

Pedro Henrique Santos

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS DE FEIJOA - *Acca
sellowiana* (O. Berg) Burret - POR MÉTODOS A BAIXA E
ALTA PRESSÕES**

Tese de Doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do grau de Doutor em
Engenharia de Alimentos
Orientador: Prof. Dr. Haiko Hense
Coorientador: Prof. Dr. José Antonio
Ribeiro de Souza

Florianópolis
2018

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

Santos, Pedro Henrique

Obtenção de extratos bioativos de feijoa - *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret - por métodos a baixa e alta pressões / Pedro Henrique Santos ; orientador, Haiko Hense, coorientador, José Antonio Ribeiro de Souza, 2018.

160 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Feijoa. 3. Extração Supercrítica. 4. Extração com Líquido Pressurizado. 5. Compostos bioativos. I. Hense, Haiko. II. Souza, José Antonio Ribeiro de . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**“OBTENÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS DE FEIJOA -
Acca sellowiana (O.Berg) Burret - POR MÉTODOS A BAIXA
E ALTA PRESSÕES”**

Por

Pedro Henrique Santos

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.



Prof. Dr. Haiko Hense

Orientador



Prof. Dr. José Antônio Ribeiro de Souza

Coorientador



Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

Coordenador

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Haiko Hense



Prof. Dr. Leandro Danielski



Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto



Dra. Simone Mazzutti

Florianópolis, 30 de maio de 2018.

Este trabalho é dedicado a Deus e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento deste trabalho é direcionado a Deus, minha fonte de toda a força, sabedoria e segurança. Sem o seu direcionamento, nada do que aqui foi realizado seria feito;

Agradeço aos meus amados pais, Paulo Fernando e Marinalva, por todo amor e suporte, em todas as circunstâncias;

Agradeço ao meu orientador e amigo, Dr. Haiko Hense, aquele que desde o primeiro momento acreditou neste projeto e confiou em meu trabalho;

Agradeço aos latesquianos, meus companheiros de jornada, parceiros até nas noites onde o labor se fez necessário;

Agradeço às minhas ex-coorientandas de TCC e agora companheiras de profissão, Joana Kammers e Ana Paula Silva, pela disposição em conhecer e também atuar com esta fruta;

Agradeço ao professor Dr. Rubens Nodari, por seu amor pela pesquisa com a feijoa e que, de forma contagiante, acabou despertando este amor em mim também. Este agradecimento se estende a toda a sua equipe do Laboratório de Recursos Genéticos e Vegetais da UFSC, em especial, à Ma. Vanessa Petry e à Ma. Morgana Lopes pelas trocas de informações valiosas acerca da nossa “superfruta”;

Agradeço à professora Dr^a. Deise Baggio pela cessão do laboratório para realização das análises antibacterianas, bem como por toda a orientação necessária no âmbito da microbiologia;

Agradeço ao professor Dr. Luciano Vitali pelas orientações e pela parceria fundamental para que as análises cromatográficas pudessem ser concretizadas, bem como à Ma. Mayara Schulz pelos direcionamentos de suma importância;

Agradeço à Ma. Aline Rosa e à Ma. Bianca Gasparini pela parceria nas longas análises cromatográficas;

Agradeço aos Engenheiros Agrônomos Douglas Córdova e Dr^a. Marlise Ciotta, por gentilmente terem cedido a matéria-prima para este estudo;

Por fim, a todos que de certa forma colaboraram para que este projeto se concretizasse, o meu mais profundo agradecimento.

“Na natureza, nada se cria, nada se perde, tudo se
transforma.”
(Antoine Lavoisier, 1774)

RESUMO

A feijoa - *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret - também conhecida como goiaba-serrana, por sua semelhança à goiaba tradicional (*Psidium guajava* L.), é uma fruta pertencente à família das mirtáceas. Embora nativa das regiões serranas dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, esta fruta é cultivada em outros países como Estados Unidos, Colômbia e, em especial, na Nova Zelândia, onde a feijoa é amplamente distribuída *in natura* ou processada, como no caso de sucos e bebidas. O processamento da feijoa origina resíduos compostos basicamente por casca e uma pequena parcela de polpa aderida à casca, os quais apresentam uma elevada concentração de compostos bioativos benéficos à saúde humana. O rendimento destes resíduos pode ser superior a 50% da fruta. Com o intuito final de agregar valor a estes subprodutos oriundos da produção industrial da feijoa, o presente trabalho teve por objetivo a obtenção de extratos da casca e da folha de feijoa por técnicas a baixa pressão como Soxhlet e Extração Assistida por Ultrassom (EAU) e técnicas a alta pressão, tais como Extração Supercrítica (ESC) e Extração com Líquido Pressurizado (ELP), em regime dinâmico de extração. Em todas as técnicas, solventes e cossolventes ambientalmente seguros, os chamados GRAS, sigla inglesa para *Generally Recognized As Safe*, foram utilizados, garantindo um produto final livre de qualquer traço de toxicidade. Para os extratos da casca, os mais elevados rendimentos, teores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram obtidos por ELP, nas temperaturas de 55 e 80 °C e ao utilizar a mistura etanol-água como solvente, indicando uma alta polaridade dos compostos presentes na casca da feijoa e a não influência das altas temperaturas na bioatividade dos extratos. Para a folha, o aumento na temperatura de 40 para 80 °C elevou o rendimento global e as propriedades bioativas dos extratos, sendo que a técnica ELP se mostrou mais eficaz que as demais, e a mistura etanol-água, mais uma vez, o solvente com os mais proeminentes resultados. Como alternativa para a técnica ELP, avaliou-se a influência da substituição de um regime dinâmico de extração por 2 ciclos em regime estático, utilizando-se o mesmo tempo total aplicado em regime dinâmico. Os resultados obtidos foram promissores e colocam a ELP, tanto em regime estático quanto em regime dinâmico, como um método de extração altamente eficaz na obtenção de compostos bioativos de feijoa, bem como uma alternativa viável também em termos econômicos e ambientais frente aos métodos convencionais de extração. O coeficiente de correlação de Pearson foi aplicado com o intuito de avaliar a correlação entre Compostos Fenólicos Totais (CFT) e as

atividades antioxidantes determinadas pelos métodos de redução do íon 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e método de redução do íon férrico (FRAP, sigla em inglês para *Ferric Reducing Ability Power*). Devido aos altos valores obtidos, em especial, para a correlação CFT e DPPH, podem-se atribuir aos compostos fenólicos, as altas atividades antioxidantes observadas tanto para casca quanto para folha de feijoa. Embora os extratos de casca obtidos pela ESC não tenham apresentado resultados promissores em termos de CFT e atividade antioxidante, observou-se inibição ao crescimento bacteriano em concentração de $6.750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e atividade bactericida contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas a $13.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, no extrato obtido a 300 bar, 55°C e com 5 % de etanol como cossolvente. Em contrapartida, o extrato de folha obtido pela ESC a 300 bar, 55°C e 15 % de etanol-água como cossolvente, apresentou resultados promissores tanto em termos de atividade antioxidante quanto em termos de atividade antibacteriana, agregando ainda mais valor ao extrato. Por fim, o perfil cromatográfico dos extratos da casca e folha obtidos por Soxhlet, ESC e ELP e com os melhores resultados em termos de CFT, foi realizado através Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (HPLC-ESI-MS/MS, sigla em inglês para *High Performance Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry*). Ácido gálico, ferúlico e elágico, além de catequina e isoquercetina, foram os compostos majoritários identificados e devidamente quantificados; contudo, suas baixas concentrações em comparação ao alto teor de CFT sugere a atribuição majoritária aos taninos condensados, uma classe de polímeros fenólicos de alto peso molecular e presentes em abundância na feijoa, mas não identificados por HPLC, pelas altas atividades antioxidantes dos extratos.

Palavras-chave: Feijoa. Goiaba-serrana. Extração Supercrítica. Extração com Líquido Pressurizado. Compostos bioativos.

ABSTRACT

Feijoa - *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret - also known as pineapple guava and guavasteen due to its resemblance do the traditional guava (*Psidium guajava* L.) is a *Myrtaceae* fruit. Although it is native to the highlands of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, south of Brazil, this fruit is also cultivated in other countries such as United States, Colombia and mainly New Zealand, where feijoa is widely distributed *in natura* or processed to produce juices and beverages. The wastes from feijoa processing are composed of primarily skin and pulp adhered to the skin and contain large amounts of bioactive compounds that are beneficial to human health. The total feijoa waste may reach more than 50 % per fruit. Aiming for add value to feijoa wastes originated by fruit processing, the objective of the present work was to obtain extracts from feijoa skin and leaves by using low-pressure methods such as Soxhlet and Ultrasound Assisted Extraction (UAE) and high-pressure methods such as Supercritical Fluid Extraction (SFE) and Pressurized Liquid Extraction (PLE) in dynamic and static mode. Generally Recognized as Safe (GRAS) solvents and co-solvents were used providing extracts free from any toxic compound. The highest global yields, total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activities found for the skin extracts were obtained by PLE at 55 and 80 °C with ethanol-water as solvent indicating that the bioactive compounds present in feijoa extracts show high polarity indexes. Moreover, the results indicate a resistance of the bioactive compounds to the high temperatures applied. The increase of temperature from 40 to 80 °C was also positive for feijoa leaf extracts, providing highest global yields, TPC and antioxidant activities by using PLE method. Regarding to the solvent, ethanol-water mixture provided the best results. Additionally, the dynamic mode performed in PLE assays during 50 min was changed to a static mode comprised by 2 cycles 25 min each. The obtained results were promising and present PLE both in dynamic and static mode as a highly efficient extraction method to obtain bioactive compounds as well as a viable alternative in economic and environmental terms comparing to the conventional methods. The Pearson's correlation coefficient was applied in order to evaluate the correlation between TPC and the two antioxidant activity methods, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) reduction method and the Ferric Reducing Ability Power (FRAP) method. Due to the high correlations observed mainly between TPC and DPPH, the high antioxidant activity found in feijoa peel and leaf extracts may be attributed to the TPC. Although skin extracts obtained by SFE did not present promising results

in terms of TPC and antioxidant activity it was observed antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria from the extract obtained at 300 bar, 55 °C, 5 % ethanol-water as co-solvent at 6,750 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration. Moreover, the same extract showed bactericidal activity at 13,500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration. On the other hand, leaf extract obtained by SFE at 300 bar, 55 °C and 15 % ethanol-water as co-solvent showed promising results both antioxidant and antibacterial activities adding value to the extract. Finally, the phenolic compounds profile from feijoa skin and leaf extracts obtained by Soxhlet, SFE and PLE with the best results in terms of TPC was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC-ESI-MS/MS). Gallic acid, ferulic acid, ellagic acid, catechin and isoquercetin were the major compounds identified and properly quantified, however, their low concentrations compared to the high TPC suggest that the high antioxidant activities found in the extracts may be due mainly to the presence of condensed tannins, a class of phenolic polymers with high molecular weight but not identified by HPLC.

Keywords: Feijoa. Pineapple guava. Supercritical Fluid Extraction. Pressurized Liquid Extraction. Bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Feijoa (<i>Acca sellowiana</i> (O. Berg) Burret): fruta integral e seção transversal.....	26
Figura 2 - Etapas da autoxidação lipídica.....	32
Figura 3 - Etapa de Propagação sendo interrompida por ação de um antioxidante doador de hidrogênio.	32
Figura 4 – Mecanismo de estabilização do radical DPPH.....	34
Figura 5 – Mecanismo de redução do complexo férrico para complexo ferroso no método antioxidante FRAP.	35
Figura 6 - Placas de 96 poços utilizadas na microdiluição.....	38
Figura 7 - Aparato Soxhlet.	41
Figura 8 - Formação, crescimento e colapso de uma bolha de cavitação.	43
Figura 9 - Colapso de uma bolha de cavitação e liberação do material vegetal.	44
Figura 10 - Diagrama de fases de uma substância pura.	46
Figura 11 – Diagrama simplificado de ESC.....	47
Figura 12 - Principais cossolventes em extrações supercríticas de matrizes vegetais, de acordo com 166 publicações encontradas na base de dados.....	50
Figura 13 - Representação da CGE.....	52
Figura 14 - Diagrama de ELP.	54
Figura 15 - Secagem da casca de feijoa.	56
Figura 16 - Aparato Soxhlet em operação.....	58
Figura 17 - Equipamento de EAU (LATESC/UFSC).	59
Figura 18 - Unidade de ESC (LATESC/UFSC).....	60
Figura 19 - Diagrama de ESC (LATESC/UFSC).....	61
Figura 20 - Unidade de ELP (LATESC/UFSC).	66
Figura 21 - Diagrama de ELP (LATESC/UFSC).....	67
Figura 22 – Equipamentos utilizados para evaporação de solvente.	69
Figura 23 - CGE da casca de feijoa obtida em ESC.....	81
Figura 24 - Cinética supercrítica da casca de feijoa com cossolvente... 83	
Figura 25 - Rendimento global dos extratos da casca de feijoa obtidos por ESC.....	87
Figura 26 - CGE da casca de feijoa obtida por ELP.....	89
Figura 27 - Microdiluição em placa de 96 poços para extrato da casca de feijoa obtido por ESC.....	105
Figura 28 - Verificação do crescimento bacteriano em soluções contendo extrato da casca de feijoa obtido por ESC e suspensão de <i>S. aureus</i>	106

Figura 29 - Estrutura química do ácido ferúlico.	109
Figura 30 - Mecanismo de ressonância do radical de ácido ferúlico. .	110
Figura 31 - Estruturas químicas do ácido gálico e do ácido elágico. ...	111
Figura 32 - CGE da folha de feijoa obtida por ELP.	117
Figura 33 - Verificação do crescimento bacteriano em soluções contendo extratos da ELP da folha de feijoa e suspensões de <i>S. aureus</i> e <i>Salmonella</i>	131
Figura 34 - Estrutura química da catequina.	133
Figura 35 - Estrutura química da isoquercetina.	134
Figura 36 - Curva analítica de ácido gálico para utilização no cálculo de CFT nos extratos da casca e folha de feijoa.	159
Figura 37 - Curva analítica de Trolox para utilização no cálculo de atividade antioxidante nos extratos da casca e folha de feijoa pelo método FRAP.	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Referências bibliográficas relativas à bioatividade da feijoa.	39
Tabela 2 - Temperatura e pressão críticas de alguns fluidos.....	48
Tabela 3 - Lista de componentes da unidade de ESC (LATESC/UFSC).	63
Tabela 4 - Umidade e Diâmetro médio de partícula da casca de feijoa após secagem.....	77
Tabela 5 - Rendimento global dos extratos da casca de feijoa obtidos por técnicas a baixa pressão.....	78
Tabela 6 - Parâmetros do modelo de Regressão Linear por Partes da ESC.	80
Tabela 7 - Propriedades do leite e parâmetros cinéticos de extração supercrítica da casca de feijoa.	82
Tabela 8 - Rendimento global dos extratos da casca de feijoa obtidos por ESC, com 5% de etanol como cossolvente.	84
Tabela 9 - Rendimento global dos extratos da casca de feijoa obtidos por ESC, com 5, 10 e 15% de etanol como cossolvente.....	86
Tabela 10 - Parâmetros do modelo de Regressão Linear por Partes da ELP.....	88
Tabela 11 - Rendimento global dos extratos da casca de feijoa obtidos por ELP.	90
Tabela 12 - CFT de extratos da casca de feijoa obtidos por métodos a baixa e alta pressões.	92
Tabela 13 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos da casca de feijoa pelo método de captura do radical DPPH.....	98
Tabela 14 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos da casca de feijoa pelo método de redução do íon férrico (FRAP).....	101
Tabela 15 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre CFT (mg EAG.g ⁻¹ de extrato) e os métodos antioxidantes DPPH e FRAP.	103
Tabela 16 - Íon precursor, íon quantitativo e tempos de retenção dos compostos fenólicos identificados nos extratos da casca de feijoa.	107
Tabela 17 - Teor de Compostos fenólicos identificados nos extratos da casca de feijoa e expressos em mg.g ⁻¹ de extrato.	108
Tabela 18 - Rendimento global dos extratos da folha de feijoa obtidos por técnicas a baixa pressão.	113
Tabela 19 - Parâmetros do modelo de Regressão Linear por Partes da ELP.....	116
Tabela 20 - Rendimento global dos extratos da folha de feijoa obtidos por ELP.	118

Tabela 21 - CFT dos extratos da folha de feijoa obtidos por técnicas a baixa e alta pressões.....	120
Tabela 22 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos da folha de feijoa pelo método de captura do radical DPPH.	123
Tabela 23 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos da folha de feijoa pelo método de redução do íon férrico (FRAP).....	126
Tabela 24 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre CFT (mg EAG.g ⁻¹ de extrato) e os métodos antioxidantes DPPH e FRAP.	128
Tabela 25 - CMI dos extratos da folha de feijoa obtidos por ESC e ELP contra <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i>	130
Tabela 26 - Teor de Compostos fenólicos identificados em extratos de folha de feijoa e expressos em µg.g ⁻¹ de extrato.	132
Tabela 27 - Diagrama simplificado de preenchimento dos tubos na análise de CFT pelo Método de Folin-Ciocalteu.	159
Tabela 28 - Diagrama simplificado de preenchimento dos tubos no método antioxidante de captura do radical DPPH.	160
Tabela 29 - Diagrama simplificado de preenchimento dos tubos no método antioxidante de redução de íon férrico (FRAP).	160

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.2 OBJETIVOS	22
1.2.1 Objetivo geral	22
1.2.2 Objetivos específicos	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. FEIJOA (<i>Acca sellowiana</i> (O. Berg) Burret)	25
2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS	27
2.2.1 Compostos fenólicos	28
2.2.1.1 Métodos de avaliação quantitativa de compostos fenólicos totais	29
2.2.2 Agentes antioxidantes	30
2.2.1.2 Métodos de avaliação quantitativa de compostos antioxidantes	33
2.2.2 Agentes antimicrobianos	35
2.2.2.1 Métodos de avaliação de atividade antimicrobiana	36
2.3 BIOATIVIDADE DA FEIJOA	38
2.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	40
2.4.1 Soxhlet	40
2.4.2 Extração Assistida por Ultrassom (EAU)	42
2.4.3 Extração Supercrítica (ESC)	45
2.4.3.1 Uso de cossolventes	48
2.4.3.2 Curva Global de Extração (CGE).....	51
2.4.4 Extração com Líquido Pressurizado (ELP)	53
3 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA	55
3.1.1 Teor de umidade e substâncias voláteis	55
3.1.2 Secagem e moagem	56
3.2 Métodos de extração.....	57
3.2.1 Métodos de extração a baixa pressão	57
3.2.1.1 Soxhlet.....	57
3.2.1.2 Extração Assistida por Ultrassom (EAU).....	58
3.2.2 Métodos de extração a alta pressão	59
3.2.2.1 Extração Supercrítica (ESC)	59
3.2.2.1.1 Cinética de extração.....	64
3.2.2.1.2 Extrações com uso de cossolvente.....	65
3.2.2.2 Extração com Líquido Pressurizado (ELP)	66
3.2.2.2.1 Cinéticas de extração	68
3.2.2.2.2 Extrações.....	68
3.2.3 Pós-tratamento dos extratos	68
3.3 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS.....	69

3.3.1 Teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT)	69
3.3.2 Atividade antioxidante	70
3.3.2.1 Método de captura do radical DPPH.....	70
3.3.2.2 Método de redução do íon férrico - FRAP.....	72
3.3.2.3 Correlação entre CFT e atividade antioxidante.....	73
3.3.3 Atividade antibacteriana	73
3.3.3.1 Preparo dos inóculos e microdiluição	73
3.3.4 Perfil de compostos fenólicos por HPLC	75
3.3.4.1 Preparo da amostra: extração lipídica prévia	75
3.3.4.2 Preparo da amostra: hidrólise-ácida	75
3.3.4.3 Análise dos compostos fenólicos por HPLC – ESI - MS/MS... ..	75
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	76
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.1 CASCA DE FEIJOA.....	77
4.1.1 Caracterização da Matéria-Prima	77
4.1.2 Rendimento Global de Extração	77
4.1.2.1 Métodos a baixa pressão	77
4.1.2.2 Extração Supercrítica (ESC).....	80
4.1.2.2.1 <i>Cinética</i>	80
4.1.2.2.2 <i>Ensaio</i>	84
4.1.2.3 Extração com Líquido Pressurizado (ELP).....	87
4.1.2.3.1 <i>Cinética</i>	87
4.1.2.3.2 <i>Ensaio</i>	89
4.1.3 Compostos Fenólicos Totais (CFT)	91
4.1.4 Atividade antioxidante	97
4.1.4.1 Método de captura do radical DPPH.....	97
4.1.4.2 Método de redução do íon férrico - FRAP.....	100
4.1.5 Coeficiente de Correlação de Pearson (r)	103
4.1.6 Atividade antibacteriana	104
4.1.7 Perfil de compostos fenólicos por HPLC	106
4.2 FOLHA DE FEIJOA.....	113
4.2.1 Caracterização da Matéria-Prima	113
4.2.2 Rendimento global de extração	113
4.2.2.1 Métodos a baixa pressão	113
4.2.2.2 Extração Supercrítica (ESC).....	115
4.2.2.3 Extração com Líquido Pressurizado (ELP).....	116
4.2.2.3.1 <i>Cinética</i>	116
4.2.2.3.1 <i>Ensaio</i>	117
4.2.3 Compostos Fenólicos Totais (CFT)	119
4.2.4 Atividade antioxidante	123
4.2.4.1 Método de captura do radical DPPH.....	123

4.2.4.2 Método de redução do íon férrico - FRAP	125
4.2.5 Coeficiente de correlação de Pearson (r).....	127
4.2.6 Atividade antibacteriana	128
4.2.7 Perfil de compostos fenólicos por HPLC.....	131
5 CONCLUSÕES	135
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	137
REFERÊNCIAS	139
APÊNDICE.....	159

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, as plantas são utilizadas pelo homem como forma de tratamento de doenças e promotoras de saúde. O uso de plantas em caráter medicinal era utilizado, até então, de forma instintiva, ou seja, como não se dispunha das composições de cada espécie, toda descoberta se baseava em método de tentativa e erro. Com o passar do tempo e o avanço da ciência e da tecnologia, o conhecimento empírico foi sendo substituído por estudos cientificamente embasados e as espécies passaram a ser divididas e pontualmente aplicadas (PETROVSKA, 2012).

A mais antiga evidência da aplicação de plantas para uso medicinal remete aos Sumérios, em aproximadamente 5.000 a.C. Diversos recipientes de barro utilizados para o preparo das drogas medicinais apresentavam inscrições e desenhos associados a mais de 250 espécies de plantas, dentre elas, a papoula, de onde se extrai o ópio (ARAGÓN-POCE et al., 2002; PETROVSKA, 2012). Hoje, sabe-se que o ópio é fonte de morfina, um poderoso analgésico usado para o tratamento de dores intensas.

O maior embasamento científico decorrente do avanço tecnológico do século XX trouxe diversos ganhos, não apenas para a medicina, mas para diversas áreas. Todavia, novas descobertas trazem consigo, novos desafios. No ramo alimentício, um grande desafio enfrentado por pesquisadores do mundo todo é a busca pela diminuição no volume de perdas e desperdícios de alimentos aptos ao consumo humano. De acordo com números da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2017): 1,3 bilhão de toneladas de alimentos destinados ao consumo humano são desperdiçadas; em valores, este número representa exatos US\$ 1 trilhão; no grupo de frutas e vegetais, aproximadamente 45% do volume produzido é desperdiçado, levando-se em consideração tanto os processos *upstream* (colheita e transporte) quanto processos *downstream* (processamento, distribuição e consumo). Em resumo, 45% de frutas e vegetais, muitas delas com elevada qualidade nutricional, são simplesmente descartadas. Outro desafio enfrentado por pesquisadores é a busca por compostos bioativos naturais (antioxidantes, antimicrobianos, edulcorantes, dentre outros) à altura dos aditivos sintéticos tradicionalmente utilizados, os quais podem estar relacionados ao aumento na incidência de alergia, câncer e outras patologias.

Para a extração de compostos bioativos de matrizes vegetais, diversas técnicas podem ser utilizadas, as quais se dividem em dois

grupos: técnicas convencionais e técnicas não-convencionais. As técnicas convencionais apresentam, como principais vantagens, o baixo custo de aplicação e a facilidade operacional. Em contrapartida, algumas desvantagens, dentre elas, o longo tempo de operação e o uso de solventes orgânicos prejudiciais à saúde e ao meio ambiente, estão embutidas nessas técnicas. Métodos alternativos, também conhecidos como técnicas não-convencionais, surgem com o intuito de sanar estes problemas, provendo extratos mais puros e seguros, tanto para o consumidor direto quanto para o meio ambiente num todo.

A feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret), popularmente conhecida como goiaba-serrana, é uma fruta nativa do planalto brasileiro e uruguaio. Apesar de ter sido introduzida primeiramente na Europa, no final do século XIX, tornou-se popular em países como os Estados Unidos e a Colômbia e em especial, na Nova Zelândia, país onde a feijoa é amplamente cultivada e comercializada, muito devido ao seu aroma suave bastante característico (BARNI et al., 2004).

Weston (2010) apresenta uma série de estudos relacionados às propriedades bioativas da feijoa, propriedades encontradas tanto no fruto quanto nas folhas, concluindo que o extrato de feijoa apresenta um elevado potencial bioativo, podendo ser utilizado com propósitos nutracêuticos. Contudo, a qualidade final de um extrato está fortemente relacionada à técnica de extração aplicada e ao solvente utilizado para sua obtenção.

Diante do exposto, buscou-se, no presente trabalho, obter extratos da casca (resíduo da produção industrial de suco) e da folha da feijoa através de técnicas convencionais e não-convencionais, a baixa e alta pressões.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Através de técnicas convencionais e não-convencionais, métodos a baixa e alta pressões, e com uso de solventes ambientalmente seguros, obter extratos bioativos da casca e folha de feijoa, caracterizando-os em termos de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e atividade antibacteriana.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Obter extratos de casca e folha de feijoa por técnicas a baixa pressão (Soxhlet e Extração Assistida por Ultrassom) com uso de água e etanol, solventes ambientalmente seguros.
- b) Obter extratos de casca e folha de feijoa via Extração Supercrítica;
- c) Obter extratos de casca e folha de feijoa via Extração com Líquido Pressurizado;
- d) Avaliar os extratos obtidos em termos de rendimento global, teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante *in vitro* e atividade antibacteriana;
- e) Avaliar o perfil de compostos fenólicos dos extratos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (HPLC-ESI-MS/MS).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FEIJOA (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret)

Frutos de espécies nativas com propriedades nutraceuticas e sensoriais como cor, sabor e aroma podem ser explorados comercialmente para o consumo *in natura* ou através de produtos processados, tais como sucos, geleias, sorvetes e bebidas. A região sul do Brasil possui várias dessas espécies frutíferas nativas com potencial para exploração comercial, das quais se destaca a feijoa (AMARANTE; SANTOS, 2011).

Popularmente chamada de goiaba-serrana, a feijoa é uma frutífera nativa do planalto brasileiro e uruguaio e foi introduzida na Europa por volta de 1890, de onde se espalhou por outros continentes. A despeito de ser pouco conhecida e cultivada no Brasil, a fruta já é tradicional em diversos países como a Colômbia e os Estados Unidos (em especial, nos estados da Califórnia e na Flórida), nas ex-repúblicas soviéticas e regiões do Cáucaso e em outros países subtropicais como Austrália e, em especial, a Nova Zelândia, quem mais tem contribuído para a divulgação da feijoa através de suas exportações e pesquisas (BARNI et al., 2004).

A feijoa foi introduzida na cultura neozelandesa em 1908 e em 1983, criou-se a *New Zealand Feijoa Growers Association* (em português, Associação Neozelandesa de Fruticultores de Feijoa) (SUN-WATERHOUSE et al., 2012). Esta associação tem por base o fornecimento de todas as informações necessárias ao cultivo e à distribuição da feijoa, além de prover diretrizes fundamentais para a garantia de qualidade do produto final distribuído *in natura* (NZ FEIJOA GROWERS ASSOCIATION, 2017).

A comercialização da feijoa no mercado interno neozelandês, no triênio 2008-2010, alcançou o valor de US\$ 1,7 milhões. As exportações somaram, no mesmo período, US\$ 0,2 milhões. No biênio 2014-2015, os valores dobraram, chegando a US\$ 3,2 e 0,4 milhões, respectivos à distribuição em mercado interno e externo (AITKEN; HEWETT, 2015). Outro fato que merece destaque é a colheita da feijoa no mercado neozelandês: o volume colhido chegou a 500 t em 2010. Em 2015, o volume colhido chegou a 1.000 t, um aumento de 100% em apenas 5 anos (AITKEN; HEWETT, 2015).

Aproximadamente 50% das feijoas comercializadas no mercado interno neozelandês seguem para consumo *in natura*. Os outros 50% são direcionados para processamento industrial de sucos, bebidas, entre outros produtos. O processamento industrial proporciona agregação de valor à cultura da feijoa. Todavia, uma parcela da fruta composta por

casca e polpa aderida à casca segue como rejeito, uma vez que esta fração não é utilizada na industrialização, resultando em um desperdício para a empresa (SUN-WATERHOUSE et al., 2012).

O *habitat* natural da feijoa é a região sul do Brasil, em formações abertas como os campos e a Mata dos Pinhais. É uma arvoreta semidecídua, de 3-5 m de altura. Folhas simples, subcoriáceas, brancocinéreas na face inferior, de 4-6 cm de comprimento (BARNI et al., 2004; LORENZI, 2006).

Esta fruta, que pode atingir o tamanho e aparência de uma goiaba comum (Figura 1), é consumida e apreciada pelas populações que habitam as regiões onde a espécie frutífera ocorre naturalmente. Destacam-se sua polpa cor de gelo com sabor doce-acidulado e seu aroma, ao mesmo tempo inconfundível e delicado (BARNI et al., 2004).

Figura 1 - Feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret): fruta integral e seção transversal.



Fonte: Weston (2010).

O número de sementes da feijoa pode chegar a mais de 100 por fruto, são pequenas e podem ser consumidas juntamente com a polpa. As sementes encontram-se embebidas em uma polpa firme e gelatinosa, podendo apresentar formatos que variam de gota até coração. O rendimento da polpa também é bem variável, geralmente atingindo valores máximos de 50% (AMARANTE; SANTOS, 2011).

A maturação se estende por cerca de 3 a 4 semanas, sendo na serra catarinense, distribuída entre final de fevereiro e final de maio (AMARANTE; SANTOS, 2011)

Através de um teste comparativo, Barni et al (2004) avaliaram o nível de aceitabilidade de feijoa, em comparação a espécies tradicionais do sul do Brasil como a pera, o kiwi, a ameixa e a goiaba. Os testes foram realizados em dois centros comerciais localizados nos municípios de Florianópolis e Blumenau, em Santa Catarina. Os resultados demonstraram que a feijoa possui um nível de aceitabilidade semelhante à pera, kiwi e ameixa, e nível de aceitabilidade superior à goiaba. De acordo com Barni et al (2004), o mercado da feijoa pode se igualar ao de frutas como o kiwi, pera, amora e goiaba, desde que o consumidor venha a ter a oportunidade de conhecer o fruto, proporcionando, assim, uma nova opção de renda para os produtores rurais da região serrana catarinense.

O MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2011) classificou a feijoa como uma das espécies alimentícias nativas da região sul de valor econômico atual ou potencial. De acordo com os autores, diversos estudos comprovaram as propriedades bioativas dos frutos de feijoa, principalmente no que se refere às atividades bactericida e antioxidante, assim como a existência de flavonoides, cujas propriedades auxiliam na atividade imunológica frente a processos inflamatórios ou alérgicos.

2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

Segundo Bernhoft (2010), compostos bioativos são compostos oriundos do metabolismo secundário das plantas. Diferentes das macromoléculas do metabolismo primário das plantas como carboidratos, aminoácidos, proteínas e lipídios, as quais possuem funções de crescimento e desenvolvimento para as plantas, os compostos bioativos auxiliam as plantas em sua relação com o ecossistema, protegendo-as de herbívoros e patógenos (DURMIC; BLACHE, 2012). Apresentam demais funções, tais como: atração a polinizadores, absorção à radiação ultravioleta e competição com plantas vizinhas (AZMIR et al., 2013; BERNHOFT, 2010; KESHANI et al., 2012; SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016). Os compostos bioativos consistem de oleoresinas, ácidos graxos, alcaloides, terpenoides, glicosídeos, fitoesteróis e compostos fenólicos (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

O aumento nos casos de doenças crônicas relacionadas à má alimentação e à restrição de diversos aditivos sintéticos tradicionalmente inseridos em alimentos têm elevado o número de pesquisas relacionadas

à identificação e aplicação de aditivos naturais em alimentos (MIŠIĆ et al., 2008; SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016). Muitos compostos extraídos de fontes naturais têm demonstrado diversas aplicações bioativas, tais como agentes antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, antitumorais, dentre outros (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

2.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais (ANGELO; JORGE, 2007).

Como produtos resultantes do metabolismo secundário de plantas, os compostos fenólicos, embora não desempenhem um papel fundamental no desenvolvimento da planta como os metabólitos primários (aminoácidos, lipídios, carboidratos, entre outros), e não possuam uma distribuição universal nas mesmas, eles representam importantes agentes de defesa da planta contra patógenos e na competição entre as plantas. Estes produtos também agem como protetores das plantas em estresses abióticos, tais como mudança de temperatura, infecções, ferimentos, radiação UV, entre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004). Em alimentos, os compostos fenólicos contribuem para o amargor, adstringência, coloração, aroma, odor e estabilidade oxidativa de produtos. Ademais, compostos fenólicos não apenas conservam a qualidade dos alimentos, mas também reduzem o risco de desenvolvimento de patologias, tais como aterosclerose e câncer (ANGELO; JORGE, 2007; MALACRIDA; DA MOTTA, 2005; PERES, 2016).

Os compostos fenólicos são tradicionalmente reconhecidos pelo seu elevado potencial antioxidante. Eles atuam como antioxidantes primários, interrompendo a reação em cadeia, mas também, podem atuar como antioxidantes secundários, inativando radicais metálicos presentes na amostra e responsáveis pela aceleração do processo de autooxidação (MICHALAK, 2006).

Um radical livre antioxidante resultante não deve, idealmente, iniciar novos radicais e nem ser susceptível a uma oxidação rápida em cadeia. Neste sentido, os antioxidantes fenólicos ocupam uma posição privilegiada. São excelentes doadores de hidrogênio ou elétrons e seus intermediários radicalares são relativamente estáveis, devido à ressonância provocada pelo deslocamento do elétron desemparelhado e a

carência de posições adequadas ao ataque do oxigênio molecular (FENNEMA, 1996).

Embora os compostos fenólicos sejam reconhecidamente estabelecidos como agentes antioxidantes, seu mecanismo de ação permite classificá-los também como agentes antimicrobianos. O mecanismo de ação dos antimicrobianos fenólicos é relacionado à inativação de enzimas celulares, as quais dependem da baixa permeabilidade da membrana celular (MORENO et al., 2006). O aumento na permeabilidade celular é o principal mecanismo de ação de um composto antimicrobiano, onde compostos podem romper a membrana celular, provocando desordem na integridade e eventualmente, causando a morte celular (CETIN-KARACA, 2011). Segundo Cueva et al (2010), o mecanismo de ação de ácidos fenólicos pode residir na hiper-acidificação da membrana celular, resultado da dissociação dos ácidos fenólicos. A hiper-acidificação alteraria o potencial da membrana celular, elevando a sua permeabilidade e afetando inclusive a síntese de ATP.

O conhecimento dos efeitos antimicrobianos de compostos fenólicos permite buscar novas estratégias, a fim de combinar o seu potencial antimicrobiano com seu já estabelecido potencial antioxidante (CETIN-KARACA, 2011).

Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples e taninos (ANGELO; JORGE, 2007).

2.2.1.1 Métodos de avaliação quantitativa de compostos fenólicos totais

Métodos espectrofotométricos e cromatográficos são comumente utilizados para a quantificação de compostos fenólicos.

Os métodos espectrofotométricos são de fácil execução e curto tempo experimental; contudo, permitem apenas quantificar os compostos fenólicos totais presentes na amostra, sem identificá-los, nem quantificá-los separadamente (ANGELO; JORGE, 2007).

