63 ± 0,01 ^f
DDPH modificado (% de inibição)	55,17 ± 0,06 ^a	39,93 ± 0,03 ^c	55,42 ± 0,02 ^a	47,85 ± 0,02 ^b	30,43 ± 0,01 ^d	17,37 ± 0,05 ^e
ABTS (mmol AAE 100 g⁻¹)	181,3 ± 0,02 ^c	134,7 ± 0,01 ^d	227,4 ± 0,01 ^a	201,2 ± 0,02 ^b	99,43 ± 0,01 ^e	78,66 ± 0,02 ^f
FRAP (mmol AAE 100 g⁻¹)	16,75 ± 0,005 ^c	16,21 ± 0,01 ^c	93,39 ± 0,58 ^a	70,26 ± 0,58 ^b	16,03 ± 0,04 ^c	15,65 ± 0,01 ^c

*Resultados expressos como média ± desvio padrão. Resultados seguidos pela mesma letra na linha não diferem significativamente ($p < 0,05$)

EPG e ERG extraídos por BEAU apresentaram os maiores TCTs, seguidos pelos extratos obtidos por ME e PEAU, respectivamente. Portanto, a BEAU por 30 min com acetato de etila como solvente foi o método mais eficiente para a extração de carotenoides a partir da polpa de goiaba e de seus subprodutos. Isto pode ser explicado pelo processo de

cavitação acústica que acontece durante a BUAE, o que promoveu a ruptura das células do material, facilitando a penetração do solvente e a dissolução dos carotenoides. Além disso, as ondas ultrassônicas são responsáveis por uma expansão dos poros nas paredes celulares do material, o que também contribui para uma maior transferência de massa, aumenta a quantidade de carotenoides no extrato (VINATORU, 2001).

Por outro lado, na ME, a ruptura das paredes celulares do material ocorre manualmente por meio da maceração das amostras misturadas ao solvente de extração, o que não apresenta a mesma eficácia que a cavitação acústica promovida pela EAU. Além disso, a ME exigiu um tempo de extração mais longo (1 h) que a EAU (30 min para a BEAU e 5 min para a PEAU). Dessa forma, a amostra foi exposta a fatores oxidantes por um período de tempo estendido, o que pode ter levado a uma degradação dos carotenoides. Porém, os resultados de TCT mostraram que o ERG foi mais sensível a este fenômeno que o EPG. A quantidade de carotenoides foi reduzida em 39% no ERG extraído por ME quando comparado ao ERG extraído por BEAU. O TCT do EPG não diferiu significativamente entre estes dois métodos de extração.

Além da quantidade significativamente menor de carotenoides totais encontrada no ERG obtido por maceração em comparação com o ERG obtido por BEAU, o EPG da maceração apresentou um alto desvio padrão. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que a ME possui muitas etapas, o que acaba contribuindo para que maiores perdas de carotenoides sejam causadas. A extração por ultrassom, pelo contrário, é mais simples e possui um menor número de etapas, aumentando o controle sobre as amostras e mitigando os riscos de ocorrência de perda e degradação de carotenoides.

A PEAU não exibiu a mesma eficiência da BEAU para a extração de carotenoides a partir da PGP e do RGP. Esta técnica resultou no menor TCT dentre todos os métodos estudados. Uma possível explicação para este resultado pode ser a formação de radicais livres na EAU. Na cavitação acústica, o colapso das microbolhas produz radicais hidroxila no meio. Porém, na BEAU este efeito é atenuado, uma vez que as ondas ultrassônicas são indiretamente aplicadas às amostras. Este não é o caso da PEAU, onde a sonda está imersa dentro da amostra e as ondas ultrassônicas são aplicadas diretamente na matriz (VILKHU et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2007; RIESZ; KONDO, 1992). Mesmo o tempo de extração mais curto não preveniu a degradação dos carotenoides no EPG e no ERG. A ocorrência deste fenômeno também foi reportada por Lianfu e Zelog (2008) ao extrair licopeno de tomate.

As amostras de EPG apresentaram um maior TCT em comparação às de ERG, o que era esperado, uma vez que os carotenoides estão majoritariamente localizados na polpa da goiaba. Jain et al. (2003) extraíram carotenoides a partir de goiaba madura fresca (cv. Banarsi Surkha) usando-se uma solução de acetona a 80% (método de extração não mencionado) e obtiveram um TCT de 0,45 mg 100 g⁻¹. Nora et al. (2014) usaram maceração com acetona para extrair os carotenoides de goiaba inteira fresca. Os autores encontraram um TCT de 2298 µg 100 g⁻¹ (2,298 mg 100 g⁻¹). Estes resultados são significativamente menores que aqueles obtidos nas amostras provenientes de todos os métodos de extração conduzidos neste trabalho. Alguns fatores que podem ter contribuído para esta discrepância são as diferenças na variedade da goiaba e nas condições climáticas onde a fruta foi cultivada, além na diferença de solvente usado para a extração.

A atividade antioxidante de todos os extratos foi avaliada por métodos que medem a capacidade de transferência de elétrons (GÜLÇİN, 2012). Estes ensaios são adequados para o tipo de amostra usado neste trabalho, uma vez que o licopeno, que é o carotenoide majoritário da goiaba, já foi reportado como um dos carotenoides mais eficientes em reações de transferência de elétrons (MORTENSEN et al., 2001). Os resultados para o DPPH modificado foram menores que aqueles obtidos pelo DPPH clássico em todas as amostras. Isto pode ser explicado pelo fato de que o DPPH modificado elimina o efeito da desprotonação do DPPHH, que é responsável por superestimar os resultados no método tradicional (STAŠKO et al., 2007).

Em geral, as determinações de atividade antioxidante *in vitro* seguiram a mesma tendência. Os extratos com as maiores concentrações de TCT foram responsáveis pelos maiores níveis de atividade antioxidante. Portanto, o EPG e o ERG extraídos por BEAU demonstraram maior eficácia na inibição dos radicais, seguidos pelos extratos obtidos por ME e PEAU, respectivamente. A relação entre um maior TCT e uma mais alta atividade antioxidante pode ser confirmada pelos coeficientes de correlação entre TCT e os ensaios de atividade antioxidante (Tabela 4.2). A correlação é alta para todos os processos de extração e os parâmetros encontram-se positivamente correlacionados em todos os casos.

Tabela 4.2 – Coeficiente da Correlação de Pearson e p-valor entre o teor de carotenoides totais (TCT) e atividade antioxidante para cada método de extração

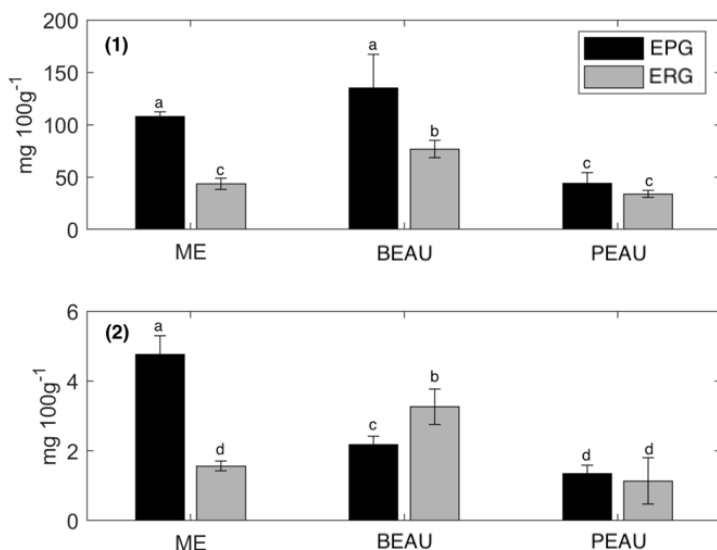
Coeficiente de Correlação (r)	DPPH	DPPH Modificado	ABTS	FRAP
ME				
TCC	0.8930	0.8903	0.8926	0.8557
p-valor	0.0166	0.0174	0.0167	0.0158
BUAE				
TCC	0.8453	0.8417	0.8402	0.8561
p-valor	0.0340	0.0356	0.0363	0.0296
PUAE				
TCC	0.9351	0.9349	0.9337	0.9454
p-valor	0.0062	0.0062	0.0064	0.0044

