



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS DAS FOLHAS DA GOIABA-SERRANA (*Acca
sellowiana* (O. Berg.) Burret) POR MÉTODOS À BAIXA PRESSÃO**

Joana Costa Kammers

Florianópolis

2017

Joana Costa Kammers

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS DAS FOLHAS DA GOIABA-SERRANA (*Acca
sellowiana* (O. Berg.) Burret) POR MÉTODOS À BAIXA PRESSÃO**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – EQA da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Dr. Ing - Haiko Hense

Coorientador: Ms. Pedro Henrique Santos

Florianópolis

2017

Joana Costa Kammers

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS DAS FOLHAS DA GOIABA-SERRANA (*Acca
sellowiana* (O. Berg.) Burret) POR MÉTODOS À BAIXA PRESSÃO**

Este trabalho de conclusão de curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Engenharia de Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos.

Local, 04 de julho de 2017.

Prof. Haiko Hense, Dr. Ing

Orientador

Pedro Henrique Santos, Ms.

Coorientador

Banca Examinadora:

Prof. Haiko Hense, Dr. Ing

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcelo Lanza, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Luis Gustavo Gonçalves Rodrigues, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar meu caminho e se mostrar sempre presente.

Aos meus pais, Dagui e Nivaldo por todo incentivo, suporte, amor e apoio dados durante toda minha vida.

Aos meus irmãos Pauline e Nivaldo Junior, por terem sido minhas fontes de inspiração, por me ensinarem sobre dedicação e amor a profissão.

Ao meu namorado, Marcos por toda compreensão, parceria, paciência, carinho e amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Haiko Hense pela orientação, pela oportunidade concedida e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, Ms. Pedro Henrique Santos por gentilmente ter aceitado me coorientar, por toda paciência, atenção, contribuições e amizade consolidada no decorrer deste trabalho.

A Marlise, Eng. Agrônoma da EPAGRI que tão atenciosamente nos recebeu e nos concedeu a matéria-prima.

Ao Professor Dr. Marcelo Lanza por cuidar da manutenção do Laboratório de Termodinâmica e Extração e Tecnologia Supercrítica.

À minha amiga e companheira de trabalho Ana, por dividir comigo as mesmas experiências e juntas encontrarmos soluções aos percalços do caminho, pelo que me foi cedido e pela confiança depositada.

Aos meus amigos da graduação, Helena por sempre ter sido ombro amigo e confidente, Jéssica pela descontração necessária nas dificuldades, Uiná pela sensibilidade e carinho, Jeronymo pelo apoio e pelas risadas garantidas. Todos eles, cada qual com suas características, foram fundamentais para minha formação acadêmica.

À minha amiga Thienne e minha prima Marina, por terem colaborado em pontos principais deste trabalho.

Às minhas amigas Camila e Francielly, que entenderam minha ausência e se fizeram ouvidos quando precisei.

Aos colegas do LATESC por dividirem conhecimento, paciência e espaço, aos que foram gentis e cederam equipamentos para eu realizar meus experimentos, ao ambiente descontraído e acolhedor em que todos me proporcionaram.

À banca que se fez presente para contribuir com a avaliação e aperfeiçoamento deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram e torceram por mim e pelo sucesso deste trabalho.

“Não há saber mais ou saber menos: Há saberes diferentes”.
(Paulo Freire)

RESUMO

A goiaba-serrana (*Acca sellowiana*) é uma planta nativa do sul do Brasil, e apesar de não ser conhecida comercialmente, é um fruto com excelentes características organolépticas, bastante reconhecida por possuir sua polpa adocicada e casca adstringente. Devido ao fruto ser bem adaptado as condições edafoclimáticas de Santa Catarina é que foram iniciados os processos de domesticação da espécie na serra Catarinense em 1986. O objetivo deste estudo é a obtenção de extratos da folha da goiaba-serrana utilizando métodos à baixa pressão, a fim de avaliar o rendimento global e os compostos fenólicos presentes no extrato. As extrações à baixa pressão (EBP) selecionadas foram Soxhlet, US e UB, utilizando etanol, água e uma mistura de etanol-água (50:50 v/v) como solventes. O teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. O rendimento dos extratos obtido pela utilização de etanol foi inferior aos resultados dos demais solventes. Em Soxhlet a extração com etanol foi a que obteve melhor rendimento, 21 % de extrato, enquanto que com etanol-água e água, resultaram em 27 % e 28 %, respectivamente. Foi realizada análise estatística através do teste de Tukey, e este demonstrou que não há diferença significativa entre os dois métodos de extração com ultrassom utilizando água e etanol-água como solventes. Todos os extratos obtidos por EBP apresentaram teores significativos de compostos fenólicos, que são os principais responsáveis pela atividade antioxidante de extratos de produtos naturais. O método que apresentou maior CFT foi US com etanol-água e etanol, resultando 322 mgEAG.g⁻¹ e 320 mgEAG.g⁻¹, respectivamente. Sendo assim, as folhas da goiaba-serrana podem ser consideradas como potenciais fontes de compostos fenólicos totais e possível fonte de compostos antioxidantes.

Palavras-chave: Goiaba-serrana. Folha. Soxhlet. Ultrassom. Compostos fenólicos. Antioxidantes.

ABSTRACT

Feijoa (*Acca sellowiana*) is a native plant from Southern Brazil and, although not known commercially, it is a fruit with terrific organoleptic characteristics with a distinct sweet pulp and astringent peel. Due to the great adaptation of the fruit to the local conditions and its organoleptic potential, processes of domestication of the species were initiated in Santa Catarina's ridge in 1986. Therefore, the objective of this study is to obtain extracts from feijoa leaves using low pressure methods in order to evaluate the total yield and phenolic compounds in the extract. The low pressure extractions (LPE) selected were Soxhlet, UP and UB, using ethanol, water and a mixture of ethanol-water (50:50 v/v) as solvents. The total phenolic content (TPC) was determined by the Folin-Ciocalteu method. The yield of the extracts obtained by using ethanol was lower than the results of other solvents. The Soxhlet ethanol extraction had the Best yield, 21% of extract, while with ethanol-water and water, these yields were 27% and 28%, respectively. Statistical analysis was performed using Tukey's test, which showed that there is no significant difference between the two methods of ultrasonic extraction using water and ethanol-water as solvents. All the extracts obtained by LPE presented significant levels of phenolic compounds, which are the main responsible for the antioxidant activity of natural product extracts. The method with the highest TPC was UP with ethanol-water and ethanol, resulting in 322 mgGAE.g⁻¹ and 320 mgGAE.g⁻¹, respectively. Thus, feijoa leaves can be considered a potential source of total phenolic content and possible source of natural antioxidants.

Key-words: Feijoa. Leaf. Soxhlet. Ultrasound. Phenolic compounds. Antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagens ilustrativas da goiaba-serrana.....	21
Figura 2 – Reação do ácido gálico com molibdênio.	31
Figura 3 – Folhas da goiaba-serrana (<i>Acca sellowiana</i>) dispostas em bandejas da estufa com circulação forçada.....	32
Figura 4 – Estufa com circulação forçada de ar utilizada na secagem da folha de goiaba-serrana.	33
Figura 5 – Equipamento utilizado na extração Soxhlet.....	35
Figura 6 – Equipamento para extração em sonicador ultrassônico.....	36
Figura 7 – Equipamento para extração em banho ultrassônico.	37
Figura 8 – Evaporador rotativo (à esquerda) e liofilizador (à direita).	37
Figura 9 – Método Folin-Ciocalteu aplicado ao extrato da folha da goiaba-serrana, obtido através do ultrassom banho. À esquerda a reação que ocorreu com o extrato, e à direita o branco.....	39
Figura 10 – Curva analítica de ácido gálico para utilização no cálculo CFT em folha de goiaba-serrana.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de umidade da amostra de folha de goiaba-serrana após secagem.	41
Tabela 2 – Rendimento global da goiaba-serrana por técnicas à baixa pressão.	42
Tabela 3 – Propriedades dos solventes.	43
Tabela 4 – Teor de Compostos fenólicos totais (CFT) de extratos de goiaba-serrana, obtidos por métodos à baixa pressão.....	45
Tabela 5 – Diagrama simplificado da análise de Compostos Fenólicos Totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BS	Base Seca
BU	Base Úmida
CFT	Compostos Fenólicos Totais
EAG	Equivalente Ácido Gálico
EAU	Extração Assistida por Ultrassom
EBP	Extração à Baixa Pressão
Epagri	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
ESC	Extração Supercrítica
GRAS	Generally Recognized as Safe
SANJO	Cooperativa Agrícola de São Joaquim
UB	Ultrassom Banho
US	Ultrassom Sonda
X ₀	Rendimento Global de Extração

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.2	OBJETIVO	17
1.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	GOIABA-SERRANA (<i>ACCA SELLOWIANA</i> (O. BERG) BURRET))	19
2.2	COMPOSTOS BIOATIVOS DA GOIABA-SERRANA	21
2.3	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	23
2.3.1	<i>Métodos convencionais de extração</i>	23
2.3.1.1	Extração Soxhlet	24
2.3.1.2	Maceração.....	25
2.3.1.3	Hidrodestilação.....	25
2.3.2	<i>Métodos não-convencionais de extração</i>	25
2.3.2.1	Extração Assistida por Ultrassom (EAU)	26
2.4	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)	27
2.4.1	<i>Método de avaliação dos compostos fenólicos</i>	29
2.4.2	<i>Método Folin-Ciocalteu</i>	29
2.5	CONSIDERAÇÕES	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	RECEPÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	32
3.1.1	<i>Teor da umidade na amostra</i>	32
3.1.2	<i>Secagem e moagem</i>	33
3.2	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	34
3.2.1	<i>Extrações à baixa pressão</i>	34
3.2.1.1	Extração em Soxhlet	34
3.2.1.2	Extração assistida por ultrassom com uso de sonda (US)	35
3.2.1.3	Extração assistida por ultrassom com uso de banho (UB)	36
3.3	ELIMINAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO DOS EXTRATOS	37
3.4	AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT).....	38
3.5	CÁLCULOS DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO	39
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

4.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	41
4.2	RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO (X_0).....	41
4.3	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)	44
5	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	49
	APÊNDICE A	57

1 INTRODUÇÃO

A goiaba-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret), conhecida também por feijoa, goiaba-do-mato, ou ainda por goiaba-da-serra, é uma espécie nativa do planalto meridional brasileiro e ficou evidenciada pelo seu expressivo potencial organoléptico (MATTOS, 1990; SANTOS, 2009).

Muitas espécies nativas são desconhecidas pela maioria da população, como é o caso da goiaba-serrana, pertencente à família *Myrtaceae*, considerada fruta exótica no Brasil, mas cultivada comercialmente em outros países (GODOY et al., 2010).

