



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Giordana Demaman Arend

**CONCENTRAÇÃO POR NANOFILTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS  
PRESENTES EM EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE GOIABEIRA (*Psidium  
guajava L.*) E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES E CITOTÓXICOS**

Florianópolis

2020

Giordana Demaman Arend

**CONCENTRAÇÃO POR NANOFILTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS  
BIOATIVOS PRESENTES EM EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE  
GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.) E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS  
ANTIOXIDANTES E CITOTÓXICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José C. C. Petrus

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Katia Rezzadori

Florianópolis

2020

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

Arend, Giordana Demaman  
CONCENTRAÇÃO POR NANOFILTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS  
PRESENTES EM EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE GOIABEIRA  
(*Psidium guajava* L.) E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES  
E CITOTÓXICOS / Giordana Demaman Arend ; orientador, José  
Carlos Cunha Petrus, coorientador, Katia Rezzadori, 2020.  
107 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Nanofiltração. 3.  
Compostos Fenólicos. 4. Atividade Citotóxica. 5. Folhas de  
Goiabeira. I. Petrus, José Carlos Cunha. II. Rezzadori,  
Katia. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV.  
Título.

Giordana Demaman Arend

**CONCENTRAÇÃO POR NANOFILTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS  
PRESENTES EM EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE GOIABEIRA (*Psidium  
guajava* L.) E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES E CITOTÓXICOS**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus - presidente

Prof. Dr. Vandr e Barbosa Brião (videoconferência) - membro externo - UPF

Profa. Dra. Silvani Verruck - membro externo - UFSC

Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões - membro externo - UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que  
foi julgado adequado para obten o do título de doutora em Engenharia de  
Alimentos.

---

Profa. Sandra Regina Salvador Ferreira, Dra.  
Coordenadora do Programa

---

Prof(a). Dr. José Carlos Cunha Petrus  
Orientador(a)

Florianópolis, 2020.

Dedico este trabalho aos meus pais, Jorge e Sueli, a minha avó Iria e minha tia Cladir por iluminarem o meu caminho e darem sentido a tudo que faço. Ao meu marido Luciano por ter permanecido ao meu lado nos piores e nos melhores momentos, por todo o amor.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a Deus, por sempre ter guiado meus passos e me dado forças, por ter sempre me guiado para o caminho correto.

Aos meus orientadores Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus e Dr. Katia Rezzadori por toda a ajuda, paciência e dedicação ao longo destes anos de trabalho. Obrigada por estarem contribuindo com o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais Wladimir Jorge Arend e Sueli Fatima Demaman. Obrigada pela força, pela dedicação, por sempre terem estado ao meu lado. Obrigada por sempre me mostrarem o caminho correto, por serem o meu porto seguro, por sempre se dedicarem e me darem o melhor. Não existem palavras para descrever o meu amor por vocês.

A minha tia Cladir e minha avó Iria. Obrigada por mesmo distantes terem feito eu acreditar que eu podia, que eu conseguiria. Obrigada por mesmo de longe me darem paz e amor. Sem vocês nada disso teria sido possível.

Aos meus avós Laide e Osmar (*in memoriam*) por compreenderem a minha ausência. Por sempre me esperarem de braços abertos mesmo depois de meses longe.

Ao meu marido, meu companheiro. Lu, obrigada por sempre estar presente, obrigada por sempre me acompanhar, me apoiar e ajudar. Obrigada por sempre ter sido tão compreensivo, por sempre ter me acompanhado em minhas loucuras, por ser o melhor! Sempre!

Aos meus sogros, Luciano e Adriana, por sempre me acolherem com tanto carinho. Por entenderem os momentos que eu não pude estar presente. Obrigada por me apoiarem e me incentivarem a continuar.

Meu agradecimento mais que especial as minhas estrelinhas que estão no céu cuidando de mim, meu avô Alexandre, e meus tios Isolde e Paulo. A presença de vocês é constante em meu coração e nos meus pensamentos. Tenho certeza que estejam onde estiverem, estão zelando por mim. No decorrer desses quatro anos, acabei ganhando outra estrela, meu avô Osmar, que hoje também cuida de mim de onde ele estiver, provavelmente ainda com o bolso cheio de balas para eu pegar quando encontrasse com ele.