Uma relação similar também foi observada por Kong et al. (2010) ao utilizar o ensaio ABTS para avaliar a atividade antioxidante de um extrato rico em licopeno extraído de goiaba. O extrato obtido por extração com solvente apresentou o maior teor de licopeno e atividade antioxidante (49,82 mg g⁻¹ de extrato e 0,2271 μmol LE, respectivamente) comparado ao extrato obtido por extração por CO₂ supercrítico (13,66 mg g⁻¹ de extrato e 0,1068 μmol LE, respectivamente). O ensaio ABTS também foi usado por Kong e Ismail (2011) para analisar a atividade antioxidante de diferentes subprodutos do processamento da goiaba. *Decanter* (esclereídeo) foi a amostra que apresentou o maior resultado (21,69 μmol LE 100 g⁻¹). Mais uma vez, esta era a amostra que também apresentou o maior teor de licopeno no experimento.

4.3.3 Análise de licopeno e β -caroteno por HPLC

Os resultados de licopeno e β -caroteno determinados pela análise de HPLC para EPG e ERG obtidos por ME, BEAU e PEAU são mostrados na Figura 4.3.

Figura 4.3 – Teor de licopeno (1) e β -caroteno (2) dos extratos de polpa e resíduo de goiaba (EPG e ERG, respectivamente) obtidos por maceração (ME), extração assistida por ultrassom de banho (BEAU) e de sonda (PEAU)



*Os resultados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$)

O licopeno foi o carotenoide majoritário encontrado tanto em EPG quanto em ERG. Portanto, este pigmento é o principal responsável pela atividade antioxidante dos extratos, o que foi demonstrado no item 4.3.2. Um estudo conduzido por Santos et al. (2018) correlacionou o licopeno extraído da goiaba com propriedades antitumorais. Os autores aplicaram extratos ricos neste composto a células de adenocarcinoma de mama humano da linhagem MCF-7 e verificaram que os extratos foram capazes de diminuir a viabilidade destas células. Também foi descoberto que os mecanismos pelos quais este efeito ocorre envolvem a fragmentação do

DNA da célula, interrupção do ciclo celular e mudanças morfológicas. Os autores concluíram que a presença de licopeno no extrato contribuiu para um aumento da atividade antioxidante, o que, em contrapartida, causou um impacto positivo nos efeitos anticarcinogênicos. Também foi concluído que os extratos ricos em licopeno extraídos da goiaba devem ser usados para o desenvolvimento de produtos com propriedades anticâncer.

O licopeno também pode ser usado para retardar a oxidação de alimentos, com consequente aumento da vida de prateleira. Montenegro et al. (2007) conseguiram reduzir a degradação fotossintetizada das vitaminas A e D₃ mediada por riboflavina em leite desnatado através da adição de microcápsulas de cristais de licopeno. De acordo com os autores, a capacidade de inativação do oxigênio singlete foi um dos mecanismos que ajudaram na proteção oxidativa do produto.

A BEAU demonstrou ser a técnica mais eficiente para a obtenção de licopeno a partir de PGP (135,0 mg 100 g⁻¹) e RGP (76,64 mg 100 g⁻¹) e β-caroteno a partir de RGP (3,26 mg 100 g⁻¹). Portanto, de todos os métodos testados neste trabalho, a BEAU foi o mais adequado. Isto também foi constatado pela análise de carotenoides totais, onde tanto o EPG quanto o ERG obtidos por BEAU foram aqueles que apresentaram os maiores TCTs dentre todos os extratos.

O teor de licopeno no EPG extraído por ME (107,6 mg 100 g⁻¹) não apresentou diferença significativa do teor de licopeno encontrado no EPG extraído por BEAU. Além disso, a ME foi capaz de obter o mais alto teor de β-caroteno dentre todos os EPGs (4,76 mg 100 g⁻¹). Contrariamente, a PEAU se provou mais uma vez como a abordagem menos efetiva dentre os métodos estudados neste trabalho, obtendo os mais baixos teores de licopeno (EPG = 44,2 mg 100 g⁻¹, ERG = 33,8 mg 100 g⁻¹) e β-caroteno (EPG = 1,35 mg 100 g⁻¹, ERG = 1,14 mg 100 g⁻¹) dentre todos os métodos estudados. Uma vez que a BEAU apresentou a maior eficácia na maioria dos parâmetros analisados, faz-se viável a substituição de ME para a extração de compostos bioativos. Ademais, a BEAU é uma técnica verde de extração, com menor gasto de solvente, menores tempos de extração, simples de conduzir e possível de ser aplicada em escala comercial.

O teor de carotenoides quantificado por espectrofotometria (Tabela 4.1) foi maior que a soma dos teores de licopeno e β-caroteno quantificados pela análise de HPLC (Figura 4.3) para todas as amostras. Uma das possíveis explicações para esta discrepância é a possível presença de outros carotenoides nos extratos, que não foram possíveis de serem identificados pela análise de HPLC. Outra hipótese seria uma

superestimação dos resultados na análise de espectrofotometria devido à presença de substâncias interferentes nas amostras que podem ter sido quantificadas como carotenoides.

O estudo dos carotenoides presentes na goiaba ainda é um tópico relativamente pouco explorado, especialmente no que diz respeito ao uso de métodos verdes de extração. O Quadro 4.1 mostra uma compilação dos estudos encontrados na literatura que investigaram a extração de licopeno e β -caroteno a partir da goiaba e de seus subprodutos.

Quadro 4.1 – Compilação de estudos sobre a extração de licopeno e β -caroteno a partir da goiaba e seus subprodutos

Referência	Objetivo	Amostra	Variedade	Condições de Extração	B-caroteno (mg 100 g ⁻¹)	Licopeno (mg 100 g ⁻¹)
Kong et al. (2010)	Desenvolvimento de um processo comercial de extração	<i>Decanter</i> (esclereídeo): seco em estufa a 43 °C por 6,4 h	Sungkai Beaumont	Extração por solvente: 10 g de amostra para 320 mL de solvente (hexano:acetona:etanol: - 50:25:25, v/v/v) em shaker por 60 min. CO ₂ supercrítico : 10 g de amostra, 55 °C, 300 bar, taxa de 2,5 mL min ⁻¹ , etanol como co-solvente (10%), 3 h	-	Extração por solvente: 33,62 CO ₂ supercrítico: 42,99
Kong e Ismail (2011)	Desenvolvimento de um processo comercial de extração	Amostras liofilizadas: fruta inteira, <i>refiner</i> (sementes e polpa residual), <i>siever</i> (pedaços de polpa), <i>decanter</i> (esclereídeo)	Sungkai Beaumont	Extração por solvente: 0,6 g de amostra para 20 mL de solvente (hexano:acetona:etanol - 10:5:5, v/v/v)	-	Fruta: 27,83 Refiner: 8,74 Siever: 12,54 Decanter: 17,07