O método espectrofotométrico mais utilizado para a quantificação de compostos fenólicos totais presentes em uma amostra baseia-se na reação destes compostos com o reagente de Folin-Ciocalteu, em meio alcalino. O reagente de Folin-Ciocalteu é formado por sais de molibdato de sódio e tungstato de sódio. Na presença de uma solução contendo compostos fenólicos, estes reduzem os sais presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, 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).

Os métodos cromatográficos podem ser definidos como métodos físico-químicos de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados em duas fases, uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido. A fase móvel pode ser um líquido, um gás ou um fluido supercrítico. Quando a fase móvel for um líquido, é denominada cromatografia líquida (SCHULZ, 2015).

No sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), a amostra é injetada e arrastada pela fase móvel que se movimenta continuamente através da coluna, a qual contém a fase estacionária, onde, de fato, ocorre a separação da mistura. O soluto interage com ambas as fases por adsorção e/ou partição. As substâncias separadas saem da coluna cromatográfica dissolvidas na fase móvel e por fim, passam por um detector que gera um sinal proporcional à quantidade de material separado. A interpretação desse registro produz dados qualitativos e quantitativos sobre a amostra e seus constituintes (SCHULZ, 2015).

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com um espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia, como a alta seletividade e a eficiência de separação, com as vantagens da espectrometria de massas, como a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional de seletividade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

2.2.2 Agentes antioxidantes

Radicais livres são moléculas fundamentais em qualquer processo bioquímico e representam uma parte importante no metabolismo de seres aeróbios. O consumo de oxigênio, inerente ao crescimento celular, resulta na geração de espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio são continuamente produzidas durante os processos fisiológicos normais e, com isso, podem iniciar a oxidação de membranas lipídicas. As espécies reativas de oxigênio são capazes de danificar biomoléculas cruciais como ácidos nucleicos, lipídios, proteínas e carboidratos e, se não forem inativadas por algum agente antioxidante, tendem a resultar em problemas de saúde (BEYHAN; ELMASTAŞ; GEDIKLI, 2010).

Em organismos vivos, o estresse oxidativo é o principal responsável pelos danos celulares. Nos alimentos, predominantemente, ocorrem reações de autoxidação em cadeia (BOROSKI et al., 2015). O processo de oxidação lipídica é um sério problema em alimentos, pois sua ocorrência produz odores e sabores desagradáveis, diminui o tempo de prateleira do produto, resulta em alterações de coloração e textura, além de diminuir o valor nutricional do produto (ALAMED et al., 2009).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em pequenas concentrações, retardam ou previnem significativamente o início da propagação das reações de oxidação em cadeia (OLIVEIRA et al., 2007), sendo divididos entre sintéticos, como o butil-hidroxi-anisol (BHA) e o butil-hidroxi-tolueno (BHT) e os naturais, como os compostos fenólicos, carotenoides, ácido ascórbico, dentre outros (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Os antioxidantes sintéticos são substâncias que tiveram seu uso aprovado em alimentos após investigações que comprovaram sua segurança dentro de um limite de ingestão diária; sendo assim, estão sujeitos a legislações específicas de cada país ou por normas internacionais. Dentre os antioxidantes sintéticos, os mais utilizados pela indústria brasileira são o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), galato de propila (PG) e *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) (TAKEMOTO; FILHO; GODOY, 2009). No Brasil, o uso e a quantidade de antioxidantes sintéticos adicionados aos alimentos são controlados pelo Ministério da Saúde (BOROSKI et al., 2015).

A adição de antioxidantes naturais, em substituição aos antioxidantes sintéticos, vem crescendo na indústria de alimentos, pois, os apelos não mais se restringem apenas às qualidades sensoriais do alimento, mas também, à prevenção de doenças em nível agudo e crônico. Dentre os antioxidantes naturais, destacam-se as enzimas, as vitaminas e os compostos fenólicos (BOROSKI et al., 2015).

Antes de conhecer os diferentes grupos de antioxidantes e seus mecanismos de ação, é apresentado, na Figura 2, o processo de autoxidação lipídica e suas respectivas etapas, sem a presença de um antioxidante diretamente na cadeia.

Figura 2 - Etapas da autoxidação lipídica.

RH = substrato, R* = radical livre, ROO* = radical peróxido, ROOH = hidroperóxido.

Iniciação	$RH \rightarrow R^* + H^*$ $ROOH \rightarrow RO^* + ^*OH$
Propagação	$R^* + O_2 \rightarrow ROO^*$ $ROO^* + RH \rightarrow ROOH + R^*$
Término	$AO^* + ROO^* \rightarrow \text{produtos não radiculares}$ $ROO^* + ROO^* \rightarrow ROOR + O_2$ $R^* + R^* \rightarrow RR$

Fonte: Boroski et al (2015).

Segundo definição de Ingold (1968), os antioxidantes podem ser divididos em dois grandes grupos: os primários e os secundários. Os primários atuam na interrupção da autoxidação diretamente na etapa de propagação, ao reagirem com radicais livres. A Figura 3 apresenta a etapa de propagação da autoxidação sendo interrompida por ação de um antioxidante. Neste exemplo, um átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres R* e ROO*. Assim, formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte AO* procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). Segundo Gordon (1990), a doação de átomos de hidrogênio é o mecanismo de ação mais comum entre antioxidantes alimentícios. De fato, muitos cientistas acreditam que este seja o mecanismo de ação mais relevante dos antioxidantes (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Figura 3 - Etapa de Propagação sendo interrompida por ação de um antioxidante doador de hidrogênio.

Propagação	$R^* + AOH \rightarrow RH + AO^*$ (estável) $ROO^* + AOH \rightarrow ROOH + AO^*$ (estável)
------------	--

Fonte: Boroski et al (2015).

Os antioxidantes secundários, também chamados de preventivos, não participam diretamente das etapas de propagação na autoxidação mas retardam o período de iniciação, o qual é catalisado por íons metálicos (GORDON, 1990). Estes metais, em especial, ferro e cobre, atuam como pró-oxidantes, através da transferência de elétrons, liberando radicais de ácidos graxos e hidroperóxidos (ROOH) para reações. A redução destes metais pró-oxidantes por parte dos antioxidantes eleva a energia de

ativação da etapa de iniciação, retardando o início do processo de autoxidação consideravelmente (GORDON, 1990). Os antioxidantes secundários podem apresentar demais mecanismos de atuação, tais como: sequestro de oxigênio, desativação do oxigênio singlete, absorção de radiação UV, entre outros.

2.2.1.2 Métodos de avaliação quantitativa de compostos antioxidantes

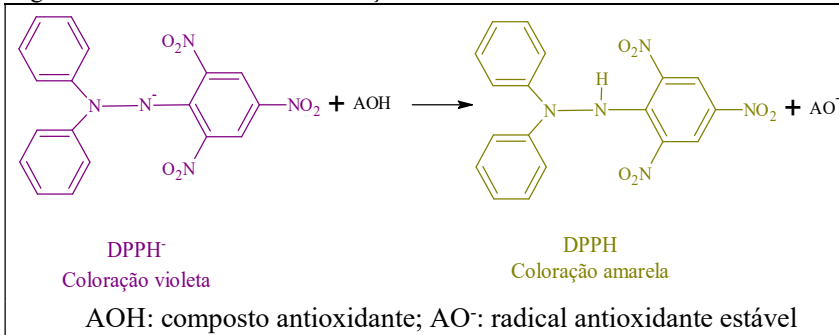
Diversos ensaios têm sido adotados a fim de se estimar a atividade antioxidante de frutas e vegetais, dentre eles, encontram-se o método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), método de captura do radical ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e o método de redução do íon férrico (FRAP, do inglês *Ferric Reducing Ability Power*) (THAIPONG et al., 2006).

O ensaio empregando o radical DPPH tem sido amplamente utilizado em diferentes amostras, tais como frutas, vegetais, plantas medicinais, ervas aromáticas, temperos, cereais, leguminosas, chás, folhas, cogumelos e algas, devido à sua alta sensibilidade, facilidade de aplicação e versatilidade, visto que o DPPH pode ser utilizado tanto para identificar antioxidantes de caráter hidrofílico quanto para identificar antioxidantes de caráter lipofílico (BOROSKI et al., 2015; MOON; SHIBAMOTO, 2009; KEDARE; SINGH, 2011).

O radical livre DPPH apresenta em sua estrutura, dois anéis aromáticos de seis membros, contendo átomos de C e H e um anel picril-hidrazila, constituído por um anel aromático de seis membros ligado a três grupos NO₂ e uma hidrazina, em que o átomo de N ligado diretamente ao anel está com um elétron desemparelhado, o que caracteriza a espécie como um radical livre (BOROSKI et al., 2015).

Na reação de oxirredução entre o radical DPPH e a espécie antioxidante, o elétron desemparelhado do átomo de N se emparelha com um átomo de H cedido pelo composto antioxidante. O antioxidante, por outro lado, perde o átomo de H, mas se estabiliza por ressonância (BOROSKI et al., 2015). O radical DPPH possui coloração violeta, com absorção máxima na região de 517 nm (515 a 528 nm) e por se tratar de uma reação estequiométrica em relação ao número de átomos de hidrogênio absorvidos, tem sua absorbância diminuída em decorrência da presença de antioxidantes, passando para coloração amarela, através da reação (Figura 4) (BOROSKI et al., 2015; MACDONALD-WICKS; WOOD; GARG, 2006; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Figura 4 – Mecanismo de estabilização do radical DPPH.



Fonte: o próprio autor.

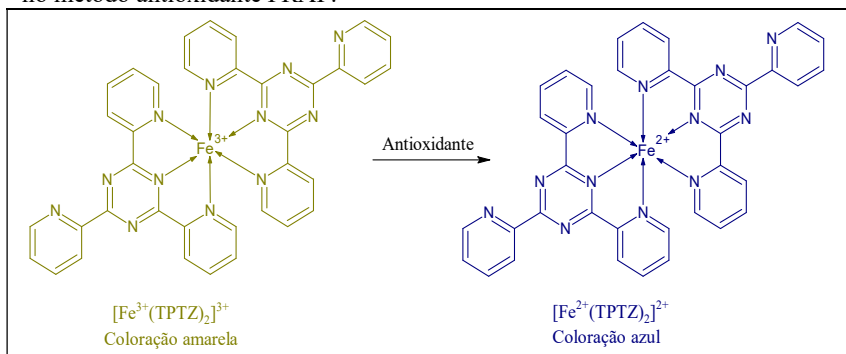
Os resultados são geralmente expressos em função do valor do EC₅₀ da amostra, ou seja, a quantidade necessária de antioxidantes na amostra para diminuir a concentração inicial do radical DPPH em 50% (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Compostos antioxidantes que possuem a capacidade de retardar a taxa de autooxidação lipídica por mecanismos distintos à conversão de radicais livres em espécies mais estáveis são chamados de antioxidantes secundários (GORDON, 1990). Dentre os mecanismos de ação de antioxidantes secundários, destacam-se a complexação de metais, o sequestro de oxigênio, a decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radicalar, absorção de radiação UV ou desativação do oxigênio singlete (BOROSKI et al., 2015; GORDON, 1990).

Existem várias metodologias para a determinação do poder de redução de antioxidantes, sendo que as mais empregadas baseiam-se na redução do íon Fe³⁺ para Fe²⁺ (BOROSKI et al., 2015).

A metodologia que utiliza o complexo férrico 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina ([Fe³⁺(TPTZ)₂]³⁺) para determinar o poder de redução de um íon metálico é conhecida como FRAP (do inglês *Ferric Reducing Ability Power*) ou seja, Poder de Redução do Íon Férrico (BOROSKI et al., 2015). Quando o complexo ([Fe³⁺(TPTZ)₂]³⁺) é reduzido, por ação de um antioxidante e em meio acidificado, forma-se o complexo ([Fe²⁺(TPTZ)₂]²⁺) de intensa coloração azul, com máxima absorção em 593 nm (Figura 5). A intensidade da coloração final da amostra é diretamente proporcional à capacidade redutora do antioxidante (BOROSKI et al., 2015; KARADAG, OZCELIK; SANER, 2009; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Figura 5 – Mecanismo de redução do complexo férrico para complexo ferroso no método antioxidante FRAP.



Fonte: o próprio autor.

O método FRAP é de fácil execução, apresenta resultados confiáveis e em um curto período de tempo, sendo, por esta razão, um método bastante utilizado na análise da capacidade antioxidante em plantas e alimentos, especialmente, em conjunto com o método DPPH (MOON E SHIBAMOTO, 2009).

2.2.2 Agentes antimicrobianos

Doenças infecciosas são as principais causas de morbidade e mortalidade, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Dentre essas doenças, estão aquelas transmitidas por alimentos contaminados, sejam esses contaminantes as bactérias, vírus ou parasitas (SINGH et al., 2016). Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (do inglês *The United States Centers for Disease Control and Prevention – CDC*) estimam que um em cada seis americanos (48 milhões de pessoas) adoeçam, 128 mil são hospitalizados e 3 mil morrem, por ano, em decorrência do consumo de alimentos contaminados (XU et al., 2014). A Organização Mundial da Saúde – OMS, estima que o número de consumidores acometidos por doenças transmitidas por alimentos contaminados e que podem vir a óbito pode chegar a 2 milhões (HINTZ; MATTHEWS; DI, 2015). Os patógenos mais comuns encontrados em alimentos incluem *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* e *Escherichia coli* (XU et al., 2014). De fato, algumas cepas de *E. coli* são livres de patogenicidade a ponto de serem utilizadas em formulações de probióticos infantis, como é o caso da cepa O6:K5:H1. Em contrapartida, sérios problemas de saúde

como infecção enterro-hemorrágica e falha renal podem ser causados pela *E. coli* O157:H7 (CUEVA et al., 2010).

Muitos alimentos são perecíveis por natureza e necessitam de proteção a fim de evitar sua contaminação, seja ela causada por micro-organismos deteriorantes, os quais alterarão características sensoriais como cor, aroma e textura do produto, e até por micro-organismos patogênicos, os quais poderão ser letais ao consumidor.

Com o intuito de proteger os alimentos e manter sua inocuidade, diversas técnicas são aplicadas, desde a adição de sais e ácidos a tratamentos térmicos (LUCERA et al., 2012). O tratamento térmico, apesar de ser um método eficaz na destruição de micro-organismos vegetativos, a depender do tempo e temperatura do processo, pode produzir efeitos nutricionais e sensoriais indesejáveis no produto final (HINTZ; MATTHEWS; DI, 2015).

A descoberta dos antimicrobianos foi um marco na história da medicina. No entanto, devido ao uso excessivo destes antibióticos, diversos fatores adversos, dentre eles, a resistência microbiana, vêm atraindo a atenção de pesquisadores e consumidores no mundo todo (FU; LU; ZHOU, 2016). Com isso, diversos esforços têm sido realizados com o intuito de se buscar alternativas naturais em substituição aos produtos químicos e antimicrobianos sintéticos utilizados em alimentos, muitos deles já proibidos em diversos países devido às suas elevadas toxicidades (LUCERA et al., 2012; ORTEGA-RAMIREZ et al., 2014).

Os antimicrobianos naturais, compostos capazes de inibir o crescimento de bactérias, fungos e vírus, constituem, cada vez mais, uma nova forma de garantir um produto de qualidade inalterada e absolutamente seguro para o consumo. Em voga há muitos anos, o uso destes compostos vem crescendo no mercado europeu, especialmente com outras técnicas modernas de controle como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

2.2.2.1 Métodos de avaliação de atividade antimicrobiana

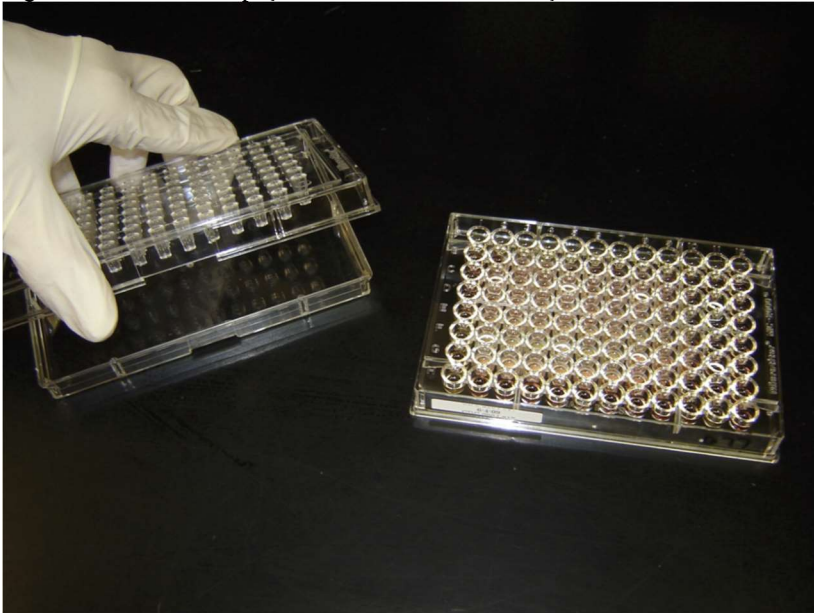
Atualmente, vários métodos *in vitro* podem ser reproduzidos a fim de se avaliar a atividade antimicrobiana de um extrato de fruta ou planta. Dentre os métodos mais aplicados, encontram-se os métodos de difusão, tais como o método de difusão em poço e o método de difusão em disco, e os métodos de diluição, sendo o método de microdiluição, o mais utilizado (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; OSTROSKY et al., 2008).

O método de difusão em disco é simples, prático e já padronizado pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para testes com bactérias e fungos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Basicamente, inocula-se uma cepa bacteriana de concentração $1-2 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ sobre a superfície de uma placa contendo ágar Müller-Hinton. Em seguida, discos de papel filtro estéreis de 6 mm e contendo um certo volume da solução antimicrobiana são adicionados sobre o ágar. Após incubação, os resultados são obtidos através da medição do halo que se formará em torno dos discos, no caso de inibição. Quanto maior o diâmetro do halo, maior é o seu potencial antimicrobiano. Um disco adicionado de antibiótico é usado como controle positivo e um disco com o solvente utilizado para solubilizar o extrato é aplicado como controle negativo (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; JORGENSEN; FERRARO, 2009).

No método de difusão em poço, assim como no método de difusão em disco, a superfície do ágar é inoculada com um volume conhecido da cepa bacteriana. Em seguida, um pequeno orifício de aproximadamente 6 mm de diâmetro é feito assepticamente sobre o ágar, e então, um volume de 20 a 100 µL de extrato antimicrobiano é adicionado ao orifício. Após incubação, verifica-se se a devida difusão do agente antimicrobiano pelo ágar resultou em impedimento de crescimento das bactérias ou fungos. A eficácia do agente antimicrobiano é realizada através da medição do diâmetro do halo formado em torno do orifício (OSTROSKY et al., 2008).

O método de microdiluição é um método de fácil reprodutibilidade, econômico em termos de materiais e diferente das técnicas de difusão, tem a vantagem de possibilitar o estabelecimento da Concentração Mínima Inibitória (CMI), ou seja, a concentração mínima de extrato capaz de inibir o crescimento microbiano. Essa praticidade é alcançada pois, para realizar a microdiluição, é necessário utilizar apenas uma pequena placa de 96 poços, a qual é apresentada na Figura 6, onde, através de diluições seriadas do extrato e uma concentração fixa de inóculo, é possível avaliar o crescimento bacteriano ou fungico, após incubação, através da turvação do sistema ou da mudança de coloração, no caso de se utilizar um corante com potencial redox (ELSHIKH et al., 2016; JORGENSEN; FERRARO, 2009).

Figura 6 - Placas de 96 poços utilizadas na microdiluição.



Fonte: Jorgensen; Ferraro (2009).

2.3 BIOATIVIDADE DA FEIJOA

Fonte de vitamina C, minerais e fibras e com baixa caloria, a feijoa é matéria-prima utilizada no desenvolvimento de diversos produtos na forma de sucos, geleias, licores, xaropes e frutas cristalizadas, em especial, no mercado australiano e neozelandês, onde se tornou espécie tradicional (RUBERTO; TRINGALI, 2004; WATSON; PREEDY, 2011; WESTON, 2010). Aliado às suas proeminentes propriedades nutricionais e sensoriais, a feijoa tem sido fonte de diversas pesquisas nas duas últimas décadas, em especial, devido aos seus compostos bioativos. A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos já realizados acerca dos compostos bioativos da feijoa.

Tabela 1 - Referências bibliográficas relativas à bioatividade da feijoa.

Potencial bioativo	Fonte
Antioxidante	(EBRAHIMZADEH et al., 2008) (BEYHAN; ELMASTAŞ; GEDIKLI, 2010) (HAMINIUK et al., 2011) (SUN-WATERHOUSE et al., 2012) (TUNCEL; YILMAZ, 2015) (AMARANTE et al., 2017) (POODI et al., 2018) (MOSBAH et al., 2018)
Antimicrobiano	(BASILE et al., 1997) (MOTOHASHI et al., 2000) (VUOTTO et al., 2000) (MOSBAH et al., 2018)
Antitumoral	(MOTOHASHI et al., 2000) (BONTEMPO et al., 2007)
Antifúngico	(MOTOHASHI et al., 2000)

Ebrahimzadeh et al (2008) avaliaram a atividade antioxidante dos extratos de folha e casca de feijoa, obtendo resultados elevados, tanto em termos de antioxidantes primários ou doadores de hidrogênio, quanto em termos de antioxidantes secundários redutores de íons metálicos.

Beyhan; Elmastas; Gedikli (2010) observaram elevado potencial antioxidante no extrato alcoólico da *Acca sellowiana*, em especial, em suas folhas.

Um elevado potencial antioxidante foi observado na casca da feijoa, no trabalho desenvolvido por Tuncel; Yilmaz (2015). Os autores, por fim, sugerem o uso do extrato da casca de feijoa em matrizes alimentares, objetivando a prevenção a processos oxidativos.

Basile et al. (1997) obtiveram um alto potencial antimicrobiano na polpa e na casca de feijoa contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e outras 5 cepas microbianas, dentre espécies Gram positivas e Gram negativas. Resultados semelhantes foram observados por Vuotto et al (2000).

Motohashi et al (2000), além de observarem efeito antibacteriano e antifúngico em extrato alcoólico e em acetona de casca de feijoa, obtiveram resultados significativos relacionados à apoptose de células tumorais, caracterizando o extrato da casca da feijoa, em acetona, como agente antitumoral. Efeito antitumoral em extratos de feijoa também foi relatado por Bontempo et al (2007).

Os resultados supracitados permitem apontar a casca da feijoa, um subproduto industrial, e as folhas da feijoa, como ricas fontes de compostos bioativos.

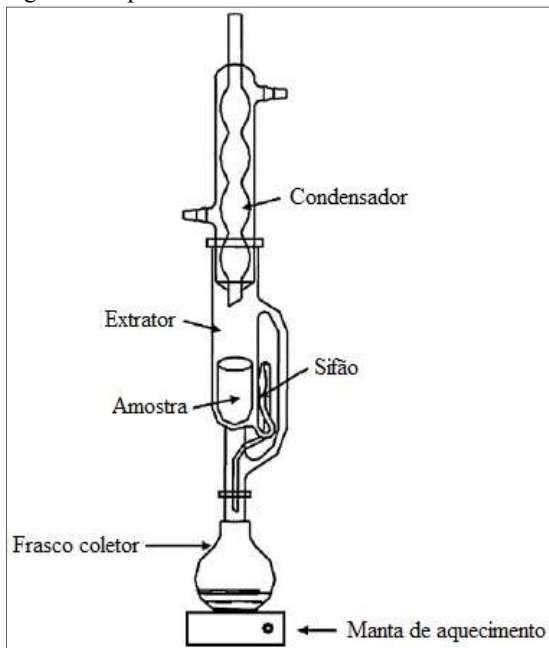
2.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Durante as últimas décadas, novas técnicas de extração de compostos bioativos de matrizes vegetais, também chamadas de técnicas não-convencionais, têm sido desenvolvidas com o intuito de romper as barreiras enfrentadas por técnicas convencionais, tais como Soxhlet e maceração: o longo tempo extração, a baixa seletividade e o elevado volume de solvente utilizado por extração. Dentre as mais promissoras, encontram-se as técnicas de Extração Assistida por Ultrassom (EAU), Extração Assistida por Micro-ondas (EAM), Extração com Líquido Pressurizado (ELP) e Extração Supercrítica (ESC). As técnicas ELP e ESC apresentam, como diferencial, o emprego de líquidos de alta difusão - líquidos de elevada pressão e temperatura - os quais possuem coeficientes de difusão superiores em comparação aos líquidos aplicados à temperatura e pressão ambientes e utilizados em técnicas convencionais, tais como Soxhlet e maceração. Com o uso de líquidos de alta difusão, a taxa de transferência de massa é aumentada, acelerando o processo de extração como um todo (AZMIR et al., 2013; TURNER; WALDEBÄCK, 2010).

2.4.1 Soxhlet

O método de extração por Soxhlet foi desenvolvido pelo químico alemão von Soxhlet, em 1879, com o intuito de se determinar a fração lipídica em leites (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). O aparato é composto por: um condensador, um extrator com sifão, um frasco coletor e uma manta de aquecimento, conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Aparato Soxhlet.



Fonte: adaptado de Luque de Castro; Priego-Capote (2010).

Basicamente, o processo se dá pela seguinte forma: a amostra seca é adicionada a um cartucho e acoplada ao extrator. O solvente, em quantidade pré-determinada, é inserido no frasco coletor e através do aquecimento promovido pela manta, entra em ebulição e ascende em direção ao condensador. Ao chegar ao condensador por onde circula um líquido a baixa temperatura, o vapor de solvente é condensado, e ao gotejar sobre o cartucho, extrai o composto de interesse. O sifão trabalha como um vaso comunicante, controlando o nível de solvente em contato com o cartucho. Quando o nível de solvente ultrapassa o nível máximo do sifão, solvente e amostra são direcionados para o frasco coletor e assim, o processo se reinicia (AZMIR et al., 2013; LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998; LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

A extração por Soxhlet foi o método convencional de extração mais utilizado por muitos anos. Este método possui vantagens como o baixo custo de aquisição do aparato, facilidade de operação, alta temperatura empregada - o que facilita o rompimento da ligação soluto-matriz - o elevado rendimento de extração e a supressão da etapa de

filtração, uma vez que a amostra não se encontra em contato direto com o solvente (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Em contrapartida, o que é tido como vantagem, em alguns casos, pode ser visto como desvantagem. Como a extração por Soxhlet demanda um longo tempo de operação, a alta temperatura empregada pode degradar compostos termolábeis de interesse. Além do mais, o uso de solventes orgânicos comumente aplicados, os quais, em muitos casos, estão associados a problemas de saúde e de meio ambiente, constituem uma desvantagem da técnica (BIMAKR et al., 2011; LOPRESTO et al., 2014; LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010)

Embora apresente desvantagens significativas, especialmente em se tratando de compostos antioxidantes termolábeis, o método de Soxhlet ainda é utilizado como método oficial em diversas metodologias (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010), e devido ao alto rendimento, resultante da baixa seletividade, aliado à simplicidade de operação, o método é utilizado como forma de comparação de rendimento e qualidade de extratos obtidos com métodos não-convencionais (GRIGONIS et al., 2005).

2.4.2 Extração Assistida por Ultrassom (EAU)

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2016), *Green chemistry* ou Química Verde, é o desenvolvimento de produtos e processos químicos que reduzem ou eliminam a geração de substâncias tóxicas. Dentre os 12 princípios contemplados pela Química Verde, destacam-se o aproveitamento de resíduos industriais, o uso de solventes com mínima ou até zero toxicidade para o ser humano e o meio ambiente, processos com baixa demanda energética, entre outros.

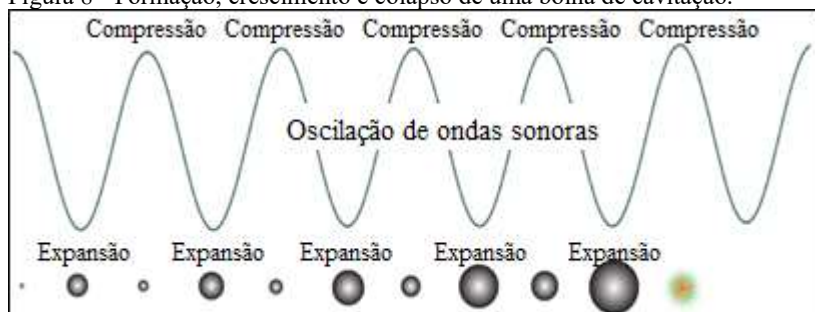
Os maiores desafios para as extrações convencionais são, além da baixa seletividade e a possibilidade de decomposição de compostos termolábeis, o longo tempo de extração e o uso de solventes nocivos ao homem e ao meio ambiente (AZMIR et al., 2013), características que também entram em desacordo com os princípios básicos da Química Verde.

A Extração Assistida por Ultrassom (EAU) é uma tecnologia emergente no ramo de extrações, sendo classificada como tecnologia não-convencional e buscando contemplar os princípios da Química Verde. Através da aplicação de ondas ultrassônicas, extrações completas são

realizadas em minutos, obtendo-se produtos com elevado grau de pureza, reduzindo o consumo energético (CHEMAT et al., 2017).

As ondas ultrassônicas ocorrem em frequências acima de 20 kHz (frequências superiores ao limiar acústico humano) e exibem todas as características e propriedades de ondas sonoras. Diferentes das ondas eletromagnéticas, as ondas sonoras dependem de um meio para se propagar. Quando em um meio líquido, as ondas ultrassônicas realizam ciclos sucessivos de compressão e expansão. Os ciclos de compressão exercem uma pressão positiva sobre as moléculas, pressionando-as umas contra as outras, enquanto que os ciclos de expansão exercem pressão negativa sobre as moléculas, afastando-as (WU et al., 2013). Esses ciclos de compressão e expansão formam bolhas de cavitação. As bolhas formadas crescem sucessivamente devido às variações de amplitude das ondas. Uma vez que a bolha atinge seu tamanho crítico, o mínimo de energia recebida resulta em um colapso instantâneo (Figura 8). Devido ao colapso, cada bolha pode gerar energia capaz de aumentar a temperatura e pressão local em 5000 K e 500 atm, respectivamente, seguida de um resfriamento repentino de aproximadamente 10^9 K/s (WU et al., 2013). De acordo com Chemat; Zill-E-Huma; Khan (2011), a pressão no momento de colapso das bolhas pode chegar a 2000 atm, em um banho ultrassônico operando à temperatura constante.

Figura 8 - Formação, crescimento e colapso de uma bolha de cavitação.

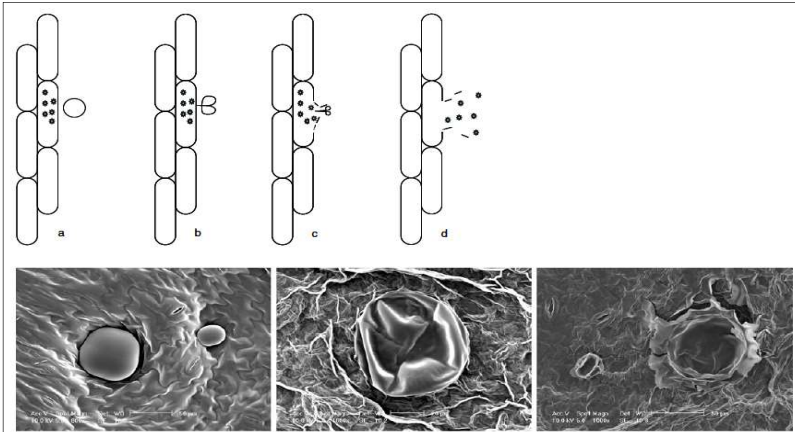


Fonte: adaptado de Leong; Ashokkumar; Sandra (2011).

Quando as bolhas entram em colapso próximo a superfícies sólidas, microjatos com alta pressão e temperatura são liberados e atingem a superfície do sólido a uma velocidade média de 400 km/h (LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003). Estes jatos são responsáveis pelo processo de limpeza de materiais em lavadoras ultrassônicas (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

A Figura 9 apresenta a formação de uma bolha de cavitação próxima a uma matriz vegetal (a); após ciclos sucessivos de compressão e expansão, a bolha entra em colapso (b), liberando microjatos que atingem a superfície da matriz vegetal (c), rompendo paredes celulares e, por fim, liberando os materiais de interesse (d).

Figura 9 - Colapso de uma bolha de cavitação e liberação do material vegetal. Exemplo de extração de óleo essencial de manjeriço.



Fonte: Chemat; Zill-E-Huma; Khan (2011).

A aplicação de ondas ultrassônicas pode se dar direta ou indiretamente à amostra (PICO, 2013). As lavadoras, também conhecidas como banhos, apresentam um baixo custo, facilidade de manuseio e como grande vantagem, podem realizar duas ou mais extrações simultaneamente. No entanto, por se tratar de um método indireto de extração, sua principal desvantagem reside na perda da energia ultrassônica na parede do recipiente onde a amostra está contida (LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003; TIWARI, 2015).

Em contrapartida, o método direto de extração não apresenta esse inconveniente, sendo o transdutor ultrassônico (dispositivo capaz de converter energia elétrica em ondas ultrassônicas) acoplado diretamente sobre a amostra através de uma sonda. A sonda pode fornecer potências até 100 vezes superiores às fornecidas por um banho, reduzindo-se o tempo de extração (PICO, 2013).

Embora as lavadoras sejam mais utilizadas, a sonda proporciona maior cavitação na solução. No entanto, o método direto de extração pode afetar a qualidade dos extratos provocando perda em compostos

termolábeis devido à intensa cavitação provocada. Portanto, não apenas a configuração de um equipamento é importante, mas fatores como potência ultrassônica, frequência, tempo, temperatura, solvente utilizado e razão soluto:solvente são de fundamental importância na qualidade final dos extratos (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012; TIWARI, 2015).

2.4.3 Extração Supercrítica (ESC)

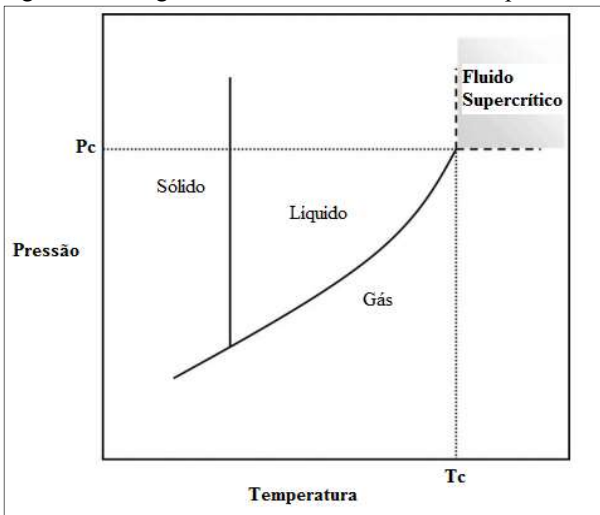
A Química Verde tem buscado desenvolver e otimizar processos de extração com baixa demanda energética e utilização de solventes atóxicos, garantindo produtos com alta qualidade e seguros ao consumidor. Nisto, a Extração Supercrítica (ESC) vem ganhando destaque como uma excelente alternativa frente aos métodos convencionais de extração (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

Em 1879, os pesquisadores James B. Hannay e James Hogarth publicaram um artigo intitulado *On the solubility of solid in gases* (Solubilidade de sólidos em gases), no qual eles identificaram a dissolução de compostos em fluidos supercríticos, abrindo caminho para um novo meio de solvatação. No entanto, somente por volta de 1960 que processos industriais com uso de fluidos supercríticos começaram a ser desenvolvidos (AZMIR et al., 2013; HERRERO et al., 2010). Com o passar dos anos, a extração supercrítica foi se consolidando em diversas áreas, tais como a área ambiental, farmacêutica, análise de polímeros e principalmente, na área de alimentos (LANG, 2001; ZOUGAGH; VALCÁRCEL; RÍOS, 2004).