A professora Dra. Elane Prudêncio, a Maria Helena e Silvani pela amizade construída. Pelos dias de análises, risadas e conversas.

A professora Dra. Cláudia Simões e a Dra. Naira Schneider pelas análises citotóxicas dos extratos.

Agradeço ao produtor, Sr. Maurino Decker e família, que gentilmente nos recebeu para a retirada das folhas. Obrigada por sempre nos receberem com bom humor e sempre dispostos a ajudar.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Al profesor Vito Verardo por la caracterización de los extractos realizada en el Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (Granada, España).

À CAPES, pela bolsa de doutorado.

À banca examinadora por todas as contribuições indispensáveis para este trabalho.

A todos que torceram por mim, para todos que me enviaram energia positiva ao longo destes anos.

**Muito obrigada!**

“Somos o que repetidamente fazemos.  
Portanto, a excelência não é um feito,  
é um hábito.” (Aristóteles)

“Ao longo dos séculos, quem sofre dessa doença foi submetido a quase todas as formas concebíveis de experiência. Os campos e florestas, a farmácia e o templo foram saqueados em busca de algum tipo de alívio para essa doença intratável. Quase nenhum animal escapou de dar a sua contribuição, fosse com pele ou pelo, dente ou unha, timo ou tireoide, fígado ou baço, na vã busca de alívio.”

-William Bainbridge

## RESUMO

As folhas de goiabeira (*Psidium guajava*) são conhecidas popularmente devido aos seus efeitos farmacológicos, os quais estão relacionados à presença de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante. Processos para a concentração destes extratos são necessários uma vez que seus efeitos farmacológicos são dose-dependentes. Dentro deste contexto, a tecnologia de separação por membranas se mostra uma importante alternativa devido às diversas vantagens inerentes a este processo como, por exemplo, a utilização de temperaturas brandas. O objetivo deste trabalho foi concentrar os compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de folhas de goiabeira utilizando membrana de nanofiltração. Obteve-se valores de fluxo iniciais de aproximadamente  $45 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ . Visualizou-se o desenvolvimento das resistências ao longo do processo, sendo que a resistência reversível foi correspondente a aproximadamente 60 % do valor total. Os resultados mostraram um incremento de aproximadamente 20 vezes na concentração de compostos fenólicos e de aproximadamente 10 vezes na atividade antioxidante. A simulação gastrointestinal reduziu em aproximadamente 30% a concentração de compostos fenólicos no extrato concentrado, complementarmente, quando avaliados em relação ao armazenamento, estes compostos se mantiveram estáveis durante 126 dias. Todos os extratos avaliados se mostraram eficientes para a inibição de células tumorais de pulmão, sendo que o extrato concentrado FRV 20 apresentou valores de inibição abaixo de  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em relação ao índice de seletividade, o concentrado FRV 10 apresentou valores superiores, mantendo após a simulação gastrointestinal e o armazenamento por 126 dias, valores de 4 e 6, respectivamente. Com base nos importantes resultados obtidos, os processos de separação por membranas se mostram uma alternativa promissora para a produção de extrato concentrado de folhas de goiabeira com elevado valor farmacológico e potencial citotóxico.

**Palavras-Chave:** folhas de goiabeira. Compostos fenólicos. Tecnologia de membranas.

## ABSTRACT

Guava (*Psidium guajava*) leaves are popularly known for their pharmacological effects, which are related to the presence of phenolic compounds and their antioxidant activity. Processes for the concentration of these extracts are necessary since their pharmacological effects are dose dependent. Within this context, membrane separation technology is an important alternative due to the many advantages inherent in this process such as the use of mild temperatures. The objective of this research was to concentrate the phenolic compounds present in the aqueous extract of guava leaves using nanofiltration membrane. Initial flow values of approximately 45 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> were obtained. The development of resistances was visualized throughout the process, with the reversible resistance corresponding to approximately 60% of the total. The results showed an approximately 20-fold increase in phenolic compound concentration and approximately 10-fold increase in antioxidant activity. Gastrointestinal simulation reduced the concentration of phenolic compounds in the concentrated extract by approximately 30%, complementarily, when evaluated in relation to storage, these compounds remained stable for 126 days. All extracts evaluated were efficient for inhibition of lung tumor cells, being that the concentrated extract FRV 20 showed inhibition values below 4 µg.mL<sup>-1</sup>. Regarding the selectivity index, the concentrate FRV 10 showed higher values, maintaining values of 4 and 6 after the gastrointestinal simulation and storage for 126 days, respectively. Based on the important results obtained, membrane separation processes are a promising alternative for the production of concentrated extract of guava leaves with high pharmacological value and cytotoxic potential.