Rojas-Garbanzo et al. (2017)	Caracterização de licopeno durante a maturação	Pericarpio e polpa	Criolla	Maceração: 1 g de amostra para 10 mL de acetona e uma mistura de metanol: acetato de etila:éter de petróleo (1:1:1, v/v/v)	Pericarpio: não detectado Polpa: 8,0	Pericarpio : 4,05 Polpa: 4,53
Shishir et al. (2016)	Desenvolvimento de um pó de fruta rico em licopeno para a aplicação como ingrediente funcional	Suco de goiaba seco em spray-drier	Não reportado	Extração por solvente: 0,5 g diluída em água (10 mL) extraída com 10 mL de hexano:acetona:etanol (2:1:1, v/v/v) em um shaker por 10 min	-	54,70 (na condição otimizada em spray-drier)
Corrêa et al. (2011)	Caracterização do teor de licopeno nesta matéria-prima	Goiaba fresca (sem sementes)	Não reportado	Extração por solvente: 0,5-2,0 g de amostra para 20 mL de hexano:acetona (6:4, v/v) em um homogeneizador por 15 min	-	4,04
Oliveira et al. (2010)	Caracterização do teor de licopeno nesta matéria-prima	Goiaba fresca	Paluma	Maceração com acetona	0,366 (amostra controle)	6,99 (amostra controle)
González et al. (2011)	Caracterização do teor de licopeno em goiaba colombiana	Goiaba inteira liofilizada	Regional roja	Maceração com acetona	Não detectado	0,0183

É possível observar que a maioria dos estudos foi realizado com o objetivo de caracterizar os carotenoides da goiaba, dessa forma, foram usadas a maceração ou a extração por solvente, uma variação da maceração. Apenas um estudo testou uma tecnologia verde para extrair os carotenoides do resíduo de goiaba, com o objetivo de desenvolver um processo que pode ser posteriormente implementado em escala industrial. Kong et al. (2010) obtiveram um maior teor de licopeno usando-se extração por CO₂ supercrítico comparado à extração convencional, para

o desenvolvimento de um método de extração comercial para se obter um extrato antioxidante rico em licopeno. Os resultados alcançados pelos autores são similares ao que foi encontrado para os EPGs extraídos por ME e PEAU no presente trabalho. Porém, os mesmos não foram maiores que os teores de licopeno encontrados para o EPG obtido por BEAU. A BEAU é vantajosa comparada à SF-CO₂ devido à simplicidade do processo, tempo de extração reduzido e aparato mais econômico (SELVAMUTHUKUMARAN; SHI, 2017).

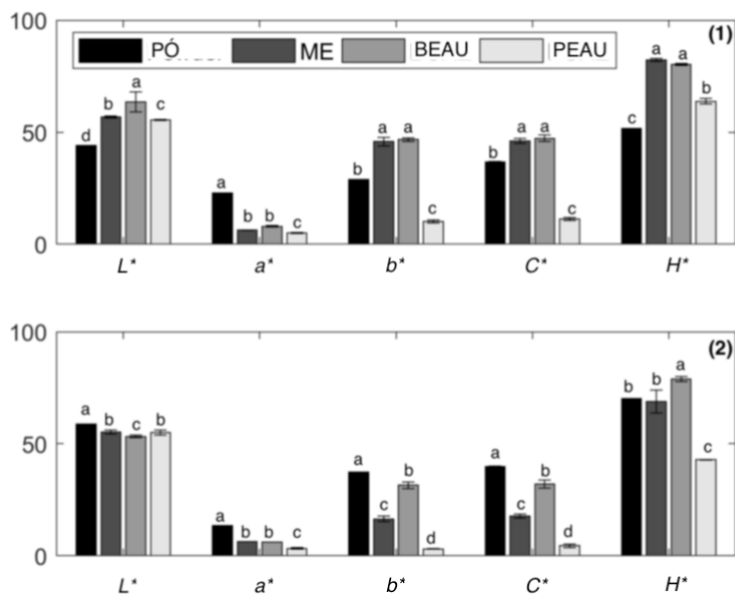
No geral, os teores de licopeno e de β -caroteno do EPG e do ERG obtidos no presente trabalho foram os mais altos dentre todos os estudos disponíveis sobre este tópico. Além da tecnologia de extração, a escolha do solvente e a metodologia das análises provavelmente contribuíram para esta variação.

Além disso, muitos dos estudos apresentados na Tabela 4.3 utilizaram a goiaba fresca como a matriz para a condução das extrações, uma vez que a maioria deles tinha como objetivo apenas a caracterização dos carotenoides das amostras. A goiaba vermelha brasileira já foi reportada com uma concentração de licopeno de 5,34 mg 100 g⁻¹ (PADULA; RODRIGUEZ-AMAYA, 1986), que é um teor 14 vezes menor que a média dos teores de licopeno encontrados nas amostras deste estudo. Este fato pode ser atribuído ao processo de secagem conduzido para a obtenção de PGP e RGP. De acordo com Roldán-Gutiérrez e Castro (2007), quando os alimentos são submetidos a um tratamento térmico, os carotenoides presentes aumentam sua biodisponibilidade como um resultado de sua dissociação das proteínas. Os autores mencionam que pós de tomate podem apresentar até 30 vezes mais licopeno que tomates frescos. Porém, a exposição destes materiais a temperaturas maiores que 60 °C por tempos prolongados, pode resultar na isomerização e degradação do licopeno, formando-se isômeros *cis* e produtos voláteis (DURING; HARRISON, 2005). Dessa forma, a manutenção da temperatura e do tempo durante o processo de secagem de uma matriz rica em licopeno é essencial para que se mantenham as propriedades do composto.

4.3.4 Determinação de cor

A Figura 4.4 apresenta os parâmetros de cor para os pós e os extratos da polpa e do resíduo de goiaba, obtidos por ME, BEAU e PEAU.

Figura 4.4 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*) da (1) polpa de goiaba em pó e extrato (PGP e EPG, respectivamente) e (2) resíduo de goiaba em pó e extrato (RGP e ERG, respectivamente) obtidos por maceração (ME), extração assistida por ultrassom de banho (BEAU) e de sonda (PEAU)



*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$)

A PGP apresentou uma coloração vermelha escura, o que pode ser confirmado por valor de a^* , em que valores maiores denotam uma amostra mais vermelha. Este foi o maior valor de a^* dentre todas as amostras, o que já era esperado, uma vez que a fração polpa da goiaba possui a maior concentração de licopeno. Por outro lado, o RGP apresentou-se menos vermelho (valor a^*) e mais amarelo (valor b^*) quando comparado ao PGP, o que provavelmente se deve ao menor teor de licopeno e à presença de sementes de goiaba na fração residual total do processamento da goiaba. Além disso, o RGP apresentou maior luminosidade (valor L^*) e maior brilho (C^*) comparado à PGP.

Quanto aos extratos, todos os EPGs mostraram maior brilho quando comparados aos ERGs. Além disso, os EPGs também apresentaram maior intensidade das cores vermelha (valor a^*) e amarela (valor b^*) que os extratos do resíduo. O EPG e o ERG obtidos por BEAU

foram os extratos que se mostraram mais vermelhos e amarelos quando comparados aos outros métodos de extração testados, o que foi promovido pelo teor de carotenoides. Assim, os extratos da BEAU se mostraram mais atrativos em termos de coloração. A Tabela 4.3 confirma que, para a maioria dos métodos de extração, existe uma alta correlação entre o teor de licopeno e os parâmetros de cor, o que confirma a coloração mais forte apresentada pelos extratos obtidos por BEAU.