Toda substância química apresenta três estados físicos, como se sabe: sólido, líquido e gasoso. O estado supercrítico é um estado distinto e somente pode ser alcançado se a substância for submetida a uma temperatura e pressão acima de seu ponto crítico. O ponto crítico é uma característica peculiar de cada substância química e é definido com base na relação entre sua temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c), temperatura e pressão na qual não existe mais distinção entre as fases líquida e gasosa (Figura 10). Fluidos com temperaturas e pressões acima da T_c e P_c , respectivamente, são chamados de fluidos supercríticos (AZMIR et al., 2013; MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996). No estado supercrítico, as propriedades de líquido e gás do fluido desaparecem, o que significa que um fluido supercrítico não pode ser liquefeito sem que se altere a temperatura e a pressão. Os fluidos supercríticos apresentam propriedades semelhantes às de gases (viscosidade, difusividade e tensão

superficial) e propriedades semelhantes às de líquido (densidade e poder de solvatação) (AZMIR et al., 2013; SIHVONEN, 1999). Outra característica importante de um fluido no estado supercrítico é que seu poder de solvatação pode ser controlado através de pequenas mudanças, tanto na temperatura quanto na pressão, uma vez que, a partir do ponto crítico, pequenas alterações desses parâmetros provocam grandes mudanças na densidade do solvente, característica essa, fundamental no poder de solvatação de compostos. Alta densidade, em geral, significa alta solubilidade e baixa seletividade (OLIVEIRA, 2015).

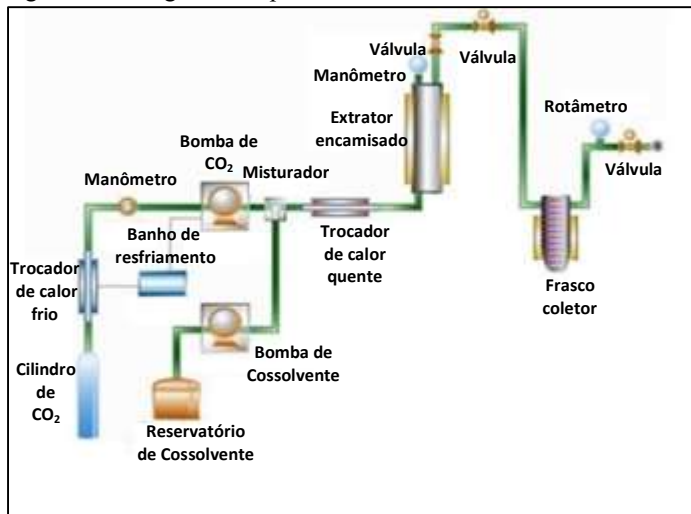
Figura 10 - Diagrama de fases de uma substância pura.



Fonte: Herrero; Cifuentes; Ibañez (2006).

O processo de extração supercrítica consiste basicamente em duas etapas: extração de um composto de interesse através de um solvente supercrítico apropriado e separação da mistura do composto de interesse e do solvente supercrítico através de expansão isotérmica (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Este processo básico de extração supercrítica é apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Diagrama simplificado de ESC.



Fonte: adaptado de Oliveira, 2015.

Como se observa na Figura 11, ao sair do cilindro, o CO_2 é resfriado, a fim de garantir que o mesmo se encontre no estado líquido antes de adentrar à bomba e ser pressurizado. Ao sair da bomba a uma pressão acima de 73,8 bar, o CO_2 é aquecido acima de 31,04 °C, atingindo desta forma, o estado supercrítico. Em seguida, o CO_2 supercrítico flui através de um leito fixo de partículas sólidas contidas em um extrator encamisado e dissolve os compostos de interesse contidos no sólido, tendo início, a etapa de extração propriamente dita. Por fim, o fluido supercrítico, ao chegar ao frasco coletor, é despressurizado, separando-se totalmente do extrato. O fluxo de extração pode se dar de forma ascendente ou descendente. A forma, as dimensões e as propriedades físicas do extrator são algumas das variáveis do processo (BRUNNER, 1994).

Diversos fluidos podem ser utilizados como solventes supercríticos devido às suas boas propriedades de solvatação. Alguns desses fluidos estão listados na Tabela 2. Todavia, como a extração supercrítica surge como representante da Química Verde e uma alternativa aos processos convencionais de extração, alguns solventes, por mais que resultem em altos rendimentos de extrato, devem ser evitados por razões de segurança, tanto para o manipulador quanto para o meio ambiente, de forma geral (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

Tabela 2 - Temperatura e pressão críticas de alguns fluidos.

Fluido	Tc (°C)	Pc (bar)
Nitrogênio	-147,00	33,93
Metano	-82,49	46,41
Etano	32,25	48,84
Etileno	9,21	50,31
Propano	96,85	42,56
Amônia	132,40	113,00
Metanol	79,90	240,20
Água	221,00	363,80
Dióxido de carbono	31,04	73,80

Fonte: Maul; Wasicky; Bacchi (1996).

O dióxido de carbono (CO₂) é o solvente mais utilizado, em se tratando de extração supercrítica, por alguns motivos fundamentais: baixo custo sob alta pureza; sua temperatura crítica é baixa (31,04 °C), preservando as propriedades de compostos termolábeis no momento da extração; apresenta pressão crítica de 73,8 bar, pressão facilmente atingida em nível industrial; separação completa do extrato por simples redução de pressão; inerte, atóxico e comumente utilizado na gaseificação de bebidas; polaridade semelhante à do pentano e do hexano, solventes apolares comumente utilizados em extrações convencionais; os parâmetros de extração com o CO₂ supercrítico podem ser facilmente alterados, através de mudanças na temperatura e pressão, ou até na adição de um cossolvente polar como a água ou o etanol. Tais opções adicionam flexibilidade e permitem a adequação do processo ao extrato que se almeja obter (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996).

Como desvantagem da ESC, tem-se o elevado custo dos equipamentos, ou seja, produtos com baixo valor agregado e baixo rendimento podem tornar a ESC uma alternativa economicamente inviável. A baixa polaridade do CO₂ pode ser outro impasse da técnica, visto que este solvente é seletivo para compostos apolares (MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996)

2.4.3.1 Uso de cossolventes

Alguns fatores exercem influência significativa no processo de extração, como é o caso da temperatura, da pressão, do tamanho da partícula e do pré-tratamento da amostra. Contudo, a solubilidade de um soluto em um solvente supercrítico depende fundamentalmente das

corretas relações entre temperatura e pressão. Estes parâmetros são, de fato, responsáveis diretos pela qualidade e funcionalidade do extrato (AKANDA et al., 2012). Em geral, sob altas temperaturas, o poder de solvatação do CO₂ se eleva devido ao aumento da pressão de vapor do soluto. Altas pressões também aumentam o poder de solvatação do CO₂ devido a seu aumento de densidade. Todavia, por apresentar baixa polaridade, o CO₂ é pouco solúvel em compostos polares, mesmo sob elevadas temperaturas e pressões. Neste caso, a utilização de cossolventes, solventes de caráter polar que atuam em conjunto com o CO₂, pode se tornar uma alternativa viável (HERRERO; CIFUENTES; IBÁÑEZ, 2006; PEREIRA; MEIRELES, 2010).

A presença de cossolventes eleva a densidade do solvente e altera de estrutura da matriz vegetal, rompendo as interações polares entre essa matriz e o soluto, melhorando a performance da extração, tanto em termos de rendimento quanto em termos de seletividade - quando se almeja obter solutos de elevada polaridade - o que justifica a aplicação de cossolventes na ESC (DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Álcoois, por serem polares, compreendem o principal grupo de compostos utilizados como cossolventes. O metanol é muito utilizado como cossolvente em diversas matrizes vegetais, contudo, sua elevada toxicidade restringe seu uso (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Apesar de resultar em elevados rendimentos de extrato final, o uso de metanol tem sido preterido nos últimos anos, especialmente quando o produto final destina-se a empresas do ramo alimentício, cosmético e farmacológico (MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014)

Etanol tem sido utilizado em substituição ao metanol. O etanol é um solvente com baixa toxicidade, sendo reconhecido, assim como o CO₂, como um solvente GRAS (sigla em inglês para *Generally Recognized As Safe* – Geralmente Reconhecido como Seguro) (LANG; WAI, 2001). De acordo com Melo; Silvestre; Silva (2014), o uso de etanol como cossolvente em extrações de matrizes vegetais corresponde a mais de 50% das publicações nas áreas de extração supercrítica (Figura 12).

Outra alternativa frente aos solventes orgânicos tradicionalmente utilizados é a água. Seu alto índice de polaridade justifica sua preferência em extrações de compostos altamente polares. Outro ponto positivo baseia-se no fato de a água, assim como o CO₂ e o etanol, ser um solvente atóxico, enquadrando-se na classe de solventes GRAS. Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos fazendo-se uso da água como cossolvente em extração supercrítica de matrizes vegetais.

Da Porto, Decorti; Natolino (2014), ao avaliarem o rendimento global de proantocianidinas no extrato de bagaço de uva, obtiveram valor

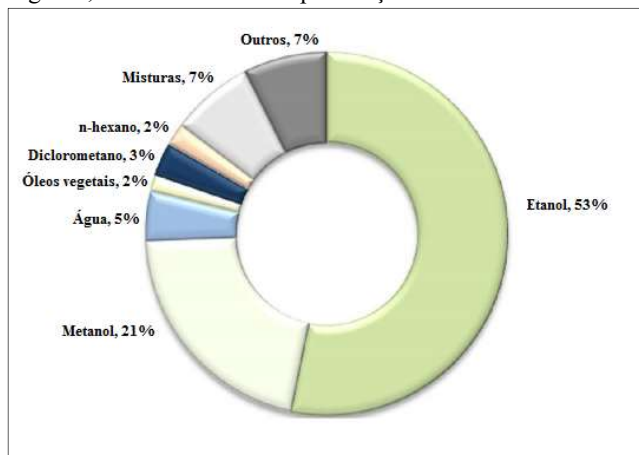
superior utilizando água como cossolvente, em comparação ao metanol e ao etanol, nas mesmas concentrações.

Água também foi utilizada como cossolvente na remoção de caféina em folhas de chá verde (*Camellia sinensis*), obtendo-se elevado rendimento no trabalho desenvolvido por Park et al (2007). Resultado semelhante foi observado por Casas et al (2007), na extração de compostos bioativos de girassol, onde os autores obtiveram melhores rendimentos a 500 bar, 50 °C e 5% de água como cossolvente.

Não obstante às vantagens do uso de água como cossolvente, alguns autores como Nossack et al (2000) e Pereira et al (2003) tiveram problemas com este solvente ao extrair alcaloides de tremoço (*Lupinus spp.*) e jasmim-catavento (*Tabernaemontana catharinensis*), respectivamente. Em ambos os casos, houve formação de espuma. Sob pressão de 250 bar e 45 °C, devido ao equilíbrio de fases do sistema CO₂:água, ocorre formação de duas fases, uma rica em CO₂ e a outra rica em água. Interações específicas (hidrogênio, dipolo - dipolo, dipolo induzido - dipolo, dipolo induzido - dipolo induzido) entre o solvente e um ou mais solutos do extrato também podem existir, influenciando a solubilização destes solutos no fluido supercrítico e/ou fracionando-o no cossolvente (PEREIRA et al., 2003).

A Figura 12 apresenta os principais cossolventes utilizados em ESC de matrizes vegetais, de acordo com 166 publicações até o ano de 2014.

Figura 12 - Principais cossolventes em extrações supercríticas de matrizes vegetais, de acordo com 166 publicações encontradas na base de dados.



Fonte: Melo; Silvestre; Silva (2014).

Observa-se, através da Figura 12, que a gama de cossolventes utilizados em processos de extração é grande, ainda que o etanol corresponda a mais de 50% das publicações na área.

2.4.3.2 Curva Global de Extração (CGE)

O transporte de substâncias pode ocorrer tanto dentro de uma matriz sólida quanto através de sua superfície. De acordo com Brunner (1994), este processo compreende alguns passos: 1) a matriz vegetal absorve o solvente supercrítico, inchando as estruturas celulares e, concomitantemente, diminuindo a resistência à transferência de massa; 2) os compostos são dissolvidos no solvente presente no interior das células; 3) através do processo de difusão, os compostos são transportados para fora das células; 4) ao sair das células, a mistura entre compostos e solvente é direcionada para a superfície da matriz vegetal onde, por fim, será completamente extraída pelo solvente através do processo de convecção. Entretanto, matrizes vegetais possuem diferentes estruturas celulares e composições físico-químicas. Até mesmo matrizes da mesma espécie podem ser diferentes devido a fatores como períodos de colheita, tratamento pós-colheita e idade (BRUNNER, 1994). No tratamento prévio à extração supercrítica, fatores como umidade da amostra e tamanho de partícula são fundamentais no que tange ao processo de transferência de massa (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

A curva global de extração (CGE) é obtida através da relação entre quantidade acumulada de extrato, em função do tempo total de extração ou em função da quantidade de solvente utilizada. Devido aos diversos fatores que podem influenciar uma extração supercrítica, a comparação de CGE's de diferentes matrizes vegetais e diferentes extratores deve ser evitada. Todavia, a CGE fornece informações fundamentais acerca dos fenômenos de transferência de massa relativos à matriz vegetal em estudo, possibilitando comparações de diversos ensaios desta mesma matéria-prima realizadas no mesmo equipamento (BRUNNER, 1994).

De acordo com a literatura (FERREIRA; MEIRELES, 2002; JESUS et al., 2013; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; PEREIRA; MEIRELES, 2010; SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016), as CGE's são divididas em três etapas, etapas CER, FER e DC, as quais são controladas por diferentes mecanismos de transferência de massa:

a) Taxa de extração constante (CER – *Constant Extraction Rate*): etapa onde a superfície externa da partícula é coberta pelo extrato, o qual é facilmente extraído pelo solvente, atingindo sua concentração

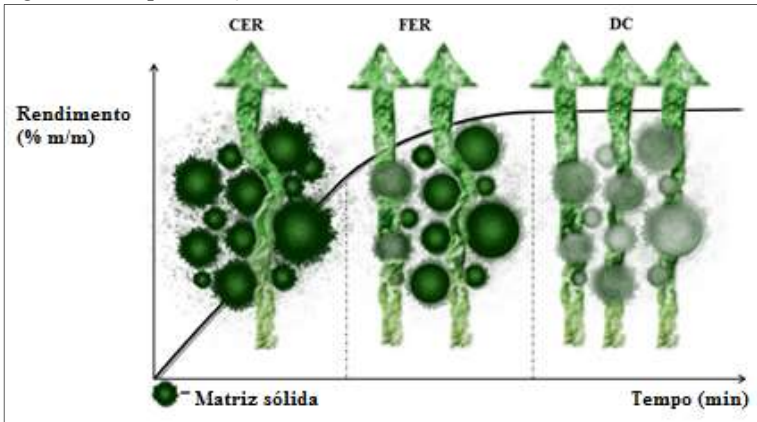
máxima na saturação (solubilidade de equilíbrio). Segundo Pereira; Meireles (2010), 50 a 90% do extrato pode ser obtido nesta etapa. Portanto, em muitos casos, a extração é finalizada logo após a etapa CER, exceto nos casos onde um composto de interesse apresenta baixa solubilidade no solvente ou se localiza em uma estrutura celular de difícil acesso por parte do solvente;

b) Taxa de extração decrescente (FER – *Falling Extraction Rate*): etapa na qual a disponibilidade do extrato localizado na superfície da partícula diminui. Concomitantemente, inicia-se o processo de transferência de massa por difusão;

c) Taxa de difusão controlada (DC – *Diffusion Controlled*): etapa final de extração, onde a transferência de massa por difusão é preponderante, ocorrendo desde o interior das partículas.

Um melhor entendimento da CGE, bem como suas três etapas e seus respectivos fenômenos de transferência de massa, pode ser mais bem elucidado através da visualização da Figura 13.

Figura 13 - Representação da CGE.



Fonte: adaptado de Silva; Rocha-Santos; Duarte (2016).

Nota-se que na etapa CER, a matriz sólida apresenta uma grande quantidade de soluto de fácil acesso localizado na superfície das partículas, facilitando a solubilização do mesmo por parte do solvente. A etapa seguinte, FER, caracteriza-se por uma diminuição na quantidade de soluto de fácil acesso. Por fim, na etapa DC, o soluto de fácil acesso praticamente inexistente, e então, processos difusivos passam a governar a transferência de massa.

2.4.4 Extração com Líquido Pressurizado (ELP)

Com o intuito de aprimorar processos de extração e atender preceitos da Química Verde, fazendo-se baixo uso de solventes orgânicos em extrações que demandam poucos minutos, tem-se a Extração com Líquido Pressurizado (ELP), do inglês *Pressurized Liquid Extraction* (PLE). Esta tecnologia foi apresentada pela Dionex Corporation na Conferência de Pittsburgh (Pittcon), em 1995, com o nome de *Accelerated Solvent Extraction Technology* (ASE®), em português, Tecnologia de Extração Acelerada com Solvente (MUSTAFA; TURNER, 2011). Atualmente, esta técnica possui outras denominações como *Pressurized Fluid Extraction* (PFE) ou *Enhanced Solvent Extraction* (ESE) (CAMEL, 2001).

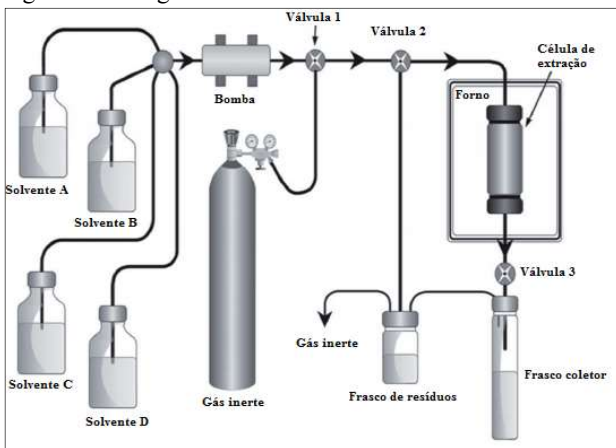
A ELP é uma técnica que utiliza os princípios básicos das extrações com solventes orgânicos semelhante à técnica de Soxhlet. Todavia, diferente dos métodos convencionais, o solvente utilizado na extração é pressurizado, permitindo seu uso em altas temperaturas e ainda assim, mantendo-o no estado líquido (BULDINI; RICCI; SHARMA, 2002; CAMEL, 2001; TURNER; WALDEBÄCK, 2010).

Há duas razões fundamentais pelas quais o uso de solventes em altas temperaturas e pressões elevam o rendimento das extrações, em comparação com os mesmos solventes à temperatura e pressão ambientes: o potencial aumento na solubilidade e na transferência de massa e o rompimento da superfície de equilíbrio (CHEOK et al., 2013). O uso de altas temperaturas aumenta a capacidade do solvente em solubilizar compostos de interesse, além de aumentar as taxas de difusão. O aumento da temperatura também pode romper a forte interação entre soluto e matriz causada pelas forças de van der Waals, pontes de hidrogênio e atrações entre moléculas do soluto e sítios ativos da matriz. A energia térmica pode inibir as interações de coesão (soluto-soluto) e adesão (soluto-matriz) através da diminuição da energia de ativação necessária para o processo de desorção. O aumento da temperatura também provoca diminuição na viscosidade do solvente, possibilitando uma maior penetração do líquido na matriz. As altas pressões aplicadas têm como função, não apenas a manutenção do solvente no estado líquido em temperaturas acima de seu ponto de ebulição, mas também atuam pressionando o solvente para dentro da matriz (absorção), proporcionando um maior contato com o soluto (CAMEL, 2001; RICHTER et al., 1996). Uma ampla faixa de temperatura e pressão pode ser utilizada em um sistema ELP. Temperaturas podem variar de 25 a 200

°C e pressões podem partir de 35 bar e chegar a 200 bar (MUSTAFA; TURNER, 2011).

Há basicamente duas configurações de operação para sistemas ELP: configuração dinâmica e configuração estática. Na configuração dinâmica, o solvente é bombeado para a célula de extração e o produto é continuamente recolhido no frasco. Na configuração estática, o processo de extração consiste de um a vários ciclos de extração, com renovação do solvente a cada ciclo (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005; MUSTAFA; TURNER, 2011). A Figura 14 apresenta um sistema ELP tradicional.

Figura 14 - Diagrama de ELP.



Fonte: Turner; Waldebäck (2010).

Basicamente, o solvente é pressurizado e adentra a célula de extração, onde a matriz sólida está contida. A célula pode estar inserida em um forno ou então ser encamisada, possibilitando o aquecimento do solvente à temperatura desejada. Ao fim do ciclo, o processo de despressurização libera o solvente juntamente com o soluto em um frasco coletor. Por fim, um gás inerte é injetado sobre a matriz, a fim de eliminar os resíduos de solvente e soluto que ainda possam estar aderidos à superfície, os quais serão coletados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir, serão apresentados o material utilizado em todas as etapas experimentais do trabalho, bem como os métodos empregados.

3.1 CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

As cascas de feijoa foram gentilmente cedidas pela Cooperativa Agrícola de São Joaquim – SANJO, localizada na cidade de São Joaquim-SC. As cascas são subprodutos da industrialização de suco misto de maçã e feijoa e, em decorrência da safra da feijoa, o suco é produzido apenas no período de abril a julho. A safra utilizada no presente trabalho foi relativa ao ano de 2016.

Após a sanitização inicial dos frutos realizada na própria empresa, eles foram manualmente cortados em sessão transversal, onde então, a casca e a polpa foram separadas. A casca foi armazenada em sacos plásticos escuros para evitar o contato com a luz. Os mesmos foram selados e acondicionados em câmara de congelamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento das análises.

As folhas de feijoa foram gentilmente cedidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI, localizada na cidade de São Joaquim, no segundo semestre de 2016. Inicialmente, a sujidade foi removida, procedendo-se então à imediata secagem das folhas.

3.1.1 Teor de umidade e substâncias voláteis

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

Pesaram-se cerca de 5g de amostra (casca ou folha de feijoa) 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 (E.L. 003, Odontobrás, Ribeirão Preto, Brasil) a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 horas. Após este período, o cadinho foi resfriado em dessecador e pesado. Em seguida, repetiu-se a etapa de aquecimento, seguida de resfriamento e peso, de hora em hora, até observação de peso constante. Para o cálculo do teor de umidade e substâncias voláteis, em base úmida, empregou-se a Equação 1.

$$\% \text{ Umidade} = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

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 média e respectivo desvio padrão.

3.1.2 Secagem e moagem

As cascas foram descongeladas, dispostas em bandejas e secas em estufa com circulação forçada de ar (De Leo, Porto Alegre, Brasil) (Figura 15), a 55 °C por 24 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.

As folhas de feijoa foram secas à temperatura de 50 °C por 10 h. Em seguida, as amostras foram fragmentadas em moinho de facas, acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas em freezer doméstico a -18 °C.

Figura 15 - Secagem da casca de feijoa.



Fonte: o próprio autor.

O procedimento experimental para determinação do diâmetro médio das partículas se deu através da inserção de 100 g da matéria-prima devidamente seca e moída, pesada em balança de 0,01 g de precisão (BG

2000, Gehaka Ind. E Com. De Eletro-eletrônicos Ltda., São Paulo, Brasil), em jogo de peneiras série Tyler, com mesh variando de -16/+80, sendo o conjunto de peneiras agitado por 30 minutos. Com as frações retidas em cada peneira, calculou-se o diâmetro médio das partículas através das Equações 2 e 3 (GOMIDE, 1983).

$$\bar{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta l_i}{d_i}}{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta l_i}{d_i^2}}} \quad (2)$$

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{m_t} \quad (3)$$

Onde, \bar{d}_s é o diâmetro médio das partículas (mm), m_i é a massa de amostra retida na peneira i (g), m_t é a massa total de amostra (g), d_i é o diâmetro da peneira i (mm) e n é o número de frações.

3.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os métodos de extração utilizados no presente trabalho englobam técnicas conduzidas a baixa pressão (pressão atmosférica) e técnicas conduzidas a alta pressão (pressões iguais e superiores a 100 bar).

3.2.1 Métodos de extração a baixa pressão

3.2.1.1 Soxhlet

A obtenção de extratos da casca e folha de feijoa pelo método Soxhlet se deu de acordo com a metodologia 032/IV do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), adaptada. Inicialmente, pesaram-se 5 g de amostra diretamente em cartucho de papel filme, o qual foi inserido em extrator Soxhlet. Em seguida, 150 ml de solvente foram adicionados a um balão de fundo chato, procedendo-se à ligação de manta de aquecimento na temperatura de ebulição do solvente, conforme a Figura 16. O tempo total de análise foi de 6 h contadas a partir do início do gotejamento.

Figura 16 - Aparato Soxhlet em operação.



Fonte: o próprio autor.

Os solventes utilizados no presente trabalho foram etanol (99,8%, Neon, São Paulo, Brasil), água e a mistura etanol-água (50:50 v/v). Através de literatura e testes preliminares, observou-se que tanto a casca quanto a folha da feijoa apresentam baixa solubilidade em solventes apolares. Com isso, optou-se por utilizar apenas solventes de média e alta polaridade. Outrossim, os solventes utilizados no presente trabalho são classificados como solventes GRAS.

3.2.1.2 Extração Assistida por Ultrassom (EAU)

A técnica de Extração Assistida por Ultrassom (EAU) 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 v/v]), mantendo a razão amostra – solvente em 1:30 (m/v). Em seguida, a amostra foi inserida em um equipamento ultrassônico (Ultronique QR 500, Ecosonics, Indaiatuba, Brasil). Uma sonda de titânio de 4 mm de diâmetro foi introduzida na amostra, a 5 mm da superfície, como meio de transmissão de ondas a 20 kHz de frequência.

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, o béquer contendo a amostra foi continuamente resfriado com água, buscando manter a temperatura interna controlada durante o experimento. Os parâmetros utilizados no presente trabalho foram definidos de acordo com a literatura e recomendações do fabricante do equipamento: 250 W de potência (DENT et al., 2015; HORŽIĆ et al., 2012; LEE et al., 2013), tempo de 10 min (ALBU et al., 2004; ZLABUR et al., 2015) e micropona (recomendação do fabricante).

O equipamento utilizado no presente trabalho pode ser visualizado através da Figura 17.

Figura 17 - Equipamento de EAU (LATESC/UFSC).



Fonte: Lasta (2017).

3.2.2 Métodos de extração a alta pressão

3.2.2.1 Extração Supercrítica (ESC)

Os experimentos de extração supercrítica foram realizados na unidade de extração localizada no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A unidade de extração opera em pressões de até 300

bar e vazões de solvente de até $2,2 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$. A Figura 18 apresenta a unidade de extração supercrítica utilizada no presente trabalho e a Figura 19 apresenta o diagrama da unidade, contemplando os equipamentos que a compõem, bem como o fluxo de extração. A lista completa de informações dos componentes da unidade encontra-se na Tabela 3.

O equipamento de extração supercrítica utilizado no presente trabalho foi desenvolvido pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik* da *Technische Universität Hamburg-Harburg* (Hamburgo, Alemanha). Maiores detalhes acerca dos princípios de elaboração e de construção desta unidade de extração podem ser obtidos através do trabalho de Zetzl; Brunner; Meireles (2003).

Figura 18 - Unidade de ESC (LATESC/UFSC).

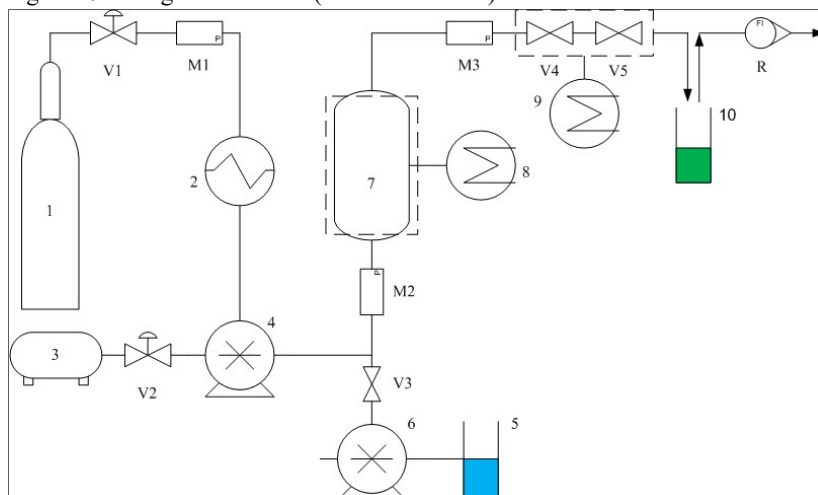


Fonte: o próprio autor.

Através do diagrama da unidade de extração supercrítica utilizada no presente trabalho, é possível visualizar cada etapa de operação durante

o processo de extração. Inicialmente, CO_2 adentra o sistema, tendo seu controle de fluxo realizado pela válvula do cilindro (V1), e então segue para o banho termostático frio (-5°C) (2) contendo etilenoglicol, garantindo que o CO_2 adentre na bomba no estado líquido (4), evitando possíveis danos causados por cavitação. A bomba de CO_2 é alimentada por um fluxo de ar comprimido (3) à pressão de 1 bar, e através de controle realizado pela válvula de frequência (V2), pressuriza o CO_2 até a pressão desejada. Ao sair da bomba, o CO_2 pressurizado entra em contato com o fluxo de cossolvente oriundo da bomba de HPLC (6) e ambos, de forma ascendente, adentram a célula de extração encamisada (7). A célula é mantida à temperatura de extração através de circulação externa de água controlada por um banho termostático (8). Ao sair da célula, o CO_2 no estado supercrítico passa pelo processo de depressurização, o qual é controlado pelas válvulas micrométrica (V4) e macrométrica (V5), ambas imersas em um banho termostático quente (9) operando à temperatura de 60°C , evitando o congelamento do CO_2 ao expandir-se. Por fim, o CO_2 segue para o frasco coletor (10), onde, após depressurização, extrato e CO_2 são separados por diferença de densidade: o extrato é coletado no frasco âmbar e o CO_2 segue para o rotâmetro (R), com o intuito de se controlar a vazão de saída do solvente.

Figura 19 - Diagrama de ESC (LATESC/UFSC).



Fonte: o próprio autor.

A pressão do sistema é controlada por 3 manômetros: o primeiro manômetro (M1), instalado logo após a válvula do cilindro, permitindo o controle da pressão de entrada na linha; o segundo manômetro (M2), localizado antes da célula de extração, garantindo que solvente e cossolvente adentrem à célula na pressão desejada; o terceiro manômetro (M3), acoplado imediatamente após a célula de extração, onde a pressão indicada deve coincidir com a pressão observada no manômetro M2.

Todo o sistema é conectado através de uma tubulação de aço-inox de 1/4".

Tabela 3 - Lista de componentes da unidade de ESC (LATESC/UFSC).

Código	Equipamento	Modelo
1	Cilindro de CO ₂ (99,9% de pureza, com tubo pescador	White Martins Ltda., Joinville, Brasil
2	Banho termostático frio	C10 – K10, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemanha
3	Linha de ar comprimido	
4	Bomba de CO ₂ (multiplicador de pressão hidropneumático)	M111, Maximator, Nordhausen, Alemanha
6	Bomba de HPLC para cossolvente	515, Waters, Milford, EUA
7	Extrator cilíndrico de aço inox (comprimento de 31,6 cm, diâmetro de 2,012 cm e volume de 103,3 mL) encamisado	
8	Banho termostático do extrator	DC30 – B3, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemanha
9	Banho termostático das válvulas	
V1	Válvula do cilindro	P1: Cat 233.50.10, Wika do Brasil, Iperó, Brasil.
V2	Válvula do ar comprimido	P1: Cat 233.50.10, Wika do Brasil, Iperó, Brasil.
M1	Manômetro do cilindro de CO ₂	P1: Cat 233.50.10, Wika do Brasil, Iperó, Brasil.
M2	Manômetro de entrada no extrator	P1: Cat 233.50.10, Wika do Brasil, Iperó, Brasil.
M3	Manômetro de saída do extrator	P1: Cat 233.50.10, Wika do Brasil, Iperó, Brasil.
V4	Válvula macrométrica	10-11NFA-V, HIP, Erie, EUA.
V5	Válvula micrométrica	10-11NFA, HIP, Erie, EUA.
R	Rotâmetro	10A61ABB, Automation products

3.2.2.1.1 Cinética de extração

A cinética de extração supercrítica é um experimento que visa elucidar as diferentes etapas do processo de extração da matéria-prima em estudo, as quais são diretamente relacionadas à massa de extrato acumulada em função do tempo do experimento.

Primeiramente, frascos âmbar de 30 mL foram pesados e selecionados para a coleta das amostras periodicamente. O tempo em que cada frasco âmbar era trocado obedeceu o seguinte planejamento: a cada 5 minutos, nos primeiros 30 minutos de extração; a cada 10 minutos, a partir do minuto 30 ao minuto 120; a cada 30 minutos, a partir do minuto 120 até estabilização da etapa difusional. As amostras secas e trituradas foram pesadas em balança analítica e uma massa de 15 g foi utilizada na cinética. O preenchimento do leito foi realizado na seguinte ordem ascendente: algodão, esferas de vidro de 3 mm como meio inerte, algodão, amostra e algodão. Utilizou-se pressão de 100 bar e temperatura de 40 °C. Essas condições foram tomadas pelo fato de compreenderem baixas condições de temperatura e pressão, com base nas limitações do equipamento, mas condições superiores às propriedades críticas do CO₂, garantindo sua manutenção no estado supercrítico. Ao utilizar nos ensaios o tempo de estabelecimento da etapa difusional observado em uma cinética a 100 bar e 40 °C, subentende-se que a mesma etapa será alcançada nos ensaios, onde as pressões e temperaturas são superiores, e conseqüentemente, densidade do solvente e pressão de vapor do soluto são mais elevadas, em um tempo igual ou inferior ao observado na cinética. A vazão de CO₂ utilizada foi de 0,5 kg.h⁻¹. Após a coleta das amostras, os frascos âmbar foram novamente pesados a fim de se obter a massa acumulada de extrato (g) *versus* o tempo de extração (min) para, por fim, construir a CGE.

Uma vez que a CGE foi obtida, o modelo de Regressão Linear por Partes foi ajustado aos dados experimentais com uso do software Origin Pro 2015 (OriginLab, Northampton, EUA). Três ajustes lineares foram aplicados, considerando dois pontos de quebra propostos pelo modelo. As três retas apresentadas pelo modelo representam as três etapas da CGE: CER, FER e difusional (DC). Os ajustes respectivos às três etapas de extração são apresentados através das Equações 4-6.

Para $t \leq t_{\text{CER}}$ (etapa CER)

$$y = a_1 + k_1 t \quad (4)$$

Para $t_{CER} \leq t \leq t_{FER}$ (etapa FER)

$$y = a_1 + k_1 t_{CER} + k_2 (t - t_{CER}) \quad (5)$$

Para $t \geq t_{FER}$ (etapa DC)

$$y = a_1 + k_1 t_{CER} + k_2 (t_{FER} - t_{CER}) + k_3 (t - t_{FER}) \quad (6)$$

Onde: y é a massa acumulada e t é o tempo; a_1 é o coeficiente linear da reta na etapa CER; k_1 , k_2 e k_3 são os coeficientes angulares das retas das etapas CER, FER e DC, respectivamente; t_{CER} é o ponto relativo à primeira quebra, ou seja, o tempo em que se encerra a etapa CER e se inicia a etapa FER; t_{FER} é o ponto relativo à segunda quebra, ou seja, o tempo em que se encerra a etapa FER e se inicia a etapa DC.

A cinética de extração supercrítica foi realizada apenas com a amostra de casca de feijoa.

3.2.2.1.2 Extrações com uso de cossolvente

O cossolvente utilizado na ESC da casca de feijoa foi o etanol. Este solvente foi escolhido por se tratar de um solvente polar, ambientalmente seguro (*GRAS*), tradicionalmente aplicado em processos na indústria de alimentos e comumente utilizado como cossolvente em extrações de compostos polares (CASAS et al., 2007; MURGA et al., 2000).

Antes de se iniciarem as extrações, uma cinética prévia, com intervalos de 30 minutos, foi realizada, a fim de se determinar o tempo necessário para estabelecimento da etapa difusional e, concomitantemente, o tempo mínimo de extração. As extrações para a casca da feijoa seguiram um planejamento experimental fatorial 2^2 , perfazendo 4 corridas experimentais. As pressões utilizadas foram de 200 e 300 bar, as temperaturas de extração foram de 40 e 55 °C, a vazão de solvente foi mantida em 0,5 kg.h⁻¹ e a concentração de cossolvente foi de 5%. Utilizando-se as condições de pressão e temperatura que apresentaram os mais elevados resultados, em termos de rendimento global e teor de compostos fenólicos totais, realizaram-se extrações com 10 e 15% de cossolvente, a fim de se avaliar não apenas o rendimento, mas a seletividade do extrato.