Segundo Pozzan (2014), apesar da goiaba-serrana ser nativa do Brasil, as frutas que podem ser encontradas por aqui, são geralmente provenientes de plantações feitas na Colômbia. Apesar de ter um potencial econômico considerável, os plantios para fins comerciais no Brasil ainda são raros, por conta da fragilidade do fruto, cuja armazenagem não ultrapassa 3 semanas, e pelo fato da espécie ainda não estar completamente domesticada.

A goiabeira-serrana é uma planta nativa do sul do Brasil mas já foi introduzida e está sendo produzida em países como a Colômbia, Estados Unidos e Nova Zelândia. Nesses países, a goiaba-serrana é utilizada para produção de frutos *in natura*, ou ainda para produção de geleias, bebidas, chocolates, biscoitos e sorvetes (EPAGRI, 2009).

Na região Sul do Brasil há muita riqueza de diversidades de frutas consideradas exóticas, há diversas espécies frutíferas nativas com potencial de uso como a Pitangueira (*Eugenia uniflora*), o Araçazeiro (*Psidium cattleianum*) e, especialmente, à Goiabeira-Serrana (*Acca sellowiana*). Contudo, na grande maioria, os esforços de pesquisa são direcionados à seleção de cultivares de espécies exóticas com melhor adaptação às condições climáticas e resistência a patógenos, o que deixa em desvantagem os estudos das espécies nativas que podem apresentar potencial equivalente ou até mesmo superior às espécies comumente cultivadas (SANTOS, 2005).

Em Santa Catarina, devido ao potencial organoléptico dos frutos da goiabeira-serrana, iniciaram-se estudos através de um Programa de Melhoramento Genético estabelecido em 1986 pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. – Epagri. Como resultado, já existem quatro cultivares lançadas

(Alcântara, Helena, Nonante e Mattos), além de conhecimentos sobre pragas, doenças e algumas informações necessárias para a exploração da espécie (EPAGRI, 2009).

O interesse no estudo desta mirtácea, deve-se ao fato da espécie adaptar-se às condições edafoclimáticas de Santa Catarina, e pelos frutos apresentarem expressivo potencial organoléptico, o cultivo desta planta é favorecido por apresentar como alternativa de renda a agricultores locais. Além disso, a goiaba-serrana apresenta grande potencial de uso ornamental, paisagístico e para recuperação de áreas degradadas (LEGRAND; KLEIN, 1977; MATTOS, 1990; DUCROQUET; RIBEIRO, 1991; NODARI et al., 1997; DUCROQUET; HICKEL; NODARI, 2000; BARNI et al., 2004; SILVA et al., 2013).

Para o cultivo comercial ser possível, é importante que as variedades selecionadas reúnam características superiores às plantas em estado natural, em termos de produtividade, estabilidade na produção e qualidade de frutos. Para que tais variedades sejam constituídas, é necessário que haja variabilidade suficiente na espécie, capaz de prover amostras que possam ser utilizados em programas de melhoramento (ALLARD, 1999).

Alguns estudos foram realizados (BASILE et al., 1997; VUOTTO et al., 2000; IELPO et al., 2000) e comprovaram propriedades farmacológicas presentes nos frutos de goiaba-serrana (*Acca sellowiana*), os quais demonstraram que este fruto apresenta atividade antibacteriana e antioxidante, assim como a existência de flavonoides em seus frutos, cujas propriedades auxiliam na atividade imunológica (SANTOS, 2005).

Segundo Mattos (1990), os frutos da goiabeira-serrana são muito apreciados como “frutos de mesa” por serem saborosos e aromáticos. Além disso, sua poupa pode ser utilizada para fabricação de geleias, goiabadas, compotas, sucos e licores. As pétalas das flores são comestíveis, e as folhas e cascas são utilizadas para chás medicinais.

Atualmente, a SANJO (Cooperativa Agrícola de São Joaquim) é uma das cinco maiores produtoras de maçãs do Brasil. Dentre os produtos elaborados por eles encontra-se destilados, espumantes, fermentados de maçã, sidra e, principalmente, sucos e vinhos. A empresa utiliza a goiaba-serrana que, juntamente com a maçã, compõe um suco denominado misto, este já se encontra à venda e tem alto índice de aceitabilidade.

Uma tendência na indústria de alimentos é a busca por extratos naturais com potenciais ativos de grau alimentício. A extração é um passo muito importante no isolamento, identificação e utilização de compostos presentes nesses extratos e não existe um método de extração padrão (NETTO, 2014).

Segundo Azmir et al. (2013), compostos bioativos de plantas podem ser obtidos por várias técnicas clássicas de extração. A maioria destas técnicas baseiam-se na extração utilizando diferentes solventes e a aplicação de calor. Um método clássico que será utilizado neste trabalho será extração Soxhlet. Esta técnica tem sido amplamente utilizada para a extração de compostos bioativos a partir de várias fontes naturais. É usado como um modelo para a comparação das novas alternativas de extração.

Outro método escolhido foi extração assistida por ultrassom, baseada na ação de ondas mecânicas de baixa frequência às quais resultam na cavitação, fenômeno responsável pela formação e colapso de bolhas de cavitação que refletem em áreas pontuais de alta pressão e temperatura, facilitando o processo de extração dos elementos (BENDICHO et al., 2012; KRUG, 2008). As vantagens desta extração incluem redução do tempo de extração, energia e a utilização de solvente (CHEMAT et al., 2008). Autores como Herrera e Luque de Castro (2004) descobriram que o ultrassom pode melhorar o rendimento de extração de acordo com os solventes selecionados.

Assim, considerando o exposto acima, o presente trabalho de pesquisa envolve a extração de compostos com atividade antioxidante da folha da goiaba-serrana mediante o emprego de extrações à baixa pressão.

1.2 OBJETIVO

Obtenção de extratos das folhas da goiaba-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret) utilizando métodos à baixa pressão.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Revisão bibliográfica acerca dos métodos convencionais e não convencionais de extração de compostos bioativos de matrizes vegetais (frutos integrais e folhas);

- b) Revisão bibliográfica acerca dos compostos bioativos presentes na goiaba-serrana;
- c) Obtenção de extratos de folhas de goiaba-serrana por diferentes métodos de extração: Soxhlet e extração assistida por ultrassom por dois meios, banho com ultrassom e sonda de ultrassom com uso de etanol, água e a mistura etanol-água (50:50 v/v) como solventes, comparando os resultados entre si e com dados da literatura;
- d) Quantificar compostos fenólicos totais utilizando curva de calibração de ácido gálico e medições espectrofotométricas de cada extrato, comparando os resultados entre si e com dados da literatura;
- e) Publicar os resultados obtidos em revistas científicas da área.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GOIABA-SERRANA (*Acca sellowiana* (O. BERG) BURRET))

A goiaba-serrana (*Acca sellowiana*) ou ainda, *Feijoa sellowiana*, pertence à família *Myrtaceae*, a qual compreende 130 gêneros e aproximadamente 4.000 espécies descritas, sendo a maior família da ordem *Myrtales* (SOUZA; LORENZI, 2005). Entre todos os gêneros existentes, quatro tem atualmente importância econômica: 1) *Psidium* – destacando-se a goiabeira e o araçazeiro; 2) *Eugenia* - onde se destaca a pitangueira; 3) *Mirciaria* – no qual se destaca a jabuticabeira e 4) *Acca* (*Feijoa*) - do qual destaca-se a Goiabeira-Serrana, nativa no planalto meridional do Brasil com dispersão secundária no Uruguai (CRÖNQUIST, 1981).

A espécie é conhecida popularmente pelos nomes de goiabeira-da-serra, goiabeira-do-mato, goiabeira-serrana ou feijoa (DUCROQUET; RIBEIRO, 1991). Existem indícios de que os indígenas Kaingang a chamam de *kanê kriyne*, já no Uruguai é conhecida como *guayabo verde* ou *guayabo del país* e, na língua inglesa é conhecida por *feijoa* ou *pinneapple-guava* (SANTOS et al., 2011).

A espécie foi coletada inicialmente em 1819 por Sellow, da qual deriva o nome *sellowiana*, e Berg foi quem realizou a descrição. No ano de 1856, Berg descreveu o gênero *Acca*, e em 1859 o gênero *Feijoa*, como os dois gêneros não apresentam diferenças que justifiquem a sua separação, são aceitos ambos os nomes *Acca sellowiana* e *Feijoa sellowiana*. No entanto, *Acca sellowiana* é mais utilizado por ser o mais antigo (MATTOS, 1986; CACIOPPO, 1988; DUCROQUET et al., 2000).

A goiabeira-serrana apresenta-se como arbusto ou pequena árvore, perenifólio, bastante ramificada quando encontrada no campo. Possui uma altura que pode variar de 2 a 6 m, devido à grande diversidade do porte da espécie, no entanto, raramente ultrapassa 5 m de altura. Dispõe de ramos cilíndricos, opostos, acinzentados, glabros, desprendendo plaquinhas de casca. As folhas são opostas, curtas, pecioladas, pequenas e estreitas. Apresenta face superior verde-escura brilhante e face inferior esbranquiçada (MATTOS, 1990; DUCROQUET; RIBEIRO, 1991). Floresce nos meses de outubro e novembro, as flores podem apresentar-se solitárias ou em cachos de no máximo 5 unidades. Suas flores sépalas discretas, e pétalas carnosas e recurvadas, normalmente brancas por fora e púrpuras internamente (MATTOS, 1986; DUCROQUETE et al., 2000).

O fruto, classificado como um pseudofruto do tipo pomo, pela flor ser epígina, com ovário ínfero e aderente. É uma baga com formato variando de redondo a oblongo, polpa cor gelo, casca lisa, semirrugosa ou rugosa, com diâmetro de 3 a 5 cm, comprimento de 4 a 10 cm, peso de 20 a 250 g e rendimento de polpa de até 50%. O fruto da goiabeira-serrana é similar ao da goiabeira comum (*Psidium guajava* L.), mas apresenta casca verde, espessura variável de 4 a 12 mm, e não comestível. Com polpa de sabor singular doce-acidulado e aroma penetrante (FRANÇA, 1991; DUCROQUET et al., 2000; AMARANTE; SANTOS, 2011) (Figura 1).

O fruto tem sabor doce e é muito aromático. A polpa em torno das sementes é succulenta e na proximidade da casca é ligeiramente arenoso. A casca é azeda e amarga, mas pode ser comida com a polpa, já que o azedo da casca contrasta com a doçura da polpa. A goiaba-serrana é fonte de vitamina C, baixa em calorias e rica em minerais e fibras (RODERICK, 2010).