Tabela 4.3 – Coeficiente da Correlação de Pearson e p-valor entre o teor de licopeno e parâmetros de cor para cada método de extração

Coeficiente de Correlação (r)	<i>L</i>*	<i>a</i>*	<i>b</i>*	<i>C</i>	<i>h</i>
ME					
Teor de Licopeno	0.8652	0.9923	0.9988	0.9975	0.9469
p-valor	0.0260	0.00009	0.000002	0.000009	0.0042
BEAU					
Teor de Licopeno	0.9910	0.9335	0.8734	0.8991	0.7957
p-valor	0.0001	0.0065	0.0230	0.0148	0.0583
PEAU					
Teor de Licopeno	0.6174	0.7539	0.7250	0.7460	0.6881
p-valor	0.1916	0.0834	0.1031	0.0886	0.1308

Por outro lado, os extratos obtidos por PEAU foram os menos atrativos em termos de cor, o que é compatível com os menores teores de licopeno e β -caroteno encontrados nos mesmos. A formação de radicais livres que pode ter afetado as amostras extraídas por PEAU já foi reportada como a causa da redução de cor devido à isomerização e degradação de pigmentos (SHI et al., 1999).

Uma vez que os extratos apresentados neste trabalho são ricos em pigmentos capazes de conferir colorações atrativas, o uso dos mesmos como corantes naturais em alimentos surge como uma possível aplicação. Pela análise de cor, os pós de goiaba também demonstraram potencial para melhorar a cor de alimentos, caso sejam usados como ingrediente em formulações.

4.3 CONCLUSÃO

Os pós de polpa e de resíduo de goiaba demonstraram-se fontes ricas de carotenoides, especialmente licopeno, confirmando o status desta fruta como uma das maiores fontes deste composto na natureza. Os extratos obtidos a partir desta fonte também apresentaram alta atividade antioxidante *in vitro*, confirmada pelos métodos DPPH, DPPH modificado, ABTS e FRAP. Além disso, os pós de goiaba apresentam uma morfologia rugosa e porosa, o que faz com que os mesmos sejam adequados para a aplicação em formulações alimentícias e também para a extração de compostos bioativos.

A extração assistida por ultrassom se mostrou uma técnica adequada para a recuperação de licopeno e β -caroteno a partir da goiaba e de seus subprodutos. A extração com acetato de etila por 30 min em um banho ultrassônico foi o melhor método, com o maior teor de carotenoides totais, atividade antioxidante e concentração de licopeno. Estes extratos também exibiram a coloração mais atrativa, o que foi confirmado pelos parâmetros da análise de cor. Por outro lado, a sonda ultrassônica causou a maior degradação de carotenoides, o que pode ter acontecido devido a uma intensa formação de radicais livres.

A maceração foi eficiente em extrair β -caroteno e licopeno a partir do da polpa de goiaba em pó. Porém, este método envolve uma grande quantidade de solvente orgânico e sua falta de praticidade o impede de ser usado em escala comercial. Portanto, a maceração deve ser substituída pela extração assistida por ultrassom, uma abordagem mais verde que permite a redução do uso de solvente, do tempo de extração e pode ser mais facilmente introduzido em indústrias alimentícias.

Por fim, este trabalho mostrou que o resíduo de processamento da goiaba é uma fonte rica de licopeno, um composto antioxidante. Sendo assim, esta fração da goiaba deve ter um destino apropriado na indústria de alimentos, podendo ser usada para proteger alimentos ricos em lipídeos contra a oxidação ou então como um ingrediente em alimentos funcionais.

Estudos futuros devem investigar o uso de solventes verdes juntamente com a extração assistida por ultrassom para a recuperação de carotenoides da goiaba e de seus subprodutos, de forma que se desenvolva um processo inteiramente ambientalmente amigável. Além disso, trabalhos futuros devem investigar técnicas de encapsulação para os extratos de goiaba para o desenvolvimento de novas formulações alimentícias, além da investigação dos possíveis efeitos antitumorais exibidos pelos compostos antioxidantes presentes no resíduo de goiaba.

Referências bibliográficas

ALVES, A.B., SILVA, M.G., CARVALHO, P.R.N., VISSOTTO, L.C., BRAGAGNOLO, N. Validação e estimativa da incerteza de método para análise de licopeno e β -caroteno em polpa de tomate por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1962-1966, 2010.

AZZOLINI, M., JACOMINO, A. P., BRON, I. U. Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 2, p. 139-145, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of free-radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CARVALHO, P.R.N., COLLINS, C.A., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Comparison of provitamin A determination by normal-phase gravity-flow column chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 33, n. 3-4, p. 133-137, 1992.

CORRÊA, L.C., SANTOS, C.A.F., VIANELLO, F., LIMA, G.P.P. Antioxidant content in guava (*Psidium guajava*) and araçá (*Psidium* spp.) germplasm from different Brazilian regions. **Plant Genetic Resources**, v. 9, n. 3, p. 384-391, 2011.

CHOE, E., MIN, D.B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 1, p. 1-22, 2006.

COSTA, L.A. Caracterização do resíduo de fabricação de farinha de mandioca e seu aproveitamento no desenvolvimento de alimento em

barra. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 2004.

DURING, A., HARRISON, E.H. An in vitro model to study the intestinal absorption of carotenoids. **Food Research International**, v. 38, p. 1001-1008, 2005.

GONZÁLEZ, I.A., OSORIO, C., MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J., GONZÁLEZ-MIRET, M.L., HEREDIA, F.J. Application of tristimulus colorimetry to evaluate color changes during the ripening of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) varieties with different carotenoid pattern. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 4, p. 840-848, 2011.

GOULA, A.M., VERVERI, M., ADAMAPOULOU, A., KADERIDES, K. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 821-830, 2017.

GRAFF, R.E., PETTERSSON, A., LIS, R.T., AHEARN, T.U., MARKT, S.C., WILSON, K.M., RIDER, J.R., FIORENTINO, M., FINN, S., KENFIELD, S.A., LODA, M., GIOVANNUCCI, E.L., ROSNER, B., MUCCI, L.A. Dietary lycopene intake and risk of prostate cancer defined by ERG protein expression. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 103, n. 3, p. 851-860, 2016.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345-391, 2012.

JAIN, N., DHAWN, K., MALHOTRA, S.P., SIDDIQUI, S., SINGH, R. Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.): compositional and enzymatic changes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 58, p. 309-315, 2003.

JAIN, N., DHAWN, K., MALHOTRA, S.P., SIDDIQUI, S., SINGH, R. Compositional and enzymatic changes in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 23, n. 3, p. 357-362, 2001.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A., RINCÓN, M., PULIDO, R., SARA-CALIXTO, F. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary

fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5489-5493, 2001.

KOHL, S.K., LANDMARK, J.D., STICKLE, D.F. Demonstration of absorbance using digital color image analysis and colored solutions. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 4, p. 644-646, 2006.

KONG, K.W., ISMAIL, A. Lycopene content and lipophilic antioxidant capacity of by-products from *Psidium guajava* fruits produced during puree production industry. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 53-61, 2011.