**Keywords:** Guava leaves. Phenolic compounds. Membrane technology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos medicinais associados às folhas de goiabeira nos principais países produtores.....	28
Figura 2: Subdivisões dos compostos fenólicos presentes em alimentos de origem vegetal.....	31
Figura 3: Estrutura básica dos flavonoides .....	32
Figura 4: Esquema ilustrativo da filtração <i>dead-end</i> e <i>cross-flow</i> , onde $R_R$ é a resistência do depósito formado na superfície da membrana e $R_M$ é a resistência da membrana. ....	36
Figura 5: Variação esquemática no fluxo permeado em função do tempo de filtração.....	38
Figura 6: Fatores que influenciam o <i>fouling</i> em processos de separação por membranas .....	39
Figura 7: Ilustração dos mecanismos de bloqueio de poro para processos de separação por membranas.....	43
Figura 8: Declínio de fluxo permeado durante a nanofiltração do extrato aquoso de folhas de goiabeira a 35 °C e 800 kPa, em sistema aberto, usando os fatores de redução volumétrico (FRV) de 5, 10 e 20.....	66
Figura 9: Influencia do percentual da resistência reversível (polarização por concentração) ( $R_r$ ), resistência da membrana ( $R_m$ ) e resistência irreversível ( $R_{ir}$ ) no fluxo permeado para os FRV 5, 10 e 20.....	67
Figura 10: Dados experimentais mostrando vazão (Q) <i>versus</i> tempo ajustados com o modelo combinado de bloqueio completo de poro e torta de filtração para os FRV de 5 (a), 10 (b) e 20 (c). Curva sólida representa o modelo matemático. ....	71
Figura 11: Teores de compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante (métodos ABTS e DPPH) e valores de retenção dos compostos fenólicos bioativos do extrato aquoso de folhas de goiabeira e do respectivo concentrado obtido pelo processo de nanofiltração (FRV = 20).....	73
Figura 12: Atividade antioxidante obtida pelo cálculo da área abaixo da curva (AUC) no método ORAC para o extrato aquoso de folhas de goiabeira não concentrado e do respectivo concentrado obtido pelo processo de nanofiltração (FRV = 20). Diluição do FRV 20 de 80 vezes.....	75

Figura 13: Teores de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante medida pelo método do ABTS dos extratos não concentrado (SC) de folhas de goiabeira, bem como de seus respectivos extratos concentrados (C10 e C20), durante a avaliação da estabilidade em temperatura refrigerada (R) e temperatura ambiente (A), por 126 dias. ....92