Além do consumo *in natura*, os frutos podem ser processados e utilizados na produção de sucos, geleias e sorvetes. Nas áreas de ocorrência natural, os frutos são muito apreciados e consumidos, sendo que a maturação ocorre de fevereiro até início de junho. Além do aproveitamento dos frutos, as pétalas das flores podem ser destinadas para consumo humano (decoração de pratos, saladas, doces) em razão do seu agradável sabor. Adicionalmente, devido à beleza das flores e ao porte da planta, esta pode ser usada na ornamentação urbana ou residencial (AMARANTE; SANTOS, 2011), como pode ser observado na Figura 1.

Em Santa Catarina, seu cultivo comercial foi iniciado em regiões de maior altitude. A goiaba-serrana já está em cultivo comercial e é igualmente apreciada por consumidores na Nova Zelândia, França, Estados Unidos (DUCROQUET; RIBEIRO, 1996), e Colômbia (EPAGRI 2009).

Figura 1 – Imagens ilustrativas da goiaba-serrana. A) Flores. B) Planta em plena floração. C) Aparência de frutos com corte transversal e longitudinal. D) Apresentação da folhagem e de frutos em estágio de maturação.



Fonte: A e B) Dream Garden (*Acca sellowiana*) (2015). C) Epagri (2009). D) Dream Garden (*Acca sellowiana*) (2015).

2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS DA GOIABA-SERRANA

A história de plantas utilizadas pela humanidade é tão antiga como o início da própria humanidade. Inicialmente, as pessoas usavam plantas para fins nutricionais, porém, após a descoberta de propriedades medicinais tornaram-se fontes de prevenção de doenças e melhoria da saúde em diversas comunidades (AZMIR et al., 2013).

Diversos estudos foram realizados (BASILE et al., 1997; VUOTTO et al., 2000; IELPO et al., 2000) e comprovaram as propriedades farmacológicas presentes nos frutos de goiaba-serrana, os quais demonstraram que este fruto apresenta atividade antibacteriana e antioxidante, assim como a existência de flavonoides em seus frutos, cujas propriedades auxiliam na atividade imunológica (SANTOS, 2005).

O valor nutracêutico comercial de frutos da goiaba-serrana reside no seu alto conteúdo fenólico que, por sua vez, fornece o fruto com excelentes propriedades antioxidantes. Os fenóis são responsáveis pela atividade imunestimulante, pela atividade anti-inflamatória e provavelmente também a atividade antimicrobiana do fruto (RODERICK, 2010).

Segundo Saj, Roy e Savitha (2008), o óleo essencial da goiaba-serrana revelou um amplo espectro de atividade antimicrobiana, especialmente contra cepas fúngicas. Um grupo japonês (MOTOHASHI et al., 2000) descobriu que os extratos da casca da fruta *in vitro*, possuíam forte atividade antimicrobiana e concluiu que este material tinha um bom potencial terapêutico. Basile et al. (1997), descreveram um extenso estudo da atividade antibacteriana de vários extratos de todas as partes da goiaba-serrana. Todos os extratos foram ativos contra 8 estirpes bacterianas, mas a atividade verificou-se residir principalmente nas sementes, seguindo pelo fruto e as partes vegetativas.

Bontempo et al. (2007) e Cassady et al. (1993) descobriram que extratos de goiaba-serrana extraídos com acetona inibiram o crescimento de células cancerígenas selecionadas. O grupo identificou flavona como o princípio ativo e mostrou que induzia a apoptose destas células. Relacionando produtos bioativos, os elagitaninos, foram identificados nas folhas e frutos de goiaba-serrana (AMAKURA et al., 2000; OKUDA et al., 1980) e estes polifenóis são conhecidos por inibir o crescimento de câncer e tumores.

Extratos de goiaba-serrana com acetona têm atividade anti-inflamatória, devido em parte, pela supressão da produção de óxido nítrico por flavona (ROSSI et al., 2007).

McGhie, Hunt e Barnett (2004), demonstrou que a maior parte da atividade antioxidante da polpa da fruta da goiaba-serrana reside no grupo proantocianidina de produtos polifenólicos, que habitualmente fornecem uma fruta com um sabor adstringente e, as vezes amargo.

Beyhan et al. (2010), realizou pesquisas analisando a capacidade antioxidante total do extrato de frutas frescas, frutas secas e da folha da goiaba-serrana. O resultado do estudo mostrou que ambas as frutas e folhas têm capacidade antioxidante, mas a atividade da folha foi superior à da fruta.

2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os estudos qualitativos e quantitativos de compostos bioativos de plantas dependem na sua maioria da escolha adequada do método de extração (SMITH, 2003; SASIDHARAN et al., 2011). A extração é a primeira etapa de qualquer estudo de plantas medicinais, desempenha um papel significativo e crucial no resultado final. Segundo Hernández et al. (2009), os fatores mais comuns que afetam processos de extração são propriedades da matriz da planta, solvente, temperatura, tempo e pressão.

Segundo Azmir et al. (2013), só é possível realizar uma separação, identificação e caracterização de compostos bioativos, se for seguido por um processo adequado de extração. Diferentes técnicas de extração devem ser utilizadas em diversas condições para a compreensão da seletividade de extração, a partir de diversas fontes naturais.

Existem várias técnicas de extração para obtenção de extratos de matrizes vegetais, entre elas: destilação por arraste a vapor, extração com solventes como maceração, Soxhlet, percolação, infusão e as não convencionais como extração supercrítica, extração assistida por microondas e extração assistida por ultrassom (VINATORU, 2001).

Antes de executar a extração deve-se levar em consideração as características do material vegetal, o seu grau de divisão, o meio extrator e a metodologia (SIMÕES et al., 2003).

No presente estudo, serão revisadas as técnicas de extração à baixa pressão em Soxhlet, extração assistida por ultrassom com uso de sonda (US) e extração assistida por ultrassom com uso de banho (UB).

2.3.1 Métodos convencionais de extração

Azmir et al. (2013), descreveu que compostos bioativos a partir de plantas podem ser extraídos pelas várias técnicas clássicas de extração. A maioria destas técnicas baseiam-se na extração utilizando diferentes solventes e na aplicação de calor e/ou de mistura dos dois fatores. Afim de obter compostos bioativos de plantas, as técnicas clássicas existentes são: extração via Soxhlet, maceração e hidrodestilação.

2.3.1.1 Extração Soxhlet

O extrator Soxhlet foi proposto pelo químico alemão Franz von Soxhlet (1879), e inicialmente foi projetado para a extração de lipídios. Mas, atualmente este método tem sido amplamente utilizado para a extração de valiosos compostos bioativos provenientes de fontes naturais (AZMIR et al., 2013). Segundo Instituto Adolfo Lutz (2008), o resíduo obtido não é constituído unicamente por lipídios, mas por todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente. Estes conjuntos incluem os ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, as lecitinas, as ceras, os carotenoides, a clorofila e outros pigmentos, além dos esteróis, fosfatídios, vitaminas A e D, óleos essenciais, e outros.

Segundo Schneider (1980), no processo de liberação extrativa levam-se em conta três etapas principais: a penetração do solvente no tecido; a formação de uma miscela intracelular e, a difusão do extrato na miscela externa. Consiste no tratamento sucessivo e intermitente da amostra imersa em um solvente puro, graças à sifonagem e subsequente condensação do solvente aquecido dentro do balão que está na base do aparelho (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998).

Esta extração opera em ciclos de preenchimento do extrator Soxhlet onde se encontra a matriz vegetal. Em cada ciclo da operação, o material vegetal entra em contato com o solvente renovado; assim o processamento possibilita uma extração altamente eficiente (SIMÕES et al., 2003; LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Uma das vantagens que o método de Soxhlet apresenta é que a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo sua constante renovação; outra vantagem é que a temperatura do sistema se mantém relativamente alta, visto que o calor aplicado para o processo de evaporação é constante. Esta é uma metodologia muito simples, pois não requer treinamento especializado e possibilita uma extração eficiente e com uma quantidade maior de extrato em relação a outros métodos, não havendo necessidade de filtração da miscela após a extração, pois a amostra esteve envolta no cartucho durante todo o procedimento (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998).

Segundo Luque de Castro e Priego-Capote (2010), as desvantagens da extração por Soxhlet são o tempo que esse método exige, leva em média 6 h, e a geração de quantidades consideráveis de resíduos de solventes no extrato quando

comparada à outras metodologias de extração de sólidos, como a extração supercrítica. Apesar disso, possibilita extrair mais massa de amostra do que a maioria dos métodos mais recentes como extração com microondas, ultrassom ou fluido supercrítico (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998). Por ser uma metodologia eficaz, a extração Soxhlet é usada como um modelo para a comparação das novas alternativas de extração.

2.3.1.2 Maceração

A maceração é o método na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em temperatura ambiente, recipiente fechado, durante um período prolongado (horas ou dias), sob ocasional agitação e não há renovação de solventes (processo estático). Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula (MIYAKE, 2016).

2.3.1.3 Hidrodestilação

No método de hidrodestilação, o material a ser destilado fica em contato direto com a água, e quando esta entra em ebulição, arrasta os compostos voláteis consigo inclusive o óleo, e quando condensa, forma uma mistura heterogênea, com duas fases, devido à diferença de polaridade e densidade entre a água e o óleo (OLIVEIRA; SOUZA, 2012).

2.3.2 Métodos não-convencionais de extração

O desenvolvimento de novas técnicas de extração para indústrias de alimentos tem recebido nos últimos anos atenção especial por conta das restrições ambientais, regulamentos de saúde pública e a necessidade de minimização de custos com energia. Na indústria processadora de alimentos, a utilização de solventes orgânicos para obtenção de extratos naturais implica em algumas dificuldades, uma delas é o tipo do solvente a ser empregado, e também há desvantagem referente às transformações oxidativas ocorridas durante a remoção do solvente (CARVALHO JUNIOR et al., 2005).

Os métodos não-convencionais são considerados ambientalmente mais amigáveis, devido à diminuição do uso de produtos químicos sintéticos e orgânicos, além disso, o tempo operacional é menor e obtém-se melhores rendimentos e qualidade do extrato. Estes métodos estão sendo desenvolvidos nos últimos 50 anos. Algumas das técnicas mais promissoras são a extração assistida por ultrassom, por microondas, por campo elétrico pulsado, extração com fluido supercrítico e com líquido pressurizado (AZMIR et al., 2013).