A condição de pressão e temperatura, a qual apresentou os mais elevados resultados, em termos de rendimento global e teor de compostos fenólicos totais, observados para as extrações com a casca da feijoa, foi

aplicada para a obtenção de extrato da folha da feijoa, com 15% de cossolvente. O cossolvente utilizado foi a mistura etanol-água (50:50 v/v).

3.2.2.2 Extração com Líquido Pressurizado (ELP)

Os ensaios de Extração com Líquido Pressurizado (ELP) da casca e folha da feijoa foram realizados em uma unidade de extração desenvolvida no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica da Universidade Federal de Santa Catarina (LATESC/UFSC), conforme apresentada na Figura 20.

Figura 20 - Unidade de ELP (LATESC/UFSC).

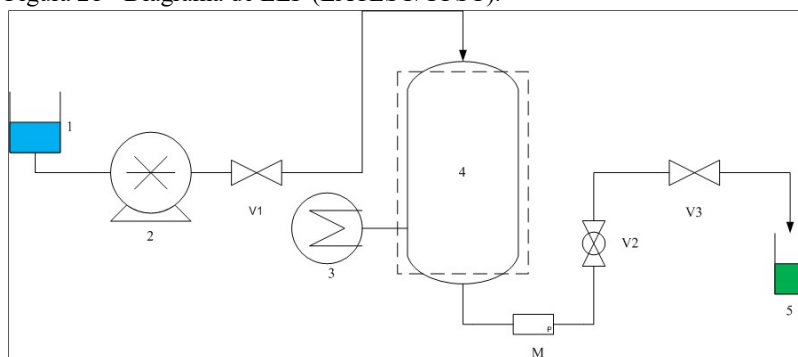


Fonte: Lasta (2017).

O diagrama da unidade customizada pode ser observada através da Figura 21.

A unidade é composta de: reservatório de solvente (1), bomba de HPLC (2), válvula micrométrica de entrada (V1), banho termostático de aquecimento (3), célula de extração encamisada (4), manômetro (M), válvula *back pressure* (V2), válvula micrométrica de saída (V3) e frasco coletor (5).

Figura 21 - Diagrama de ELP (LATESC/UFSC).



Fonte: o próprio autor.

Inicialmente, as válvulas V2 e V3 foram mantidas fechadas e o solvente foi enviado à célula de extração encamisada em fluxo descendente. A célula de extração foi mantida à temperatura definida para o ensaio por um banho termostático operando com água. Internamente, a amostra foi depositada na célula de extração e o leito final apresentou-se da seguinte forma, em modo descendente: algodão, mistura de amostra e esferas de vidro de 3 mm e algodão. Ao atingir-se a pressão almejada, procedeu-se à abertura das válvulas V2 e V3, iniciando assim, a contagem do tempo de extração, caracterizando-se o regime dinâmico.

No regime estático de extração, ao atingir-se a pressão almejada, o fornecimento de solvente pela bomba foi paralisado enquanto as válvulas V2 e V3 permaneceram fechadas. Após estabelecido o tempo total de extração, as válvulas V2 e V3 foram então abertas.

Ao final de cada extração, o extrato residual presente no leito e na linha foi recolhido no frasco âmbar por injeção de ar comprimido.

3.2.2.2.1 Cinéticas de extração

Previamente, duas cinéticas de extração foram realizadas com a casca da feijoa, utilizando-se 3 g de amostra, mantendo-se temperatura e pressão constantes, 40 °C e 100 bar, respectivamente e aplicando-se etanol como solvente. Esta condição foi adotada por apresentar a menor pressão de vapor do solvente dentre as demais condições do processo (40, 55 e 80 °C). Duas vazões foram testadas, 1 e 3 mL.min⁻¹, com o intuito de avaliar a influência deste parâmetro no rendimento global de extração da casca da feijoa.

Para a cinética da folha da feijoa, as mesmas condições de massa de amostra, temperatura, pressão e solvente aplicadas para a casca foram utilizadas. Todavia, apenas a vazão de 3 mL.min⁻¹ foi considerada, devido aos resultados prévios observados para a casca.

Uma vez que as curvas foram obtidas, o modelo de Regressão Linear por Partes foi ajustado aos dados experimentais com uso do software Origin Pro 2015 (OriginLab, Northampton, EUA), de forma semelhante ao que fora aplicado na cinética supercrítica (item 3.2.2.1.1).

3.2.2.2.2 Extrações

Para a casca da feijoa, as extrações foram realizadas à pressão constante de 100 bar e às temperaturas de 40, 55 e 80 °C, com uso de etanol, água e a mistura etanol-água (50:50 v/v) como solventes. Com base nos resultados observados pelas cinéticas de extração, a vazão adotada foi de 3 mL.min⁻¹ e o tempo total de extração foi de 60 min.

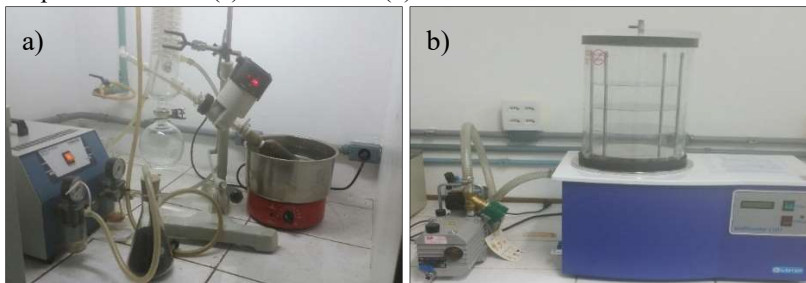
Para a folha da feijoa, dois regimes de extração foram aplicados: um regime dinâmico a 3 mL.min⁻¹ por 50 min (tempo adotado após análise da cinética) e um regime estático, com 2 ciclos de 25 min. Antes de cada ciclo do regime estático, a válvula V3 foi fechada e as amostras foram mantidas em contato com o solvente pressurizado. Após decorridos 25 min, a válvula V3 foi então aberta e a mistura extrato-solvente, coletada. O mesmo procedimento se deu para o segundo ciclo. Duas temperaturas foram utilizadas (40 e 80 °C), mantendo-se a pressão a 100 bar e utilizando-se os mesmos solventes aplicados para a casca.

3.2.3 Pós-tratamento dos extratos

Ao final das extrações, os respectivos extratos foram evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotativo (Fisatom 802, Fisatom, São

Paulo, Brasil) e liofilizador (L 101, Liotop, São Carlos, Brasil) (Figura 22).

Figura 22 – Equipamentos utilizados para evaporação de solvente. Evaporador rotativo (a) e liofilizador (b).



Fonte: o próprio autor

3.3 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS

Os extratos obtidos a baixa e alta pressões foram avaliados em termos de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante primária e secundária pelas técnicas de captura do radical DPPH e poder de redução do íon férrico (FRAP), respectivamente. Os extratos que apresentaram os resultados mais promissores em termos de teor de compostos fenólicos totais foram selecionados para avaliação da atividade antibacteriana e análise do perfil de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplada à espectrometria de massas (HPLC – ESI – MS/MS).

3.3.1 Teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

No presente trabalho, utilizou-se a metodologia de Folin-Ciocalteu proposta por Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventós (1999), adaptada por Kosar; Dorman; Hiltunen (2005).

Inicialmente, cada um dos extratos foi pesado e diluído em seus respectivos solventes de extração, obtendo solução-mãe de extrato com concentração final de 10 mg de extrato.mL⁻¹ de solvente. Em seguida, foram separados 4 tubos Eppendorf de 1,5 mL (3 para a amostra propriamente dita e um para o branco), nos quais foram adicionados 0,6 mL de água destilada. Logo após, aos tubos da amostra foram adicionados 10 µL da solução-mãe de extrato e ao branco, 10 µL do respectivo solvente utilizado na extração. Em seguida, 50µL do reagente de Folin-

Ciocalteu foram adicionados aos 4 tubos. Após agitação em vortex e repouso por 1 min, 150 μL da solução de carbonato de sódio (20% m/v), meio alcalino da reação, foram adicionados aos tubos. Por fim, 190 μL de água foram inseridos aos 4 tubos, completando-se o volume final de 1 mL. Após nova agitação em vortex, os tubos foram colocados em repouso por 2 h, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao final das 2 h, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro (800 XI, Femto, São Paulo, Brasil), no comprimento de onda de 760 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). Através da substituição dos valores de absorbância média obtidos para cada amostra na equação da curva padrão de ácido gálico, obtiveram-se os respectivos valores de equivalente em ácido gálico (EAG) para cada mL de solução.

Os resultados finais foram expressos em mg EAG.g⁻¹ de amostra seca através da Equação 7:

$$CFT \left(\frac{\text{mg EAG}}{\text{g amostra seca}} \right) = \frac{EAG \left(\frac{\text{mg EAG}}{\text{L solução}} \right) \left(\frac{R_{\text{ext}}}{100} \right)}{D_{\text{ext}} \left(\frac{\text{g extrato}}{\text{L solução}} \right)} \quad (7)$$

Onde,

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

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

R_{ext} = rendimento global de extração (%).

A curva padrão de ácido gálico utilizada no método de Folin-Ciocalteu, juntamente com um diagrama simplificado relativo ao preenchimento dos reagentes nos tubos estão disponíveis no Apêndice (Figura 36 e Tabela 27, respectivamente).

3.3.2 Atividade antioxidante

3.3.2.1 Método de captura do radical DPPH

No presente trabalho, fez-se uso da metodologia proposta por Mensor et al (2001).

O método consiste em 4 etapas básicas: preparo da solução-mãe de extrato, preparo da solução estoque de DPPH (0,3 mM), preparo do meio reacional e leitura em espectrofotômetro.

Primeiramente, a solução-mãe de extrato foi preparada ao dissolver-se 0,01 g de extrato em 10 mL do seu respectivo solvente (etanol, água ou etanol:água [50:50 v/v]), obtendo-se a concentração final de 1 mg.mL⁻¹. Em seguida, a solução estoque de DPPH (0,3 mM) foi preparada ao dissolver 0,003 g do radical DPPH em 25 mL de etanol P.A., armazenando a solução em frasco âmbar. O preparo do meio reacional se deu ao adicionar 1 mL do radical estoque DPPH a tubos de ensaio contendo a solução-mãe de extrato e etanol, em diferentes concentrações, obtendo-se sempre um volume total de 3,5 mL. O controle negativo compreende apenas a mistura de solvente com o radical DPPH. Os brancos correspondem aos solventes e às soluções-mãe de extrato.

Após preenchimento dos tubos, os mesmos foram homogeneizados em vortex, incubados à temperatura ambiente por 30 minutos e ao abrigo da luz e suas absorbâncias foram analisadas em 517 nm.

A atividade antioxidante percentual foi obtida através da Equação 8 para cada concentração (em triplicata) e os resultados finais foram expressos em função do EC₅₀, fator correspondente à concentração mínima necessária de extrato para decrescer em 50% a concentração inicial do radical DPPH.

$$AA (\%) = 100 - \left(\frac{[Abs_{amostra} - Abs_{branco}]}{Abs_{controle}} * 100 \right) \quad (8)$$

Onde,

AA = atividade antioxidante percentual (%);

Abs_{amostra} = absorbância da amostra;

ABS_{branco} = absorbância do branco;

ABS_{controle} = absorbância do controle.

Cada replicação gerou uma equação da reta. Ao substituir o valor de y por 50 (relativo a 50% de atividade antioxidante), obtém-se o valor do EC₅₀ parcial (Equação 9). O EC₅₀ total é a média dos três EC₅₀ parciais.

$$Y = AX + B \quad \therefore X = \frac{Y-B}{A} \quad \therefore X = \frac{50-B}{A} \quad (9)$$

Onde,

Y = atividade antioxidante percentual;

X = concentração de extrato (µg.mL⁻¹);

A = coeficiente angular da reta;

B = coeficiente linear da reta.

Um diagrama simplificado relativo ao preenchimento dos reagentes nos tubos pelo método DPPH está disponível no Apêndice (Tabela 28).

3.3.2.2 Método de redução do íon férrico - FRAP

A identificação de compostos antioxidantes redutores de íons férrico foi determinada através de metodologia descrita por Benzie; Strain (1996); Pulido; Bravo; Saura-Calixto (2000), com adaptações de Arnous; Makris; Kefalas (2002).

Todos os reagentes utilizados foram preparados no dia da análise. São eles:

- HCl 0,05 mM;
- Ácido cítrico 5 mM;
- Solução de FeCl₃ 3mM em ácido cítrico (cloreto férrico anidro);
- TPTZ (2, 4, 6 – trifridril-s-tiazina): 0,0780 g e m 250 mL HCl 0,05 mM;
- Solução-mãe de extrato (1 mg.mL⁻¹): os extratos foram diluídos em seus respectivos solventes de extração (etanol, água e etanol:água [50:50 v/v]).

O meio reacional consistiu da adição de 200 µL de solução-mãe de extrato a 3 tubos de ensaio (amostra em triplicata), contendo 200 µL de cloreto férrico anidro, com exceção dos tubos de branco, os quais continham apenas 200 µL de cloreto férrico e 200 µL do solvente respectivo à amostra. Após incubação em banho-maria a 37 °C, por 30 minutos, 3,6 mL de TPTZ foram adicionados às amostras e ao branco. Os tubos foram, posteriormente, agitados em vortex e inseridos em um banho frio por 10 minutos, procedendo-se à leitura em espectrofotômetro a 620 nm.

O cálculo da atividade antioxidante é dado através da Equação 10 abaixo:

$$C_{\mu\text{mol/g amostra}} = \frac{C_{\mu\text{mol/L}}}{C_{sm}} \quad (10)$$

Onde,

$C_{\mu\text{mol/g amostra}}$ = concentração equivalente ao trolox;

$C_{\mu\text{mol/L}}$ = concentração da solução (valor obtido através da substituição dos valores de absorbância das amostras no valor de Y na curva padrão realizada com trolox);

C_{sm} = concentração da solução-mãe de extrato.

A curva padrão de Trolox relativo ao método FRAP, juntamente com um diagrama simplificado relativo ao preenchimento dos reagentes nos tubos pelo método FRAP estão disponíveis no Apêndice: Figura 37 e Tabela 29, respectivamente.

3.3.2.3 Correlação entre CFT e atividade antioxidante

A correlação entre o teor de CFT e as atividades antioxidantes, DPPH e FRAP, deu-se através do coeficiente de correlação de Pearson (r). Este coeficiente estatístico mede a força e a direção de correlação entre duas variáveis aleatórias x e y . Se o sinal da correlação for positivo, as variáveis x e y são diretamente relacionadas. Se o sinal da correlação for negativo, então as variáveis x e y são inversamente relacionadas. Quanto mais próximo de 0 for o valor de r , mais fraca é a correlação. Em contrapartida, quanto mais próximo de -1 ou 1, mais forte é a correlação (ZHOU et al., 2016). A equação para determinação de r é apresentada pela Equação 11.

$$r_{xy} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})\sum(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}\sqrt{\sum(y_i - \bar{y})^2}} \quad (11)$$

Onde,

$\sum(x_i - \bar{x})$ representa o somatório de cada um dos valores de x subtraídos pelos valores de x médio;

$\sum(y_i - \bar{y})$ representa o somatório de cada um dos valores de y subtraídos pelos valores de y médio.

3.3.3 Atividade antibacteriana

3.3.3.1 Preparo dos inóculos e microdiluição

A avaliação da atividade antibacteriana foi desenvolvida com as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (bactéria Gram-positiva), *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (bactérias Gram-negativas), pertencentes à Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde, doadas pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

As cepas foram mantidas a -80 °C em criotubos contendo 1 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e 25 % de glicerol. Para uso, as cepas foram cultivadas em ágar tripton de soja e mantidas a 4 °C. Para a

preparação da cultura experimental, a cepa foi reativada em caldo BHI por 24 h a 35 °C.

Os extratos de casca e folha de feijoa obtidos pelas técnicas a alta pressão e que apresentaram os mais altos resultados, em termos de compostos fenólicos totais, foram selecionados para a análise de atividade antibacteriana através da técnica de microdiluição em placa de 96 poços (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007).

Em 1 mL de água destilada estéril foram dissolvidos 30.000 µg dos referidos extratos e em seguida, as soluções foram diluídas de forma seriada, obtendo-se concentrações de 13.500 a 105 µg.mL⁻¹. Em uma placa de microdiluição de 96 poços, foram adicionados: 90 µL de caldo Müller-Hinton, 90 µL de extrato e 10 µL de inóculo bacteriano. As bactérias utilizadas no presente trabalho foram distribuídas em uma suspensão de 10⁸ UFC.mL⁻¹. Um controle negativo para a ação antibacteriana foi preparado com uso de água destilada estéril e um controle positivo foi preparado com uso do antibiótico ceftazidima.

Após seladas com papel filme, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 h. Decorridas 20 h de experimento, as placas foram retiradas da estufa para adição de 10 µL do corante resazurina (6,75 mg.mL⁻¹) em cada um dos poços. Este produto de coloração roxa é um indicador de crescimento microbiano, ou seja, a redução de resazurina (coloração roxa) para resorufina (coloração rosa) nos poços indica crescimento bacteriano nas concentrações correspondentes. Após adição do corante, as placas retornaram à estufa para reação da resazurina, a qual tem duração de 4 h (ELSHIKH et al., 2016).

Encerrado o tempo de incubação, as placas foram retiradas da estufa e a mudança de cor foi aferida visualmente. Para os poços onde foi identificada a mudança de cor, procedeu-se à verificação da Concentração Mínima Bactericida (CMB), ou seja, a concentração mínima que não apenas impede o crescimento (efeito bacteriostático) mas também, elimina 99,9 % das bactérias presentes inicialmente no inóculo (efeito bactericida). As soluções que apresentaram coloração roxa após as 24 h foram plaqueadas em ágar PCA (*Plate Count Agar*) e após nova incubação a 35 °C por 24 h, verificou-se a presença de unidades formadoras de colônia.

Os experimentos de atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos 2 da Universidade Federal de Santa Catarina (CAL-CCA-UFSC).

3.3.4 Perfil de compostos fenólicos por HPLC

3.3.4.1 Preparo da amostra: extração lipídica prévia

Os extratos de feijoa (casca ou folha) foram previamente desengordurados, segundo método de Borges et al (2011) descrito a seguir. Uma massa de 0,1 g de extrato foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL, adicionada de 25 mL de n-hexano (Neon, Suzano, Brasil) e desengordurada com auxílio de banho ultrassônico (Ultronique Q3.0/37A, Eco-Sonics, Indaiatuba, Brasil) a 25 °C por 15 min e então, centrifugado a 2000 G (Q222T, Quimis, Diadema, Brasil). O sobrenadante foi removido e o resíduo submetido a uma segunda extração com n-hexano. Por fim, a polpa desengordurada foi submetida a arraste com fluxo de ar comprimido para remoção completa do solvente.

3.3.4.2 Preparo da amostra: hidrólise-ácida

A segunda etapa de preparo da amostra consistiu na hidrólise-ácida do extrato desengordurado. Os compostos fenólicos de materiais vegetais podem se ligar a macronutrientes, tais como carboidratos e proteínas. Ao serem submetidos à hidrólise-ácida, os compostos fenólicos são isolados dos macronutrientes e estabilizados no extrato (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

A hidrólise-ácida realizada no presente trabalho foi baseada no método descrito por Schulz et al (2015). A amostra previamente desengordurada foi adicionada de 5 mL de metanol P.A. (LAFAN, Várzea Paulista, Brasil) e 5 mL de HCl 6M (LAFAN, Várzea Paulista, Brasil) e submetida à hidrólise-ácida a 85 °C por 30 min, em estufa (DE LEO, Porto Alegre, Brasil). Em seguida, a solução foi ajustada a pH 2 com NaOH 6M (LAFAN, Várzea Paulista, Brasil) e submetida à extração por partição com 10 mL de éter etílico (SIGMA-ALDRICH BRASIL, Duque de Caxias, Brasil). O extrato foi centrifugado a 3000 G por 10 min e em seguida, a fração etérea foi extraída e armazenada em balão volumétrico. O resíduo foi submetido a mais dois ciclos de partição com éter etílico. Os sobrenadantes foram combinados e evaporados em rotaevaporador (FISATOM 801, São Paulo, Brasil) até completa secagem e então, o extrato residual foi reconstituído em 1 mL de metanol e armazenado a -18 °C até o processo de injeção no sistema cromatográfico.

3.3.4.3 Análise dos compostos fenólicos por HPLC – ESI - MS/MS

A análise cromatográfica foi realizada no Laboratório de Eletroforese Capilar da Universidade Federal de Santa Catarina (LabEC – CFM – UFSC), de acordo com o método proposto por Shulz (2015).

O extrato reconstituído ao final da etapa de hidrólise-ácida (3.3.4.2) foi centrifugado a 14000 G por 4 min e diluído 10 vezes em metanol-água (70:30 v/v) para injeção no cromatógrafo.

A separação cromatográfica e análise espectrométrica das massas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (1200 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) acoplado a espectrômetro de massas com analisador triploquadripolo e *ion trap* linear (Q Trap 3200, Applied Biosystems/MDS Sciex, Canadá). Os experimentos foram realizados utilizando fonte de ionização por eletrospray TurbolonSpray™ (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canadá) em modo negativo. O *software Analyst* versão 1.5.1 foi usado para aquisição e tratamento dos dados obtidos. Os compostos foram separados em coluna Synergi™ (4.0 µm, 2.0 x 150 mm d.i.; Phenomenex, EUA). A fase móvel consistiu de uma solução de metanol 95% e água 5% (A) e de água com ácido fórmico 0,1 % (B). A separação foi realizada a 30 °C utilizando eluição por gradiente segmentado de acordo com as seguintes etapas: 0 – 5 min, 10 % A; 5 – 7 min, 90 % A; 7 – 10 min, 90 % A; 10 – 17 min, 10 % A. O fluxo utilizado foi de 250 µL.min⁻¹ e o volume de injeção foi de 10 µL. Os compostos foram monitorados utilizando monitoramento de reações múltiplas (MRM). A identificação dos compostos fenólicos foi realizada com base no tempo de retenção, íon precursor e seus fragmentos através da comparação com os respectivos padrões disponíveis comercialmente. A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada por infusão direta de soluções contendo cada composto de interesse individualmente. A quantificação foi realizada monitorando um íon quantitativo selecionado para cada composto e utilizando curva de calibração construída em razão dos compostos previamente identificados. Os resultados dos compostos nas amostras foram expressos em mg.g⁻¹ de extrato.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados, com exceção dos resultados da análise antibacteriana, foram reportados como média ± desvio padrão. O teste de Tukey foi aplicado a fim de identificar as diferenças significativas entre as médias. As análises foram realizadas com uso do *software* Microsoft Excel 2013, admitindo nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CASCA DE FEIJOA

4.1.1 Caracterização da Matéria-Prima

Após as etapas de secagem e moagem, a casca da feijoa foi caracterizada em termos de umidade e diâmetro médio de partícula. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Umidade e Diâmetro médio de partícula da casca de feijoa após secagem.

Matéria - prima	Umidade (% b.u.)	Diâmetro médio (mm)
Casca	5,8 ± 0,2	0,26 ± 0,01

A umidade final da matéria-prima encontra-se na faixa recomendável por Pereira; Meireles (2010), de 4 a 14% (b.u.). A secagem prévia da matéria-prima utilizada na extração supercrítica é recomendável, visto que a água apresenta baixa solubilidade em CO₂ (≈ 0,3%) e na maioria dos casos, compete com o soluto quando da presença de um solvente, diminuindo o rendimento da extração (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Em contrapartida, a água pode possibilitar a interação de solvente e soluto, auxiliando o processo de extração (PEREIRA; MEIRELES, 2010; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

O diâmetro médio das partículas foi de 0,26 mm. Segundo Meireles (2008), a razão entre o diâmetro do leito de extração e o diâmetro médio das partículas deve compreender uma faixa de 50 a 250, para se evitar a formação de caminhos preferenciais. Como o leito de extração da unidade utilizada no presente trabalho apresenta um diâmetro de 22 mm, a razão entre diâmetro do leito e diâmetro médio de partículas foi de 84,61, indicando uma provável ausência de caminhos preferenciais no leito.

4.1.2 Rendimento Global de Extração

4.1.2.1 Métodos a baixa pressão

O rendimento global de extração refere-se à quantidade máxima de extrato obtido de uma matriz sólida através de técnicas e parâmetros pré-definidos. Para este fim, duas técnicas aplicadas à pressão atmosférica

foram utilizadas: Soxhlet, uma técnica convencional e facilmente aplicável e EAU, uma técnica não-convencional. Os resultados para rendimento global dos extratos estão apresentados na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 - Rendimento global dos extratos da casca de feijoa obtidos por técnicas a baixa pressão.

Método de Extração	Solvente	Índice de polaridade¹	X₀ (%)^{2,3}
Soxhlet	Etanol	5,2	39±3 ^b
	Água	9,0	39,7±0,9 ^b
	Etanol-Água	7,1	47±2 ^a
EAU	Etanol	5,2	16±2 ^c
	Água	9,0	43±1 ^{ab}
	Etanol-Água	7,1	39,6±0,6 ^b

¹O índice de polaridade da mistura foi calculado a partir da equação $(Ia/100 \times Pa) + (Ib/100 \times Pb)$, onde Ia e Ib são os índices de polaridade dos solventes a e b, respectivamente e Pa e Pb são as porcentagens dos solventes a e b, respectivamente, na mistura (MARKOM et al., 2007);

²Rendimento global;

³Letras iguais indicam ausência de diferença entre os respectivos valores, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Através da Tabela 5, nota-se que ambas as técnicas de extração apresentaram um elevado rendimento global para a casca da feijoa, com exceção da EAU com uso de etanol como solvente, onde o rendimento foi significativamente inferior aos demais. A água presente no solvente tem a capacidade de provocar um inchamento das células da matriz vegetal, resultando em um aumento na permeabilidade da parede celular, facilitando seu rompimento após aplicação das ondas ultrassônicas. Quando 100% de etanol é utilizado como solvente, não há água disponível para provocar o inchamento das células, logo, o rendimento global tende a ser menor (CHARPE; RATHOD, 2014).

Papoutsis et al (2016) avaliaram a influência da água e de solventes orgânicos, tais como metanol, etanol, acetona e suas misturas com a água, na fração de 50%, para a extração de compostos bioativos de bagaço de limão por EAU. Os solventes água e a mistura etanol-água apresentaram os mais altos valores de rendimento global, estando em consonância com o presente trabalho.

Na técnica de Soxhlet, os altos rendimentos observados se devem à diminuição da viscosidade do solvente, fruto da alta temperatura

aplicada na técnica, favorecendo a difusão deste solvente na matriz sólida e a consequente dissolução do soluto. A renovação periódica do solvente, evitando que o mesmo seja saturado devido ao longo tempo de extração, também eleva a eficiência da técnica.

Por se tratar de um solvente GRAS polar e de fácil obtenção, o etanol é muito utilizado em extrações de compostos polares por Soxhlet. No trabalho desenvolvido por Reátegui et al (2014), etanol foi utilizado como solvente em extração de bagaço de mirtilo por Soxhlet. Os autores obtiveram rendimento global de 14,58%.

Espinosa-Pardo et al (2017) avaliaram o rendimento global e a concentração de compostos fenólicos do bagaço de laranja seco através de Soxhlet com etanol a 99,5%. O rendimento global obtido após 6 h de extração foi de 15%, para uma razão de amostra: solvente de 1:60 v/v. Na técnica de Soxhlet com uso de etanol, o rendimento observado no presente trabalho foi superior aos rendimentos observados nos trabalhos supracitados.

Quando se substituiu etanol por água, o rendimento manteve-se estatisticamente semelhante. Contudo, deve-se ter atenção ao fazer uso de água como solvente na técnica de Soxhlet. De acordo com Sun-Waterhouse (2012), a alta temperatura aplicada, quando do uso de água, favorece a solubilização de diversos compostos além de compostos fenólicos, tais como proteínas e açúcares. Estes açúcares podem ainda se condensar no balão de recolhimento do extrato juntamente com compostos de interesse, diminuindo não apenas a seletividade, mas também, o rendimento da extração.

O mais elevado rendimento foi obtido quando do uso da mistura etanol-água como solventes, numa razão de (50:50 v/v), indicando um índice de polaridade do extrato entre as polaridades da água e do etanol. Segundo o princípio da similaridade e miscibilidade, quando as polaridades de soluto e solvente são similares, o soluto é facilmente dissolvido através da parede celular vegetal (YANG et al., 2010). A maior parte dos antioxidantes de fontes naturais, tais como os compostos fenólicos, os flavonoides e as antocianinas são facilmente dissolvidos por solventes de polaridade média como o etanol e o metanol, com frações de água (XU et al., 2017).

4.1.2.2 Extração Supercrítica (ESC)

4.1.2.2.1 Cinética

Antes de se iniciarem os ensaios propriamente ditos, realizou-se uma cinética de extração com a casca da feijoa, a fim de se obter informações cruciais para o prosseguimento das extrações supercríticas, tais como a duração e o rendimento das etapas CER, FER e DC. Os parâmetros do modelo de Regressão Linear por Partes e a CGE são apresentados na Tabela 6 e na Figura 23, respectivamente.

Tabela 6 - Parâmetros do modelo de Regressão Linear por Partes da ESC. Ajuste realizado com base na CGE da ESC da casca de feijoa a 100 bar, 40 °C e 0,5 kg.h⁻¹.

Parâmetros	
a1 (g)	2,80 x 10 ⁻³
k1 (g.min ⁻¹)	1,67 x 10 ⁻⁴
t _{CER} (min)	108
k2 (g.min ⁻¹)	4,09 x 10 ⁻⁵
t _{FER} (min)	355
k3 (g.min ⁻¹)	1,55 x 10 ⁻⁵
R ²	0,9944

Através da Tabela 6 e Figura 23, pode-se constatar que a etapa CER teve duração (t_{CER}) de 108 min, com uma taxa de extração (k1) de 1,67 x 10⁻⁴ g.min⁻¹. A massa de soluto obtida durante a etapa CER foi denominada por Sovová (1994) de *soluto de fácil acesso*. Nesta etapa, a transferência de massa ocorre predominantemente por convecção. O soluto disponível está depositado na superfície da matriz vegetal, resultado do processo de moagem, facilitando a transferência de massa. De acordo com Meireles (2008), o rendimento da etapa CER compreende uma faixa de 50 a 90%, a depender dos tratamentos prévios de secagem e moagem da matéria-prima. No presente trabalho, observou-se um rendimento de 59,06%.

Com duração de 247 minutos, a etapa FER apresentou uma taxa de extração inferior à etapa CER, 4,09 x 10⁻⁵ g.min⁻¹. Isto ocorre pois, uma considerável porção de partículas sólidas não mais está revestida por soluto e outras partículas sequer foram rompidas durante a moagem (MEIRELES; 2008), com isso, o mecanismo, que até então era conduzido

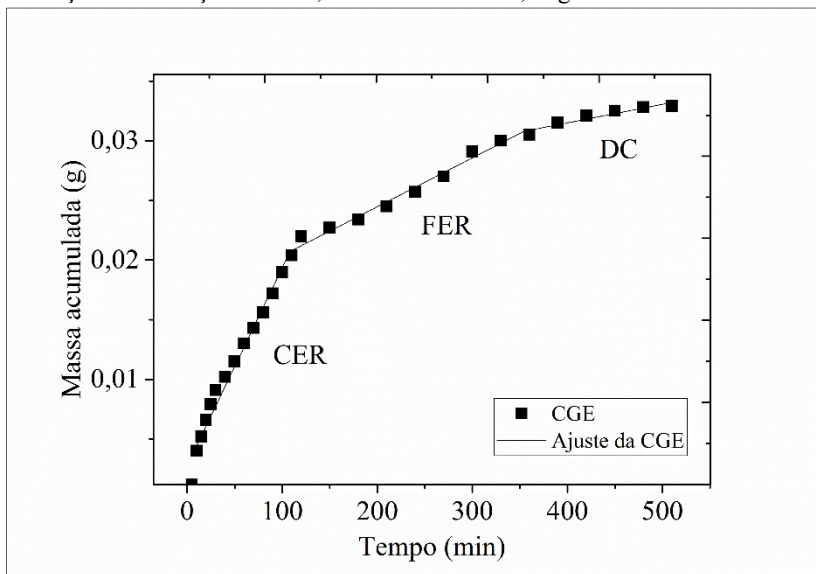
predominantemente por convecção, passa a ser conduzido também por difusão. O rendimento da etapa FER, 33,08%, resultou em um rendimento global de aproximadamente 92%. O tempo (t_{FER}) foi de 355 min, elevando o tempo total de extração a aproximadamente 6 h.

Após o minuto 355, inicia-se o período DC, onde apenas o soluto de difícil acesso é obtido e, concomitantemente, a taxa de extração é reduzida a $1,55 \times 10^{-5} \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$. Neste período, o rendimento chegou a apenas 7,87%.

O tempo de extração foi concluído em 8,5 h.

Figura 23 - CGE da casca de feijoa obtida em ESC.

Condições de extração: 100 bar, 40 °C e vazão de 0,5 kg.h⁻¹.



A Tabela 7 apresenta os parâmetros cinéticos de extração da casca da feijoa a 100 bar, 40 °C e vazão de 0,5 kg.h⁻¹, separados por etapas de extração.

Tabela 7 - Propriedades do leite e parâmetros cinéticos de extração supercrítica da casca de feijoa.

Condições de extração: 100 bar, 40 °C e vazão de 0,5 kg.h⁻¹.

Parâmetros	Etapa CER	Etapa FER	Etapa DC
t (min) ^a	108	247	155
m (g) ^b	0,018	0,010	0,002
X ₀ (%) ^c	59,06	33,08	7,87
Y (g óleo.g CO ₂ ⁻¹) ^c	2,00 x 10 ⁻⁵	4,86 x 10 ⁻⁶	1,55 x 10 ⁻⁶

^aduração da etapa; ^bmassa de extrato; ^crendimento; ^dmassa de extrato por minuto; ^e massa de extrato/massa de CO₂ utilizada.

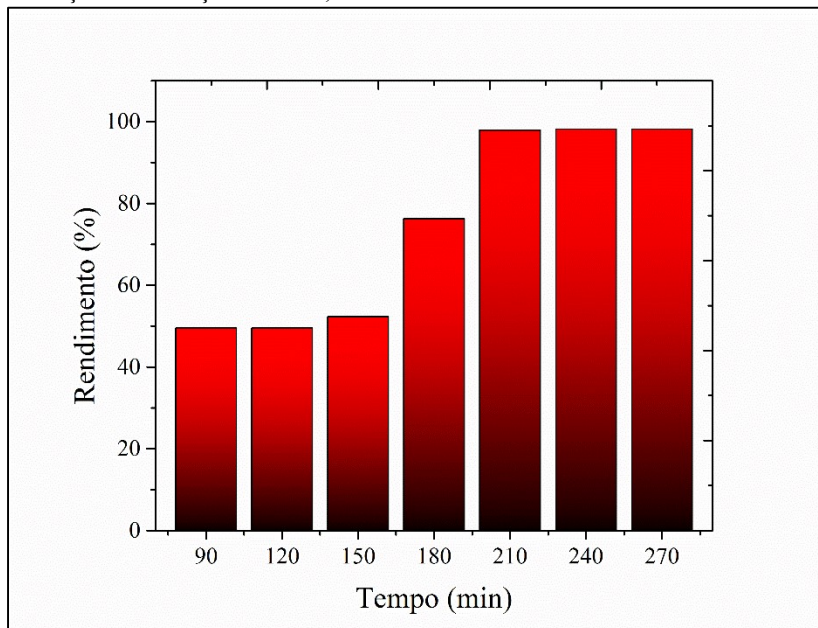
Devido ao rendimento de apenas 0,20 % observado após a cinética supercrítica da casca da feijoa, foram realizadas novas extrações com pressões mais elevadas (200 e 300 bar), a fim de favorecer a transferência de massa. As temperaturas aplicadas foram 40 e 55 °C. Após aproximadamente 4 h de extração, o maior rendimento global foi observado para o ensaio a 300 bar e 55 °C: 0,62 %. Resultados semelhantes foram observados por Casas et al (2010), onde os autores extraíram compostos antioxidantes de bagaço de uva por CO₂ supercrítico. Após rendimento abaixo de 1%, os autores implementaram etanol a 5% como cossolvente, aumentando significativamente o rendimento global de extração.