KONG, K-W., RAJAB, N.F., PRASAD, K.M., ISAMIL, A., MARKOM, M., TAN, C-P. (2010). Lycopene-rich fractions derived from pink guava by-product and their potential activity towards hydrogen peroxide-induced cellular and DNA damage. *Food Chemistry*, 123 (4), 1142-1148.

LADOLE, M.R., NAIR, R.R., BHUTADA, Y.D., AMRITKAR, V.D., PANDIT, A.B. Synergistic effect of ultrasonication and co-immobilized enzymes on tomato peels for lycopene extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, p. 453-462, 2018.

LANE, J.A., ER, V., HORWOOD, J., AVERY, K., HOLLY, J., MARTIN, R., NEAL, D., HAMDY, F., DONOVAN, J., METCALFE, C. A randomized controlled feasibility trial of green tea and lycopene interventions in men at elevated risk of prostate cancer (ProDiet). **European Journal of Surgical Oncology**, v. 44, n. 1, p. S39-S40, 2018.

LIANFU, Z., ZELONG, L. Optimization and comparison of ultrasound/microwave extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 731-737, 2008.

LIMA, R.S., FERREIRA, S.R.S., VITALI, L., BLOCK, J.M. May the superfruit red guava and its processing waste be a potential ingredient in functional foods?. **Food Research International**, v. 115, p. 451-459, 2019.

MONTENEGRO, M.A., NUNES, I.L., MERCADANTE, A.Z., BORSARELLI, C.D. Photoprotection of vitamins in skimmed milk by an

aqueous soluble lycopene-gum Arabic microcapsule. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 323-329, 2007.

MORTENSEN, A., SKIBSTED, L.H., TRUSCOTT, T.G. The interaction of dietary carotenoids with radical species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 13-19, 2001.

NIKI, E. Antioxidant capacity of foods for scavenging reactive oxidants and inhibition of plasma lipid oxidation induced by multiple oxidants. **Food & Function**, v. 7, n. 5, p. 2156-2168, 2016.

NORA, C.D., JABLONSKI, A., RIOS, A.O., HERTZ, P.F., JONG, E.V., FLÔRES, S.H. The characterization and profile of the bioactive compounds in red guava (*Psidium cattleyanum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, p. 1842-1849, 2014.

OBEROI, D.P.S., SOGI, D.S. Utilization of watermelon pulp for lycopene extraction by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 232, p. 316-321, 2017.

OLIVEIRA, D.D.S., LOBATO, A.L., RIBEIRO, S.M.R., SANTANA, A.M.C., CHAVES, J.B.P., PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Carotenoids and vitamin C during handling and distribution of guava (*Psidium guajava* L.) and papaya (*Carica papaya* L.) at commercial restaurants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6166-6172.

OROIAN, M., ESCRICHE, I. Antioxidants : Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.

PADULA, M., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Characterisation of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of Brazilian guavas (*Psidium guajava* L.). **Food Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 11-19, 1986.

PERVEEN, R., SULERIA, H.A., ANJUM, F.M., BUTT, M.S., PASHA, I., AHMAD, S. Tomato (*Solanum lycopersicum*) carotenoids and lycopene's chemistry: Metabolism, absorption, nutrition, and allied health claims – A comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 7, p. 919-929, 2015.

PULIDO, R., BRAVO, L., SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RIESZ, P., KONDO, T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 3, p. 247-270, 1992.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington: International Life Sciences Institute, 1999. 64 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., KIMURA, M., AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides**. Brasília: MMA/SBF, 2008. 100 p.

ROJAS-GARBANZO, C., GLEICHENHAGEN, M., HELLER, A., ESQUIVEL, P., SCHULZE-KAYSERS, N., SCHIEBER, A. Carotenoid profile, antioxidant capacity, and chromoplasts of pink guava (*Psidium guajava* L. Cv. 'Criolla') during fruit ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 3737-3747, 2017.

ROLDÁN-GUTIÉRREZ, J.M., CASTRO, M.D. Lycopene: The need for better methods for characterization and determination. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 2, p. 163-170, 2007.

RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, & F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. **Comunicado Técnico Online Embrapa**, v. 128, 2007.

SAINI, R.K., NILE, S.H., PARK, S.W. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, n. 3, p. 735-750, 2015.

SANTOS, R. C., OMBREDANE, A. S., SOUZA, J. M. T., VASCONCELOS, A. G., PLÁCIDO, A., AMORIM, A. G. N., BARBOSA, E. A., LIMA, F. C. D. A., ROPKE, C. D., ALVES, M. M. M., ARCANJO, D. D. R., CARVALHO, F. A. A., DELERUE-MATOS, C., JOANITTI, G. A., LEITE, J. R. S. A. Lycopene-rich extract from red

guava (*Psidium guajava* L.) displays cytotoxic effect against human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 via an apoptotic-like pathway. **Food Research International**, v. 105, p. 184-196, 2018.

SELVAMUTHUKUMARAN, M., SHI, J. Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. **Food Quality and Safety**, v. 1, n. 1, p. 61-81, 2017.

SHI, J., MAGUER, M.L., KAKUDA, Y., LIPTAY, A., NIEKAMP, F. Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. **Food Research International**, v. 32, p. 15-21, 1999.

SHISHIR, M.R.I., TAIP, F.S., AZIZ, N.A., TALIB, R.A., SARKER, M.S.H. Optimization of spray drying parameters for pink guava powder using RSM. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 461-468, 2016.

STAŠKO, A., BREZOVÁ, V., BISKUPIČ, S., MIŠKI, V. The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. *Free Radical Research*, v. 41, n. 4, p. 379-390, 2007.

SUN, M., TEMELLI, F. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 37, n. 3, p. 397-408, 2006.

TAKAHASHI, M., CHIBA, K., LI, P. Free-radical generation from collapsing microbubbles in the absence of a dynamic stimulus. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, p. 1343-1347, 2007.

TAPIERO, H., TOWNSEND, D.M., TEW, K.D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 2, p. 100-110, 2004.

TRIECHEL, M. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2016. 88p.

UCHÔA-THOMAZ, A.M.A., SOUSA, E.C., CARIOCA, J.O.B., MORAIS, S.M., LIMA, A., MARTINS, C.G., ALEXANDRINO, C.D., FERREIRA, P.A.T., RODRIGUES, A.L.M., RODRIGUES, S.P., THOMAZ, J.C.A., SILVA, J.N., RODRIGUES, L.L. Chemical

composition, fatty acid profile and bioactive compounds of guava seeds (*Psidium guajava* L.). **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 3, p. 485-492, 2014.

VILKHU, K., MAWSON, R., SIMONS, L., BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, p. 161-169, 2008.

VINATORU, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 17-25, 2001.

WANG, Y., JACOBS, E.J., NEWTON, C.C., MCCULLOUGH, M.L. Lycopene, tomato products and prostate cancer-specific mortality among men diagnosed with nonmetastatic prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 12, p. 2846-2855, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este projeto de mestrado conseguiu contribuir com dados novos no que diz respeito à exploração dos compostos bioativos da goiaba e de seus subprodutos, demonstrando-se que a fração residual deve ser aproveitada como uma matéria-prima abundante em compostos com atividade antioxidante, como fenólicos e carotenoides. Esta característica classifica a goiaba como uma superfruta e permite a utilização de sua polpa e de seu resíduo de processamento como ingredientes funcionais para a criação de novas formulações.