2.3.2.1 Extração Assistida por Ultrassom (EAU)

O ultrassom é um método que utiliza a energia de ondas sonoras que são transmitidas em frequência superior à capacidade auditiva do ouvido humano. Estas ondas sonoras criam uma vibração única que causa uma variação na pressão no líquido gerando a cavitação (LUZ, 1998). A EAU tornou-se uma boa alternativa aos métodos de extração convencionais, devido à sua alta eficiência e baixos consumos de solvente e energia. Este método tem sido utilizado com êxito para extração de substâncias bioativas de plantas (RODRIGUES; PINTO, 2007). Além disso, Koh (1983) e Marvin et al. (1992) citam como vantagens da EAU a alta reprodutibilidade da técnica, a possibilidade de utilização para uma ampla faixa de tamanho de amostra e a rapidez no processamento, como também o baixo custo.

A tecnologia de ultrassom aumenta o rendimento da extração de compostos orgânicos, devido ao fenômeno de cavitação produzido no solvente. Entre os ciclos de som são produzidas bolhas de gás que cavitam, aumentando a temperatura e a pressão (PANIWNYK et al., 2001), quando estouram elas rompem a matriz vegetal, onde ocorre a extração.

A EAU, juntamente com a extração em Soxhlet geram resíduos de solventes que precisam ser recuperados e descartados de forma consciente para não ocasionar danos ao meio ambiente. Além disso, resíduos de solvente podem permanecer no extrato e cuidados adicionais devem ser tomados para posterior uso do extrato na indústria farmacêutica ou alimentícia (SALVADOR, 2014).

2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

Os compostos fenólicos são o grupo de antioxidantes mais abundantes na natureza. Eles são chamados de sequestradores de radicais livres, pois agem como antioxidantes doando hidrogênio ou transferindo elétrons para o radical livre (BOROSKI et al., 2015). A classe a qual os compostos fenólicos pertencem, inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que apresentam no mínimo um anel aromático em que ao menos um hidrogênio é trocado por um grupamento hidroxila (SIMÕES et al., 2004).

Alguns compostos fenólicos que se apresentam no metabolismo secundário dos vegetais são estruturas variadas, como os ácidos fenólicos dos pigmentos hidrossolúveis das flores, frutos e folhas; além de abranger importantes polímeros nos vegetais, como as ligninas e os taninos. Do mesmo modo, as estruturas fenólicas fazem parte de proteínas, alcaloides e terpenoides (SIMÕES et al., 2004).

Comumente, os compostos fenólicos vêm agindo beneficemente na saúde humana. Esta ação está relacionada com a atividade anti-inflamatória e com o impedimento da aglomeração das plaquetas sanguíneas, como consequência da ação dos radicais livres no organismo. Quando estes protegem moléculas como o DNA, podem vir a abortar alguns processos carcinogênicos (SILVA et al., 2010).

Os compostos fenólicos também são comumente classificados de acordo com a ocorrência em que estes se apresentam na natureza, sendo eles divididos em compostos fenólicos amplamente distribuídos, no qual estão presentes os derivados de ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonoides e derivados de polimerização (taninos e ligninas), além de compostos fenólicos de distribuição restrita, no qual se encaixam as classes de substâncias que não foram citadas anteriormente (SIMÕES et al., 2004).

Os compostos fenólicos podem se formar a partir de duas rotas biogenéticas: via ácido chiquímico, a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimalato que inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. É esta via de formação que irá decidir o padrão de substituição do composto fenólico resultante e se os grupos hidroxilas serão dispostos na posição *orto* ou *meta* (SIMÕES et al., 2004).

Quando presentes na natureza, os compostos fenólicos não são encontrados no seu estado livre, e sim sob a forma de ésteres e ou de heterosídeos, o que significa que estes compostos são solúveis em água e também em solventes polares. Estes

compostos, por serem fenólicos, são muito reativos quimicamente, o que influencia quando se quer isolá-los dos vegetais, pois terão que ser isolados por meio da sua solubilidade em soluções fracamente básicas (SIMÕES et al., 2004).

Os compostos fenólicos influenciam no sabor, odor e coloração de inúmeros vegetais, além de serem economicamente importantes pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas (SIMÕES et al., 2004). Além de serem os metabólitos secundários mais numerosos e largamente distribuídos nas plantas, no qual aproximadamente 2% do carbono que as plantas fotossintetizam, o que equivale a 10^9 g por ano, é convertido em flavonoides e compostos relacionados (DAAYF; LATTANZIO, 2008).

As plantas, por serem organismos imóveis, necessitam produzir substâncias que ofereçam proteção a elas, e assim lhes permitam sobreviver nos diferentes nichos ecológicos terrestres. Essas substâncias que tem função de proteção são os metabólitos secundários, no qual os compostos fenólicos se encontram. As funções são de defesa (contra herbívoros, micróbios, vírus ou plantas), de sinalização, de proteção à radiação ultravioleta ou ainda como antioxidante (DAAYF; LATTANZIO, 2008). Segundo Daayf e Lattanzio (2008), um exemplo dessa proteção é quando as plantas sintetizam os compostos fenólicos que atuam absorvendo a radiação nas camadas epidérmicas dos tecidos ou regulando o sistema antioxidante nas células, protegendo-se assim da radiação.

Estudos comprovaram que o fruto da goiaba-serrana apresenta atividade antioxidante e a existência de flavonoides possuem propriedades que auxiliam na atividade imunológica (SANTOS, 2005). Outra pesquisa analisou a capacidade antioxidante total do extrato de frutas frescas, frutas secas e da folha da goiaba-serrana. O resultado do estudo mostrou que ambas as frutas e folhas têm capacidade antioxidante, mas a atividade da folha foi superior à da fruta (BEYHAN et al., 2010).

Magina et al. (2010) analisou atividade antioxidante de espécies de *Eugenia*, e verificou que o extrato bruto do caule de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia beaurepaireana* apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos quando comparado ao extrato das folhas, porém, de uma maneira geral, as frações obtidas das folhas apresentam a maior quantidade de compostos fenólicos.

2.4.1 Método de avaliação dos compostos fenólicos

Segundo Moure et al. (2001), os métodos que são utilizados para analisar os compostos fenólicos são comumente classificados de acordo com a determinação de compostos fenólicos totais, quantificação individual e/ou de um grupo ou classe de compostos fenólicos. A quantificação dos compostos fenólicos é influenciada por diferentes fatores, dentre eles, a natureza química dos compostos, os métodos de extração empregados, o tamanho das partículas das amostras, o tempo e as condições de armazenamento, além do método de análise, seleção de padrões e presença de substâncias interferentes (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Segundo Antolovich et al. (2000) métodos diferentes de análise de polifenóis têm sido estudados e publicados. Porém, a determinação da estratégia analítica apropriada para o estudo de fenólicos bioativos em vegetais depende do objetivo de estudo e da natureza da amostra e do analito (ROBARDS, 2003). Geralmente, as determinações dos compostos fenólicos acontecem pelos métodos espectrofotométricos de Folin-Ciocalteu (ROSSI JUNIOR; SINGLETON, 1965) ou pelo método de azul da Prússia modificado (GRAHAM, 1992), os quais têm o mesmo fundamento, ou seja, os dois se baseiam nas reações de oxirredução entre os compostos fenólicos e íons metálicos.

Quando é utilizado o método do reagente de Folin-Ciocalteu, acontece a redução pelos fenóis, em meio alcalino do fosfomolibdato-fosfotungstato, e apresenta uma coloração azul. Para análise dos dados, é necessária a utilização de uma curva padrão neste método. O ácido gálico é o composto mais utilizado para a formação desta curva, sendo este o motivo pelo qual a maioria dos resultados são expressos em mg de ácido gálico em 100 g de extrato (SILVA et al., 2010).

2.4.2 Método Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu mede a capacidade redutor do antioxidante baseando-se na transferência de um elétron (PRIOR et al., 2005). Este método leva o nome do principal reagente utilizado e comumente é usado para a determinação de compostos fenólicos totais (BOROSKI et al., 2015).

Este método de análise tem as seguintes vantagens: ter bastante disponibilidade comercial entre os reagentes, ter em 730 nm a absorção do grupo

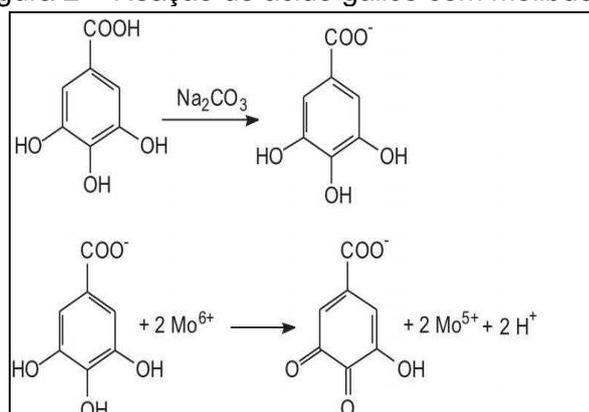
cromóforo, o que significa que a interferência de substâncias coradas presentes na amostra será reduzida, o número de dados na literatura ser grande e ter uma boa praticidade de implementação por se tratar de um ensaio simples, rápido e robusto (PRIOR et al., 2005).

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que, não necessariamente, precisam ter natureza fenólica (OLIVEIRA et al., 2009), conforme é observado na Figura 2.

Os compostos fenólicos presentes nas amostras reagem com o reagente Folin-Ciocalteu em condições básicas. Para que isso ocorra, é utilizado uma solução de carbonato de sódio, a qual fará com que o pH da solução fique em torno de 10. Em consequência, a remoção do próton fenólico induz o desenvolvimento do ânion fenolato, que tem a capacidade de reduzir o reagente Folin-Ciocalteu. A reação de oxirredução apresentada neste método não depende da estrutura dos compostos fenólicos envolvidos (BOROSKI et al., 2015).

Uma desvantagem do método Folin-Ciocalteu é o fato de que o mecanismo detecta a presença de todas as substâncias reduzidas pelo reagente, não apresentando dados quantitativos e qualitativos dos constituintes fenólicos. No entanto, muitas pesquisas relacionadas com este método têm apresentado resultados com uma ótima correlação entre este método e outros para a determinação da capacidade antioxidante (BOROSKI et al., 2015).

Figura 2 – Reação do ácido gálico com molibdênio.



Fonte: Oliveira et al., 2009.

2.5 CONSIDERAÇÕES

Finalizando esta revisão é possível afirmar que a goiaba-serrana é fonte de compostos bioativos, dentre eles, os flavonoides e compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são importantes para prevenção da oxidação e na inativação de radicais livres, enquanto os flavonoides possuem propriedades que auxiliam na atividade imunológica.

Pesquisas descrevem diferentes técnicas de extração para matrizes vegetais, tanto folhas como frutos. Escolheu-se fazer neste trabalho a extração por Soxhlet, e extração assistida por ultrassom, ambas as técnicas são eficientes e de baixo custo.

A goiaba-serrana está em processo de domesticação há mais de trinta anos, e devido ao seu potencial antioxidante e suas características organolépticas espera-se que assim como nos Estados Unidos, França, Nova Zelândia e Colômbia, o fruto também seja comercializado e industrializado no Brasil.