Segundo Díaz-Reinoso et al (2006), a ESC é um método destinado à obtenção de óleos e compostos de caráter lipofílico, todavia, diversos compostos bioativos apresentam média e alta polaridade, tais como os compostos fenólicos, tendo assim, baixa solubilidade em CO₂. Com isso, o uso de um cossolvente de caráter polar se torna fundamental no desenvolvimento da ESC para a extração de compostos bioativos.

Através da cinética supercrítica realizada com a casca da feijoa, observou-se que o baixo rendimento global ratifica a baixa solubilidade do extrato da feijoa em solventes apolares, como é o caso do CO₂. Com isso, realizou-se uma cinética de extração supercrítica com cossolvente, com o propósito de verificar a solubilidade do extrato neste solvente polar, bem como definir um tempo para as extrações seguintes. A cinética foi realizada a 200 bar e 40 °C, as condições mais baixas de pressão e temperatura, respectivamente, de acordo com o planejamento experimental adotado. Etanol P.A. foi utilizado como cossolvente, em uma proporção de 5% [m/m]. Os resultados da cinética supercrítica da casca da feijoa podem ser observados através da Figura 24.

Aproximadamente 50% do extrato foi obtido em 150 minutos de extração. Em 210 minutos, o rendimento atinge seu ápice ($\approx 98\%$), não apresentando alteração nos 60 min seguintes de extração. Com este resultado, optou-se em adotar o tempo de 210 min para as extrações supercríticas.

Figura 24 - Cinética supercrítica da casca de feijoa com cossolvente. Condições de extração: 200 bar, 40 °C e 5% etanol.



De acordo com Casas et al (2010) etanol é o cossolvente mais utilizado na extração de produtos naturais. Casas et al (2010) utilizaram etanol 5% [v/v] como cossolvente na extração supercrítica de resveratrol em uvas *Palomino fino*. Nas condições experimentais de 400 bar e 35 °C, o acréscimo no rendimento global com uso de cossolvente, em comparação à extração apenas com CO₂ foi de 114%, 150%, 290% e 249%, para sementes, pedicelo, casca e resíduo, respectivamente.

Segundo Wijngaard et al (2012), normalmente, etanol é adicionado como cossolvente em uma porcentagem de até 20%.

Na extração de compostos bioativos de raiz de azedinha (*Rumex acetosa*), Santos et al (2017) observaram um aumento significativo de rendimento global quando da variação da concentração de etanol como

cossolvente, de 5 a 35%. Todavia, a elevação na concentração de etanol de 35 para 45% não resultou em alterações significativas no rendimento. Pereira; Meireles (2010) atestam que, em determinadas condições, o incremento de cossolvente não resultará em um aumento de rendimento significativo.

De fato, a adição de um cossolvente, em altas concentrações, pode se tornar inviável, tanto em termos quantitativos quanto em termos qualitativos. A adição de etanol eleva a temperatura crítica do CO₂ e, se a pressão e a temperatura do sistema não forem elevadas para compensar a adição do cossolvente, a mistura se mantém abaixo da região supercrítica (WIJNGAARD et al., 2012).

4.1.2.2.2 Ensaios

Com base nas informações obtidas acerca da cinética supercrítica com cossolvente (item 4.1.2.2.1), procedeu-se aos ensaios propriamente ditos. Neste planejamento, manteve-se fixa a concentração de etanol como cossolvente (5% m/m) e o tempo estabelecido na cinética foi mantido: 210 min (3,5 h). Os resultados de rendimento global são observados na Tabela 8.

Tabela 8 - Rendimento global dos extratos da casca de feijoa obtidos por ESC, com 5% de etanol como cossolvente.

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	ρ (kg.m⁻³)	X₀ (%)^{1,2}
E1	200	40	839,90	1,3±0,1 ^b
E2	300	40	910,00	1,7±0,2 ^{ab}
E3	200	55	754,10	1,9±0,2 ^{ab}
E4	300	55	850,30	2,0±0,1 ^a

¹Densidade do CO₂ (WISCHNEWSKI, 2017)

²Rendimento global

³Letras iguais indicam ausência de diferença entre os respectivos valores, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

A pressão é o parâmetro limitante no processo de extração supercrítica, uma vez que a densidade do solvente aumenta com a elevação da pressão, à temperatura constante (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

De forma geral, pressões de até 100 bar e temperaturas entre 40 e 50 °C são utilizadas para extração de óleos essenciais. Com o aumento da pressão e a concomitante elevação na densidade, o solvente torna-se

capaz de extrair compostos de maior peso molecular como os polifenóis, a maior classe de antioxidantes presente em matrizes vegetais (DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Através da Tabela 8, tomando-se a temperatura de 40 °C como referência, a elevação de 200 bar (ensaio E1) para 300 bar (ensaio E2), resultou em um aumento de 68% no rendimento global. Para a temperatura de 55 °C fixa, o aumento foi levemente menor, chegando a 54% (E3 para E4). Contudo, nota-se que a variação de temperatura também apresentou influência em termos de rendimento global, sendo esta influência até superior à influência da pressão. Mantendo-se fixa a pressão em 200 bar, o aumento na temperatura de 40 °C (ensaio E1) para 55 °C (ensaio E3) resultou em acréscimo de 73,4% em rendimento global, mesmo havendo diminuição na densidade do solvente. Para a pressão de 300 bar, a elevação no rendimento global do ensaio E4 em relação ao ensaio E2 foi de 58,4%.

Pereira et al (2013) observaram comportamento semelhante na extração supercrítica de compostos bioativos de folhas de murta: a diminuição na temperatura foi diretamente proporcional ao aumento no rendimento global, em pressões de 100 a 200 bar, devido ao aumento na densidade; em contrapartida, a 300 bar, o aumento na temperatura resultou em elevação no rendimento global, apesar da diminuição na densidade.

Castro-Vargas et al (2013) avaliaram o rendimento global do extrato de casca de tomarrilho, nas pressões de 200 e 300 bar e temperaturas de 40 e 50 °C. Mesmo não apresentando a maior densidade do solvente, a condição 300 bar e 50 °C apresentou o maior rendimento global.

Segundo Pereira; Meireles (2010), o efeito da temperatura na extração supercrítica é complexo: o aumento na densidade do solvente facilita o arraste de compostos a partir da matriz vegetal, contudo, um aumento na temperatura, embora diminua a densidade, eleva a pressão de vapor do soluto presente na matriz vegetal, facilitando sua solubilização no solvente.

Apesar de influenciarem a transferência de massa e a solubilidade do soluto no solvente, as diferentes pressões e temperaturas adotadas no presente trabalho não resultaram em variações significativas no rendimento global entre os ensaios, com exceção dos ensaios E1 e E4, com 1,3 e 2,0 % de rendimento, respectivamente. Incrementos de pressão poderiam elevar ainda mais o rendimento, mas por limitações do equipamento, a pressão máxima de operação foi aplicada no presente trabalho.

Tendo em vista o maior rendimento global observado para o ensaio E4, novos ensaios foram realizados, mantendo-se a mesma condição de pressão e temperatura adotada no ensaio E4 (300 bar e 55 °C, respectivamente) e elevando-se apenas a porcentagem de cossolvente para 10 e 15% (m/m).

Através da Tabela 9 e da Figura 25, percebe-se que a elevação na concentração de cossolvente de 5 para 10 % resultou em um rendimento de 5,7 %, ou seja, um aumento de 183 %. Ao elevar a concentração de cossolvente para 15%, o rendimento foi de 7,0 %. Estes valores denotam a importância de um cossolvente de caráter polar para a obtenção de extratos da casca da feijoa.

Tabela 9 - Rendimento global dos extratos da casca de feijoa obtidos por ESC, com 5, 10 e 15% de etanol como cossolvente.

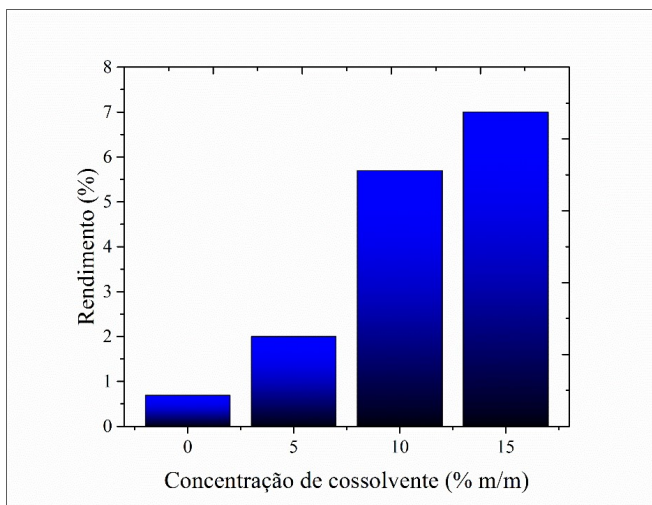
Condições de extração: 300 bar e 55 °C.

Ensaio	Concentração de cossolvente (% m/m)	X₀ (%)^{1,2}
E4	5	2,0±0,1 ^c
E5	10	5,7±0,1 ^b
E6	15	7,0±0,8 ^a

¹ Rendimento global;

² Letras iguais indicam ausência de diferença entre os respectivos valores, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Figura 25 - Rendimento global dos extratos da casca de feijoa obtidos por ESC. Condições de extração: 300 bar, 55 °C e com 0, 5, 10 e 15% de etanol como cossolvente.



4.1.2.3 Extração com Líquido Pressurizado (ELP)

A extração com líquido pressurizado (ELP) foi realizada como segunda técnica de extração em alta pressão dos compostos bioativos da casca da feijoa.

4.1.2.3.1 Cinética

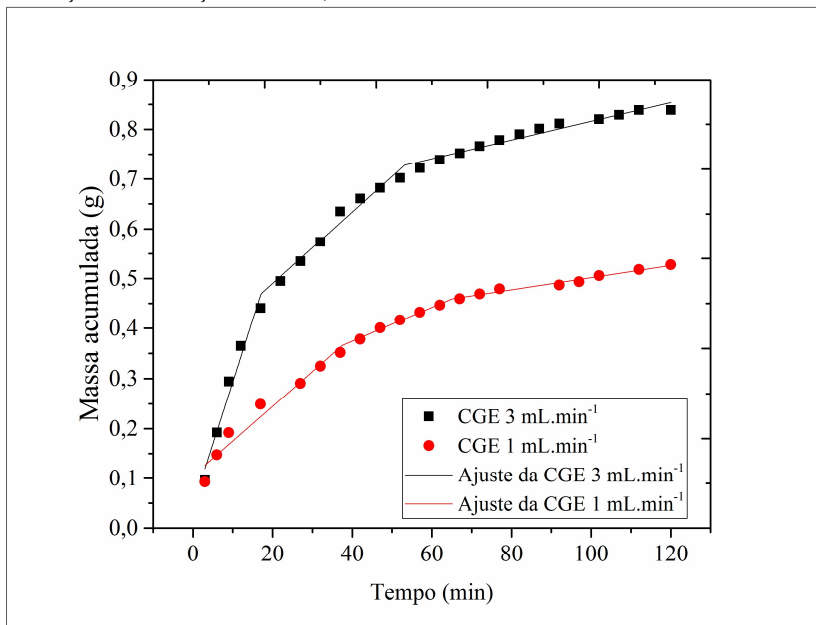
Seguindo o mesmo procedimento prévio adotado para a extração supercrítica, uma cinética de extração com líquido pressurizado foi realizada a fim de se obter informações cruciais para o prosseguimento das extrações supercríticas, tais como a duração e o rendimento das etapas CER, FER e DC. Os parâmetros do modelo de Regressão Linear por Partes são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros do modelo de Regressão Linear por Partes da ELP. Ajuste realizado com base na CGE da ELP da casca de feijoa a 100 bar, 40 °C, com vazões de 1 e 3 mL.min⁻¹.

Parâmetros	1 mL.min⁻¹	3 mL.min⁻¹
a1 (g)	1,06 x 10 ⁻¹	4,55 x 10 ⁻²
k1 (g.min ⁻¹)	6,95x10 ⁻³	2,48x10 ⁻²
t _{CER} (min)	37	17
k2 (g.min ⁻¹)	3,38x10 ⁻³	7,17x10 ⁻³
t _{FER} (min)	65	53
k3 (g.min ⁻¹)	1,22x10 ⁻³	1,88x10 ⁻³
R ²	0,9888	0,9949

Através dos resultados da Tabela 10, pode-se notar que a elevada taxa de extração (k1) observada para a cinética a 3 mL.min⁻¹, em comparação à cinética a 1 mL.min⁻¹, justifica o encerramento da etapa CER (t_{CER}) em 17 min, aproximadamente a metade do tempo t_{CER} observado para a cinética a 1 mL.min⁻¹: 37 min. Tal efeito é resultado da maior transferência de massa por convecção, ou seja, quanto maior a vazão de solvente, mais elevada é a velocidade em que o solvente passa pela matriz vegetal, arrastando consigo, o soluto de fácil acesso, prioritariamente. Em contrapartida, a cinética realizada em menor vazão permite um maior contato entre solvente e matriz vegetal. Todavia, apesar deste maior contato, a baixa vazão de 1 mL.min⁻¹ não se mostrou eficaz em termos de rendimento, sendo que ao final da etapa FER (t_{FER}), a massa acumulada de extrato foi inferior à massa acumulada ao final da etapa CER (t_{CER}) da cinética a 3 mL.min⁻¹. Este comportamento pode ser visualizado através da Figura 26.

Figura 26 - CGE da casca de feijoa obtida por ELP.
Condições de extração: 100 bar, 40 °C e vazões de 1 e 3 mL.min⁻¹.



Com base nos rendimentos observados, a vazão de 3 mL.min⁻¹ foi adotada para o planejamento experimental. O tempo de cada análise foi fixado em 60 min, tempo aproximado de encerramento da etapa FER e início da etapa DC (t_{FER}).

4.1.2.3.2 Ensaios

Os ensaios da ELP da casca da feijoa foram realizados com variação de temperatura e pressão fixa em 100 bar. Os resultados para rendimento global, utilizando-se etanol, água e a mistura etanol-água (50:50 v/v) como solvente, são apresentados na Tabela 11.

Os rendimentos obtidos pela ELP com uso de etanol são estatisticamente semelhantes para as temperaturas de 40 e 55 °C. No entanto, um aumento significativo no rendimento é observado com o aumento na temperatura para 80 °C. O uso de altas temperaturas eleva a solubilidade do soluto no solvente, além de diminuir a viscosidade e a tensão superficial do solvente, permitindo então, uma melhor penetração do solvente na matriz vegetal (HERRERO et al., 2013). Em termos de

comparação, o rendimento obtido com a maior temperatura na ELP é semelhante ao observado em Soxhlet, fazendo-se uso de etanol como solvente. Vale salientar que a temperatura de 80 °C foi adotada justamente por se tratar de uma temperatura próxima à aplicada na técnica convencional.

Tabela 11 - Rendimento global dos extratos da casca de feijoa obtidos por ELP. Condição de extração: 100 bar.

Temperatura (°C)	Solvente	X ₀ (%) ^{1,2}
40	Etanol	29,0±0,4 ^d
55	Etanol	33,8±0,7 ^{cd}
80	Etanol	42±2 ^b
40	Água	41±3 ^{bc}
55	Água	41,3±0,9 ^{bc}
80	Água	45±1 ^{ab}
40	Etanol-Água	46,9±0,5 ^{ab}
55	Etanol-Água	50±4 ^a
80	Etanol-Água	50±2 ^a

¹ Rendimento global;

² Letras iguais indicam ausência de diferença entre os respectivos valores, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Quando a água e a mistura etanol-água foram utilizadas como solventes, a influência da temperatura não foi significativa. Em contrapartida, os extratos obtidos com estes solventes apresentaram rendimento global superior às amostras com uso de etanol, em especial, as amostras obtidas com uso do solvente etanol-água. Os mais altos rendimentos com solventes hidroalcoólicos também foram observados em outros trabalhos.

No estudo de obtenção de compostos bioativos de bagaço de amora-silvestre por ELP, Machado et al (2015) obtiveram os mais elevados resultados para rendimento global ao utilizarem a mistura etanol-água (50:50 v/v) como solvente, em comparação a água e etanol puros. As temperaturas aplicadas foram 60, 80 e 100 °C e a pressão fixa em 100 bar.

Viganó et al (2016) utilizaram a técnica ELP para obtenção de compostos bioativos de casca de maracujá. As condições de extração foram 30, 45 e 60 °C, pressão de 100 bar e etanol como solvente, nas

concentrações de 70, 85 e 100 % (v/v). Os autores observaram uma diminuição significativa nos rendimentos quando elevou-se a concentração de etanol de 70 para 85% e de 85 para 100% (v/v). Segundo Garcia-Mendoza et al (2017); Mustafa; Turner (2011), a utilização de misturas de solventes pode melhorar a eficiência de uma extração. Em uma mistura binária, por exemplo, um dos solventes pode proporcionar uma maior solubilidade ao soluto, ao passo que o outro solvente pode aprimorar a dessorção do soluto pela matriz. Neste contexto, o uso de água como um dos solventes é de grande importância, visto que a água pode romper facilmente as interações matriciais e as ligações matriz-soluto.

De forma geral, a técnica ELP pode ser dividida em duas etapas: a etapa controlada por processos convectivos, seguida por uma etapa controlada por processos difusivos. Na segunda etapa, o soluto de difícil acesso deve ser extraído. Para tanto, as etapas de moagem da matéria-prima, a qual reduz o tamanho de partícula e o controle de temperatura do solvente são de fundamental importância. Todavia, na primeira etapa, ocorre uma fácil solubilização do soluto no solvente devido à fraca interação deste soluto com a matriz, resultado de um pré-tratamento bem sucedido. Com isto, a escolha de um solvente apropriado é determinante não apenas nesta primeira etapa mas no resultado final da extração. (MUSTAFA; TURNER, 2011).

Por apresentar rendimentos estatisticamente superiores às técnicas de EAU e ESC e semelhantes à técnica convencional de Soxhlet, a ELP surge como uma alternativa viável em termos de rendimento global.

4.1.3 Compostos Fenólicos Totais (CFT)

Os compostos fenólicos totais nos extratos da casca de feijoa foram avaliados de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito no item 3.3.1, e os devidos resultados podem ser visualizados através da Tabela 12.

Tabela 12 - CFT de extratos da casca de feijoa obtidos por métodos a baixa e alta pressões.

Método de extração	Solvente/ Cossolvente	T (°C)	P (bar)	C (%) ¹	CFT (mg EAG/g) ^{2,4}	CFT (mg EAG/g) ^{3,4}
Soxhlet	Etanol				62±2 ^{bc}	24,2±0,9 ^b
Soxhlet	Água				39±2 ^d	15,5±0,8 ^c
Soxhlet	Etanol-Água				71±1 ^a	33,6±0,6 ^a
EAU	Etanol				55±3 ^c	8,5±0,4 ^d
EAU	Água				34±2 ^d	16±2 ^c
EAU	Etanol-Água				68,2±0,6 ^{ab}	27,0±0,3 ^b
ESC (E1)	CO ₂ /Etanol	40	200	5	16±2 ^b	0,2±0,0 ^d
ESC (E2)	CO ₂ /Etanol	40	300	5	11±1 ^b	0,2±0,0 ^d
ESC (E3)	CO ₂ /Etanol	55	200	5	13±2 ^b	0,2±0,0 ^d
ESC (E4)	CO ₂ /Etanol	55	300	5	23±4 ^a	0,5±0,1 ^c
ESC (E5)	CO ₂ /Etanol	55	300	10	12±1 ^b	0,7±0,1 ^b
ESC (E6)	CO ₂ /Etanol	55	300	15	11,26±0,07 ^b	0,8±0,0 ^a
ELP	Etanol	40	100		53±2 ^f	15,5±0,6 ^g
ELP	Etanol	55	100		65±4 ^{ef}	22±1 ^f
ELP	Etanol	80	100		71±2 ^e	29,6±0,6 ^e
ELP	Água	40	100		95±7 ^d	39±3 ^d
ELP	Água	55	100		109,8±0,3 ^{bc}	45,3±0,1 ^c
ELP	Água	80	100		105±0 ^{cd}	47,6±0,0 ^c
ELP	Etanol-Água	40	100		121±4 ^{ab}	57±2 ^b
ELP	Etanol-Água	55	100		129±3 ^a	65±1 ^a
ELP	Etanol-Água	80	100		132±7 ^a	66±4 ^a

¹Concentração de cossolvente;

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

³Resultado expresso em mg Equivalente ao Ácido gálico.g⁻¹ de amostra seca;

⁴Letras iguais em uma mesma coluna e em métodos de extração específicos (métodos a baixa pressão, ESC e ELP) indicam ausência de diferença entre os respectivos valores, ao nível de 5% de significância (p < 0,05).

Observa-se um elevado teor de compostos fenólicos totais nos extratos da casca da feijoa.

Tuncel; Yilmaz (2015) avaliaram o teor de compostos fenólicos em extratos de polpa de feijoa obtidos por maceração dinâmica em diferentes temperaturas, solventes, razões solvente: amostra e tempos de extração. Os autores obtiveram rendimento máximo de 18,5 mg EAG.g⁻¹ de amostra seca, a 40 °C, por 3 h, razão solvente:amostra de 60:1 (ml/g) e utilizando a mistura de acetona e água (80:20 v/v) como solvente. Nas mesmas condições, os autores realizaram a extração de casca da feijoa e obtiveram teor de compostos fenólicos de 32,47 mg EAG.g⁻¹, o dobro em comparação ao observado para a polpa da feijoa, indicando uma maior concentração de compostos fenólicos na casca em comparação à polpa da fruta. O resultado observado no trabalho supracitado é semelhante ao observado no presente trabalho, quando o valor no teor de compostos fenólicos totais chegou a 33,6 mg EAG.g⁻¹ amostra seca, ao também utilizar-se uma técnica a baixa pressão, Soxhlet, com a mistura etanol-água como solvente.

Morais et al (2015) avaliaram o teor de compostos fenólicos em frutas tradicionalmente consumidas no Brasil, tais como abacate, banana, maracujá, melancia e mamão. De forma geral, os autores também observaram melhores resultados para a casca em comparação a outras partes da fruta como polpa e semente. Para casca *in natura*, a amplitude encontrada foi de 0,7 a 7,5 mg EAG.g⁻¹ de amostra seca. Já para a casca seca em estufa, a amplitude foi maior, 0,8 a 12,5 mg EAG.g⁻¹ de amostra seca, porém, inferior aos valores obtidos no presente trabalho.

Um fator de fundamental importância em todo processo de extração é o tipo de solvente a ser utilizado. Como os principais antioxidantes encontrados em matrizes vegetais são compostos por polifenóis, os quais apresentam caráter polar, optou-se pelo uso de solventes de polaridade moderada e alta, como o etanol (índice de polaridade = 5,2) e a água (índice de polaridade = 9,0), respectivamente, além de um terceiro solvente caracterizado pela mistura etanol-água (50:50 v/v), com índice de polaridade = 7,1 (MARKOM et al., 2007). Todos os solventes se mostraram eficientes em termos de teor de CFT. Em contrapartida, as extrações com uso de água em Soxhlet e em EAU apresentaram teores de CFT reduzidos em comparação aos demais ensaios.

A alta temperatura de ebulição da água, em comparação às temperaturas de ebulição do etanol e da mistura etanol e água, aliada ao longo tempo de extração, foi determinante na qualidade do extrato proveniente da técnica de Soxhlet. Este fato atesta que, apesar de a

temperatura não ter afetado o rendimento global do extrato, a seletividade foi comprometida, havendo uma diminuição significativa de CFT. A elevação da temperatura favorece os processos de solubilização mas, em contrapartida, permite também a co-extração de compostos muitas vezes indesejáveis, como proteínas e polissacarídeos, reduzindo a seletividade da extração quando a água é utilizada como solvente (SUN-WATERHOUSE et al., 2012).

Na EAU, os processos de cavitação podem produzir efeitos negativos na obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos. Esses efeitos são muitas vezes associados à reação de radicais livres com moléculas do meio reacional. Radicais livres, tais como peróxidos, superóxidos e peróxidos de hidrogênio, são formados no processo de sonicação, a partir de moléculas de água fragmentadas. Esses radicais podem produzir compostos oxidantes ou atuar na ruptura de ligações essenciais para a estabilidade das moléculas bioativas (KIDAK; INCE, 2006; MACHADO et al., 2017). Tal efeito pode ter sido um agravante na diminuição do teor de CFT em EAU quando do uso de água como solvente.

Observou-se que, de forma geral, a mistura dos solventes possibilitou uma maior extração de compostos polares, indicando uma polaridade moderada dos compostos fenólicos presentes na feijoa, uma média entre a polaridade do etanol e a polaridade da água. Efeito semelhante foi observado por Sun-Waterhouse et al (2012), na extração de polifenóis de bagaço de feijoa. Os autores fizeram uso de duas temperaturas de extração, 20 e 50 °C, e em ambos os casos, o teor máximo de CFT foi obtido com uso de etanol-água como solvente. Segundo Wijngaard et al (2012), os compostos fenólicos são moderadamente polares. Para a extração desses compostos, deve-se optar pelo uso de solventes de polaridade também moderada.

De forma geral, os extratos obtidos via ESC apresentaram um baixo teor de CFT, em comparação com os extratos obtidos pelas demais técnicas. Dentre os extratos obtidos pela ESC com 5% de cossolvente, o extrato relativo ao ensaio E4 apresentou os maiores teores de CFT. O ensaio E1, mesmo nas condições mais brandas de pressão e temperatura, 200 bar e 40 °C, respectivamente, apresentou teor de CFT estatisticamente igual aos ensaios E2 e E3. Embora o rendimento global do ensaio E1 tenha sido 68% inferior ao rendimento do ensaio E2 e 73% inferior ao rendimento do ensaio E3, os semelhantes valores no teor de CFT indicam uma possível redução na seletividade de CFT nos extratos quando da não realização dos ensaios nas condições mais altas de pressão

e temperatura. Ainda assim, a ESC com 5% de etanol como cossolvente não foi capaz de extrair grandes teores de CFT.

Segundo Díaz-Reinoso (2006), o uso de etanol como cossolvente pode elevar o teor de CFT no extrato. Monômeros como catequina e epicatequina podem ser separadas da matriz com 5% de etanol, contudo, epicatequina galato e principalmente compostos fenólicos de alto peso molecular como dímeros e oligômeros de proantocianidinas são separados apenas com uma concentração de etanol superior.

Mantendo fixa a melhor condição de pressão e temperatura, 300 bar e 55 °C, respectivamente, em termos de EAG.g⁻¹ de extrato, dois ensaios complementares foram realizados. No ensaio E5, 10% de etanol como cossolvente foi aplicado. Já no ensaio E6, a fração de cossolvente foi elevada para 15%.

O aumento nas concentrações de cossolvente, embora tenha apresentado resultados significativamente superiores, em termos de amostra seca, não resultou em teores de CFT superiores às amostras com 5% de cossolvente, em termos de EAG.g⁻¹ de extrato, evidenciando a baixa seletividade dos ensaios E5 e E6.

Benelli et al (2010) analisaram a influência da adição de cossolvente na ESC de bagaço de laranja, a 250 bar e 50 °C. De fato, a adição de 2% de cossolvente elevou o teor de CFT de 0,178 para 0,595 mg EAG.g⁻¹ de amostra seca. No entanto, os resultados de 7,63 e 14,8 mg EAG.g⁻¹ alcançados com EAU e Soxhlet, respectivamente, todos com uso de etanol, foram significativamente superiores à ESC.

Corroborando com o trabalho de Benelli et al., Espinosa-Pardo et al (2017), avaliaram o teor de CFT de bagaço de laranja obtidos por ESC, em condições de temperatura e pressão ainda mais elevadas. O maior teor de CFT foi obtido nas condições de 350 bar, 60 °C e 6% de etanol como cossolvente. No entanto, o valor de 0,570 mg EAG.g⁻¹ de amostra seca foi significativamente inferior aos 7,650 mg EAG.g⁻¹ de amostra seca obtidos com Soxhlet.

Assim como nos trabalhos supracitados, o uso da ESC nas condições empregadas e com aplicação de etanol como cossolvente, em concentrações de até 15%, não se mostrou eficaz na obtenção de compostos fenólicos da casca da feijoa.

Na técnica ELP, os resultados obtidos pra CFT foram, de modo geral, superiores aos obtidos pelas demais técnicas.

Traçando-se um paralelo entre ELP e Soxhlet, utilizando-se os mesmos solventes e à temperatura de 80 °C, os teores de CFT foram significativamente superiores para a técnica ELP, demonstrando a influência da pressão na recuperação dos compostos desejáveis. A

principal justificativa em utilizar-se altas pressões baseia-se na manutenção do solvente em seu estado líquido em uma temperatura acima de seu ponto de ebulição. Com a elevação da temperatura, a tensão superficial do solvente é reduzida e então, a alta pressão força o solvente a adentrar a matriz, atingindo o soluto e finalmente, extraindo-o (MUSTAFA; TURNER, 2011; RICHTER et al., 1996)

Avaliando-se os diferentes ensaios de ELP, nota-se que o aumento da temperatura se mostrou fundamental na obtenção de CFT, quando se utilizou etanol como solvente; a variação de 15,5 para 29,6 mg EAG.g⁻¹ de amostra seca, com o aumento gradativo na temperatura de extração evidencia isto. Todavia, quando o solvente utilizado foi a água ou a mistura etanol-água, o mesmo efeito não foi observado. Houve um aumento no teor de CFT elevando-se a temperatura de 40 para 55 °C, contudo, não houve variação significativa de 55 para 80 °C.

Outra variável significativa na obtenção de CFT foi o solvente utilizado. O comportamento observado para as técnicas a baixa pressão se repetiu para a ELP, onde a mistura etanol-água se apresentou como o melhor solvente, seguido por água e etanol.

Em misturas de solventes, a água pode agir rompendo a interação matriz-soluto devido à sua elevada polaridade, permitindo assim, uma maior obtenção de soluto (GARCIA-MENDOZA et al., 2017; MUSTAFA; TURNER, 2011).

Haminiuk et al (2011) testaram alguns solventes para a extração de CFT de feijoa. O solvente escolhido, com base em análises prévias, foi a mistura etanol-água (40:60 v/v). O resultado para o teor de CFT foi de 54,42 mg EAG.g⁻¹ de amostra seca, valor semelhante aos observados no presente trabalho.

Machado et al (2015) avaliaram o uso de diferentes solventes, tais como água, água acidificada, etanol e a mistura etanol-água na ELP do bagaço de amora-silvestre. Os melhores resultados para CFT foram obtidos com uso da mistura hidroalcoólica como solvente. Viganó et al (2016) obtiveram os melhores resultados para CFT de bagaço de maracujá em extrato obtido por ELP a 60°C e mistura etanol-água (70:30 v/v).

No trabalho de Garcia-Mendoza et al (2017), os resultados mais promissores de CFT em extrato de palmito-juçara, foram obtidos em ELP com uso de etanol-água como solvente, o mesmo solvente que apresentou os mais elevados teores de CFT em extrato de aspargos obtido por ELP, no estudo de Solana et al (2015) .

Os resultados observados no presente trabalho, em consonância com os demais estudos citados, permitem ratificar o que já fora observado

nas análises a baixa pressão, ou seja, a mistura hidroalcoólica figura como o melhor solvente para a obtenção de CFT de casca de feijoa.

4.1.4 Atividade antioxidante

4.1.4.1 Método de captura do radical DPPH

Os resultados da atividade antioxidante das amostras de casca de feijoa determinados pelo método de captura do radical DPPH e expressos em EC_{50} , são apresentados na Tabela 13.

Com exceção dos extratos obtidos pela ESC, todos os demais extratos de casca de feijoa apresentaram atividade antioxidante doadora de hidrogênio, sendo que para alguns extratos, essa atividade foi superior à observada para o antioxidante sintético Butil-hidroxi-tolueno, amplamente utilizado pela indústria de alimentos (FOOD INGREDIENTS BRASILE, 2009). De acordo com Reynertson; Basile; Kennelly (2005), extratos que apresentem EC_{50} inferiores a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados muito ativos, valores de EC_{50} entre 50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ caracterizam extratos moderadamente ativos, valores de EC_{50} entre 100 e 200 representam extratos levemente ativos e valores de EC_{50} maiores que 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados inativos.

A alta temperatura do método Soxhlet se mostrou eficiente na extração de compostos antioxidantes da casca, sendo o extrato obtido com o solvente etanol-água, o mais eficiente dentre as técnicas a baixa pressão, com EC_{50} igual a $23 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Haminiuk et al (2011) avaliaram a atividade antioxidante do extrato de polpa de feijoa, o qual foi obtido através de agitação por 1 h, seguido de centrifugação por 10 min, tendo etanol 40% como solvente (polaridade = 7,48). O EC_{50} observado foi de $108,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentando atividade antioxidante inferior aos extratos obtidos com etanol 50% (polaridade = 7,1) no presente trabalho. Nota-se que apesar da baixa diferença de polaridade entre os solventes etanol 40% e etanol 50%, a alta temperatura foi preponderante no resultado de EC_{50} .

Bazykina et al (2002) avaliaram os extratos de oxicoco (cranberry) e uva-de-urso, fontes abundantes de compostos fenólicos e, conseqüentemente, conhecidos por sua alta atividade antioxidante, obtidos por maceração (realizada à temperatura ambiente) e Soxhlet. Ao comparar as técnicas de extração, os autores observaram um aumento no rendimento global e na atividade antioxidante em decorrência do aumento na temperatura.

Tabela 13 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos da casca de feijoa pelo método de captura do radical DPPH.

Método de extração	Solvente/ Cossolvente	T (°C)	P (bar)	C (%) ²	EC ₅₀ (µg/mL) ³
Soxhlet	Etanol				67,3,3±0,5 ^c
Soxhlet	Água				73,7±0,8 ^b
Soxhlet	Etanol-Água				23,0±0,6 ^f
EAU	Etanol				91±2 ^a
EAU	Água				57±0,9 ^d
EAU	Etanol-Água				31,8±0,6 ^e
ESC (E1)	CO ₂ /Etanol	40	200	5	967±6 ^c
ESC (E2)	CO ₂ /Etanol	40	300	5	1279±31 ^d
ESC (E3)	CO ₂ /Etanol	55	200	5	1426±9 ^c
ESC (E4)	CO ₂ /Etanol	55	300	5	483±9 ^f
ESC (E5)	CO ₂ /Etanol	55	300	10	1688±14 ^a
ESC (E6)	CO ₂ /Etanol	55	300	15	1528±12 ^b
ELP	Etanol	40	100		89,3±0,7 ^a
ELP	Etanol	55	100		74±5 ^b
ELP	Etanol	80	100		57±2 ^c
ELP	Água	40	100		33,4±0,7 ^d
ELP	Água	55	100		38±2 ^d
ELP	Água	80	100		24±1 ^e
ELP	Etanol-Água	40	100		36±1 ^d
ELP	Etanol-Água	55	100		27,8±0,3 ^e
ELP	Etanol-Água	80	100		17,9±0,8 ^f
BHT ¹					47,0±0,7

¹Butil hidroxi tolueno (antioxidante sintético);

²Concentração de cossolvente;

³Letras iguais em métodos de extração específicos (métodos a baixa pressão, ESC e ELP) indicam ausência de diferença entre os respectivos valores, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

O tempo de extração (6 h) também não afetou significativamente a qualidade antioxidante dos extratos. Extrações com mais de 8 h afetam negativamente a qualidade dos extratos, podendo causar alterações na

composição dos extratos e formação de agentes pró-oxidantes (BAZYKINA et al., 2002).

De forma semelhante ao observado para Soxhlet, a EAU também apresentou resultados positivos para atividade antioxidante em seus extratos, com destaque para o extrato obtido com o solvente etanol-água, enquadrando-se na classe de antioxidantes muito ativos.

Estes resultados atestam que, apesar de terem sido conduzidos à temperatura ambiente, os ensaios de EAU apresentaram resultados promissores devido ao processo de cavitação referente à técnica. O aumento da temperatura poderia elevar ainda mais a extração de compostos antioxidantes.

No estudo conduzido por Poodi et al (2018), os autores avaliaram a influência da temperatura (30, 45 e 60°C), potência e ciclos de pulso no rendimento global e atividade antioxidante em extrato de folha de feijoa. O delineamento experimental de Box-Behnken, com três níveis, foi utilizado para a análise e otimização dos resultados. Por fim, a otimização experimental apresentou a temperatura de 46 °C como a melhor temperatura de extração nas condições empregadas.