Figura 14: Teores dos compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante medida pelo método do ABTS dos extratos não concentrado (SC) e concentrados (FRV 10 e 20) de folhas de goiabeira, durante as etapas da simulação gastrointestinal. ....95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos medicinais de extratos de folhas de goiabeira obtidos por meio de diferentes técnicas de extração e diferentes solventes .....	29
Tabela 2: Equações para modelagem de bloqueio de poro em processos de separação por membranas.....	42
Tabela 3: Aplicação dos processos de separação por membranas para a concentração de extratos aquosos.....	46
Tabela 4: Características físico-químicas do extrato aquoso de folhas de goiabeira ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ).....	65
Tabela 5: Constante fenomenológica (K) e valores de $R^2$ para o modelo de Hermia, adaptado por Field et al. (1995), para o processo de nanofiltração do extrato aquoso de folhas de goiabeira para os fatores de redução volumétricos (FRV) de 5, 10 e 20. ....	69
Tabela 6: Compostos fenólicos e outros compostos polares ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) para o extrato aquoso de folhas de goiabeira e seu respectivo concentrado obtido no processo de nanofiltração (FRV = 20).....	78
Tabela 7: Percentuais de recuperação de compostos fenólicos totais (CFT) nas diferentes etapas da simulação gastrointestinal, para as diferentes amostras (não concentrada e concentradas FRV 10 e 20).....	96
Tabela 8: Efeitos citotóxicos do extrato de folhas de goiabeira não concentrados (SC) e concentrado (FRV 10 e FRV 20) em células tumorais humanas de câncer de pulmão (A549) e fibroblastos renais de macaco-verde da África (VERO) pelo ensaio da Sulforrodamina B, após simulação gastrointestinal (AG) e após armazenamento de 126 dias (AA). Os resultados estão expressos como valores de $\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e índice de seletividade (IS). ....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Atividade antioxidante
A	Área da membrana
AUC	Área abaixo da curva
ABTS	2,2'-Azino-bis(ácido 3-etilbenzoatiazolina-6-sulfônico)
C	Concentração do principal responsável pelo fouling
C10A	Concentrado FRV10 temperatura ambiente
C10R	Concentrado FRV10 refrigerado
C20A	Concentrado FRV20 temperatura ambiente
C20R	Concentrado FRV20 refrigerado
$C_c$	Concentração do componente no concentrado
$CC_{50}$	Concentração da amostra que reduz em 50 % a viabilidade celular
$C_e$	Concentração de fenólicos na etapa
CFT	Compostos Fenólicos totais
$C_i$	Concentração de fenólicos na etapa inicial
$CO_2$	Gás Carbônico
$C_P$	Concentração do componente no permeado
DO	Densidade Óptica
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
$f_n$	Fluoresceína em cada ciclo de leitura
$f_0$	Fluoresceína no tempo zero
FRV	Fator de redução volumétrico
FT	Compostos fenólicos totais
$J^*$	Fluxo crítico no período de fluxo constante
$J_0$	Fluxo permeado inicial
J	Fluxo permeado
$J_F$	Fluxo permeado final
$J_w$	Fluxo água inicial
$J_{wF}$	Fluxo água final
K	Constante de processo
$K_1$	Constante do modelo de Hermia para o bloqueio intermediário
$K_a$	Constante do bloqueio completo de poro
$K_b$	Constante do bloqueio interno de poro

$K_c$	Constante do bloqueio intermediário de poro
$K_d$	Constante do modelo de torta de filtração
$K_t$	Constante da torta relacionando massa de torta/volume permeado
MEM	Minimal Essential Medium
MF	Microfiltração
N	Constante variável com o modelo de obstrução da membrana
NF	Nanofiltração
OI	Osmose Inversa
ORAC	Captura do radical oxigênio
P	Pressão transmembrana
PSM	Processos de separação por membranas
Q	Taxa de fluxo volumétrico (vazão)
$Q_0$	Taxa de fluxo volumétrico inicial
R (%)	Índice de retenção
$R_M$	Resistência da membrana
$R_{IR}$	Resistência irreversível
$R_R$	Resistência reversível
SC	Extrato não concentrado
SCA	Não concentrado temperatura ambiente
SCR	Não concentrado refrigerado
SFB	Soro fetal bovino
SRB	Sulforodamina B
TCA	Tricloroacético
UF	Ultrafiltração
$V_A$	Volume de Alimentação
$V_P$	Volume de permeado
$V_R$	Volume de concentrado ao final do processo
$\mu$	Viscosidade
$\mu_P$	Viscosidade do permeado
$\mu_W$	Viscosidade da água
A	Resistência específica da torta de filtração
$\epsilon_0$	Porosidade da superfície da membrana
$\Sigma$	Área bloqueada por unidade de volume filtrado

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
1.1 Objetivo Geral.....	23
1.2 Objetivos Específicos .....	24
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>27</b>
2.1 Folhas de Goiabeira ( <i>Psidium guajava</i> ).....	27
2.2 Compostos Fenólicos .....	30
2.3 Processos de separação por membranas .....	35
2.3.1 Declínio de fluxo permeado .....	37
2.3.2 Modelagem matemática para predição de fluxo permeado .....	40
2.3.3 Concentração de extratos vegetais por membranas.....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 3: CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE GOIABEIRA (<i>Psidium guajava</i> L.) PELO PROCESSO DE NANOFILTRAÇÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
2.1 Preparo das amostras .....	59
2.2 Preparo do extrato aquoso de folhas de goiabeira .....	59
2.3 Características físico-químicas.....	60
2.4 Concentração por nanofiltração.....	60
2.5 Compostos Fenólicos Totais (CFT).....	62
2.6 Atividade Antioxidante .....	62
2.7 Quantificação e caracterização dos compostos fenólicos e outros compostos polares .....	63
2.8 Análise Estatística .....	64