Diante do exposto anteriormente, existe grande interesse em verificar a eficácia das extrações para obtenção dos compostos de alto valor agregado, visando introduzir esse extrato rico em compostos bioativos nas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 RECEPÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

As folhas da goiaba-serrana (*Acca sellowiana*) (Figura 3), empregada neste estudo foram cedidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Epagri, localizada na cidade de São Joaquim - SC, no mês de agosto de 2016.

Figura 3 – Folhas da goiaba-serrana (*Acca sellowiana*) dispostas em bandejas da estufa com circulação forçada.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.1 Teor da umidade na amostra

Inicialmente, o teor de umidade e substâncias voláteis foi determinado de acordo com a metodologia 012/IV do Instituto Adolfo Lutz (LUTZ, 2008).

Mediram-se cerca de 5 g de amostra em cadinho previamente tarado, com auxílio de balança analítica com 0,0001 g de precisão (AY220, Shimadzu, São Paulo, Brasil), seguido de aquecimento em estufa com circulação forçada de ar (E.L. 003, Odontobrás, Ribeirão Preto, Brasil) a 105 °C por 3 horas. Após este período, o cadinho foi resfriado em dessecador e medido. Em seguida, repetiu-se a etapa de aquecimento, seguida de resfriamento e medida da massa, de hora em hora, até observação de massa constante. Para o cálculo do teor de umidade e substâncias voláteis, em base úmida, empregou-se a Equação 1.

$$\text{Teor de umidade e substâncias voláteis (\%)} = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Onde, m_f é a massa final da amostra em gramas e m_i é a massa inicial da amostra.

Este procedimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como a média e respectivo desvio padrão.

3.1.2 Secagem e moagem

As folhas foram dispostas em bandejas e secas em estufa com circulação forçada de ar (De Leo, Porto Alegre, Brasil) (Figura 4), a 50 °C por 10 h. Em seguida, as amostras foram fragmentadas em moinho de facas (De Leo, Porto Alegre, Brasil), acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas em freezer doméstico a -18 °C.

Figura 4 – Estufa com circulação forçada de ar utilizada na secagem da folha de goiaba-serrana.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

3.2.1 Extrações à baixa pressão

Os métodos utilizados nas extrações à baixa pressão (EBP) foram em Soxhlet e dois equipamentos de extração assistida por ultrassom, com uso de sonda e de banho. Empregando-se separadamente dois solventes de índice de polaridade distintos, além de uma mistura de solventes em igual proporção.

Os solventes selecionados foram etanol (99,8 %, Neon, São Paulo, Brasil) P.A., água e a mistura etanol-água (50:50 v/v). Através de literatura e testes preliminares observou-se que a folha da goiaba-serrana apresenta extratos polares. Com isso, optou-se por utilizar solventes de média e alta polaridade, e também ambientalmente seguros, os chamados GRAS (em inglês, *Generally Recognized as Safe*).

3.2.1.1 Extração em Soxhlet

O sistema Soxhlet consiste de um extrator que é acoplado, na extremidade inferior, a um balão volumétrico de vidro com fundo chato e capacidade para 250 mL e na extremidade superior, a um condensador, arrefecido por um banho (MQBMP-01, Microquímica, Brasil). No extrator é colocado um cartucho de papel de filtro contendo 5 g de amostra, enquanto no balão são adicionados 150 mL de solvente que é aquecido por uma manta de aquecimento (Fisatom, Mod. 52 - Classe 300) na temperatura de ebulição do solvente utilizado, conforme Figura 5. O vapor do solvente sobe até o condensador, onde resfria e condensa gotejando (aproximadamente 4 gotas por segundo) sobre a matriz vegetal contida no extrator, solubilizando os compostos. O extrator lentamente enche com o solvente até ser esvaziado por ação de sifão, sendo então enviado de volta ao balão e o processo de refluxo é repetido continuamente durante 6 horas de extração. Em cada ciclo, novos compostos são dissolvidos no solvente que se evapora novamente, deixando a substância dissolvida no balão. Os extratos obtidos foram submetidos, posteriormente, ao processo de eliminação do solvente 3.3 e armazenados em freezer doméstico a -18 °C. As extrações foram realizadas em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

Figura 5 – Equipamento utilizado na extração Soxhlet.



Fonte: Andrade (2011).

3.2.1.2 Extração assistida por ultrassom com uso de sonda (US)

A técnica de ultrassom foi adaptada de Cheok et al. (2013) onde, previamente, 5 g de amostra foram pesadas em um béquer de 250 mL e solubilizadas em 150 mL de solvente (etanol, água e etanol-água [50:50]), mantendo a razão amostra – solvente em 1:30 (m/v). Em seguida, a amostra foi inserida em um sonicador ultrassônico (Ultronique QR 500, Ecosonics, Indaiatuba, Brasil) (Figura 6), com potência de 500 W e frequência de 20 kHz, onde uma sonda de titânio de 4 mm de diâmetro foi introduzida na amostra a 5 mm da superfície.

Em decorrência de processos de cavitação oriundos dos efeitos de expansão e compressão das bolhas, um superaquecimento na amostra pode comprometer a qualidade do extrato. Para tanto, a amostra foi inserida no béquer e continuamente resfriada em uma caixa de isopor com cubos de gelo, buscando manter a temperatura interna controlada durante o experimento. Os parâmetros tempo (min) e potência (W) foram fixados em 10 e 250, respectivamente.

Após a extração, o sistema foi filtrado com auxílio de bomba de vácuo (DVR 1400, Dosivac) em funil de Büchner com papel-filtro, sendo o filtrado recolhido em Kitasato. Os filtrados obtidos foram submetidos, posteriormente, ao processo de

eliminação do solvente (3.3) e armazenados em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. O resultado de rendimento foi expresso como média \pm desvio padrão.

Figura 6 – Equipamento para extração em sonicator ultrassônico.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.1.3 Extração assistida por ultrassom com uso de banho (UB)

A maceração ultrassônica consiste em utilizar solventes, em temperatura ambiente, para a extração de compostos mediante o uso de ondas sonoras. As extrações com ultrassom foram realizadas em duplicata em aparelho de ultrassom Ultronique Ecosonics, modelo Q3.0 de frequência 37 kHz e potência de 110 W, Indaiatuba, Brasil (Figura 7).

A técnica aplicada foi adaptada de Vinatoru (2001), onde 5 g de folha de goiaba-serrana seca e moída permaneceram em contato com 150 mL de solvente durante 30 minutos em banho de ultrassom. O tempo foi escolhido a partir de uma cinética realizada em quatro tempos (10, 20, 30 e 40 min.), a fim de avaliar o rendimento global dos extratos. Ao final das extrações e evaporação total dos solventes, os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey, observou-se então que as extrações feitas em 30 e 40 min. obtiveram maiores rendimentos de extratos, e ambas não obtiveram diferenças significativas entre si.

Da mesma forma que a extração utilizando o ultrassom sonda, após a extração o sistema foi filtrado e o que foi obtido submetido ao processo de eliminação do

solvente (3.3) e armazenados em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. O resultado de rendimento foi expresso como média \pm desvio padrão.

Figura 7 – Equipamento para extração em banho ultrassônico.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 ELIMINAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO DOS EXTRATOS

Após os procedimentos de extração em Soxhlet, com ultrassom sonda e banho, as misturas resultantes de cada técnica foram separadas usando evaporador rotativo (Fisatom, 802, São Paulo, Brasil) e liofilizador (L 101, Liotop, São Carlos, Brasil) (Figura 8).

Para garantir a eliminação de todo o solvente, os extratos foram pesados até obtenção de massa constante. Todos os extratos foram armazenados em frascos âmbar a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 8 – Evaporador rotativo (à esquerda) e liofilizador (à direita).



Fonte: Santos (2017).

3.4 AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

A metodologia para identificação e quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) presentes em uma amostra baseia-se na reação destes compostos com o reagente de Folin-Ciocalteu, em meio alcalino. Nesta reação, os compostos fenólicos reduzem os sais tungstato de sódio e molibdato de sódio, de coloração amarela, para complexos de molibdênio-tungstênio, de coloração azul, cuja intensidade é proporcional ao número de hidroxilas ou grupos potencialmente oxidáveis dos compostos fenólicos (BOROSKI et al., 2015).

A determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT) presente nos extratos da folha da goiaba-serrana foi realizado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965; PESCHEL et al., 2006).

Inicialmente, cada um dos extratos foi pesado e diluído em seus respectivos solventes de extração, obtendo solução-mãe de extrato com concentração final de 1,67 mg de extrato/mL de solvente. A metodologia foi realizada em triplicata, portanto, aos tubos da amostra foram adicionados 100 µL da solução-mãe de extrato. Em seguida, 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu foram adicionados aos 3 tubos. Após agitação em vortex e repouso de 30 segundos, 1,5 mL da solução de carbonato de sódio a 20%, meio alcalino da reação, foram adicionados aos tubos. Por fim, 7,9 mL de água destilada foram inseridos aos tubos, completando o volume final de 10 mL. Ao branco, foi realizado os mesmos procedimentos das amostras, excluindo a adição do extrato e adicionando 8,0 mL de água destilada aos tubos. Após os tubos passaram por nova agitação em vortex e colocados em repouso por 2 h, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao final das 2 h (Figura 9), a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro (800 XI, Femto, São Paulo, Brasil), no comprimento de onda de 765 nm.

Os valores de absorbância média encontrados para cada amostra foram correlacionados com uma curva padrão de ácido gálico (absorbância *versus* concentração de ácido gálico) (Apêndice A: Figura 10). Através da substituição dos valores de absorbância média obtidos para cada amostra na equação da curva padrão de ácido gálico, obteve-se os respectivos valores de mg equivalente em ácido gálico (EAG) para cada L de solução.

Figura 9 – Método Folin-Ciocalteu aplicado ao extrato da folha da goiaba-serrana, obtido através do ultrassom banho. À esquerda a reação que ocorreu com o extrato, e à direita o branco.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados finais foram expressos em mg EAG/g extrato através da Equação 2:

$$CFT \left(\frac{EAG}{extrato} \right) = \frac{EAG \left(\frac{EAG}{solução} \right)}{D_{ext} \left(\frac{extrato}{solução} \right)} \quad (2)$$

Onde,

EAG = equivalente em ácido gálico obtido através da curva padrão (mg EAG. L solução⁻¹);

D_{ext} = diluição dos extratos (1,667 g extrato. L solução⁻¹).

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

A curva padrão de ácido gálico relativo ao método de Folin-Ciocalteu, juntamente com um diagrama simplificado relativo ao preenchimento dos reagentes nos tubos pelo método de Folin-Ciocalteu estão disponíveis no Apêndice A: Figura 10 e Tabela 5, respectivamente.