Os ensaios para estimar os compostos fitoquímicos da polpa e do resíduo de goiaba mostraram-se bons indicativos para se conhecer o teor de fenólicos totais, flavonoides, flavonóis e taninos condensados, com destaque para o ensaio de Prussian Blue, que atingiu resultados para fenólicos totais mais próximos àqueles quantificados por LC-ESI-MS/MS, uma técnica mais sofisticada e precisa. Portanto, recomenda-se que a técnica de Prussian Blue seja utilizada para a estimativa de fenólicos totais em detrimento do ensaio de Folin-Ciocalteu.

O perfil de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS apresentou variações dependendo da técnica de extração. Porém, no geral, todas as técnicas testadas mostram-se adequadas para a extração de fenólicos a partir da polpa e do resíduo de goiaba em pó.

A extração por ultra-turrax e a extração assistida por ultrassom de sonda foram equivalentes em termos de fenólicos quantificáveis da polpa da goiaba. Para aplicações industriais, a extração assistida por ultrassom de sonda pode ser mais adequada, devido ao tempo curto de extração (2 min, contra 1 h da extração por ultra-turrax).

A extração por líquido pressurizado se mostrou muito eficaz para a recuperação de fenólicos a partir do resíduo de goiaba. Esta técnica permitiu a identificação do maior número de fenólicos já reportado para esta matéria-prima até o presente momento (39 compostos), apresentando também o maior teor de fenólicos totais quantificado por LC-ESI-MS/MS.

Já a extração por ultrassom de banho se mostrou uma boa alternativa quando se deseja uma técnica mais rápida que os métodos convencionais e de custo mais econômico. Além disso, há a vantagem de se poder conduzir a extração de mais uma amostra por vez, o que é um fator atrativo para sua aplicação a nível industrial.

A extração por ultrassom de banho também se mostrou eficaz na recuperação de carotenoides a partir da polpa e do resíduo de goiaba. Com

a mesma, foi possível reduzir a quantidade de solvente usada e o tempo de extração. Portanto, este método caracteriza-se como uma alternativa possível para o desenvolvimento de um processo industrial menor agressivo ao meio ambiente para a extração de compostos bioativos a partir de fontes naturais.

Trabalhos futuros devem ser conduzidos a fim de se investigar técnicas que permitam a eliminação total de solventes orgânicos para a extração de bioativos. Neste cenário, a extração por água subcrítica pode ser uma opção interessante.

Também deve ser estudada a utilização dos extratos de goiaba ricos em fenólicos e carotenoides para a investigação da atividade antioxidante dos mesmos em testes com células e estudos *in vivo*.

Por fim, também é preciso se investigar técnicas de encapsulamento destes extratos para permitir a aplicação dos mesmos em produtos alimentícios.

ANEXO A

Tabela A.1 – Parâmetros da análise de LC-ESI-MS/MS para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos nas amostras de pó e extrato de polpa de goiaba (PGP e EPG) e pó e extrato de resíduo de goiaba (RGP e ERG) referente ao Capítulo 2.

	Composto Fenólico	[M-H] (m/z)	Íon Quantitativo (m/z)	Tempo de Retenção (min)	LOD* (mg L⁻¹)	LOQ* (mg L⁻¹)
1	Ácido Salicílico	139,6	91,1	10,8	0,0012	0,0040
2	Ácido Cinâmico	146,9	100,7	11,71	0,0283	0,0943
3	Ácido Mandélico	150,9	106,8	8,55	0,0059	0,0198
4	Vanilina	150,9	132,8	10,34	0,0053	0,0178
5	4-Hidroximetil-benzóico	150,9	104,2	8,52	0,0020	0,0068
6	Ácido Protocatecúico	153,0	109,0	6,90	0,0148	0,0495
7	Umbeliferona	160,8	129,0	10,69	0,0015	0,0052
8	Ácido p-cumárico	163,0	119,0	10,37	0,0012	0,0042
9	Ácido Metoxifenil-acético	164,9	118,6	10,33	0,0300	0,1000
10	Ácido Vanílico	166,8	148,5	9,51	0,0062	0,0206
11	Ácido Gálico	168,8	124,1	3,83	0,0133	0,0444
12	Coniferaldeído	176,9	160,3	11,22	0,0028	0,0095
13	Siringaldeído	180,9	163,1	10,73	0,0078	0,0260
14	Ácido Ferúlico	192,8	129,7	10,71	0,0038	0,0129
15	Ácido Siringico	196,9	119,6	9,97	0,0052	0,0173
16	Sinapaldeído	206,9	174,4	11,36	0,0012	0,0042
17	Ácido Sinápico	222,9	161,6	10,89	0,0022	0,0074
18	Crisina	252,9	62,2	13,98	0,0030	0,0100
19	Pinocembrina	254,9	60,7	13,37	0,0014	0,0047
20	Apigenina	268,8	114,8	12,52	0,0012	0,0042
21	Galangina	268,8	59,9	13,28	0,0026	0,0086
22	Naringenina	590,0	150,2	12,32	0,0015	0,0051
23	Kaempferol	284,8	62,6	12,27	0,0085	0,0285
24	Eriodictiol	286,8	132,1	11,73	0,0008	0,0026
25	Aromadendrina	286,8	123,9	11,22	0,0021	0,0072
26	Fustina	286,8	105,6	10,25	0,0019	0,0064
27	Catequina	288,8	120,3	8,68	0,0013	0,0044
28	Epicatequina	288,9	122,3	9,26	0,0085	0,0285
29	Hispidulina	298,8	282,7	12,66	0,0012	0,0042

30	Ácido Elágico	300,8	142,5	12,06	0,2727	0,9090
31	Quercetina	301,0	149,3	10,84	0,0113	0,0377
32	Taxifolina	302,8	120,7	10,65	0,0036	0,0121
33	Miricetina	316,9	150,6	11,23	0,0078	0,0260
34	Carnosol	329,0	284,0	13,88	0,0028	0,0095
35	Ácido Clorogênico	352,9	187,8	9,17	0,0018	0,0060
36	Ácido Rosmarínico	358,9	159,8	10,81	0,0008	0,0027
37	Isoquercetina	462,9	297,3	10,89	0,0019	0,0064
38	Ácido p-Anísico	150,8	105,2	11,34	0,0200	0,0667
39	Ácido 4- Hidroxicinâmico	162,9	116,8	10,46	0,0011	0,0034
40	Ácido Cafêico	178,8	131,3	9,45	0,0143	0,0476
41	Escopoletina	190,7	172,8	10,99	0,0011	0,0036
42	Resveratrol	226,9	181,6	11,14	0,0072	0,0240
43	Naringina	579,9	150,0	11,18	0,0086	0,0286
44	Rutina	609,1	301,0	10,72	0,0143	0,0476
45	Epigallocatequina	304,8	124,9	8,2	0,0122	0,0399
46	Epicatequina Galato	441,6	168,9	10,2	0,0144	0,0480
47	Ácido 4- aminobenzóico	135,8	90,5	10,47	1,44	4,8

ANEXO B

Tabela B.1 – Parâmetros da análise de LC-ESI-MS/MS para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos nas amostras de extrato de polpa de goiaba e resíduo de goiaba (EPG e ERG, respectivamente), obtidos por maceração (ME), extração assistida por ultrassom de banho (BEAU) e de sonda (PEAU), referente ao Capítulo 3.