Como se sabe, o aumento na temperatura eleva as taxas de difusão, permitindo uma maior migração do solvente na matriz sólida. Contudo, o aumento na temperatura também induz a um aumento na pressão de vapor do solvente. Este aumento na pressão de vapor provoca a entrada de vapor nas bolhas em cavitação, o que faz com que a eficiência do colapso das bolhas diminua, reduzindo assim, os efeitos desejáveis da sonicação (CHEMAT et al., 2017; POODI et al., 2018; TIWARI, 2015). Portanto, para se atingir uma alta eficiência na EAU, é fundamental definir uma temperatura de extração de acordo com os compostos-alvo do extrato.

Dentre todas as técnicas de extração, a ESC apresentou os maiores resultados para EC₅₀. Sabe-se que a utilização do método DPPH está diretamente relacionada com a capacidade de doação de um átomo de hidrogênio por parte do composto antioxidante, inativando assim, o radical livre DPPH. Consequentemente, extratos mais polares, os quais apresentam uma maior concentração de radicais hidroxila, tendem a possuir uma maior capacidade antioxidante (MENSOR et al., 2001). Por esta razão, aumentou-se a concentração do cossolvente etanol de 5 para 10 e 15% (v/v) a fim de avaliar até que ponto a alteração de polaridade do meio foi realmente significativa ou não. Os resultados obtidos com os ensaios E5 e E6 apresentaram valores ainda mais altos para o EC₅₀, indicando a extração de compostos não doadores de hidrogênio.

No estudo conduzido por Serra et al (2010), os autores avaliaram a influência da adição de etanol como cossolvente em ESC de cereja, em

porcentagens de 10 a 100% (v/v). Após uma etapa preliminar em extração sem uso de cossolvente, a matriz passou por uma segunda etapa com uso de cossolventes. O aumento no rendimento foi proporcional à adição da fração etanólica; contudo, acima de 10% de cossolvente, os extratos apresentaram atividade antioxidante reduzida e essa redução se prolongou proporcionalmente ao aumento da fração de cossolvente. Quando a fração etanólica foi de 100%, a atividade antioxidante voltou a subir.

Apesar de os mais altos rendimentos terem sido alcançados nas amostras E5 e E6, a seletividade do extrato, em termos de compostos antioxidantes doadores de hidrogênio, foi prejudicada.

Para a ELP, os baixos valores de EC_{50} observados em todas as condições empregadas indicam alta atividade antioxidante nos referidos extratos, além de caracterizar a técnica como um método de obtenção de extratos com elevado valor agregado.

Os resultados mais promissores foram obtidos sob a mais alta temperatura e novamente, quando a água foi utilizada como solvente, seja na fração de 100% e, principalmente, na fração de 50%. Segundo Oroian; Escriche (2015) o uso da mistura entre água e solvente orgânico facilita o processo de extração, uma vez que, além de manter a alta polaridade do meio, permite que diversos compostos antioxidantes de interesse, os quais são solúveis em apenas um dos dois solventes, sejam extraídos.

Segundo Motohashi et al (2000); Weston (2010), o poder antioxidante da feijoa se deve principalmente à presença de proantocianidinas. Também conhecidas como taninos condensados, as proantocianidinas são compostos fenólicos de alto peso molecular formados por oligômeros e polímeros de flavan-3-óis, dentre eles, a catequina e a epicatequina (ANGELO; JORGE, 2007; ZHAO et al., 2015). A presença de hidroxilas em alta concentração, aliada ao elevado peso molecular característico desses antioxidantes comprovam o fato de solventes de alta polaridade terem apresentado os mais elevados resultados.

4.1.4.2 Método de redução do íon férrico - FRAP

O segundo método utilizado na avaliação da atividade antioxidante dos extratos da casca da feijoa foi o FRAP e seus resultados podem ser observados na Tabela 14.

Primeiramente, nota-se os extratos obtidos pela ESC apresentaram as menores atividades de redução do íon férrico, estando em consonância com o que já fora observado pelo método DPPH. Em contrapartida, os extratos obtidos a baixa pressão apresentaram resultados promissores.

Tabela 14 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos da casca de feijoa pelo método de redução do íon férrico (FRAP).

Método de extração	Solvente/ Cossolvente	T (°C)	P (bar)	C (%) ¹	FRAP ($\mu\text{mol ET/g}$) ^{2,3}
Soxhlet	Etanol				132 \pm 4 ^{bc}
Soxhlet	Água				124 \pm 10 ^c
Soxhlet	Etanol-Água				234 \pm 5 ^a
EAU	Etanol				229 \pm 3 ^a
EAU	Água				142 \pm 3 ^b
EAU	Etanol-Água				146 \pm 5 ^b
ESC (E1)	CO ₂ /Etanol	40	200	5	38 \pm 1 ^b
ESC (E2)	CO ₂ /Etanol	40	300	5	32 \pm 2 ^{bc}
ESC (E3)	CO ₂ /Etanol	55	200	5	34 \pm 4 ^{bc}
ESC (E4)	CO ₂ /Etanol	55	300	5	66 \pm 4 ^a
ESC (E5)	CO ₂ /Etanol	55	300	10	28 \pm 3 ^c
ESC (E6)	CO ₂ /Etanol	55	300	15	15 \pm 5 ^d
ELP	Etanol	40	100		83 \pm 3 ^f
ELP	Etanol	55	100		108,7 \pm 0,4 ^e
ELP	Etanol	80	100		124 \pm 5 ^e
ELP	Água	40	100		322 \pm 9 ^c
ELP	Água	55	100		338 \pm 6 ^b
ELP	Água	80	100		349 \pm 5 ^b
ELP	Etanol-Água	40	100		447 \pm 7 ^a
ELP	Etanol-Água	55	100		312 \pm 8 ^{cd}
ELP	Etanol-Água	80	100		305 \pm 1 ^d

¹Concentração de cossolvente;

²Resultado expresso em μmol Equivalente ao Trolox.g⁻¹ de extrato;

³Letras iguais em métodos de extração específicos (métodos a baixa pressão, ESC e ELP) indicam ausência de diferença entre os respectivos valores, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Fuentes et al (2013) avaliaram a atividade antioxidante de casca de tomate vermelho e casca de tomate verde submetidos à sonicação. Os valores de FRAP de 46,9 e 23,6 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de amostra para tomate vermelho e verde, respectivamente, são inferiores aos observados no presente trabalho.

As diferentes técnicas a baixa pressão apresentaram resultados semelhantes, com destaque para a amostra obtida por EAU com etanol e a amostra obtida por Soxhlet com os solvente etanol-água.

Suttirak; Manurakchinakorn (2014) avaliaram a influência de diversos solventes na extração de compostos antioxidantes redutores em casca de mangostão e concluíram que a mistura etanol-água se apresenta como o solvente mais indicado para o objetivo proposto.

Nos extratos obtidos por ELP, observou-se influência tanto dos diferentes solventes utilizados quanto da temperatura.

Mais uma vez, a adição de água como solvente, seja da forma pura ou na mistura hidroalcoólica, apresentou os resultados mais elevados também para os antioxidantes redutores do íon férrico, assim como fora observado para os antioxidantes doadores de hidrogênio, salientando a eficiência destes solventes na obtenção de antioxidantes da casca da feijoa.

Assim como observado para o método DPPH, o aumento da temperatura resultou em valores mais elevados no conteúdo de antioxidantes redutores de íon férrico, para os extratos obtidos com etanol e para os extratos obtidos com água. Todavia, quando o solvente utilizado foi a mistura hidroalcoólica, o aumento na temperatura de 40 para 55 °C provocou uma diminuição significativa no valor de FRAP, efeito não observado com a elevação de 55 para 80 °C.

O método FRAP identifica o poder de redução de íons metálicos como o Fe^{3+} , por ação de um antioxidante. Uma vez reduzidos os íons metálicos, a taxa de oxidação é reduzida (ANTOLOVICH et al., 2002; BARBOSA et al., 2010). Todavia, uma desvantagem do método FRAP reside no fato de que qualquer substância doadora de elétrons e com potencial redox, pode contribuir para a redução do íon Fe^{3+} , mesmo não sendo uma substância antioxidante, indicando assim, altos mas falsos valores de FRAP (BOROSKI et al., 2015; KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). O elevado valor de FRAP observado para a amostra obtida a 40 °C e com a mistura etanol-água como solvente pode ter sido resultado de uma co-extração de compostos redutores mas não necessariamente antioxidantes.

Portanto, recomenda-se aplicar o FRAP não como o único método de identificação de antioxidantes, mas sempre em conjunto com algum outro método (BOROSKI et al., 2015), tal como o DPPH.

4.1.5 Coeficiente de Correlação de Pearson (r)

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi aplicado como forma de identificação de correlação entre CFT (mg EAG.g⁻¹ de extrato) e EC₅₀ (µg.mL⁻¹) e entre CFT e FRAP (µmol ET.g⁻¹ de extrato). Os valores de correlação e os respectivos valores de p são apresentados na Tabela 15.

Observa-se uma correlação negativa entre CFT e EC₅₀, resultado esperado, visto que, o aumento no teor de compostos fenólicos e o consequente aumento na atividade antioxidante, resulta em diminuição no EC₅₀. O baixo resultado de p (p < 0,05) indica uma alta correlação entre CFT e EC₅₀.

Tabela 15 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre CFT (mg EAG.g⁻¹ de extrato) e os métodos antioxidantes DPPH e FRAP.

Teste conduzido no nível de 5% de significância.

	DPPH ¹		FRAP ²	
	r	p	R	p
ESC	-0,94	5,86 x 10 ⁻³	0,93	7,06 x 10 ⁻³
ELP	-0,92	4,21 x 10 ⁻⁴	0,86	2,69 x 10 ⁻³

¹Calculado em termos de EC₅₀ (µg.mL⁻¹);

²Calculado em termos de (mg ET.g⁻¹ de extrato).

A alta correlação de r, seguida pelos valores de p < 0,05, atesta para a forte correlação entre CFT e DPPH. Segundo Vuotto et al (2000); Weston (2010), a feijoa apresenta elevadas concentrações de ácido ascórbico, um antioxidante não-fenólico e doador de hidrogênio. Embora a presença de ácido ascórbico na feijoa seja, portanto, estabelecida na literatura, os resultados do presente trabalho indicam a predominância dos compostos fenólicos como os principais agentes antioxidantes doadores de hidrogênio.

Os coeficientes de correlação entre CFT e FRAP apresentaram valores de r inferiores aos obtidos pela correlação entre CFT e DPPH, indicando uma correlação mais tênue entre os antioxidantes redutores do íon Fe³⁺ e os compostos fenólicos. Todavia, a possível extração de compostos redutores e não-fenólicos, tais como o próprio ácido ascórbico, podem ter afetado o valor de r.

Os resultados obtidos sugerem que a influência dos compostos fenólicos como agentes antioxidantes foi maior no processo de doação de hidrogênio do que no processo de redução de metais.

O estudo da correlação entre CFT e métodos antioxidantes já foi avaliado em alguns trabalhos: Viganó et al (2016) obtiveram valores de $r > 0,70$ na correlação entre CFT e três métodos antioxidantes (DPPH, FRAP e ORAC) na avaliação de extratos de casca de maracujá obtidos por ELP e métodos a baixa pressão; Machado et al (2015) obtiveram valores de $r > 0,93$ na correlação entre CFT e DPPH e entre CFT e ABTS, na avaliação de extrato de amora-preta obtido por ELP; Denardin et al (2015) obtiveram correlação $r < - 0,75$ e $r > 0,77$ entre CFT e DPPH e CFT e FRAP, respectivamente, para extratos de pitanga, araçá, butiá e amora.

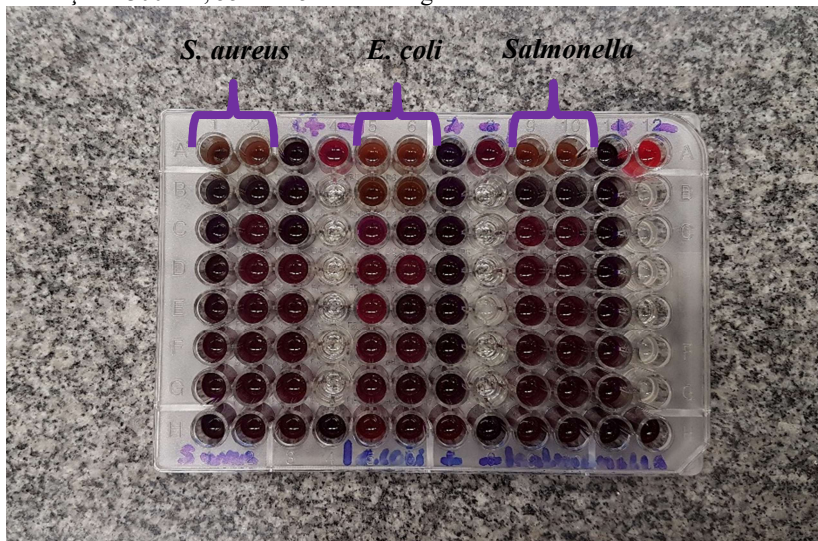
4.1.6 Atividade antibacteriana

Os extratos que apresentaram maior teor de compostos fenólicos, sendo separados por métodos a baixa pressão, ESC e ELP, foram selecionados para avaliação da atividade antibacteriana. São eles: extrato Soxhlet com solvente etanol-água, extrato ESC (300 bar, 55 °C e 5% de etanol como cossolvente) e extrato ELP (100 bar, 55 °C e etanol-água como solvente).

Após 24 h de incubação a 35 °C e adição do indicador resazurina, verificou-se a mudança de coloração em todas as concentrações para os extratos Soxhlet e ELP, indicando a ausência de atividade antibacteriana dos referidos extratos sobre as cepas utilizadas. Em contrapartida, o extrato da ESC apresentou atividade bacteriana, como pode-se observar na Figura 27.

Figura 27 - Microdiluição em placa de 96 poços para extrato da casca de feijoa obtido por ESC.

Condições: 300 bar, 55 °C e 5% etanol-água como cossolvente.



Fonte: o próprio autor.

Através da Figura 27, percebe-se que a segunda concentração, a qual é referente a $6.750 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, apresentou ausência de coloração rosa para todos os micro-organismos testados, sendo definida portanto como a Concentração Mínima Inibitória (CMI).

Os resultados observados são superiores aos obtidos por Vuotto et al (2000) para extrato aquoso da feijoa, onde os autores obtiveram valores de CMI $< 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Basile et al (1997), após triagem do melhor solvente de extração de casca de feijoa, utilizaram a acetona como tal e obtiveram valores de MIC ainda inferiores aos observados por Vuotto: $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para inibição de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

O extrato de casca de feijoa em acetona também apresentou resultados promissores na inibição de crescimento de alguns micro-organismos, tais como *S. epidermidis*, *E. coli* e *Candida albicans*, no estudo conduzido por Motohashi et al (2000).

Nos três estudos supracitados, os autores obtiveram excelentes resultados, contudo, todos os extratos foram obtidos à pressão e temperatura ambientes, o que pode ter sido determinante no resultado

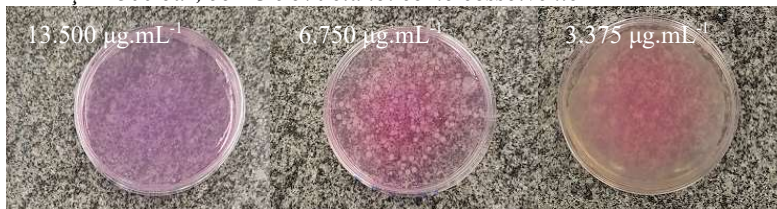
final. Segundo Mosbah et al (2018), dois dos compostos voláteis mais abundantes na feijoa, limoneno e β -cariofileno, são reconhecidos por seu efeito antibacteriano. As altas pressões e/ou temperaturas aplicadas nos processos de extração no presente trabalho podem ter blindado a extração destes terpenos, comprometendo o valor final de CMI.

A segunda etapa de análise antibacteriana consistiu na avaliação da atividade bactericida do extrato. Para tanto, as soluções correspondentes a 6.750 e 13.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram plaqueadas.

Após 24 h de incubação, verificou-se que para as três bactérias testadas, houve crescimento acentuado nas amostras com bactérias Gram negativas em 6.750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e um crescimento menos pronunciado para a bactéria Gram positiva, na mesma concentração. Todavia, na concentração máxima, não foi observado crescimento microbiano de nenhuma das cepas, caracterizando o extrato de ESC a 13.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, não apenas como agente bacteriostático mas também, bactericida. A Figura 28 apresenta as placas devidamente preenchidas com a solução de extrato e o inóculo de *S. aureus*, após 24 h de incubação, para avaliação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) da ESC da casca de feijoa.

Figura 28 - Verificação do crescimento bacteriano em soluções contendo extrato da casca de feijoa obtido por ESC e suspensão de *S. aureus*.

Condição: 300 bar, 55 °C e 5% etanol como cossolvente



Fonte: o próprio autor.

4.1.7 Perfil de compostos fenólicos por HPLC

Através da análise cromatográfica, foi possível identificar os principais compostos fenólicos presentes na casca da feijoa. A Tabela 16 apresenta as informações relativas aos espectros de massas dos padrões e a Tabela 17 apresenta as devidas identificações e quantificações em cada extrato. Os extratos avaliados foram: extrato obtido por Soxhlet (com solvente etanol-água), extrato obtido por ESC (300 bar, 55°C, 5 % etanol como cossolvente) e extrato obtido em ELP (100 bar, 55 °C, etanol-água como solvente).

Tabela 16 - Íon precursor, íon quantitativo e tempos de retenção dos compostos fenólicos identificados nos extratos da casca de feijoa.

Composto padrão	Íon precursor (m/z) Q1	Íon quantitativo (m/z) Q3	Tempo de retenção (min)
Ácido 4-aminobenzoico	135,850	90,5	10,47
Ácido cinâmico	146,886	100,7	11,80
Ácido p-anísico	150,832	105,2	11,34
Vanilina	150,892	132,8	10,42
Ác. protocatecuico	153,019	109,0	6,95
Umbeliferona	160,802	129,5	10,78
Ácido p-cumárico	163,040	119,0	10,46
Ácido vanílico	166,831	148,5	9,65
Ácido gálico	168,836	124,1	3,98
Ácido caféico	178,834	131,3	9,45
Ácido ferúlico	192,856	129,7	10,73
Ácido elágico	300,813	142,5	11,71
Apigenina	268,794	114,8	12,62
Aromadendrina	286,824	123,9	11,29
Catequina	288,853	120,3	8,82
Kaempferol	284,808	62,6	12,34
Eriodictiol	286,823	132,1	11,85
Taxifolina	302,815	120,7	10,70
Quercetina	301,010	149,3	10,84
Isoquercetina	462,901	297,3	10,83
Mircetina	316,875	150,6	11,24
Rutina	609,147	301,0	10,72

Através da Tabela 16, nota-se a ampla gama de compostos fenólicos identificados na casca da feijoa, desde compostos com baixa incidência na natureza, como a vanilina, um aldeído derivado do ácido benzóico, a compostos amplamente distribuídos, tais como os flavonoides, cumarinas e ácidos fenólicos (GIADA, 2013).

O limite de quantificação (LOQ) é a concentração mínima do composto fenólico padrão ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) que permita a sua quantificação nos extratos, em outras palavras, caso o composto fenólico seja identificado no extrato, a concentração média deste composto no extrato precisa ser igual ou superior a LOQ para que ele seja também quantificado. Dos compostos fenólicos identificados nas 3 amostras, 10 deles apresentaram, ao menos, uma concentração média igual ou superior a LOQ.

Dentre os compostos fenólicos identificados, ácido gálico, ácido elágico e ácido ferúlico foram os majoritários, estando presentes em altas concentrações, nos três extratos avaliados.

Tabela 17 - Teor de Compostos fenólicos identificados nos extratos da casca de feijoa e expressos em mg.g^{-1} de extrato.

Composto fenólico	Soxhlet¹	ESC²	ELP³
Ácido 4-aminobenzóico	<LOQ	-	-
Ácido cinâmico	-	<LOQ	-
Ácido p-anísico	-	0,020±0,007	-
Vanilina	0,074±0,054	0,022±0,012	0,015±0,022
Ác. protocatecuico	0,041±0,008	0,032±0,004	0,027±0,006
Umbeliferona	-	<LOQ	<LOQ
Ácido p-cumárico	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ácido vanílico	0,138±0,039	0,182±0,078	0,058±0,016
Ácido gálico	0,240±0,018	0,029±0,013	0,305±0,047
Ácido caféico	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ácido ferúlico	0,258±0,048	0,7840±0,036	0,2530±0,031
Ácido siríngico	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ácido elágico	0,692±0,067	0,516±0,125	0,321±0,011
Aromadendrina	0,019±0,001	0,011±0,002	0,017±0,004
Catequina	-	-	<LOQ
Kaempferol	-	-	<LOQ
Eriodictiol	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Taxifolina	0,045±0,007	0,012±0,006	<LOQ
Quercetina	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Isoquercetina	0,184±0,148	<LOQ	<LOQ
Mircetina	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Rutina	<LOQ	<LOQ	<LOQ

¹Extrato obtido por Soxhlet (etanol-água como solvente);

²Extrato obtido por Extração Supercrítica (300 bar, 55 °C e 5% etanol como cossolvente);

³Extrato obtido por Extração com Líquido Pressurizado (100 bar, 55 °C e etanol-água como solvente);

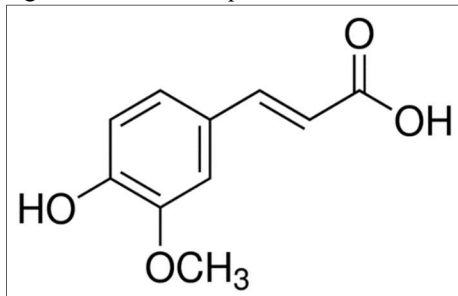
* - composto não identificado;

* <LOQ = concentração média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) inferior ao limite de quantificação.

O ácido ferúlico (Figura 29) é um composto fenólico pertencente à classe dos ácidos hidroxicinâmicos, gerado através do metabolismo da fenilalanina e da tirosina, pela via do chiquimato (GRAF, 1992; PERES, 2015; SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007).

Amplamente encontrado em diversas fontes naturais, como o milho, arroz, trigo, vegetais e frutas, o ácido ferúlico foi extraído pela primeira vez em 1886, a partir da planta *Ferula foetida*, de onde advém a sua denominação (PERES, 2015; SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007).

Figura 29 - Estrutura química do ácido ferúlico.



Fonte: SIGMA-ALDRICH (2018).

O ácido ferúlico, tanto em sua forma *cis* quanto *trans*, apresenta ações terapêuticas comprovadas, tais como ações antineurodegenerativas e cardíacas, anticâncer, antidiabetes, anti-inflamatórias e antimicrobiana (PERES, 2015).

Lin; Yin (2012) apontaram os ácidos ferúlico e elágico, como dois dos principais compostos fenólicos associados aos efeitos anti-diabetes em ratos submetidos à ingestão de extratos aquosos e etanólicos de goiaba, fruto da família das mirtáceas, assim como a feijoa.

Cho; Moon; Park (2000) observaram efeito antibacteriano de ácido ferúlico isolado de extratos de *Hovenia dulcis*, contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas, tais como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além de efeito anti-fúngico contra *Candida albicans*. Ainda assim, a atividade antioxidante é responsável pelos principais benefícios e aplicações do ácido ferúlico (PERES, 2015).

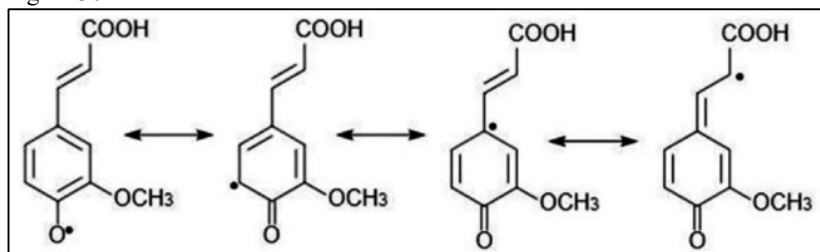
Segundo Graf (1992), qualquer radical livre, ao colidir com o ácido ferúlico, é capaz de abstrair facilmente um átomo de hidrogênio, formando radical fenoxil. Este radical gerado, no entanto, é estabilizado por ressonância, uma vez que o par de elétrons desemparelhado estará presente não apenas ligado ao oxigênio, mas se deslocará por toda a cadeia, como pode ser visualizado na Figura 30. Uma estabilização adicional do radical fenoxil é provida pela extensa conjugação da cadeia insaturada, impossibilitando o radical fenoxil em iniciar ou propagar uma

cadeia oxidativa e direcionando-o à colisão e condensação com um outro radical fenólico, resultando na produção de compostos fenólicos também com ação antioxidante.

No trabalho desenvolvido por Tuncel; Yilmaz (2015), ácido ferúlico foi um dos fenólicos majoritariamente identificados em extratos de casca de feijoa obtidos por maceração.

Poodi et al (2018) avaliaram a influência de técnicas convencionais e não convencionais na obtenção de extratos bioativos de folha de feijoa e concluíram que a bioatividade dos extratos, em termos de atividade antioxidante, foi diretamente proporcional à presença dos compostos fenólicos majoritários, ácido ferúlico e ácido gálico, dois dos compostos majoritários encontrados nos extratos da casca de feijoa no presente estudo.

Figura 30 - Mecanismo de ressonância do radical de ácido ferúlico.



Fonte: Paiva et al (2013).

O ácido gálico (Figura 31a), assim como o ácido elágico (Figura 31b), são ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzóico (estrutura química C6–C1) com elevada bioatividade (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; FERNANDES; SALGADO, 2016; GONÇALVES, 2012).

Fernandes; Salgado (2016) relataram uma série de propriedades bioativas referentes ao ácido gálico, tais como atividade anti-inflamatória, atividade anti-câncer, atividade antimicrobiana e atividade antifúngica, além de atividade antioxidante.

Embora a bioatividade de ambos os ácidos fenólicos seja atestada pela literatura, os ácidos fenólicos raramente se apresentam em sua forma livre na natureza; de modo geral, eles são encontrados na forma conjugada, em especial, a carboidratos (HARBORNE, 1979).

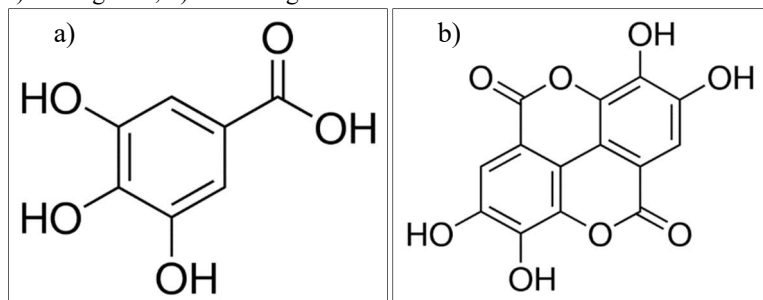
Quando moléculas de glicose ou outro poliol se esterificam com as hidroxilas do ácido gálico, a esta conjugação se dá o nome de galotaninos; se a esterificação ocorrer entre a glicose (ou um poliol) e o ácido

hexaidroxidifenílico, a esta conjugação se dá o nome de elagitaninos (DAI; MUMPER, 2010; HARBORNE, 1979).

Galotaninos e elagitaninos fazem parte da classe dos taninos hidrolisáveis, polímeros fenólicos de alto peso molecular que recebem esta denominação por justamente serem hidrolisados sob tratamento ácido, liberando ácido gálico e ácido elágico, respectivamente (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; KY et al., 2015).

Figura 31 - Estruturas químicas do ácido gálico e do ácido elágico.

a) ácido gálico; b) ácido elágico.



Fonte: SIGMA-ALDRICH (2018)

Como a etapa de hidrólise ácida foi realizada como tratamento prévio à análise cromatográfica, as frações de ácidos gálico e elágico identificadas nas amostras podem indicar a presença de taninos hidrolisáveis nos extratos da feijoa.

Todavia, o elevado teor de compostos fenólicos totais observados nos extratos de feijoa, em comparação aos teores de compostos fenólicos identificados por HPLC, indicam a presença de uma outra classe de polímeros fenólicos, os taninos condensados. Estes recebem esta denominação por não serem hidrolisados por tratamento ácido (KY et al., 2015).

Os taninos condensados, também chamados de proantocianidinas, são oligômeros ou polímeros de flavan-3-ol, produtos do metabolismo do fenilpropanol, unidos através de ligações interflavanas C4→C8 ou C4→C6 (ambas classificadas como proantocianidinas do tipo B). Unidades de flavan-3-ol também podem apresentar um grupamento éter entre C2→O7, sendo denominadas proantocianidinas tipo A (ANGELO; JORGE, 2007; OU; GU, 2014).

As unidades de flavan-3-ol diferenciam-se umas das outras através de alguns outros fatores, tais como: seus substituintes e suas estereoquímicas estruturais. As proantocianidinas mais estudadas têm

como unidades exclusivas os isômeros catequina e epicatequina, sendo chamadas de procianidinas. Aquelas que possuem os isômeros afzelequina e epiafzelequina são chamadas de propelargonidinas. As proantocianidinas que possuem os isômeros galocatequina e epigalocatequina são chamadas de prodelfinidinas (DA PORTO; DECORTI; NATOLINO, 2014; DE BRUYNE et al., 1999; GU et al., 2003).

Pesquisas avaliando o efeito de proantocianidinas na dieta humana, relevaram efeitos benéficos em potencial, entre eles, efeito anti-diabetes, efeito anti-carcinogênico, efeito antiinflamatório, efeito antimicrobiano e efeito antioxidante (DA PORTO; DECORTI; NATOLINO, 2014; MAYER et al., 2008). O poder de inibição de radicais livres por parte das proantocianidinas pode superar o poder de inibição do SO₂, o agente antioxidante comumente utilizado em vinhos, em até 20 vezes (DE GAULEJAC; PROVOST; VIVAS, 1999). Segundo Shi et al (2003), alguns trabalhos demonstram que o efeito antioxidante de oligômeros de proantocianidinas de semente de uva pode chegar a uma eficácia de aproximadamente 20 vezes a eficácia do ácido ascórbico e 50 vezes a eficácia da vitamina E.

De acordo com Weston (2010), a atividade antioxidante da feijoa se deve, em especial, à presença de taninos condensados na fruta e principalmente, na casca, os quais promovem a adstringência peculiar na fruta.

No estudo conduzido por Foo; Porter (1981), foram avaliadas as diferentes classes de taninos na feijoa e como resultado, observou-se a presença exclusiva de taninos condensados, com predominância de procianidinas.

Os resultados do presente trabalho, aliados às informações da literatura, sugerem que grande parcela da bioatividade da feijoa reside na presença dos taninos condensados.

4.2 FOLHA DE FEIJOA

4.2.1 Caracterização da Matéria-Prima

Após colheita e secagem das folhas de feijoa, esta matéria-prima foi avaliada em termos de umidade total.

A umidade observada após a secagem foi de $4,8 \pm 0,2$ % (b.u.). O teor de umidade observado encontra-se na faixa de umidade recomendada para ESC de matrizes vegetais por Pereira; Meireles (2010).

4.2.2 Rendimento global de extração

4.2.2.1 Métodos a baixa pressão

Assim como fora realizado para casca, os métodos de Soxhlet, um método tradicional e EAU, um método não-convencional, foram aplicados também para a folha com o intuito de se verificar a influência de métodos a baixa pressão no rendimento global e compará-los diretamente aos métodos a alta pressão. A Tabela 18 apresenta os referidos resultados para rendimento global de folha de feijoa em métodos a baixa pressão.

Tabela 18 - Rendimento global dos extratos da folha de feijoa obtidos por técnicas a baixa pressão.

Método de Extração	Solvente	Índice de polaridade¹	X₀ (%)^{2,3}
Soxhlet	Etanol	5,2	21±1 ^c
	Água	9,0	28±1 ^a
	Etanol-Água	7,1	27±1 ^{ab}
EAU	Etanol	5,2	4,6±0,3 ^c
	Água	9,0	24,1±0,6 ^{bc}
	Etanol-Água	7,1	24±1 ^{bc}

¹O índice de polaridade da mistura foi calculado a partir da equação $(Ia/100 \times Pa) + (Ib/100 \times Pb)$, onde Ia e Ib são os índices de polaridade dos solventes a e b, respectivamente e Pa e Pb são as porcentagens dos solventes a e b, respectivamente, na mistura (MARKOM et al., 2007);

²Rendimento global;

³Letras iguais indicam ausência de diferença entre os respectivos valores, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Os resultados observados na Tabela 18 apontam para um elevado rendimento global, com valores superiores a 20% para ambas as técnicas e solventes utilizados. A exceção fica por conta da EAU quando do uso de etanol como solvente.

Assim como observado para a casca da feijoa, o uso de etanol como solvente não foi eficaz para a obtenção de um elevado rendimento global. Quando a água foi utilizada em frações de 100% ou até em mistura com etanol, notou-se um aumento significativo no rendimento global.

Poodi et al (2018) avaliaram a influência das variáveis temperatura (°C), pulso proporcional (%) e intensidade ultrassônica ($W.cm^{-2}$) na obtenção de extratos de folha de feijoa por EAU. O solvente utilizado foi etanol, apenas, e os resultados obtidos para rendimento global variaram de 2,7 a 5,6 %, ou seja, uma magnitude similar à observada no presente trabalho. Resultados semelhantes foram obtidos por Moura et al (2012) na avaliação do rendimento global de folha de goiaba, com rendimentos de 21 e 5,9% em Soxhlet e EAU, respectivamente, utilizando etanol como solvente.

Mazzutti et al (2017) observaram um aumento de 4,5 para 16,7% de rendimento em amostra de *Plantago major*, quando da substituição de etanol por etanol-água (30:70 v/v) como solvente em EAU. Os autores repetiram as mesmas condições na obtenção de extratos de outra folha do gênero *Plantago*, a *Plantago lanceolata* e, de forma semelhante, o rendimento observado passou de 2,88 para 23%, apenas alterando-se o solvente alcoólico pela mistura hidroalcoólica.

No trabalho desenvolvido por Lasta (2017), os valores de rendimento global observados após obtenção de extratos de folha de beterraba por EAU, variaram de 4 para valores superiores a 30% de rendimento, apenas com a substituição do solvente etanol pelos solventes água e a mistura etanol-água.

Para a técnica de Soxhlet, a mesma amplitude de variação não foi observada. Ainda assim, embora a técnica tenha apresentado rendimentos superiores a 20% em todos os ensaios, nota-se uma elevação significativa de 6 e 7% quando da substituição de etanol por etanol-água (50:50 v/v) e água, respectivamente, como solventes, indo de acordo com o observado na EAU. Este mesmo efeito foi observado no trabalho desenvolvido por Bimakr et al (2011), onde os autores obtiveram variação de 21,8 para 25,7% de rendimento global devido à substituição de etanol (99,5%) por etanol (70%) como solvente em Soxhlet, na extração de compostos bioativos de folha de menta.

Os resultados dos trabalhos supracitados salientam a eficácia da água e da mistura hidroalcoólica como solventes na obtenção de extratos

de matrizes vegetais. Os resultados do presente trabalho não só corroboram com os demais trabalhos apresentados, como também indicam a predominância de compostos de polaridade elevada nos extratos de feijoa, ratificando o que já fora observado por Tuncel; Yilmaz (2015) e Weston (2010).

4.2.2.2 Extração Supercrítica (ESC)

No capítulo 4.1.2.2, observou-se que a ESC da casca da feijoa, sem uso de cossolvente, resultou em rendimentos muito baixos, inferiores a 1%. Com isso, os demais experimentos foram conduzidos sob diferentes pressões e temperaturas, mas sempre com a aplicação de um cossolvente, em diferentes concentrações (5, 10 e 15%).