3.5 CÁLCULOS DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO

Todos os experimentos de extração dos sistemas foram realizados em duplicata e os rendimentos determinados pela razão entre a massa do extrato obtido

e a massa de matéria-prima utilizada (base seca), e apresentados por média \pm desvio padrão. As medidas de massas das amostras, dos balões e dos frascos âmbares realizaram-se em balança analítica com 0,0001 g de precisão (AY220, Shimadzu, São Paulo, Brasil).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados no software Assistat versão 7.7 pt 3.0.1 da Universidade Federal de Campina Grande (SILVA; AZEVEDO, 2016).

Os rendimentos das extrações e análise dos compostos fenólicos totais foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de comparação múltipla de Tukey, ambos com nível de confiança de 95 %.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Após as etapas de secagem e moagem, a matéria-prima utilizada no presente trabalho foi caracterizada em termos de teor de umidade. O resultado pode ser observado através da Tabela 1.

Tabela 1 – Teor de umidade da amostra de folha de goiaba-serrana após secagem.

Matéria-Prima	Umidade (% b.u.)
Folha	4,80 ± 0,20

O teor de umidade presente na amostra pode influenciar a eficiência das extrações. Na maioria dos casos, a água compete com o soluto na presença de um solvente, diminuindo o rendimento da extração. No entanto, a água pode provocar o inchaço das células do material facilitando a transferência de massa, consequentemente auxiliando o processo de extração (SALVADOR, 2014; PEREIRA; MEIRELES, 2010; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007). O valor de umidade determinado para folha da goiaba-serrana foi de $4,8 \pm 0,20$ %, e encontra-se na faixa recomendável por Pereira e Meireles (2010), de 4 a 14 % (b.u.).

4.2 RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO (X_0)

O rendimento global de extração refere-se à quantidade máxima de extrato obtido de uma matriz sólida através de técnicas e parâmetros pré-definidos. No presente trabalho foram aplicadas três técnicas de extração à pressão atmosférica, são elas: Soxhlet, US e UB. Em US, a onda ultrassônica ocorre através de uma sonda de titânio de 4 mm, já em UB a onda ocorre por um recipiente com água destilada. Optou-se em utilizar solventes ambientalmente seguros, tais como etanol, água e uma mistura etanol-água (50:50 v/v). Os resultados para rendimento global das amostras estão apresentados na tabela abaixo, assim como a polaridade dos solventes empregados e a análise estatística através do teste de Tukey.

Tabela 2 – Rendimento global da folha da goiaba-serrana por técnicas à baixa pressão.

Método de Extração	Solvente	Índice de polaridade ¹	X ₀ (%)* ² Folha
Soxhlet	Etanol	5,2	21 ± 1 ^c
	Água	9	28 ± 1 ^a
	Etanol-Água	7,1	27 ± 1 ^{ab}
US ³	Etanol	5,2	4,6 ± 0,3 ^d
	Água	9	24,1 ± 0,6 ^{abc}
	Etanol-Água	7,1	24 ± 1 ^{bc}
UB ⁴	Etanol	5,2	7,6 ± 0,6 ^d
	Água	9	23,8 ± 0,3 ^{bc}
	Etanol-Água	7,1	26 ± 2 ^{ab}

*Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras, no nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$);

¹O índice de polaridade da mistura foi calculada a partir da equação $(I_a/100 \times P_a) + (I_b/100 \times P_b)$, onde I_a e I_b são os índices de polaridade dos solventes a e b, respectivamente e P_a e P_b são as porcentagens dos solventes a e b, respectivamente, na mistura (MARKOM et al., 2007);

²Rendimento da folha;

³(US) Extração assistida por sonda ultrassônica;

⁴(UB) Extração assistida por banho ultrassônico.

Mazzutti e Ferreira (2014) obtiveram resultados semelhantes na avaliação do rendimento global da tansagem (*Plantago major*), sendo eles 4,5 % e 20,5 % em UB utilizando etanol e etanol-água (50:50 v/v), respectivamente, como solventes, o que vai de encontro aos resultados do presente trabalho. Brum (2010) avaliou o rendimento global da folha de eucalipto através de Soxhlet com etanol e água. O rendimento global obtido após 6 h de extração foi de 27 % utilizando etanol, e 26 % para água.

Michielin (2009) avaliou o rendimento global da erva baleeira através de Soxhlet com etanol, etanol-água (50:50 v/v) e água. O rendimento global obtido após 6 h de extração foi de 14,2 % utilizando etanol, e 24 % para etanol-água e água.

Na Tabela 3 são apresentadas algumas propriedades dos solventes utilizados nas extrações como viscosidade, temperatura de ebulição, constante dielétrica, energia de coesão e tensão superficial, que podem auxiliar no entendimento da influência destes parâmetros no rendimento de extração.

De acordo com o teste de Tukey, os rendimentos dos extratos (Tabela 2) obtidos através de Soxhlet com água e etanol-água diferem entre si ao nível de 5 % de significância. Assim como a extração obtida através da sonda ultrassônica com água e etanol-água são estatisticamente iguais. A mesma situação acontece para o

banho ultrassônico com esses mesmos solventes. A mistura aquosa de etanol (50:50 v/v) fornece rendimentos iguais para os três métodos de extração aplicados. Na situação onde etanol foi utilizado como solvente, para US e UB os rendimentos finais não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança.

Tabela 3 – Propriedades dos solventes.

	Viscosidade (mPa)	Temperatura de ebulição (°C)	Constante dielétrica	Energia de Coesão (J x mol/mL)	Tensão Superficial (cal/mol A²)
Etanol	1,07	78	24,85	618,87	31,62
Água	0,89	100	78,36	2095,93	104,7

Fonte: Gu et al. 2004

Os maiores rendimentos foram obtidos pelo método de extração em Soxhlet com água (28 ± 1 %) e com a mistura aquosa 50 % etanol-água (27 ± 1 %). Este resultado indica que a folha da goiaba-serrana possui grande quantidade de compostos solúveis em solventes polares como a água com polaridade de 9,0 (BYERS, 2009). Segundo Barwick (1997), a polaridade pode ser definida como a habilidade da molécula em participar de interações de todas espécies (por pontes de hidrogênio, interações do tipo dipolo e forças de dispersão) com outras moléculas polares. A temperatura de operação, o reciclo do solvente e as interações entre água e soluto podem ter contribuído para a dissolução. A água tem viscosidade e tensão superficial alta, características que normalmente não são desejadas na extração, uma vez que impedem a absorção do solvente nos sítios ativos da matriz. No entanto, a constante dielétrica e energia coesiva são significativamente mais altas e dessa forma, as moléculas de água são fortemente ligadas aos componentes polares extraíndo-os (MARKOM et al. 2007).

Na extração Soxhlet o solvente é utilizado na temperatura de ebulição, e nesta condição, a tensão superficial e viscosidade do solvente são grandemente reduzidas quando comparadas com uma temperatura mais baixa, portanto o solvente pode alcançar os sítios ativos dentro da matriz com maior facilidade solubilizando os solutos (MARKOM et al. 2007).

Já os menores rendimentos se deram com o uso do etanol pelos métodos US e UB, resultando num rendimento de 4,6 % e 7,6 %, respectivamente. Em seu trabalho Quispe-Condori et al. (2007) estudaram a extração de erva baleeira cultivada em Campinas, São Paulo, obtendo rendimento de 8,13 % na extração Soxhlet com etanol.

Segundo Markom et al. (2007), características como a constante dielétrica (capacidade de atenuar campos elétricos e, portanto, auxiliar na interação entre cargas) do solvente podem afetar a extração de determinados compostos. O autor observou em seu trabalho que a recuperação de taninos somente foi possível quando utilizou-se solventes com constante dielétrica maior que 20 (etanol e água).

Muito provavelmente este baixo resultado de rendimento do etanol nas duas metodologias de extração assistida por ultrassom, deve-se a baixas temperaturas em que o solvente foi submetido, quando comparados com Soxhlet, já que o mesmo solvente utilizado em Soxhlet obteve rendimento tão alto quanto às outras extrações aplicadas. Outro fator a ser observado é que provavelmente a polaridade dos compostos presentes no extrato não possui tanta semelhança à polaridade do etanol. Portanto, para aplicação do etanol como solvente ser eficaz é necessária alta temperatura, próxima ao seu ponto de ebulição (78 °C).

4.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

Os resultados dos compostos fenólicos totais presentes nos extratos da folha de goiaba-serrana obtidos por diferentes técnicas de extração são apresentados na Tabela 4. Estes compostos foram avaliados de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito no item 3.4. Segundo Roginsky e Lissi (2005), os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante de extratos de produtos naturais. A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu não caracteriza completamente a atividade antioxidante, mas representa uma boa estimativa dessa.

Observa-se, através da Tabela 4, um elevado rendimento de compostos fenólicos nos extratos da folha da goiaba-serrana. O extrato que apresentou maior valor de concentração de compostos fenólicos foi obtido através de US e o solvente etanol-água, sendo este de 322 ± 13 mg EAG/g. O menor valor observado pelo extrato obtido por Soxhlet utilizando etanol como solvente, sendo este de 152 ± 6 mg EAG/g.

Tabela 4 – Teor de Compostos fenólicos totais (CFT) de extratos de goiaba-serrana, obtidos por métodos à baixa pressão.

Método de Extração	Solvente	CFT (mg EAG/g) ^{1,2}
Soxhlet	Etanol	152 ± 6 ^d
	Água	273 ± 10 ^b
	Etanol-Água	210 ± 17 ^c
US ³	Etanol	320 ± 13 ^a
	Água	254 ± 16 ^b
	Etanol-Água	322 ± 13 ^a
UB ⁴	Etanol	171 ± 7 ^d
	Água	163 ± 3 ^d
	Etanol-Água	211 ± 13 ^c

¹Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras, no nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$);

²Resultado expresso mg Equivalente ao Ácido gálico.g⁻¹ de extrato;

³(US) Extração assistida por sonda ultrassônica;

⁴(UB) Extração assistida por banho ultrassônico.

Brum (2010) avaliou o teor de compostos fenólicos em extratos de folhas de eucalipto (*Eucalyptus dives*), que assim como a goiaba-serrana também pertence à família das mirtáceas, utilizando o método convencional de extração Soxhlet, obtendo teor de compostos fenólicos de 103,0 mg EAG.g⁻¹ e 99,9 mg EAG.g⁻¹ para etanol e água, respectivamente. Brum obteve resultados inferiores de compostos fenólicos para a mesma metodologia e solvente de extração utilizado no presente trabalho.