	Composto Fenólico	[M-H] (m/z)	Íon Quantitativo (m/z)	Tempo de Retenção (min)	LOD* (mg L⁻¹)	LOQ* (mg L⁻¹)
1	Ácido Salicílico	139,6	91,1	10,8	0,0009	0,0048
2	Ácido Cinâmico	146,9	100,7	11,71	0,0263	0,0723
3	Ácido Mandélico	150,9	106,8	8,55	0,0048	0,0200
4	Vanilina	150,9	132,8	10,34	0,0044	0,0178
5	4-Hidroximetil-benzóico	150,9	104,2	8,52	0,0027	0,0059
6	Ácido Protocatecúico	153,0	109,0	6,90	0,0155	0,0568
7	Umbeliferona	160,8	129,0	10,69	0,0009	0,0049
8	Ácido p-cumárico	163,0	119,0	10,37	0,0011	0,0074
9	Ácido Metoxifenil-acético	164,9	118,6	10,33	0,0500	0,1001
10	Ácido Vanílico	166,8	148,5	9,51	0,0042	0,0103
11	Ácido Gálico	168,8	124,1	3,83	0,0282	0,0441
12	Coniferaldeído	176,9	160,3	11,22	0,0026	0,0091
13	Siringaldeído	180,9	163,1	10,73	0,0066	0,0198
14	Ácido Ferúlico	192,8	129,7	10,71	0,0028	0,0112
15	Ácido Siringico	196,9	119,6	9,97	0,0041	0,0098
16	Sinapaldeído	206,9	174,4	11,36	0,0011	0,0037
17	Ácido Sinápico	222,9	161,6	10,89	0,0035	0,0066
18	Crisina	252,9	62,2	13,98	0,0022	0,0090
19	Pinocembrina	254,9	60,7	13,37	0,0012	0,0037
20	Apigenina	268,8	114,8	12,52	0,0017	0,0033
21	Galangina	268,8	59,9	13,28	0,0018	0,0077
22	Naringenina	590,0	150,2	12,32	0,0011	0,0044
23	Kaempferol	284,8	62,6	12,27	0,0090	0,0276
24	Eriodictiol	286,8	132,1	11,73	0,0006	0,0025
25	Aromadendrina	286,8	123,9	11,22	0,0065	0,0068
26	Fustina	286,8	105,6	10,25	0,0024	0,0055
27	Catequina	288,8	120,3	8,68	0,0008	0,0041
28	Epicatequina	288,9	122,3	9,26	0,0099	0,0285

29	Hispidulina	298,8	282,7	12,66	0,0013	0,0039
30	Ácido Elágico	300,8	142,5	12,06	0,1845	0,8462
31	Quercetina	301,0	149,3	10,84	0,0123	0,0366
32	Taxifolina	302,8	120,7	10,65	0,0035	0,0106
33	Miricetina	316,9	150,6	11,23	0,0066	0,0222
34	Carnosol	329,0	284,0	13,88	0,0033	0,0085
35	Ácido Clorogênico	352,9	187,8	9,17	0,0012	0,0055
36	Ácido Rosmarínico	358,9	159,8	10,81	0,0003	0,0019
37	Isoquercetina	462,9	297,3	10,89	0,0022	0,0046
38	Ácido p-Anísico	150,8	105,2	11,34	0,0150	0,0578
39	Ácido 4- Hidroxicinâmico	162,9	116,8	10,46	0,0021	0,0025
40	Ácido Caféico	178,8	131,3	9,45	0,0115	0,0695
41	Escopoletina	190,7	172,8	10,99	0,0021	0,0029
42	Resveratrol	226,9	181,6	11,14	0,0067	0,0210
43	Naringina	579,9	150,0	11,18	0,0081	0,0252
44	Rutina	609,1	301,0	10,72	0,0128	0,0336
45	Epigallocatequina	304,8	124,9	8,2	0,0119	0,0338
46	Epicatequina Galato	441,6	168,9	10,2	0,0200	0,0365
47	Ácido 4- aminobenzóico	135,8	90,5	10,47	1,02	5,3



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

May the superfruit red guava and its processing waste be a potential ingredient in functional foods?

Renan da Silva Lima^a, Sandra Regina Salvador Ferreira^b, Luciano Vitali^c, Jane Mara Block^{b,*}

^a Agricultural Sciences Center, Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^b Department of Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^c Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Guava by-products
Ultrasound-assisted extraction
Ellagic acid
Antioxidants
Polyphenols
Flavonoids

ABSTRACT

Guava (*Psidium guajava* L.), a popular fruit in tropical countries, can be consumed *in natura* or transformed into many products. Guava's processing waste (seed, peel, and pulp leftovers) can represent up to 30% of the fruit's volume. Evidence indicates that this fraction still holds a significant amount of antioxidant substances, such as phenolic compounds. Therefore, the objective of this study was to investigate the phytochemical composition (total phenolics, flavonoids, flavonols, and condensed tannins), phenolic profile, and antioxidant activity (DPPH, modified DPPH, ABTS, and FRAP) of guava's pulp and waste extracts (GPE and GWE) obtained from guava's pulp and waste powders (GPP and GWP). The extraction was performed using a probe-type ultrasound for 2 min at 25 °C, using ethanol/water (30/70, v/v) as the solvent (15 mL for 1 g of sample). The phenolic profile of guava's powders and extracts was performed by LC-ESI-MS/MS analysis. GPE showed the highest concentration of total phenolics (2348.3 mg GAE 100 g⁻¹ by Folin-Ciocalteu and 518.00 mg GAE 100 g⁻¹ by Prussian Blue), and the greater *in vitro* antioxidant activity among all the assays tested. On the other hand, GWE was found to hold a higher amount of flavonoids (1006.08 mg QE 100 g⁻¹), flavonols (352.59 mg QE 100 g⁻¹), and condensed tannins (1466.9 mg g⁻¹). Overall, 37 phenolic compounds were identified among all the samples, with 14 compounds being reported for the first time for red guava. Ellagic acid was the major phenolic present in all samples. The results showed that guava's pulp and waste are a rich source of phenolics compounds and may be used as an ingredient for the development of functional foods.

1. Introduction

Guava (*Psidium guajava* L.) is one of the most popular exotic fruits in tropical countries because of its slightly sweet taste and bland aroma. It has drawn the attention of researchers due to its high phenolic content and other antioxidant substances, which could potentially classify guava as a superfruit. The color of guava's pulp varies according to its type, with red guava being superior in flavor and antioxidant compounds, such as carotenoids, when compared to the white variety (Yadava, 1996). Guava is a versatile fruit, therefore, it may be consumed *in natura* or processed into juices, jams, pie fillings, and other products. This fruit and its by-products have a potential for being incorporated into healthier processed foods because of their sensory characteristics and the presence of bioactive compounds.

Brazil, with a guava production of 424,305 tons, is the third largest

guava producer in the world (Triechele, 2016). The red varieties 'Pedro Sato', along with 'Paluma', are the main ones used both for *in natura* consumption and industry processing (Souza et al., 2014). Moreover, it is estimated that 55% of the total guava volume produced in Brazil is processed, which corresponds to 233,368 tons. Triechele (2016) reported that 30% of the total volume of processed guava is lost in the form of waste (seeds, peel, and pulp leftovers). Therefore, a total of 70,010 tons of residue is produced and, in many cases, discarded, despite its high amount of bioactive compounds.