Assim como para a casca, realizou-se uma ESC prévia para a folha da feijoa a 300 bar e 55 °C. Todavia, o rendimento inferior a 1%, após 4 h de extração, inviabilizou a execução dos ensaios sem uso de cossolvente. Portanto, com base nos resultados mais altos de rendimento global e compostos fenólicos totais (mg EAG.g⁻¹ de amostra seca) observados para a ESC da casca da feijoa (4.1.3), utilizaram-se as mesmas condições de pressão, temperatura e fração de cossolvente, 300 bar, 55 °C e 15% (m/m), respectivamente, para a obtenção de extrato de folha de feijoa. O tempo de extração também foi o mesmo utilizado para a outra matéria-prima: 3,5 h. A diferença para o ensaio realizado com a casca fica por conta do cossolvente utilizado: etanol-água (50:50 v/v). Este cossolvente foi escolhido devido aos mais elevados resultados observados nos extratos da casca, tanto para rendimento quanto para atividade antioxidante.

O resultado observado para o rendimento global (%), após 3,5 h de extração, foi de 32,96±1,45, um aumento de aproximadamente 500 % em comparação ao melhor ensaio de ESC com a casca da feijoa, em termos de rendimento global. O resultado também é superior aos rendimentos obtidos pelas técnicas a baixa pressão, evidenciando a mistura etanol-água como cossolvente eficaz na obtenção de extratos da folha da feijoa. Uma ampla variação de 4,15 para 21,6 % de rendimento foi observada quando o cossolvente etanol foi substituído por etanol-água, na obtenção de extratos de espiga de milho, no trabalho desenvolvido por Monroy et al (2016).

Lasta (2017) observou uma variação de 4 para 14 % no rendimento global de extrato de folha de beterraba, ao substituir o cossolvente etanol pela mistura etanol-água (90:10 v/v), sendo 10 % a fração de cossolvente.

4.2.2.3 Extração com Líquido Pressurizado (ELP)

4.2.2.3.1 Cinética

Antes da realização dos ensaios propriamente ditos, uma cinética foi desenvolvida, a fim de se ter um conhecimento maior acerca da matéria-prima em estudo, além de se determinar o tempo necessário de extração em cada ensaio. Os parâmetros da Regressão Linear por Partes, bem como a CGE, são apresentados na Tabela 19 e na Figura 32, respectivamente.

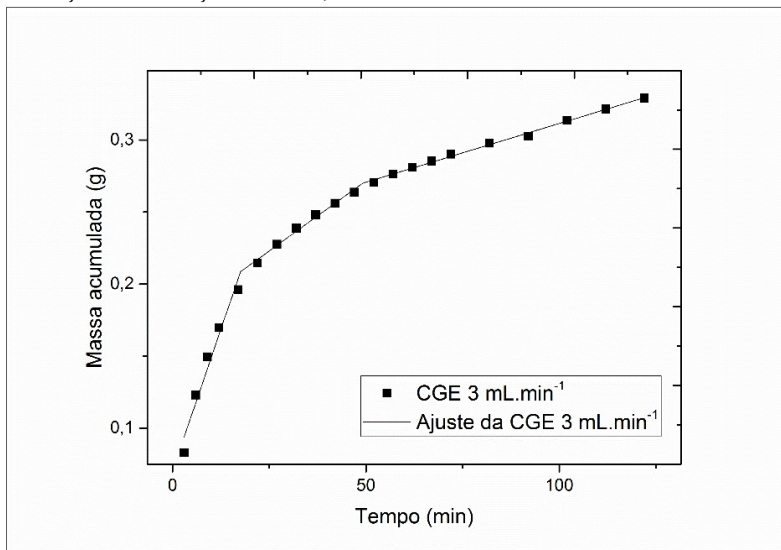
Tabela 19 - Parâmetros do modelo de Regressão Linear por Partes da ELP. Ajuste realizado com base na CGE da ELP da folha de feijoa a 100 bar, 40 °C e 3,0 mL.min⁻¹.

Parâmetros	
a1 (g)	7,02 x 10 ⁻²
k1 (g.min ⁻¹)	7,88 x 10 ⁻³
t _{CER} (min)	17,55
k2 (g.min ⁻¹)	1,95 x 10 ⁻³
t _{FER} (min)	49,15
k3 (g.min ⁻¹)	8,14 x 10 ⁻⁴
R ²	0,9950

Através dos parâmetros do modelo, nota-se que a curta duração da etapa CER (t_{CER} = 17,55 min) é justificada pela elevada taxa de extração nesse período, a qual resultou em um rendimento de 58%.

Como esperado, a etapa FER apresentou uma taxa de extração reduzida, visto que nessa etapa, o soluto de fácil acesso já foi extraído em sua maior parte e então, processos difusivos passam a ser observados. A taxa de extração nessa etapa foi de 1,95 x 10⁻³ g.min⁻¹, resultando em um rendimento acumulado de 83,3%. O tempo de encerramento se deu em 49,15 min. Com isso, o tempo de 50 min foi adotado para os ensaios propriamente ditos.

Figura 32 - CGE da folha de feijoa obtida por ELP.
Condições de extração: 100 bar, 40 °C e vazão de 3 mL.min⁻¹.



4.2.2.3.1 Ensaios

Os resultados para rendimento global da ELP da folha da feijoa são apresentados na Tabela 20.

Os rendimentos observados permitem traçar alguns parâmetros críticos no processo: temperatura, solvente e regime de extração.

Assim como observado para a casca (4.1.2.3), o aumento de temperatura resultou em rendimentos superiores, evidenciando a importância deste parâmetro no rendimento final do extrato, visto que o aumento de temperatura favorece os processos de solubilização e transferência de massa. Com exceção do regime estático com uso da mistura etanol-água como solvente, todos os demais ensaios resultaram em aumento significativo de rendimento com a elevação de temperatura de 40 para 80 °C.

A relevância do solvente utilizado, assim como observado para as técnicas a baixa pressão, repetiu-se na técnica ELP. Segundo Turner; Waldebäck (2010), a escolha do solvente adequado é a etapa prévia mais importante em uma ELP, seguida pela definição da temperatura de trabalho. De forma geral, os menores rendimentos foram obtidos quando do uso de etanol como solvente. Água e a mistura etanol-água

apresentaram rendimentos estatisticamente semelhantes, todavia, com uma tendência a rendimentos superiores para a mistura hidroalcoólica.

Tabela 20 - Rendimento global dos extratos da folha de feijoa obtidos por ELP. Rendimento em regime dinâmico (3 mL.min⁻¹) e estático (2 x 25 min).

Método (Regime de extração)	Solvente	Temperatura (°C)	X₀ (%)^{1,2}
ELP (din)	Etanol	40	7,9±0,6 ^g
ELP (din)	Etanol	80	17±1 ^{ef}
ELP (din)	Água	40	27,62±0,01 ^{bc}
ELP (din)	Água	80	31±1 ^{ab}
ELP (din)	Etanol-Água	40	30±3 ^b
ELP (din)	Etanol-Água	80	35,1±0,2 ^a
ELP (est)	Etanol	40	7,9±0,2 ^g
ELP (est)	Etanol	80	14,6±0,9 ^f
ELP (est)	Água	40	22±1 ^{de}
ELP (est)	Água	80	25,3±0,5 ^{cd}
ELP (est)	Etanol-Água	40	28,1±0,3 ^{bc}
ELP (est)	Etanol-Água	80	29,8±0,7 ^{bc}

¹Rendimento global

²Letras iguais indicam ausência de diferença entre os respectivos valores, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Fernández-Ponce et al (2015) avaliaram a influência da temperatura e da fração de etanol como parâmetros da ELP para obtenção de extratos de folha de manga (*Mangifera indica* L.) ricos em antioxidantes fenólicos. Os autores observaram que o aumento no rendimento global foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura (60 – 100 °C). Da forma semelhante, a mistura de solventes também interferiu significativamente no rendimento global: a mistura etanol-água apresentou os mais altos resultados, ao passo que o uso de etanol 100% apresentou os mais baixos rendimentos.

A eficiência de misturas de solvente reside no fato de que, enquanto um dos solventes pode solubilizar mais facilmente um determinado soluto, o outro pode facilitar a dessorção deste soluto pela matriz. Em termos econômicos e sustentáveis, o uso de misturas hidroalcoólicas são sempre mais interessantes que o solvente orgânico isoladamente (MUSTAFA; TURNER, 2011).

De forma geral, os diferentes regimes, dinâmico e estático, não apresentaram diferença significativa quando comparados diretamente entre si. Esta semelhança, em termos de rendimento, indica uma alta taxa de transferência de massa por difusão, característica fenomenológica do regime estático, uma vez que a matriz vegetal e o solvente em excesso são mantidos em contato sem estabelecimento de vazão. A adição de um novo solvente a cada ciclo eleva o gradiente de concentração entre a matriz vegetal e este solvente. Quanto maior o gradiente de concentração, maior o fluxo mássico, de acordo com a Primeira Lei de Fick (RICHTER et al., 1996).

Do ponto de vista econômico e ambiental, os resultados de rendimento obtidos para o regime estático surgem como uma boa nova, visto que aproximadamente 30 mL de solvente foram necessários para preencher o leito. Ao final da extração, um volume de 60 mL de solvente foi utilizado, uma economia de 150 % frente ao volume utilizado tanto no regime dinâmico quanto no método de Soxhlet.

Os resultados de rendimento global, embora bastante promissores, são inconclusivos em termos de qualidade do extrato. As análises a seguir permitirão compreender até que ponto estes altos rendimentos correspondem à alta seletividade.

4.2.3 Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A Tabela 21 apresenta os teores de CFT em extratos de folha de feijoa, obtidos por técnicas a baixa e alta pressões.

Os resultados observados para baixa pressão seguem uma tendência também observada no teor de CFT da casca da feijoa (4.1.3): solvente etanol-água com resultados superiores aos demais solventes e a técnica de Soxhlet sobressaindo-se à EAU.

Ebrahimzadeh et al (2008) avaliaram a influência de diferentes solventes sobre o teor de CFT em extratos de folha de feijoa obtidos por percolação à temperatura ambiente. Os teores observados foram de 92,09 e 44,17 mg EAG.g⁻¹ de extrato, para o extrato aquoso e metanólico, respectivamente. A mesma técnica de percolação foi aplicada por Beyhan; Elmastas; Gedikli, (2010), onde o teor de CFT em extrato metanólico de folha de feijoa, obtido à temperatura ambiente, foi de 68,69 mg EAG.g⁻¹ de extrato.

Ambos os trabalhos supracitados, ao serem diretamente comparados com o presente trabalho, tornam evidente não apenas a importância do solvente mas também, o efeito das altas temperaturas na extração dos compostos fenólicos.

Tabela 21 - CFT dos extratos da folha de feijoa obtidos por técnicas a baixa e alta pressões.

Método de extração	Solvente/ Cossolvente	T (°C)	P (bar)	CFT (mg EAG/g) ^{2,4}	CFT (mg EAG/g) ^{3,4}
Soxhlet	Etanol			75±6 ^c	16±1 ^d
Soxhlet	Água			97±4 ^b	27±1 ^b
Soxhlet	Etanol-Água			113±4 ^a	30±1 ^a
EAU	Etanol			92±3 ^b	4,2±0,1 ^e
EAU	Água			89,2±0,0 ^b	21,5±0,0 ^e
EAU	Etanol-Água			88±3 ^b	21,1±0,8 ^e
ESC ¹	CO ₂ / Etanol-Água	55	300	162±4 ^{abc}	53,3±1,4 ^b
ELP (din)	Etanol	40	100	157±0 ^{abcd}	12,4±0,0 ⁱ
ELP (din)	Etanol	80	100	140,3±0,7 ^f	24,4±0,1 ^g
ELP (din)	Água	40	100	152±6 ^{bcd}	42±2 ^d
ELP (din)	Água	80	100	158,0±5,1 ^{abcd}	48,6±1,6 ^e
ELP (din)	Etanol-Água	40	100	163±2 ^{ab}	49,3±0,7 ^e
ELP (din)	Etanol-Água	80	100	165,8±2,2 ^a	58,2±0,8 ^a
ELP (est)	Etanol	40	100	150±5 ^{cdef}	11,8±0,4 ⁱ
ELP (est)	Etanol	80	100	143,8±6,1 ^{def}	21,1±0,9 ^h
ELP (est)	Água	40	100	146±3 ^{def}	31,7±0,7 ^f
ELP (est)	Água	80	100	155±5 ^{abcde}	39,2±1,3 ^e
ELP (est)	Etanol-Água	40	100	155±3 ^{abcd}	43,7±0,9 ^d
ELP (est)	Etanol-Água	80	100	165±2 ^a	49,3±0,5 ^e

¹Extração Supercrítica + 15% Etanol-Água (50:50 v/v) como cossolvente;

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

³Resultado expresso em mg Equivalente ao Ácido gálico.g⁻¹ de amostra seca;

⁴Letras iguais em uma mesma coluna e em métodos de extração específicos (métodos a baixa pressão e métodos a alta pressão) indicam ausência de diferença entre os respectivos valores, ao nível de 5% de significância (p < 0,05).

No extrato obtido pela ESC, obteve-se um elevado teor de CFT. Todavia, quando o rendimento global é considerado, este resultado é ainda mais proeminente, 53,3 mg EAG.g⁻¹ de amostra seca. Este teor de CFT é inferior apenas ao extrato obtido por ELP, nas condições de 80 °C, em regime dinâmico e com uso da mistura etanol-água como solvente. Esta constatação, mais uma vez, salienta a eficácia da mistura

hidroalcoólica na obtenção de compostos fenólicos da feijoa, mesmo atuando como cossolvente em uma extração supercrítica.

Ao avaliar os resultados da ELP, é possível estabelecer a influência de três parâmetros de processo no teor de CFT da folha de feijoa. São eles: temperatura, solvente e pressão.

A elevação da temperatura resultou em um aumento no teor de CFT. Embora algumas reações indesejáveis, tais como a diminuição da seletividade e a degradação de compostos de interesse, possam ocorrer em decorrência do uso de altas temperaturas de extração (ONG; CHEONG; GOH, 2006), os resultados da Tabela 21 indicam que estas reações não ocorreram de modo significativo no presente trabalho.

Os diferentes solventes aplicados também foram cruciais na obtenção de extratos com maiores teores de CFT. De forma geral, os extratos obtidos com solventes de alta polaridade como água e principalmente, a mistura etanol-água, apresentaram resultados mais promissores, corroborando com os resultados obtidos para rendimento global.

Ao comparar em resultados observados por ELP com os resultados obtidos por Soxhlet, nota-se a importância não apenas da temperatura e do tipo de solvente, mas também, da pressão na obtenção de CFT. O uso de pressões elevadas pode romper as células da matriz vegetal, aumentando a transferência de massa da matriz para o solvente. As altas pressões também evitam a formação de bolhas de ar na matriz, as quais, quando presentes, evitam que o solvente atinja o soluto. Portanto, a influência da pressão, muitas vezes negligenciada, pode ser fundamental no incremento de solubilidade e nos processos de desorção do soluto a partir da superfície e dos sítios ativos da matriz vegetal (MUSTAFA; TURNER, 2011; ROSTAGNO et al., 2009).

Essa correlação positiva entre pressão e teor de CFT foi bastante evidente no trabalho conduzido por Fernández-Ponce et al (2015), onde os autores observaram um aumento significativo no teor de CFT em extratos de folha de manga obtidos por ELP, com os mesmos solventes utilizados no presente trabalho, contudo, com um aumento de pressão: 40, 120 e 200 bar.

A técnica ELP também foi utilizada por Garmus et al (2014) para obtenção de compostos fenólicos da folha de pitangueira. Em seu estudo, os autores obtiveram teores de CFT de 163,5 e 152,2 mg EAG.g⁻¹ de extrato, com uso de etanol e água, respectivamente, como solventes. Os resultados são semelhantes aos observados no presente estudo. No entanto, as condições de pressão e temperatura aplicadas no trabalho de Garmus et al, 60°C e 400 bar, respectivamente, além do longo tempo de

extração (360 min) e solvente consumido (180 mL) são mais acentuadas que as condições utilizadas neste estudo.

Uma desvantagem do regime estático de extração, em comparação ao regime dinâmico, é a saturação do solvente. Em outras palavras, é possível que mesmo após estabelecida uma concentração de equilíbrio, uma parcela significativa de soluto ainda esteja presente na matriz vegetal (ONG; CHEONG; GOH, 2006). Uma solução para esta limitação é a aplicação de mais de um ciclo de extração, possibilitando a renovação do solvente (MUSTAFA; TURNER, 2011). Quando comparados os regimes de extração, para uma mesma temperatura e tipo de solvente, nota-se que os teores de CFT são estatisticamente semelhantes. Embora os rendimentos obtidos pelo método dinâmico tenham sido estatisticamente superiores, os teores de CFT, quando avaliados em termos de extrato bruto, são equivalentes, indicando uma alta seletividade para o método estático em comparação ao método dinâmico. Outra vantagem do método estático reside em termos econômicos pois, apesar de os tempos de extração terem sido os mesmos em ambos os métodos, o volume de solvente utilizado no método dinâmico chegou a 150 mL, ao passo que no método estático, este volume foi de aproximadamente 60 mL, o que representa uma economia de 150 % em volume de solvente.

Traçando-se uma comparação direta com resultados de teor de CFT observados para a casca da feijoa (4.1.3), é possível notar que o teor de CFT na folha é levemente superior ao observado para a casca.

Lagha-Benamrouche; Madani (2013) avaliaram o teor de CFT em 7 variedades de casca e folhas de laranja, sendo seus respectivos extratos obtidos por maceração, à temperatura ambiente. Os resultados apresentaram teor de CFT superior para a folha em algumas variedades e inferior para outras, não permitindo obter conclusão acerca do maior teor de CFT nestas duas matérias-primas. A mesma conclusão pode ser trazida para a feijoa. Ou seja, embora a casca apresente teores mais acentuados de compostos bioativos em comparação com a polpa da fruta (WESTON, 2010), não há estudos, até o momento, que apresentem um comparativo direto entre casca e folha de feijoa.

Segundo Carbone et al (2011), um comparativo direto entre dois órgãos de uma mesma variedade é complexo, uma vez que outros fatores, tais como a época da colheita e condições pedoclimáticas devem ser sempre levadas em consideração.

4.2.4 Atividade antioxidante

4.2.4.1 Método de captura do radical DPPH

Os resultados referidos à atividade antioxidante pelo método DPPH são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos da folha de feijoa pelo método de captura do radical DPPH.

Método de extração	Solvente/ Cossolvente	T (°C)	P (bar)	EC ₅₀ (µg/mL) ³
Soxhlet	Etanol			12,71±0,08 ^a
Soxhlet	Água			8,7±0,1 ^c
Soxhlet	Etanol-Água			8,6±0,3 ^c
EAU	Etanol			11,0±0,2 ^b
EAU	Água			13±0,3 ^a
EAU	Etanol-Água			9,1±0,5 ^c
ESC ¹	CO ₂ / Etanol-Água	55	300	10,6±0,1 ^{gh}
ELP (din)	Etanol	40	100	12,6±0,2 ^f
ELP (din)	Etanol	80	100	25,4±0,4 ^b
ELP (din)	Água	40	100	20,0±0,4 ^c
ELP (din)	Água	80	100	9,90±0,05 ^h
ELP (din)	Etanol-Água	40	100	11,1±0,5 ^g
ELP (din)	Etanol-Água	80	100	9,5±0,2 ^h
ELP (est)	Etanol	40	100	14,4±0,3 ^e
ELP (est)	Etanol	80	100	15,7±0,4 ^d
ELP (est)	Água	40	100	28,1±0,7 ^a
ELP (est)	Água	80	100	5,0±0,2 ^j
ELP (est)	Etanol-Água	40	100	11,1±0,6 ^g
ELP (est)	Etanol-Água	80	100	8,4±0,2 ^k
BHT ²				47,0±0,7

¹Extração Supercrítica + 15% Etanol-Água (50:50 v/v) como cossolvente;

²Butil-hidroxi-tolueno (antioxidante sintético);

³Letras iguais em métodos de extração específicos (métodos a baixa pressão e métodos a alta pressão) indicam ausência de diferença entre os respectivos valores, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Ao observar os resultados da Tabela 22, é possível notar que todos os extratos apresentaram valores de EC_{50} inferiores a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo incluídos na categoria de antioxidantes muito ativos na classificação de Reynertson; Basile; Kennelly (2005), conforme apresentado em 4.1.4.1. Outro ponto a se destacar é que todos os extratos apresentaram valores de EC_{50} inferiores a $47 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o EC_{50} relativo ao BHT, um antioxidante sintético comumente utilizado pela indústria de alimentos. Portanto, os extratos de folha de feijoa obtidos pelos métodos a baixa e alta pressões, aplicados no presente trabalho, surgem como uma interessante alternativa na substituição de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais.

Ao avaliar os resultados das técnicas a baixa pressão, é possível notar que, mais uma vez, a mistura etanol-água se destacou como o melhor solvente em termos de captura do radical DPPH, ao apresentar o menor valor de EC_{50} ($8,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para o extrato obtido por Soxhlet. Este valor é estatisticamente semelhante a $9,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, valor observado em extrato obtido por EAU, com o mesmo solvente e semelhante a $8,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ obtido por Soxhlet com uso de água.

Fernández-Ponce et al (2015) avaliaram a influência dos solventes etanol, água e a mistura etanol-água (50:50 v/v) na extração de antioxidantes da folha de manga pelo método de Soxhlet. Uma elevada atividade antioxidante foi observada nos extratos obtidos com os solventes puros, todavia, o extrato obtido com a mistura hidroalcoólica apresentou atividade antioxidante ainda superior aos demais extratos. O mesmo comportamento foi observado por Turkmen; Sari; Velioglu (2006), onde a mistura hidroalcoólica foi o melhor solvente para antioxidantes doadores de hidrogênio de chá mate. Alguns solventes orgânicos como o próprio etanol puro, metanol, acetona e N, N – dimetilformamida, além da água, foram utilizados.

No estudo de Sasidharan; Menon (2011), os autores avaliaram a influência de diferentes solventes e técnicas de extração na obtenção de compostos antioxidantes doadores de hidrogênio na folha de caril, uma árvore tradicional na Índia e sul da Ásia. Esta matéria-prima é conhecida por apresentar diversas propriedades bioativas, tais como atividade anti-inflamatória, antidiabética, antioxidante, entre outras. Após a utilização de alguns solventes orgânicos e água, observou-se que tanto para a técnica de maceração quanto para a técnica de Soxhlet, a mistura etanol-água (50:50 v/v) apresentou os mais altos valores de atividade antioxidante.

Para os métodos a alta pressão, nota-se que os extratos obtidos com a presença de água, seja ela pura ou na mistura com etanol, obtiveram os melhores resultados, especialmente com a elevação da temperatura.

Enquanto nos métodos a baixa pressão, o efeito da temperatura não foi demasiadamente significativo, o mesmo não se pode dizer do método ELP. Observa-se que o incremento da temperatura exerceu efeito positivo na atividade antioxidante, ou seja, com o aumento de 40 para 80 °C, houve um aumento estatisticamente significativo na atividade antioxidante. O valor mais baixo aqui ficou por conta do extrato obtido a 80 °C, com uso de água e método estático de extração (5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), seguido pelo extrato obtido também a 80 °C, com uso da mistura etanol-água e método estático de extração (8,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

4.2.4.2 Método de redução do íon férrico - FRAP

A avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP revela a capacidade de um extrato em reduzir o íon férrico (Fe^{3+}), um pró-oxidante, para íon ferroso (Fe^{2+}), através da doação de um elétron.

A atividade antioxidante dos extratos de folha de feijoa obtidos por métodos a baixa e alta pressões e determinados pelo método FRAP é apresentada na Tabela 23.

Ao observar os métodos a baixa pressão, nota-se que a alta temperatura e o longo tempo de extração, características do método de Soxhlet, não foram cruciais para o estabelecimento de uma maior atividade antioxidante. Em contrapartida, o solvente etanol-água se apresentou, mais uma vez, como a melhor escolha em termos de atividade antioxidante. Os valores estatisticamente semelhantes de 285 e 280 $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$ para os extratos obtidos com Soxhlet e EAU, ratificam o uso da mistura hidroalcoólica como um solvente de alta eficácia na solubilização de compostos antioxidantes da folha de feijoa. Os resultados obtidos são superiores aos observados por Lasta (2017) em extrato de folha de beterraba obtida por Soxhlet e EAU, com os solventes etanol-água (50:50 v/v) e semelhante a 205 $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$ observado por Silva et al (2013) em extrato aquoso de folha de maracujá.

Partindo para os métodos a alta pressão, a extração supercrítica apresentou resultado semelhante às técnicas ELP, contrastando com o que fora observado para a casca da feijoa (4.1.4.2), muito em decorrência das próprias características da matéria-prima (a atividade antioxidante observada para a casca foi, de modo geral, inferior à observada para a folha) mas também, pelo solvente utilizado: para a casca, etanol foi utilizado, ao passo que para a folha, a mistura hidroalcoólica foi aplicada.

Tabela 23 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos da folha de feijoa pelo método de redução do íon férrico (FRAP).

Método de extração	Solvente/ Cossolvente	T (°C)	P (bar)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g}$) ²
Soxhlet	Etanol			261 \pm 4 ^c
Soxhlet	Água			269 \pm 2 ^{bc}
Soxhlet	Etanol-Água			285 \pm 9 ^a
US	Etanol			278 \pm 5 ^{ab}
US	Água			267 \pm 2 ^{bc}
US	Etanol-Água			280 \pm 4 ^a
ESC ¹	CO ₂ / Etanol-Água	55	300	529 \pm 8 ^{ab}
ELP (din)	Etanol	40	100	250 \pm 10 ^f
ELP (din)	Etanol	80	100	216 \pm 4 ^g
ELP (din)	Água	40	100	486 \pm 18 ^{de}
ELP (din)	Água	80	100	499 \pm 15 ^{cd}
ELP (din)	Etanol-Água	40	100	527 \pm 6 ^{ab}
ELP (din)	Etanol-Água	80	100	553 \pm 5 ^a
ELP (est)	Etanol	40	100	517 \pm 5 ^{bc}
ELP (est)	Etanol	80	100	248 \pm 9 ^f
ELP (est)	Água	40	100	473 \pm 1 ^e
ELP (est)	Água	80	100	523 \pm 5 ^{bc}
ELP (est)	Etanol-Água	40	100	533 \pm 4 ^{ab}
ELP (est)	Etanol-Água	80	100	471 \pm 7 ^e

¹Extração Supercrítica + 15% Etanol-Água (50:50 v/v) como cossolvente;

²Letras iguais em métodos de extração específicos (métodos a baixa pressão e métodos a alta pressão) indicam ausência de diferença entre os respectivos valores, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

No método ELP, percebe-se um aumento significativo na atividade antioxidante dos extratos quando o solvente utilizado foi a água ou, em especial, a mistura hidroalcoólica, seguindo o mesmo comportamento observado no método DPPH (4.2.4.1). Os resultados de 250 e 216 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ para os extratos etanólicos obtidos a 40 e 80 °C, respectivamente, são semelhantes ao valor de 275 $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ observado por Lasta (2017) para extrato etanólico de folha de beterraba obtido por ELP a 100 bar, 40 °C e 3 mL.min⁻¹, vazão idêntica à aplicada no presente

trabalho. Os resultados do presente trabalho aumentaram com o uso de água como solvente e chegam ao mais alto resultado ($553 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$) quando do uso de etanol-água como solvente, na temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Machado et al (2017) avaliaram a influência dos solventes água e a mistura hidroalcoólica na extração de antioxidantes de grumixama por ELP, nas condições de 100 bar, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e regime dinâmico. As mais elevadas atividades antioxidantes, avaliadas tanto pelo método FRAP quanto pelo método DPPH, foram obtidas quando do uso da mistura hidroalcoólica. Extrações com uso de solventes moderadamente polares, como é o caso da mistura etanol-água, alcançam resultados mais proeminentes em termos de atividade antioxidante devido ao fato de uma ampla variedade de compostos orgânicos, desde simples cadeias carbônicas a compostos polifenólicos, terem a facilidade de se solubilizar nestes solventes (MACHADO et al., 2017), ratificando a versatilidade da mistura.

Os diferentes regimes de extração não apresentaram diferença evidente entre os resultados, muito embora o mais elevado resultado tenha sido obtido pelo método dinâmico a $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pulido; Bravo; Saura-Calixto (2000) avaliaram a capacidade de diversos compostos fenólicos em reduzir o íon pró-oxidante Fe^{3+} a Fe^{2+} , através do método FRAP. Os autores observaram que os menores valores em EC_{50} foram obtidos para ácido tânico, quercetina, ácido gálico, ácido caféico, rutina e catequina, todos com resultados inferiores ao antioxidante sintético BHA. Segundo Elshenawy et al (2008); Vuotto et al (2000), a feijoa é rica fonte de taninos, dentre os quais, o ácido tânico, o ácido gálico e a catequina são estruturas básicas. Portanto, a possível presença destes compostos nos extratos pode ter refletido no poder de redução do íon Fe^{3+} .

4.2.5 Coeficiente de correlação de Pearson (r)

O coeficiente de correlação de Pearson é aplicado para avaliar a possível interação entre dois parâmetros. Os parâmetros aqui relacionados foram o teor de compostos fenólicos totais (CFT) e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP, em extratos obtidos pelos métodos a alta pressão. Os resultados dessas correlações são apresentados na Tabela 24 abaixo.

Tabela 24 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre CFT (mg EAG.g⁻¹ de extrato) e os métodos antioxidantes DPPH e FRAP.

Teste conduzido ao nível de 5 % de significância.

	Coeficientes de correlação	
	r	p
DPPH ¹	-0,75	0,003
FRAP ²	0,62	0,020

¹Calculado em termos de EC₅₀ (µg.mL⁻¹);

²Calculado em termos de (mg ET.g⁻¹ de extrato).

Semelhante ao que já fora observado para a casca (4.1.5), os extratos da folha apresentaram correlação significativa entre compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, em especial, para o método DPPH.

O valor de -0,75 para r indica uma forte correlação entre os compostos fenólicos e os antioxidantes doadores de hidrogênio presentes nos extratos obtidos a alta pressão. O valor negativo é esperado, uma vez que os resultados de DPPH são expressos em EC₅₀. O valor de p < 0,05 indica não apenas a existência de correlação, mas comprova a alta significância dela no nível de 5% de probabilidade.

Para o método FRAP, o valor de r = 0,62 e o valor de p = 0,020, indicam uma correlação mais fraca, embora significativa, entre os compostos fenólicos e este método antioxidante.

Com os resultados obtidos, é possível concluir que o principal mecanismo de ação antioxidante observado para os extratos de folha de feijoa obtidos pelos métodos a alta pressão, é o de doação de átomos de hidrogênio, evidenciado pelo método DPPH.

4.2.6 Atividade antibacteriana

Os extratos obtidos por ELP (100 bar, 80 °C, etanol-água como solvente, em regime dinâmico e estático) apresentaram os mais altos teores de compostos fenólicos totais e foram, desta forma, selecionados para a avaliação da atividade antibacteriana juntamente com o extrato da ESC (300 bar, 55 °C e 15% de etanol-água como cossolvente).

Após adição da resazurina, observou-se mudança de coloração em todas as concentrações dos extratos da ELP, indicando que os mesmos não possuem efeito bacteriostático nas concentrações aplicadas contra os micro-organismos testados.

Em contrapartida, o extrato da ESC apresentou inibição ao crescimento bacteriano para as 3 cepas em estudo. Para *E. coli* e

Salmonella, a CMI foi de 13.500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ao passo que para *S. aureus*, a CMI foi ainda menor: 3.375 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A primeira conclusão que se pode tomar é que a bactéria Gram-positiva foi mais susceptível à ação dos compostos antibacterianos presentes no extrato. As bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa e um espaço acima da membrana plasmática denominado espaço periplasmático, os quais são ausentes nas bactérias Gram-positivas. A membrana externa, formada em grande parte por fosfolípidios e lipopolissacarídeos, representa uma barreira ao transporte de compostos antibacterianos. Já o espaço periplasmático possui uma alta concentração de enzimas, as quais podem bloquear a entrada de moléculas na célula (BASILE et al., 1997). Normalmente, os antibacterianos oriundos de plantas produzem baixo efeito em bactérias Gram-negativas e, em muitos casos, esse efeito sequer existe (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

O resultado de 3.375 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para inibição de *S. aureus* por ação do extrato da ESC é próximo ao valor de 2.500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ obtido por Mostafa et al (2017) para inibição de *S. aureus* por ação de extrato etanólico de folha de romãzeira.

Bussmann et al (2010) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos aquosos e etanólicos de 141 plantas tradicionalmente utilizadas como agentes antibacterianos no Peru. A atividade dos extratos foi avaliada contra *S. aureus* e *E. coli*. Os resultados de CMI variaram de 8 a 250.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo os extratos etanólicos, os mais eficazes e a bactéria *S. aureus*, a mais susceptível à ação dos agentes antibacterianos, assim como observado no presente trabalho.

Basile et al (1997) observaram uma forte inibição de extratos em acetona de folha de feijoa contra *S. aureus* e *E. coli*, com CMI's de 64 e 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os autores atribuíram o baixo valor de CMI à elevada concentração de iodo presente na folha da feijoa, elemento que não encontra dificuldades em atravessar a membrana externa das bactérias Gram-negativas e não é degradado pelas enzimas presentes no espaço periplasmático. Por se tratar de uma molécula apolar, o iodo foi facilmente solubilizado em acetona mas pode não se solubilizar totalmente em solventes com polaridade mais elevada. Como o extrato da ESC foi obtido por uma mistura entre um solvente apolar, o CO_2 , e um solvente polar, a mistura hidroalcoólica, é possível que maiores concentrações de iodo possam ter sido extraídas na ESC em comparação com os extratos da ELP.

A segunda etapa do estudo da atividade antimicrobiana consistiu na avaliação da Concentração Mínima Bactericida (CMB), ou seja, a

concentração mínima em que 99,9% do inóculo inicial é eliminado. Essa aferição foi realizada através de plaqueamento direto das soluções em que não foi observado crescimento microbiano na placa de microdiluição.

Novamente, o extrato da ESC apresentou resultados notáveis, com CMB de 3.375 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus* e 13.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *Salmonella*. Embora o extrato da ESC tenha apresentado efeito inibidor ao crescimento de *E. coli*, não foi observado efeito bactericida para esta cepa. Os resultados observados indicam que o extrato da ESC da feijoa pode ser utilizado como agente antibacteriano natural em matrizes alimentares. A Tabela 25 apresenta os resultados para CMI e CMB dos extratos de folha de feijoa obtidos por ESC e ELP. A Figura 33 apresenta o plaqueamento para análise do crescimento bacteriano.

Tabela 25 - CMI dos extratos da folha de feijoa obtidos por ESC e ELP contra *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella*.

	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			CMB ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
ESC	3.375	13.500	13.500	3.375	N	13.500
ELP ²	N	N	N	N	N	N
ELP ³	N	N	N	N	N	N

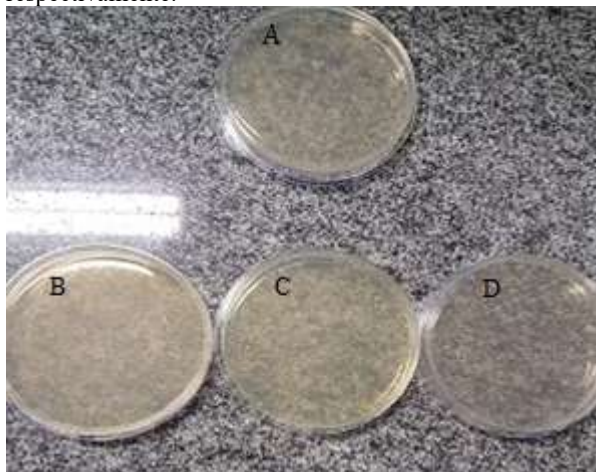
¹ESC: 300 bar, 55 °C e 15 % de etanol-água como cossolvente.

²ELP: 100 bar, 80 °C, etanol-água como solvente e regime dinâmico de extração;

³ELP: 100 bar, 80 °C, etanol-água como solvente e regime estático de extração;

*N: ausência de ação contra a cepa na concentração de 13.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;

Figura 33 - Verificação do crescimento bacteriano em soluções contendo extratos da ELP da folha de feijoa e suspensões de *S. aureus* e *Salmonella*. A: ausência de crescimento de *Salmonella*, sob ação do extrato de ESC, na concentração de $13.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; B, C, D: ausência de crescimento de *S. aureus*, sob ação do extrato de ESC, nas concentrações de $3,375$, $6,750$ e $13.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.



Fonte: o autor.

4.2.7 Perfil de compostos fenólicos por HPLC

Através de análise cromatográfica, foi possível identificar os principais compostos fenólicos presentes na folha da feijoa.