Souza (2013), realizou extração com 80 % de etanol acidulado com 0,5 % (v/v) de HCl concentrado em b.s. (base seca) de folhas da pitangueira, jabuticabeira, goiabeira e araçazeiro, todos estas pertencentes à mesma família da goiaba-serrana. Os compostos fenólicos obtidos para as respectivas plantas foram, 206,26 mg EAG.g⁻¹, 178,28 mg EAG.g⁻¹, 125,08 mg EAG.g⁻¹ e 166,7 mg EAG.g⁻¹. Apesar de a técnica de extração ser diferente da utilizada no presente trabalho, em ambas foram analisadas a mesma parte do vegetal, ou seja, a folha. E que todas pertencem à mesma família das mirtáceas, observou-se o índice de compostos fenólicos compatíveis entre ambos trabalhos.

De acordo com o teste de Tukey, os compostos fenólicos totais (CFT) (Tabela 4) obtidos através da US com etanol-água e etanol não diferem entre si ao nível de 5 % de significância. Assim como os CFT obtidos com água através de US e de Soxhlet são considerados estatisticamente iguais. A mesma situação acontece para mistura

aquosa de etanol (50:50 v/v) para as extrações por Soxhlet e UB. O etanol no Soxhlet e em UB, assim como a água em UB obtiveram CFT que não diferem entre si ao nível de 95 % de confiança.

Os resultados obtidos no presente trabalho podem estar relacionados ao processo de extração utilizado em cada estudo, à natureza dos compostos fenólicos, ao tempo e às condições de estocagem do material vegetal, ao padrão utilizado e até mesmo à presença de interferentes tais como ceras, gorduras e terpenos. Também pode estar relacionado aos fatores genotípicos e às condições ambientais que interferem no crescimento e desenvolvimento das plantas (SHAHIDI; NACZK, 1995; NACZK; SHAHIDI, 2004; FENG et al., 2014). A partir dos resultados apresentados, foi possível observar que UB rendeu menores teores de compostos fenólicos totais comparado às outras técnicas. Possivelmente isso aconteceu por conta da metodologia de extração, onde as ondas ultrassônicas não entram em contato diretamente com a solução de solvente e material a ser extraído.

5 CONCLUSÕES

Os extratos da folha da goiaba-serrana obtidos através de técnicas à baixa pressão, mostraram-se eficazes com rendimentos globais superiores a 20 %, com exceção ao solvente etanol, que em ambas as técnicas assistidas por ultrassom, apresentaram rendimentos globais inferiores a 10 %. Muito provavelmente este baixo resultado de rendimento deve-se a baixas temperaturas em que o solvente foi submetido, já que o mesmo solvente utilizado em Soxhlet obteve rendimento tão alto quanto às outras extrações aplicadas. Outro fator a ser observado é que provavelmente a polaridade dos compostos presentes no extrato não possui tanta semelhança à polaridade do etanol. Portanto, para aplicação do etanol como solvente ser eficaz é necessária alta temperatura, próxima ao seu ponto de ebulição (78 °C).

As análises de compostos fenólicos totais da folha da goiaba-serrana, mostraram-se superiores quando comparados a folhas das plantas pertencentes à mesma família. Como os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante de extratos de produtos naturais, sugere-se que mais estudos sejam realizados a cerca desta matéria-prima para possíveis aplicação em alimentos, ou ainda em fármacos, podendo substituir antioxidantes sintéticos a fim de reforçar a segurança alimentar.

Para trabalhos futuros, sugere-se a identificação dos compostos bioativos presentes na folha e a avaliação do seu efeito no organismo humano. Além disso, outros fatores importantes seriam: avaliação do teor de açúcares destes extratos, bem como sua atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

ACS, A. C. S. **Pharmaceutical Roundtable Solvent Selection Guide**: GCI-Green Chemistry Institute: 2 p. 2011.

AKINNIFESI, F. K.; LEAKEY, R. R. B.; AJAYI, O. C.; SILESHI, G.; TCHOUNDJEU, Z.; MATAKALA, P.; KWESIGA, F. R. **Indigenous fruit trees in the tropics: domestication, utilization and commercialization**. Wallingford, Oxfordshire, UK: CAB International, 2008a. 438p.

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 2. ed, New York: John Wiley & Sons, p. 253, 1999.

AMAKURA, Y., OKADA, M., TSUJI, S., & TONOGAI, Y. **Determination of ellagic acid in fresh and processed fruits by HPLC**. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 41(3), 206-211. 2000.

AMARANTE, C. V. T.; SANTOS, K. L. **Goiaba-serrana *Acca Sellowiana***. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33 nº 1, p. 001-334, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452011000100042>. Acesso em: 29 mai. 2016.

ANDRADE, Kátia Suzana. **Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (*Coffea arabica L.*)**. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. **Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits**. *Critical Review. Analyst*, v. 125, p. 989-1009, 2000.

AZMIR, J.; Z Aidul I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFoor, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. **Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review**. *Journal of Food Engineering* 117 (2013) 426–436.

BARNI, E. J.; DUCROQUET, J-P. H. J.; SILVA, M. C.; NETO, R. B.; PRESSER, R. F. **Potencial de Mercado para Goiabeira-serrana Catarinense**. Documento nº 212, Florianópolis: Epagri, p. 48, 2004.

BARWICK, V. J. **Strategies for solvent selection – a literature review**. *Trends in Analytical Chemistry*, v.16, n.6, p.293-309, 1997.

BASILE, A.; VUOTTO, M. L.; VIOLANTE, U.; SORBO, S.; MARTONE, G.; & CASTALDO-COBIANCHI, R. **Antibacterial activity in *Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra***. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.8, p. 199–203. 1997.

BENDICHO, C.; DE LA CALLE, I.; PENA, I.; COSTAS, M.; CABALEIRO, N.; LAVILLA, I.; **TrAC, Trends Anal. Chem.** 2012, 31, 50. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993611002834>>. Acesso em 29 mai. 2016.

BEYHAN, Ö.; ELMASTAS, M.; GEDIKLI, F. **Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Acca sellowiana*, Myrtaceae)**. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(11), pp. 1065-1072, 2010.

BONTEMPO, P.; MITA, L.; MICELI, M.; DOTO, A.; NEBBIOSO, A.; DE BELLIS, F.; et al. **Feijoa sellowiana derived natural flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities**. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 39(10), 1902–1914. 2007.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R.; **Antioxidantes: Princípios e Métodos Analíticos**, 1. ed. – Curitiba, Appris, 2015.

BRUM, Luis Fernando Wentz. **Obtenção e avaliação de extratos de folhas de eucalipto (*Eucalyptus dives*) como potenciais antioxidantes em alimentos**. 2010. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

BRUNNER, G. **Supercritical fluids: technology and application to food processing**. Journal of Food Engineering, v. 67, n. 1–2, p. 21-33, 3// 2005.

BYERS, J. A. **Catálogo Phenomenex**. 2009. Disponível em: <<http://www.phenomenex.com/phen/Doc/z366.pdf>>. Acesso em 05 de janeiro de 2017.

CACIOPPO, O. **La Feijoa**. Madrid: Ediciones Mundi Persa, 1988. 85p.

CARVALHO JÚNIOR, R. N.; MOURA, L. S.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. **Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity**. The Journal of Supercritical Fluids, v. 35, p. 197-204, 2005.

CASSADY, J. M.; WANG, X.; LIU, Y. L.; HO, D. K.; BAIRD, W. M.; & CHAE, Y. H., et al. (1993). **Recent advances in the discovery of potential cancer chemopreventive agents**. In Q. Dai, M.-A. Armour, & Q. Zheng (Eds.), Recent advances of chemistry and molecular biology in cancer research, international symposium (pp. 15–20), Beijing, July 23–26, 1991. Beijing: Science Press.

CHEMAT, F.; TOMAO, V.; & VIROT, M., In: Otlés, S (Ed.), **Handbook of Food Analysis Instruments, Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis**. CRC Press, pp. 85-94, 2008.

CHEOK, C. Y. et al. **Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) hull using ultrasonic treatments**. Industrial Crops and Products, v. 50, n. 6, p. 1–7, out. 2013.

CRÖNQUIST, A. **An integrate system of classification of flowering plants**. New York: Columbia university Press, 1981. 519p.

DAAYF, F.; LATTANZIO, V.; **Recent Advances in Polyphenol Research**. vol I: Blackwell Publishing Ltd; 2008.

DREAM GARDEN (*Acca sellowiana*) (2015). Disponível em: <<http://dreamgarden3.blogspot.com.br/2015/10/feijoa-sellowiana-acca-sellowiana.html>>. Acesso em 09 jun. 2017.

DUCROQUET, J. P. H. J. & RIBEIRO, P. **A Goiabeira-serrana**: velha conhecida, nova alternativa. *Agropecuária Catarinense*, v. 4, n. 3, p. 27-29, 1991.

DUCROQUET, J. P. H. J. & RIBEIRO, P. A. **A Goiabeira Serrana**: fatores climáticos trazem a pesquisa de volta ao centro de origem da espécie. *Agropecuária Catarinense*, v. 9, n. 3, p. 13-15, 1996.

DUCROQUET, J. P. H. J.; HICKEL, E. R.; NODARI, R. O. **Goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana*)**. Série Frutas Nativas 5; Jaboticabal: Funep, p. 66, 2000.

EPAGRI. **Conhecimento popular e diversidade da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) na Serra Catarinense**. Florianópolis, 2009. 29p. (Epagri. Boletim Didático, 83).

FENG, F. et al. **Effects of location within the tree canopy on carbohydrates, organic acids, amino acids and phenolic compounds in the fruit peel and flesh from three apple (*Malus X domestica*) cultivars**. *Horticulture Research*, v. 1, 2014.

FRANÇA, S. **Fruteiras nativas**: preservação e lucro. *Manchete Rural*, 4, p. 30-32, 1991.

GODOY, R. C. B.; DELIZA, R.; CHAVES, C. P.; DANTAS, S. A. A.; SANTOS, K. L. In: *Simpósio Ibero-Americano em Análise Sensorial*, 6., 2010, São Paulo. Anais... São Paulo: Associação Brasileira de Ciências Sensoriais, 2010. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/878652/1/Catie.pdf>>. Acesso em 25 mai. 2016.

GRAHAM, H. D. **Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols**. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992.

GU, Z. L. ; BAI, Y. F. ; CHEN, B. J. ; HUO, G. C. ; ZHAO, C., 2004. **Effect of protein level on lactating performance, daily gain and fur density in rex rabbit**. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress*, September 7-10, 2004, Puebla, Mexico: 1289-1294

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M. G.; GONZALEZ, M. 2009. **Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple**. *Food Chemistry* 114 (2), 734–741.