Red guava has been previously analyzed for its phytochemical composition by some authors, and it has shown high contents of total phenolics (Vasco et al., 2008) and flavonoids (Kong et al., 2010). Phenolic compounds are a group of secondary metabolites found in plants, characterized by the presence of phenol units in its structure. The main phenolic group is the flavonoids, consisting of a 15-carbon

Abbreviations: GPP, Guava's pulp powder; GPE, Guava's pulp extract; GWP, Guava's waste powder; GWE, Guava's waste extract

* Corresponding author at: Federal University of Santa Catarina, Agricultural Sciences Center, Food Science and Technology Department, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP: 88034-001 Florianópolis, SC, Brazil.

E-mail addresses: s.ferreira@ufsc.br (S.R.S. Ferreira), janeblock@gmail.com (J.M. Block).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.053>

Received 30 May 2018; Received in revised form 14 October 2018; Accepted 19 October 2018

Available online 22 October 2018

0963-9969/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO D

1 **Green extraction methods as a tool to obtain phenolic-rich extracts from**
 2 **guava (*Psidium guajava* L.) pulp and processing waste**

3
 4 Renan da Silva Lima^a, Guilherme Corrêa Danielski^b, Simone Mazzutti^c; Sandra Regina
 5 Salvador Ferreira^c, Luciano Vitali^d, Jane Mara Block^{a*}
 6

7 ^{*}Corresponding author at: Federal University of Santa Catarina, Agricultural Sciences Center,
 8 Food Science and Technology Department, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP:
 9 88034-001, Florianópolis, SC, Brazil.

10 Corresponding author email: janeblock@gmail.com
 11

12 ^aDepartment of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina,
 13 Florianópolis, SC, Brazil

14 ^bDepartment of Electrical and Electronic Engineering, Federal University of Santa Catarina,
 15 Florianópolis, SC, Brazil

16 ^cChemical and Food Engineering Department, Federal University of Santa Catarina,
 17 Florianópolis, SC, Brazil

18 ^dDepartment of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil
 19

20 Email addresses: renanslima30@gmail.com (R.S. Lima); danielski.guilherme@gmail.com (G.
 21 C. Danielski), monemazzutti@gmail.com (S. Mazzutti); s.ferreira@ufsc.br (S.R.S. Ferreira);
 22 lucianovitali@gmail.com (L. Vitali); janeblock@gmail.com (J.M. Block).
 23
 24

25 **Abstract:** Guava (*Psidium guajava* L.) has been reported as a “superfruit” rich in phenolic
 26 compounds. Guava’s pulp and processing waste may also be a source for the extraction of these
 27 substances. However, conventional extraction techniques are usually laborious, time-
 28 consuming, and harmful to the environment due to the use of toxic solvents. Therefore, three
 29 green extraction methods (ultra-turrax extraction, bath-type ultrasound-assisted extraction, and
 30 pressurized liquid extraction) were studied for the recovery of phenolic-rich extracts from
 31 guava’s pulp and processing waste powders. A mixture of ethanol:water (30:70, v/v) was used
 32 as the solvent and the extracts were assessed for total phenolic, flavonoid, flavonol, and
 33 condensed tannins contents. Antioxidant activity was evaluated by DPPH, modified DPPH,
 34 ABTS, and FRAP assays. The phenolic profile of the samples was carried out using LC-ESI-
 35 MS/MS. The highest total phenolic (22.168 mg GAE g⁻¹), flavonoid (2.170 mg QE g⁻¹), and
 36 flavonol (1.180 mg QE g⁻¹) contents among all guava pulp extracts were found using the ultra-
 37 turrax extraction at 25 °C for 1 h. Pressurized liquid extraction (PLE) for 30 min at 60
 38 °C/10 MPa presented the best performance for the extraction of flavonoid (9.196 mg QE g⁻¹),
 39 flavonol (2.504 mg QE g⁻¹), and condensed tannins (11.498 mg CE g⁻¹) in guava waste. This is
 40 the first time that PLE is reported for the extraction of phenolic compounds from red guava
 41 and its by-products. Among the 39 phenolic compounds identified, scopoletin, resveratrol, and
 42 naringin are being reported for the first time in this raw material. The major phenolics identified
 43 in the samples were ellagic acid, vanillic acid, gallic acid, and isoquercetin. These results
 44 indicate that extracts rich in bioactive compounds from guava powders may be used as
 45 ingredients for the incorporation into functional foods.
 46

47 **Keywords:** bioactive compounds; pressurized liquid extraction; ultra-turrax; ultrasound-
 48 assisted extraction; LC-ESI-MS/MS.

ANEXO E

1 **Ultrasound-assisted Extraction of Lycopene and β -Carotene from Red Guava** 2 **(*Psidium guajava* L.) Pulp and Processing Waste**

3
4 Renan da Silva Lima^a, Itaciara Larroza Nunes^a, Jane Mara Block^{a*}

5
6 ^aCorresponding author at: Federal University of Santa Catarina, Agricultural Sciences Center,
7 Food Science and Technology Department, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Zip code:
8 88034-001, Florianópolis, SC, Brazil.

9 Corresponding author email: janeblock@gmail.com

10 ^aDepartment of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina,
11 Florianópolis, SC, Brazil.

12 Email addresses: renanslima30@gmail.com (R.S. Lima); itaciara.nunes@ufsc.br (I. L. Nunes);
13 janeblock@gmail.com (J. M. Block).

14 15 **ABSTRACT**

16
17
18 Lycopene and β -carotene are natural antioxidant pigments majorly encountered in fruits and
19 vegetables. Besides the ability to delay oxidation in food, β -carotene presents provitamin A
20 activity while lycopene is related to anticarcinogenic effects. Guava (*Psidium guajava* L.), is one
21 of the main sources of lycopene. In Brazil, its processing generates 70,010 tons of waste (seeds,
22 peels, and pulp leftovers) annually. In addition, evidence shows that guava's pulp and waste are a
23 rich source of carotenoids. Ultrasound-assisted extraction (UAE), a green technology, can be used
24 for carotenoid extraction to substitute the conventional techniques, which are harmful to the
25 environment. UAE has never been used to extract carotenoids from guava and its by-products
26 before. Therefore, this work obtained lycopene and β -carotene-rich extracts from guava's pulp and
27 waste powders (GPP and GWP, respectively) using maceration (ME), bath-type ultrasound-
28 assisted extraction (BUAE, 25 °C for 30 min), and probe-type ultrasound-assisted extraction
29 (PUAE, 25 °C for 5 min). Ethyl acetate was used as the solvent. The extracts were evaluated for
30 total carotenoid content (TCC), *in vitro* antioxidant activity by DPPH, modified DPPH, ABTS,
31 and FRAP, and lycopene and β -carotene content by HPLC-DAD. BUAE demonstrated to be the
32 best technique for lycopene extraction from guava pulp (135.0 mg 100 g⁻¹) and waste (76.64 mg
33 100 g⁻¹), followed by maceration (107.6 for GPE and 43.57 mg 100 g⁻¹ for GWE), and PUAE
34 (44.19 for GPE and 33.83 mg 100 g⁻¹ for GWE). BUAE extracts also showed the highest TCC,
35 antioxidant activity, and the most appealing color. The lycopene and β -carotene results presented
36 in this work are the highest among all the studies about carotenoid extraction from guava. This
37 could be due to the drying of the guava's pulp and waste prior to extraction, which increases the
38 bioavailability of lycopene. UAE proved to be a suitable extraction process to obtain carotenoid-
39 rich extracts from guava and its by-products.

40
41 **Keywords:** carotenoids; green extraction; antioxidant activity; HPLC-DAD; maceration; guava
42 powders.