Os extratos avaliados foram: extrato obtido por Soxhlet (etanol-água como solvente), extrato obtido por ESC (300 bar, 55°C e 15 % etanol-água como cossolvente), extrato obtido em ELP (100 bar, 80°C , etanol-água como solvente, em modo dinâmico de extração) e extrato obtido por ELP (100 bar, 80°C , etanol-água como solvente, em modo estático de extração).

Dos 45 padrões de compostos fenólicos aplicados, 27 foram identificados nos extratos e destes, um total de 17 foram também quantificados em pelo menos um dos extratos. A Tabela 26 apresenta os compostos fenólicos identificados e quantificados nos extratos.

Tabela 26 - Teor de Compostos fenólicos identificados em extratos de folha de feijoa e expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de extrato.

Composto fenólico	Soxhlet ¹	ESC ²	ELP _{DIN} ³	ELP _{EST} ⁴
Ácido 4-aminobenzóico	-	14±1	-	-
Ácido salicílico	11±2	-	4,2±0,4	19,0±0,2
Ácido p-anísico	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ
Vanilina	<LOQ	-	-	-
Ácido 4-hidroximetilbenzóico	-	-	-	<LOQ
Ácido protocatecuico	250±12	-	53±13	117±10
Umbeliferona	25,7±0,3	0,6±0,3	4,1±0,1	8,1±0,8
Ácido ρ -cumárico	47±4	<LOQ	6,0±0,2	27,9±0,3
Ácido vanílico	14±6	-	<LOQ	<LOQ
Ácido gálico	1359±119	-	548±36	706±18
Coniferaldeído	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ
Ácido caféico	85±9	8,0±0,8	60±5	120±2
Siringaldeído	<LOQ	-	-	-
Ácido ferúlico	715±5	47,3±0,1	106±6	197±18
Ácido siríngico	9,5±0,4	-	5,1±0,4	10±1
Ácido sinápico	11±2	-	1,7±0,3	5,4±0,2
Ácido elágico	1918±265	-	282±68	404±141
Aromadendrina	-	-	<LOQ	-
Catequina	23±4	-	839±221	164±8
Epicatequina	<LOQ	-	<LOQ	45±9
Kaempferol	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ
Taxifolina	10±3	3±2	13±2	20±4
Quercetina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Isoquercetina	1625±51	351±97	794±34	319±21
Mircetina	30±7	<LOQ	50±2	45±2
Carnosol	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ácido clorogênico	3,4±0,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ

¹Extrato obtido por Soxhlet (etanol-água como solvente);

²Extrato obtido por Extração Supercrítica (300 bar, 55 °C e 15% etanol-água como cosolvente);

³Extrato obtido por Extração com Líquido Pressurizado (100 bar, 80 °C, etanol-água como solvente, em modo dinâmico de extração);

⁴Extrato obtido por Extração com Líquido Pressurizado (100 bar, 80 °C, etanol-água como solvente, em modo estático de extração);

* - composto não identificado;

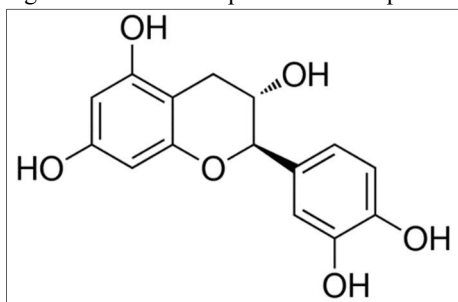
*<LOQ = concentração média ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) inferior ao limite de quantificação.

Os ácidos ferúlico, gálico e elágico, assim como fora observado para a casca, também se apresentaram como alguns dos compostos

fenólicos majoritários em folha de feijoa, juntamente com a catequina e a isoquercetina. Os resultados observados no presente trabalho estão em consonância com os resultados observados por Poodi et al (2018), onde os autores, após submeterem as amostras à EAU, identificaram os ácidos ferúlico e gálico, além de catequina e quercetina como majoritários.

A catequina (Figura 34) é um composto fenólico pertencente à classe dos flavan-3-óis e conhecida por representar o maior grupo de compostos bioativos encontrados em chá verde e chá preto (NOWACK; OLECH; NOWACKA, 2014; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Figura 34 - Estrutura química da catequina.



Fonte: SIGMA-ALDRICH (2018)

Dentre as propriedades bioativas da catequina, destacam-se as atividades anticâncer (AHMAD; MUKHTAR, 1999), antibacteriana (JUNEJA et al., 2007; NAKAYAMA et al., 2012) e antioxidante (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

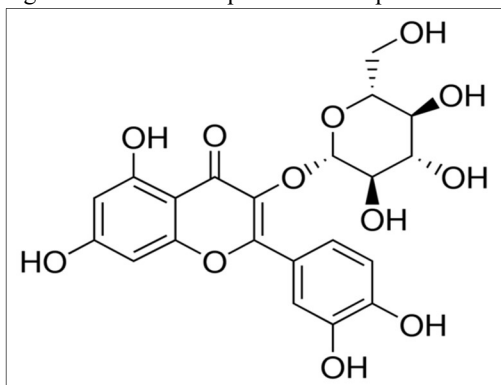
A isoquercetina (Figura 35), também conhecida como quercetina glicosilada, é um composto fenólico pertencente à classe dos flavonóis e, embora não tenha sido identificada em folhas de feijoa até o presente trabalho, apresenta-se como um dos compostos fenólicos majoritários em folhas de goiaba (METWALLY et al., 2010), uma mirtácea, assim como a feijoa.

Vongsak et al (2013) avaliaram a atividade antioxidante de extratos de folhas de acácia-branca, obtidos por diferentes métodos de extração, a baixa pressão. Os resultados de atividade antioxidante mais proeminentes, sendo avaliados pelos métodos DPPH e FRAP, foram observados no extrato obtido por maceração e com a mistura etanol-água (70:30 v/v) como solvente. O aumento na atividade antioxidante dos extratos foi diretamente proporcional ao aumento de isoquercetina, o composto fenólico majoritário nas folhas de acácia-branca.

Além de alta atividade antioxidante, a isoquercetina também é um composto fenólico com alta atividade antiviral.

No trabalho conduzido por Kim; Narayanan; Chang (2010), os autores avaliaram a atividade de alguns compostos fenólicos, tais como quercetina, rutina, resveratrol e isoquercetina, contra o vírus influenza. Como resultado, a análise *in vitro* indicou uma alta atividade por parte da isoquercetina. Em seguida, testes *in vivo* foram realizados em ratos infectados pelo vírus influenza. Após tratamento diário com 10 mg.kg⁻¹, observou-se uma redução viral significativa nos ratos submetidos ao tratamento, em comparação aos ratos que foram mantidos sem o tratamento.

Figura 35 - Estrutura química da isoquercetina.



Fonte: SIGMA-ALDRICH (2018)

5 CONCLUSÕES

Os resultados alcançados no presente trabalho permitem afirmar que tanto a casca, quanto a folha da feijoa são ricas fontes de compostos bioativos, apresentando atividades antibacterianas e principalmente, elevadas atividades antioxidantes.

Os métodos a baixa pressão se mostraram eficazes, resultando não apenas em alto rendimento global, mas em alto teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, com destaque para a técnica convencional de Soxhlet, muito devido à alta temperatura, a qual não se mostrou prejudicial aos extratos, e ao longo tempo de extração, permitindo um contato maior entre matriz vegetal e solvente, com periódica renovação de solvente.

Os extratos obtidos com CO₂ supercrítico produziram rendimentos muito baixos, indicando a predominância de compostos de elevada polaridade na feijoa. Com isso, procedeu-se à aplicação de um cossolvente polar (etanol, para a casca da feijoa e a mistura etanol-água para a folha). As diferentes concentrações de cossolvente (5, 10 e 15%) aplicadas para a casca, elevaram o rendimento global de forma significativa, contudo, o mais alto teor de compostos fenólicos foi obtido com 5% de cossolvente, indicando uma diminuição na seletividade em decorrência do aumento na concentração de cossolvente. Embora o extrato obtido pela ESC da casca de feijoa, com 5% de cossolvente, tenha produzido extratos com baixos teores de CFT e baixa atividade antioxidante, em comparação aos extratos obtidos pelos demais métodos de extração, este mesmo extrato foi o único a apresentar atividade bacteriostática contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas e, na sua concentração máxima de aplicação, apresentou eliminação de 99,9 % das bactérias, permitindo caracterizar o extrato não apenas como agente inibidor de crescimento bacteriano mas também, como agente bactericida.

O extrato obtido pela ESC da folha da feijoa, além de apresentar atividade antibacteriana e bactericida, mostrou uma forte atividade antioxidante, muito devido às próprias características da matéria-prima, mas também, ao cossolvente aplicado: para a folha, o cossolvente foi a mistura etanol-água.

A mistura etanol-água, de fato, foi a melhor opção de solvente, em termos de rendimento e seletividade. Em todas as técnicas, os resultados mais proeminentes foram obtidos justamente quando do uso deste solvente, evidenciando a versatilidade de solventes de diferentes polaridades na recuperação de compostos bioativos de fontes vegetais.

Os extratos obtidos pela ELP apresentaram os mais elevados rendimentos e seletividade, com resultados superiores aos obtidos por Soxhlet. Embora as altas temperaturas aplicadas em ambas as técnicas sejam próximas, a elevada pressão da técnica não-convencional foi fator de fundamental importância. Como resultado, uma economia de aproximadamente 5 h de reação pôde ser observada.

Para as extrações com a folha por ELP, uma sequência de ensaios foi realizada em regime estático, substituindo-se o tempo total em regime dinâmico por 2 ciclos em regime estático. Por fim, extratos foram obtidos com atividades antioxidantes estatisticamente semelhantes aos obtidos em regime dinâmico, todavia, com uma economia 150 % de solvente, em volume, aproximando ainda mais dos preceitos da química verde.

O método de correlação de Pearson foi utilizado para verificar a correlação entre os compostos fenólicos totais e as atividades antioxidantes doadoras de hidrogênio e redutoras do íon férrico nas amostras. Os altos valores do r de correlação, em conjunto com os baixos valores de p , atribuem aos compostos fenólicos totais, as elevadas atividades antioxidantes dos extratos.

O perfil químico dos compostos fenólicos foi realizado com o intuito de identificar os principais compostos presentes na casca e na folha da feijoa. Os ácidos fenólicos gálico, elágico e ferúlico foram os compostos majoritários identificados e devidamente quantificados nos extratos de casca de feijoa. Catequina, um flavan-3-ol, e isoquercetina, um flavonol, foram os compostos majoritários, os quais foram identificados e quantificados na folha de feijoa, juntamente com os ácidos gálico, elágico e ferúlico. Os teores, embora estejam em acordo com a literatura, são baixos em comparação ao elevado teor de compostos fenólicos totais, permitindo atribuir majoritariamente aos taninos condensados, polímeros de alto peso molecular, presentes em abundância na casca de feijoa, mas não identificados pela cromatografia, a alta atividade antioxidante dos extratos.

Com base nos estudos realizados, pode-se concluir que as técnicas a alta pressão foram muito eficazes na obtenção de extratos bioativos de casca de feijoa, um resíduo industrial da produção de sucos, e da folha da feijoa, colocando-as como alternativas viáveis, em termos econômicos e sustentáveis, para a agregação de valor a esta rica fonte de compostos bioativos que é a feijoa.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar os resíduos sólidos pós-extração;
- Avaliar a eficácia de outras técnicas não-convencionais de extração, tais como a Extração Assistida por Micro-ondas (EAM) e a Extração com Água Subcrítica, na obtenção de extratos bioativos de feijoa;
- Avaliar outras propriedades bioativas da feijoa, buscando uma agregação de valor ainda maior para a fruta.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. **Nutrition Reviews**, v. 57, n. 3, p. 78-83, 1999.
- AITKEN, A. G.; HEWETT, E. W. **Fresh Facts: New Zealand Horticulture 2015**. Disponível em: <<http://www.freshfacts.co.nz/files/freshfacts-2015.pdf>>. Acesso em: 15 maio. 2017.
- AKANDA, M. J. H. et al. Applications of supercritical fluid extraction (SFE) of palm oil and oil from natural sources. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 1764–1794, 2012.
- ALAMED, J. et al. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2969–2976, 2009.
- ALBU, S. et al. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 3-4, p. 261–265, 2004.
- AMARANTE, C. V. T. et al. Phenolic content and antioxidant activity of fruit of Brazilian genotypes of feijoa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 1, p. 1223–1230, 2017.
- AMARANTE, C. V. T. DO; SANTOS, K. L. DOS. Goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 001–0034, 2011.
- ANGELO, M. P.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183–198, 2002.
- ARAGÓN-POCE, F. et al. History of opium. **International Congress Series**, v. 1242, p. 19–21, dez. 2002.
- ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 6, p. 655–665, 2002.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71–79, 2016.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARNI, E. J. et al. **Potencial de mercado para a goiaba serrana catarinense**. Florianópolis: Epagri, 2004.

BASILE, A. et al. Antibacterial activity in *Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 8, n. 3, p. 199–203, 1997.

BAZYKINA, N. I. et al. Optimization of conditions for the extraction of natural antioxidants from raw plant materials. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 36, n. 2, p. 46–49, 2002.

BENELLI, P. et al. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 132–141, 2010.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BERNHOF, A. A brief review on bioactive compounds in plants. In: SYMPOSIUM BIOACTIVE COMPOUNDS IN PLANTS - BENEFITS AND RISKS FOR MAN AND ANIMALS, 1, 2008, Oslo. **Proceedings from the symposium Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals**. Oslo: The Norwegian Academy of Science and Letters, 2010, p 11-17.

BEYHAN, Ö.; ELMASTAŞ, 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**, v. 4, n. 11, p. 1065–1072, 2010.

BIMAKR, M. et al. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 1, p. 67–72, 2011.

BONTEMPO, P. et al. *Feijoa sellowiana* derived natural flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 10, p. 1902–1914, 2007.

BORGES, G. DA S. C. et al. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2128–2133, ago. 2011.

BOROSKI, M. et al. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1. ed. Curitiba: Appris, 2015.

BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals to supercritical fluids and the application to separation process**. Darmstadt: Steinkopff, 1994.

BULDINI, P. L.; RICCI, L.; SHARMA, J. L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, n. 1, p. 47–70, 2002.

BUSSMANN, R. W. et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 101–108, 2010.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **The Analyst**, v. 126, n. 7, p. 1182–1193, 2001.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R. et al. Pressurized liquid extraction in the analysis of food biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1-2, p. 1-17, 2005.

CARBONE, K. et al. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 493–500, 2011.

CASAS, L. et al. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, n. 1, p. 43–49, 2007.

CASAS, L. et al. Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 2, p. 304–308, jan. 2010.

CASTRO-VARGAS, H. I. et al. Supercritical fluid extracts from tamarillo (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp and its application as protectors against lipid oxidation of cooked beef meat. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 76, p. 17–23, 2013.

CETIN-KARACA, H. **Evaluation of Natural Antimicrobial Phenolic Compounds Against Foodborne Pathogens**. 2011. 196 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), University of Kentucky, Lexington.

CHARPE, T. W.; RATHOD, V. K. Effect of ethanol concentration in ultrasound assisted extraction of glycyrrhizic acid from Licorice root. **Iranian Journal of Chemical Engineering**, v. 11, n. 4, p. 21–30, 2014.

CHEMAT, F. et al. 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.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 2011.

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, 2013.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CHO, J. Y.; MOON, J. H.; PARK, K. H. Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* thunb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 32, n. 6, p. 1403–1408, 2000.

CUEVA, C. et al. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 5, p. 372–382, 2010.

DA PORTO, C.; DECORTI, D.; NATOLINO, A. Water and ethanol as co-solvent in supercritical fluid extraction of proanthocyanidins from grape marc: A comparison and a proposal. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 87, p. 1–8, 2014.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.

DE BRUYNE, T. et al. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 4, p. 445–459, 1999.

DE GAULEJAC, N. S. C.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 425–431, 1999.

DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387–398, 2015.

DENT, M. et al. Comparison of conventional and Ultrasound-Assisted Extraction techniques on mass fraction of phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis* L.). **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, n. 3, p. 475–484, 2015.

DÍAZ-REINOSO, B. et al. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2441–2469, 2006.

DURMIC, Z.; BLACHE, D. Bioactive plants and plant products: effects on animal function, health and welfare. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1-4, p. 150–162, 2012.

EBRAHIMZADEH, M. A. et al. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sellowiana* fruits peel and leaves. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 7–14, 2008.

ELSHENAWY, S. et al. Polyphenols and biological activities of *Feijoa sellowiana* leaves and twigs. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 36, n. 3, p. 103–120, 2008.

ELSHIKH, M. et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 6, p. 1015–1019, 2016.

ESPINOSA-PARDO, F. A. et al. Extraction of phenolic compounds from dry and fermented orange pomace using supercritical CO₂ and cosolvents. **Food and Bioproducts Processing**, v. 101, p. 1–10, 2017.

FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996.

FERNANDES, F. H. A.; SALGADO, H. R. N. Gallic Acid: review of the methods of determination and quantification. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 257–265, 2016.

FERNÁNDEZ-PONCE, M. T. et al. Use of high pressure techniques to produce *Mangifera indica* L. leaf extracts enriched in potent antioxidant phenolic compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 29, p. 94–106, 2015.

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 0260, p. 263–269, 2002.

FOO, L. Y.; PORTER, L. J. The structure of tannins of some edible fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 32, n. 7, p. 711–716, 1981.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Global initiative on food loss and waste reduction**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4068e.pdf>>. Acesso em: 6 dez. 2017.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. 2009. **Dossiê Antioxidantes**. Disponível em: <http://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060979450001465584876.pdf>. Acesso em: 7 fev. 2017.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. 2010. **Agentes antimicrobianos: agentes antimicrobianos químicos e naturais**. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf>>. Acesso em: 9 set. 2016.

FU, L.; LU, W. Q.; ZHOU, X. M. Phenolic compounds and in vitro antibacterial and antioxidant activities of three tropic fruits: persimmon, guava, and sweetsop. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

- FUENTES, E. et al. Antioxidant and antiplatelet activities in extracts from green and fully ripe tomato fruits (*Solanum lycopersicum*) and pomace from industrial tomato processing. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–9, 2013.
- GARCIA-MENDOZA, P. et al. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juc (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 9–16, 2017.
- GARMUS, T. T. et al. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 4–14, 2014.
- GIADA, M. DE L. R. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In: MORALES-GONZÁLEZ, J. A. **Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants**. Londres: Intech Publisher, 2013. p. 87–112.
- GOMIDE, R. **Operações com sistemas sólidos granulares**. São Paulo: Catalogação na Câmara Brasileira do Livro, 1983.
- GONÇALVES, A. E. S. S. **Compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh): caracterização e atividade biológica**. 101 p. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: HUDSON, B. **Food Antioxidants**. New York: Springer, 1990. p. 1–18.
- GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, p. 435–448, 1992.
- GRIGONIS, D. et al. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloe odorata*). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, n. 3, p. 223–233, 2005.
- GU, L. et al. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic. **J. Agric. Food Chem**, v. 51, p. 7513–7521, 2003.
- HAMINIUK, C. W. I. et al. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 7, p. 1529–1537, 2011.

HARBORNE, J. B. Variation in and functional significance of phenolic conjugation in plants. **Biochemistry of plant phenolics**, v. 12, p. 457, 1979.

HERRERO, M. et al. Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2495–2511, 2010.

HERRERO, M. et al. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 67–83, 2013.

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

HINTZ, T.; MATTHEWS, K. K.; DI, R. The use of plant antimicrobial compounds for food preservation. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

HORŽIĆ, D. et al. Comparison of conventional and Ultrasound Assisted Extraction techniques of yellow tea and bioactive composition of obtained extracts. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 7, p. 2858–2870, 2012.

INGOLD, K. U. Inhibition of autoxidation. In: MAYO, F. **Oxidation of Organic Compounds**. Washington, DC: American Chemical Society, 1968. p. 296–305.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físicos-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 589–625.

JESUS, S. P. et al. A simplified model to describe the kinetic behavior of Supercritical Fluid Extraction from a rice bran oil byproduct. **Food and Public Health**, v. 3, n. 4, p. 215–222, 2013.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Medical Microbiology**, v. 7750, p. 1749–1755, 2009.

JUNEJA, V. K. et al. Control of *Clostridium perfringens* spores by green tea leaf extracts during colling and cooked ground beef, chicken and pork. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 6, p. 1429–1433, 2007.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41–60, 2009.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011.

KESHANI, H. H. et al. Pharmacological properties of medicinal herbs by focus on secondary metabolites. **Life Science Journal**, v. 9, n. 1, p. 509–520, 2012.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.

KIDAK, R.; INCE, N. H. Ultrasonic destruction of phenol and substituted phenols : A review of current research. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 195–199, 2006.

KIM, Y.; NARAYANAN, S.; CHANG, K. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. **Antiviral Research**, v. 88, n. 2, p. 227–235, 2010.

KOŞAR, M.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 525–533, 2005.

KY, I. et al. Tannins. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 247–255, 2015.

LAGHA-BENAMROUCHE, S.; MADANI, K. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: peels and leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 723–730, 2013.

LANG, Q. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. **Talanta**, v. 53, n. 4, p. 771–782, 5 jan. 2001.

LASTA, H. F. B. **Potencial Antioxidante dos extratos dos resíduos de beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.) obtidos à alta e à baixa pressão**. 2017. 163 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- LEE, L. S. et al. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic antioxidants from green tea using response surface methodology. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13530–13545, 2013.
- LEONG, T.; ASHOKKUMAR, M.; SANDRA, K. The fundamentals of power ultrasound - A review. **Acoustics Australia**, v. 39, n. 2, p. 54–63, 2011.
- LIN, C.; YIN, M. Renal protective effects of extracts from guava fruit (*Psidium guajava* L.) in diabetic mice. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 3, p. 303-308, 2012.
- LOPRESTO, C. G. et al. A non-conventional method to extract D-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional Soxhlet extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 137, p. 13–20, 2014.
- LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.
- LUCERA, A. et al. Food applications of natural antimicrobial compounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-13, 2012.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1-2, p. 1–10, 1998.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.
- LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41–47, 2003.
- MACDONALD-WICKS, L. K.; WOOD, L. G.; GARG, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 13, p. 2046–2056, 2006.
- MACHADO, A. P. D. F. et al. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. **Food Research International**, v. 77, p. 675–683, 2015.

MACHADO, A. P. DA F. et al. Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. **Food Chemistry**, v. 231, p. 1–10, 2017.

MALACRIDA, C. R.; DA MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659–664, 2005.

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.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, p. 185–200, 1996.

MAYER, R. et al. Proanthocyanidins: Target compounds as antibacterial agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 6959–6966, 2008.

MAZZUTTI, S. et al. Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 211–220, 2017.

MEIRELES, M. A. A. Extraction of bioactive compounds from latin american plants. In: MARTINEZ, J. L. **Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds**. Boca Raton, CRC Press, 2008. p. 243–274.

MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115–176, 2014.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

METWALLY, A. M. et al. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 23, p. 212–218, 2010.

- MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: kinetics, mathematical modeling and scale-up. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 10–16, 2009.
- MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Plant Cell**, v. 15, n. 4, p. 523–530, 2006.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas pra o futuro - região sul**. Brasília: MMA, 2011.
- MIŠIĆ, D. et al. Antimicrobial activity of celery fruit isolates and SFE process modeling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 2, p. 148–152, nov. 2008.
- MONROY, Y. M. et al. Influence of ethanol, water, and their mixtures as co-solvents of the supercritical carbon dioxide in the extraction of phenolics from purple corn cob (*Zea mays* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 118, p. 11–18, 2016.
- MOON, J.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1655–1666, 2009.
- MORAIS, D. R. et al. Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, v. 77, p. 392–399, 2015.
- MORENO, S. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v. 40, n. 2, p. 223–231, 2006.
- MOSBAH, H. et al. Phytochemical characterization, antioxidant, antimicrobial and pharmacological activities of *Feijoa sellowiana* leaves growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 521–531, 2018.
- MOSTAFA, A. A. et al. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 361–366, 2018.
- MOTOHASHI, N. et al. Biological activity of feijoa peel extracts. **Anticancer Research**, v. 20, n. 6 B, p. 4323–4329, 2000.

MOURA, P. M. et al. Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 62, p. 116–122, 2012.

MURGA, R. et al. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 1994, p. 3408–3412, 2000.

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.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95–111, out. 2004.

NAKAYAMA, M. et al. Mechanism of the combined anti-bacterial effect of green tea extract and NaCl against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 225-232, 2012.

NOSSACK, A. C. et al. Supercritical fluid extraction and chromatographic analysis (HRGC-FID and HRGC-MS) of *Lupinus* spp. alkaloids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 5, p. 495–501, 2000.

NOWAK, R.; OLECH, M.; NOWACKA, N. Plant polyphenols as chemopreventive agents. In: **Polyphenols In Human Health And Disease**. Amsterdam: Elsevier, 2013. p. 1289-1307.

NZ FEIJOA GROWERS ASSOCIATION. **Membership Information**. Disponível em: <<http://www.feijoa.org.nz/membership.html>>. Acesso em: 9 abr. 2017.

OLIVEIRA, D. A. **Aplicação das tecnologias supercrítica e convencionais para o reaproveitamento dos resíduos do processamento de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**. 2015. 205 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, M. D. et al. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 267–275, 2007.

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.

- OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10–36, 2015.
- ORTEGA-RAMIREZ, L. A. et al. Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 2, p. R129–R137, 2014.
- OSTROSKY, E. A. et al. Divulgação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.
- OU, K.; GU, L. Absorption and metabolism of proanthocyanidins. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 43–53, mar. 2014.
- PAIVA, L. B. et al. Ferulic acid and derivatives: Molecules with potential application in the pharmaceutical field. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 395–411, 2013.
- PAPOUTSIS, K. et al. Impact of different solvents on the recovery of bioactive compounds and antioxidant properties from lemon (*Citrus limon* L.) pomace waste. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 971–977, 2016.
- PARK, H. et al. Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1011–1017, 2007.
- PEREIRA, C. G. et al. Supercritical extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*: an evaluation of the cosolvent on the extract compositions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 6, 2003, Versailles. **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**. Versailles: ISASF, 2003.
- 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.
- PEREIRA, P. et al. Supercritical fluid extracts with antioxidant and antimicrobial activities from myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves: response surface optimization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 83, p. 57-64, 2013.

PERES, D. D. **Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia multifuncional in vitro, ex vivo e in vivo.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário de plantas.** Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>>. Acesso em: 2 ago. 2016.

PETROVSKA, B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

PICO, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 84–99, 2013.

POODI, Y. et al. Intensification of bioactive compounds extraction from Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.) leaves using ultrasonic waves. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 37–50, 2018.

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.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005.

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, p. 3396–3402, 2000.

REÁTEGUI, J. L. P. et al. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 223-233, 2014.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, p. 025–035, 2005.

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

RICHTER, B. E. et al. Accelerated Solvent Extraction: a technique for sample preparation. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 6, p. 1033–1039, 1996.

ROSTAGNO, M. A. et al. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2–29, 2009.

RUBERTO, G.; TRINGALI, C. Secondary metabolites from the leaves of Feijoa sellowiana Berg. **Phytochemistry**, v. 65, n. 21 SPEC. ISS., p. 2947–2951, 2004.

SANTOS, Ê. R. M. et al. Supercritical fluid extraction of *Rumex acetosa* L. roots: yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 122, p. 1–9, 2017.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, p. 321–324, 2007.

SASIDHARAN, I.; MENON, N. A. Effects of temperature and solvent on antioxidant properties of curry leaf (*Murraya koenigii* L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 3, p. 366–370, 2011.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073S–2085S, 2000.

SCHULZ, M. **Influência da maturação sobre o conteúdo e bioacessibilidade de minerais e perfil de compostos fenólicos dos frutos da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius)**. 171 p. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHULZ, M. et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125–131, 2015.

SERRA, A. T. et al. Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1 : recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 184–191, 2010.

SHI, J. et al. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. **Journal of medicinal food**, v. 6, n. 4, p. 291–299, 2003.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R.

Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10–23, 2012.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 29 mai. 2018.

SIHVONEN, M. Advances in supercritical carbon dioxide technologies.

Trends in Food Science & Technology, v. 10, n. 6-7, p. 217–222, 1999.

SILVA, J. K. et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: in vitro and in vivo study. **Food Research International**, v. 53, p. 882–890, 2013.

SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, 2016.

SINGH, J. P. et al. *In vitro* antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 1025-1030, 2016.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: **Methods in Enzymology**. Cambridge: Academic Press, 1999. p. 152–178.

SOLANA, M. et al. A comparison between supercritical fluid and pressurized liquid extraction methods for obtaining phenolic compounds from *Asparagus officinalis* L. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 201–208, 2015.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂—I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 409–414, 1994.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 40, n. 2, p. 92–100, 2007.

SUN-WATERHOUSE, D. et al. Utilisation Potential of Feijoa Fruit Wastes as Ingredients for Functional Foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 12, p. 3441–3455, 2012.

- SUTTIRAK, W.; MANURAKCHINAKORN, S. *In vitro* antioxidant properties of mangosteen peel extract. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 3546–3558, 2014.
- TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p. 1199–1218, 2010.
- TAKEMOTO, E.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1189–1194, 2009.
- THAIPONG, K. et al. 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.
- TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100–109, 2015.
- TUNCEL, N. B.; YILMAZ, N. Optimizing the extraction of phenolics and antioxidants from feijoa (*Feijoa sellowiana*, *Myrtaceae*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 141–150, 2015.
- TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin – Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v. 99, p. 835–841, 2006.
- TURNER, C.; WALDEBÄCK, M. Principles of pressurized fluid extraction and environmental, food and agricultural applications. In: **Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries**. Sawston: Woodhead Publishing Limited, 2010. p. 39–70.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Green chemistry**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/greenchemistry>>. Acesso em: 10 dez. 2016.
- VIGANÓ, J. et al. Pressurized liquids extraction as an alternative process to readily obtain bioactive compounds from passion fruit rinds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 382–390, 2016.

VONGSAK, B. et al. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 566-571, 2013.

VUOTTO, M. L. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, n. 3, p. 197-201, 2000.

WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. **Bioactive Foods and Extracts**. Boca Raton: CRC Press, 2011.

WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, *Myrtaceae*): a review. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 923-926, 2010.

WIJNGAARD, H. et al. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 505-513, 2012.

WISCHNEWSKI, B. **Thermodynamic constants of carbon dioxide - CO₂**. Disponível em:

<http://www.peacesoftware.de/einigewerte/co2_e.html>. Acesso em: 5. jan. 2017.

WU, T. Y. et al. **Advances in Ultrasound Technology for Environmental Remediation**. Berlin: Springer, 2013. p. 5-12.

XU, C. et al. Antioxidant, antibacterial, and antibiofilm properties of polyphenols from muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace against selected foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6640-6649, 16 jul. 2014.

XU, D. et al. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: optimization and comparison with conventional methods. **Food Chemistry**, v. 217, p. 552-559, 2017.

YANG, L. et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. amara Engl. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 9, p. 1349-1355, 2010.

ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Standardized low-cost batch SFE units for university education and comparative research. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 6, 2003, Versailles. **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**. Versailles: ISASF, 2003.

ZHAO, C. F. et al. Characterisation of water-soluble proanthocyanidins of *Pyracantha fortuneana* fruit and their improvement in cell bioavailable antioxidant activity of quercetin. **Food Chemistry**, v. 169, p. 484–491, 2015.

ZHOU, H. et al. A new sampling method in particle filter based on Pearson correlation coefficient. **Neurocomputing**, v. 216, p. 208–215, 2016.

ZLABUR, J. S. et al. Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **International Agrophysics**, v. 29, n. 2, p. 231–237, 2015.

ZOUGAGH, M.; VALCÁRCEL, M.; RÍOS, A. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 399–405, 2004.

APÊNDICE

Figura 36 - Curva analítica de ácido gálico para utilização no cálculo de CFT nos extratos da casca e folha de feijoa.

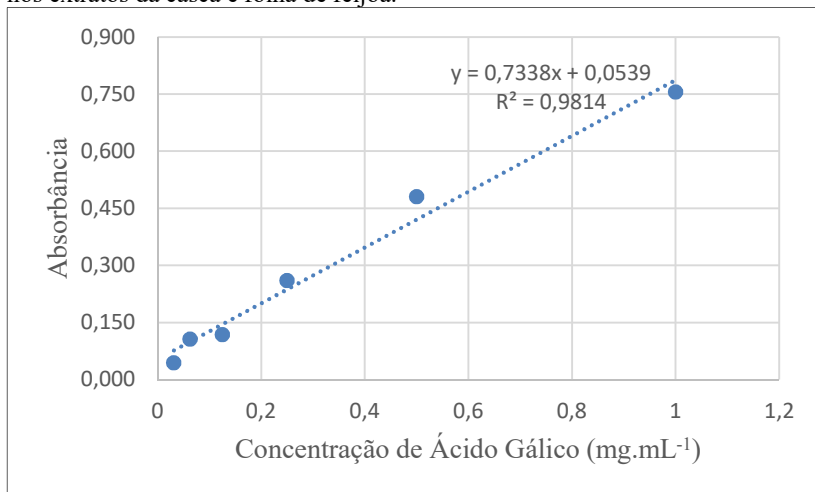


Tabela 27 - Diagrama simplificado de preenchimento dos tubos na análise de CFT pelo Método de Folin-Ciocalteu.

Reagente	Branco	Amostras (em triplicata)
Água destilada (µL)	800	790
Solução de extrato (µL)	-	10
Reagente de Folin-Ciocalteu (µL)	50	50

Aguardar ao menos 3 minutos e não mais que 8 minutos

Carbonato de sódio (µL)	150	150
-------------------------	-----	-----

Homogeneizar.

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

Ler a absorbância em espectrofotômetro a 760 nm.

Tabela 28 - Diagrama simplificado de preenchimento dos tubos no método antioxidante de captura do radical DPPH.

Reagentes	Amostras (em triplicata)						
	Concentração (µg/mL)						
Solvente (µL)	0	5	10	50	125	250	500
Solução-mãe (µL)	2500	2487,5	2475	2375	2187,5	1875	1250
DPPH (µL)	0	12,5	25	125	312,5	625	1250
DPPH (µL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Branco da amostra							
Solvente (µL)	3500	3487,5	3475	3375	3187,5	2875	2250
Solução-mãe (µL)	0	12,5	25	125	312,5	625	1250

Figura 37 - Curva analítica de Trolox para utilização no cálculo de atividade antioxidante nos extratos da casca e folha de feijoa pelo método FRAP.

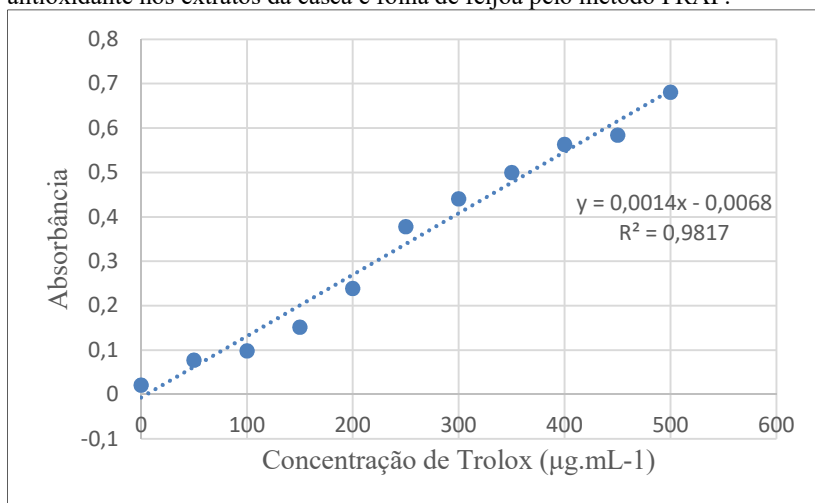


Tabela 29 - Diagrama simplificado de preenchimento dos tubos no método antioxidante de redução de íon férrico (FRAP).

Amostras (em triplicata)	FeCl ₃ 3mM	Solvente da amostra	Solução-mãe de extrato	TPTZ
1	200 µL	-	200 µL	3,6 mL
1	200 µL	-	200 µL	3,6 mL
1	200 µL	-	200 µL	3,6 mL
Branco	200 µL	200 µL	-	3,6 mL