HERRERA, M. C., LUQUE DE CASTRO, M. D. **Ultrasound-assisted Extraction for the Analysis of Phenolic Compounds in Strawberries**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379 (7-8), 1106-1112, 2004.

IELPO, M. TL.; BASILE, A.; MIRANDA, R.; MOSCATIELLO, V.; NAPPO, C.; SORBO, S.; LAGHI, E.; RICCIARDI, M. M.; RICCIARDI, L.; VUOTTO, M. L.

Immunopharmacological properties of flavonoids. Fitoterapia, v.71, p.101-109. 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, I. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos.** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 032/IV: 114-116 p. 2008.

ISOBE, Y.; KASE, Y.; NARITA, M., & KOMIYA, T. **Antioxidative activity of tropical fruit, Feijoa sellowiana Berg.** Nippon Kasei Gakkaishi, 54(11), 945–949. 2003.

KOH, T. S. Anal. Chem., 55, 1814, (1983).

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras** - Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Francisco José Krug, ed.; Piracicaba, cap. 3-5, 2008.

LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. **Mirtáceas.** In: REITZ, P. R. Flora ilustrada Catarinense. Itajaí: SUDESUL, FATMA, HBR, p. 623-629, 1977.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E.; Anal. Chim. Acta 1998, 369, 1.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. **Soxhlet extraction:** Past and presente panacea. Journal of Chromatography A, v.1217, n.16, p. 2383-2389, 4/16/2010.

LUZ, Luiza Placidina da. **Estudo do ultrassom como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos.** 1998. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

MAGINA, M. A.; GILIOLI, A.; MORESCO, H. H.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. **Atividade antioxidante de três espécies de Eugenia (Myrtaceae).** Latin American Journal of Pharmacy, v. 29, n. 3, p. 376-382, 2010.

MARKOM, M. et al. **Extraction of hydrolysable tannins from Phyllanthus niruri Linn.:** Effects of solvents and extraction methods. Separation and Purification Technology, v. 52, n. 3, p. 487–496, 2007.

MARVIN, C. H.; ALLAN, A.; McCARRY B. Intern. J. Envirom. Anal. Chem., 49, 221, 1992.

MATTOS, J. R. **A goiabeira serrana.** Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis, Porto Alegre, p. 84, 1986.

MATTOS, J. R. **Goiabeira-Serrana** – Fruteiras Nativas do Brasil. 2 ed. Porto Alegre: Ed. Gráfica Ceue, p. 120, 1990.

MAZZUTTI, S; FERREIRA, S. R. S. **Obtenção de extratos de tansagem (Plantago major) por extração supercrítica e extração com solventes orgânicos.** 2014. Trabalho submetido ao XX COBEQ - Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2014.

McGHIE, T.; HUNT, M.; & BARNETT, L. **Determination of phytochemical and antioxidant compounds in Feijoa**. Report to the New Zealand Feijoa Growers Association, HortResearch New Zealand. 2004.

MICHIELIN, Eliane Maria Zandonai. **Obtenção de extrato de erva baleeira (*Cordia verbenacea* D.C.) por diferentes técnicas: medida da atividade biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases**. 2009. 235 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MIYAKE, T. **Métodos de extração e fracionamento de extratos vegetais**. Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG. Disponível em: <<http://www.uepg.br/fitofar/dados/tecnicasesextrativas.pdf>>. Acesso em 20 jun. 2016.

MOURE A.; CRUZ J. M.; FRANCO D.; DIMÍNGUEZ J. M.; SINEIRO J.; DIMÍNGUEZ H. **Natural antioxidants from residual sources**. Food Chem 2001; 72 (2): 145-71.

MOTOHASHI, N.; KAWASE, M., SHIRATAKI, Y., TANI, S., SAITO, S., SAKAGAMI, H., et al. **Biological activity of Feijoa peel extracts**. Anticancer Research, 20(6B), 4323–4329. 2000.

NACZK, M., SHAHIDI, F. **Extraction and analysis of phenolics in foods**. Journal of Chromatography A, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NETTO, C. G. **Técnica potencializa extração de compostos de duas plantas**. Jornal da Unicamp, n. 593, Campinas, 2014. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/unicamp/ju/593/tecnica-potencializa-extracao-de-compostos-de-duas-plantas>>. Acesso em 29 mai. 2016.

NODARI, R. O., GUERRA, M. P.; MELER, K.; DUCROQUET, J. P. **Genetic Variability of *Feijoa sellowiana* Germplasm**. Acta Horticulturae, v. 452, p. 41-46, 1997.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes**. Revista Química nova, v. 32, n. 3, 2009. Disponível em: <<http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=tema.42>>. Acesso em: 20 maio 2017.

OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, M. E. A. O. **Comparação dos métodos extração de óleo essencial de arraste a vapor e hidrodestilação utilizando casca de manga nos estados de desidratação e *in natura***. VII CONNEPI (Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação) – Tocantins, 2012.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T.; YAZAKI, K.; & ASHIDA, M. **Ellagitannins of the casuarinaceae, stachyuraceae and myrtaceae**. Phytochemistry, 21(12), 2871–2874. 1980.

PANIWNYK, L. et al. **The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica***. Ultrasonics Sonochemistry, v.8, n.3, p. 299-301, 7, 2001.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. **Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives**. Food and Bioprocess Technology, v. 3, n. 3, p. 340–372, 2010.

PESCHEL, W. et al. **An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes.** Food Chemistry, v. 97, n. 1, p. 137-150, 7// 2006.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. **Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis.** Journal of Chromatography A, v. 1163, n. 1–2, p. 2–24, 2007.

POZZAN, M.; **Feijoa, a nossa goiaba-da-serra.** 2014. Disponível em: <<http://www.apremavi.org.br/noticias/apremavi/861/feijoa-a-nossa-goiabadaserra>>. Acesso em 29 mai. 2016.

PRIOR R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. **Standardized methods for the determination and antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.53, p.4290-302, 2005.

QUISPE-CONDORI, S.; ROSA, P. T. V.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A.; MEIRELES, M. A. A. **Global yield of the Supercritical CO₂ extraction from *Cordia verbenacea* DC - Anticancer and antimycobacterial activities.** Pharmacognosy Magazine. v.3, l. 9, Jan-Mar, 2007.

ROBARDS, K. **Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables.** Journal of Chromatography A, v. 1000, p. 657-691, 2003.

RODERICK, J.W; **Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review.** Food Chemistry ed. 121, p. 923-926, 2010.

RODRIGUES, S.; PINTO, G. A. S. **Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder.** Journal of Food Engineering, v. 80, n. 3, p. 869-872, 6// 2007.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food.** Food Chemistry, v. 92, p. 235-254, 2005.

ROSSI JUNIOR, J. A.; SINGLETON, V. L. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents.** American Journal of Viticulture, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

ROSSI, A.; RIGANO, D.; PERGOLA, C.; FORMISANO, C.; BASILE, A.; BRAMANTI, P., et al. **Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by an acetonic extract from *Feijoa sellowiana* Berg. fruits.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(13), 5053–5061. 2007.

SAJ, O. P.; ROY, R. K.; & SAVITHA, S. V. **Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil of *Feijoa sellowiana* O. Berg. (*pineapple guava*).** Journal of Pure and Applied Microbiology, 2(1), 227–230. 2008.

SALVADOR, Ana Augusta. **Atividade antioxidante e perfil de ácidos graxos de extratos da torta de noz pecã (*carya illinoensis*) obtidos por extração supercrítica.** 2014. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

SANJO, Produtos de Origem. Disponível em: <<http://www.sanjo.com.br/sanjo/>>. Acesso em 03 de maio 2017.

SANTOS, Karine Louise dos. **Bases Genéticas de Características de Importância Agrônoma em Goiabeira-Serrana (*Acca sellowiana*)**. 2005. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SANTOS, Karine Louise dos. **Diversidade cultural, genética e fenotípica da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*): implicações para domesticação da espécie**. 2009. 193 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SANTOS, K. L.; SIMINSKI, A.; DUCROQUET, J. P. H. J.; GUERRA, M. P.; PERONI, N.; NODARI, R. O. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília: MMA, 2011. 934p.

SANTOS, Pedro Henrique. **Obtenção de extratos bioativos de casca e folha de feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret.) por métodos à baixa e alta pressão**. 2017. 104 f. Qualificação (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; LATHA, Y. L.; 2011. **Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts**. African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines 8 (1).

SCHNEIDER, F. H.; **Fette Seifen Anstrichmittel** 1980, 80, 16.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic, 1995.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data**. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBBLITZ, M. G. B. **Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais**. Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n° 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, V. N.; SARMENTO, M. B.; SILVEIRA, A. C.; SILVA, C. S.; CICERO, S. M. **Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acca sellowiana* O. Berg por meios de análise de imagens**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, v. 35, n. 4, p. 1158-1169, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452013000400027>. Acesso em: 17 jun. 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. P. 467-595. In. SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. 1097p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. 1090p.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. **Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents**. Am. J. Enol. Vitic., v. 16, n. 3, p. 144-158, 09/01/ 1965.

SMITH, R. M. **Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques**. Journal of Chromatography A 1000 (1–2), 3–27, 2003.

SOUZA, C. V.; LORENZI, H.; **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado na APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantaru, 2005.

SOUZA, Wagner de. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais**. 2013. 37 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

SOXHLET, F., 1879. **Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes**. Dingler's Polytechnisches Journal 232, 461-465.

VALLE, T. L. Coleta de germoplasma de plantas cultivadas. In: AMOROZO, M.C.M.; MING, L. C.; SILVA, S. P. **Métodos de coleta e análise de dados em etnobiologia, etnoecologia e disciplinas correlatas**. Rio Claro: UNESP, p. 129-154, 2002.

VINATORU, M. **An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 8, n. 3, p. 303-313, 7// 2001.

VUOTTO, M. L.; BASILE, A.; MOSCATIELLO, V.; DE SOLE, P.; CASTALDO-COBIANCHI, R.; LAGHI, E.; IELPO, M. T. L. **Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruits**. International Journal of Antimicrobial Agents, v.13, p.197-201. 2000.

APÊNDICE A

Tabela 5 - Diagrama simplificado da análise de Compostos Fenólicos Totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

Reagente	Branco	Amostras (em triplicata)
Água destilada (mL)	8,0	7,9
Solução de extrato (mL)	-	0,1
Reagente de Folin-Ciocalteu (mL)	0,5	0,5
Aguardar ao menos 3 minutos e não mais que 8 minutos		
Carbonato de sódio (mL)	1,5	1,5

Homogeneizar.

Deixar em repouso por 2 h em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Ler a absorbância em espectrofotômetro a 765 nm.

Figura 10 - Curva analítica de ácido gálico para utilização no cálculo CFT em folha de goiaba-serrana.