<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
3.1 Nanofiltração do extrato aquoso de folhas de goiabeira.....	64
3.2 Características bioativas do extrato.....	72
3.3 Quantificação e caracterização dos compostos fenólicos totais e outros compostos polares .....	76
<b>4. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS</b> .....	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO 4: INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO E DA SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL NOS EFEITOS CITOTÓXICOS DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE GOIABEIRA (NÃO CONCENTRADOS E CONCENTRADOS POR NANOFILTRAÇÃO) em CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO</b> .....	<b>84</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>85</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>87</b>
2.1. Produção do extrato aquoso de folhas de goiabeira .....	87
2.2. Processo de nanofiltração .....	87
2.3 Determinação da estabilidade durante o armazenamento .....	88
2.4 Simulação gastrointestinal.....	88
2.5 Compostos fenólicos totais.....	89
2.6 Atividade antioxidante .....	89
2.7 Determinação da viabilidade celular .....	90
2.8 Análise estatística.....	91
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>91</b>
3.1 Estabilidade ao armazenamento .....	91
3.2 Simulação gastrointestinal.....	94
<b>4. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS</b> .....	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>103</b>
<b>CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>106</b>

## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Concentração de compostos bioativos de folhas de goiabeira (*psidium guajava*) por nanofiltração e avaliação do efeito citotóxico do extrato concentrado

### Por quê?

- O Brasil é um grande produtor de goiaba, porém sua produção é basicamente destinada a produção de sucos, geleias e polpas. Nestes processos, há um descarte de folhas, cascas e sementes, que podem ser utilizadas como fonte de compostos bioativos.
- Os diversos efeitos farmacológicos relacionados aos compostos fenólicos são dose-dependentes.
- Os métodos de concentração tradicionais utilizam altas temperaturas e podem causar alterações sensoriais e nutricionais no produto.
- Os processos de separação por membranas apresentam diversas vantagens, como utilização de temperaturas brandas, alta seletividade e um baixo consumo energético.

### Quem já fez?

- Diversos trabalhos já foram realizados para a concentração de compostos bioativos oriundos de diferentes fontes vegetais por nanofiltração. Arend et al. (2017) avaliaram a concentração de sucos de morango; Brás et al. (2015) avaliaram a nanofiltração para a concentração de extratos de alcachofra; Murakami et al. (2013) realizaram a concentração de extratos aquosos de folhas de erva mate, entre outros. Todos estes autores relataram bons resultados, demonstrando o potencial desta tecnologia. Porém, durante pesquisas em diversas bases de dados, nenhum trabalho foi encontrado utilizando-se os processos de separação por membranas para a concentração dos compostos fenólicos totais presentes no extrato aquoso de folhas de goiabeira.

### **Hipóteses da pesquisa:**

- Qual será a eficiência da nanofiltração para a concentração dos compostos fenólicos do extrato aquoso da folha de goiabeira?
- Quais serão as resistências ao fluxo permeado que estarão presentes durante a nanofiltração?
- Como será o comportamento bioativo dos compostos fenólicos após a concentração?
- Quais são os compostos fenólicos majoritários?
- Qual o comportamento dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante ao longo do armazenamento?
- Como a concentração irá afetar a biodisponibilidade destes compostos?

### **Métodos experimentais:**

- Avaliação das variáveis de processo de nanofiltração necessárias para um elevado fluxo permeado e uma elevada retenção de compostos fenólicos.
- Caracterização das frações de permeado e concentrado obtidas após o processo de nanofiltração.
- Avaliação da biodisponibilidade dos compostos fenólicos.
- Avaliação dos efeitos farmacológicos das frações obtidas.
- Avaliação da estabilidade do extrato concentrado durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração e temperatura ambiente.

### **Resultados:**

- Quantificação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais, bem como caracterização dos compostos fenólicos presentes nas frações obtidas.

- Valores da biodisponibilidade dos compostos fenólicos após processo de simulação gastrointestinal
- Comportamento dos efeitos exercidos pelo extrato concentrado na inibição de células cancerígenas.
- Conhecimento do comportamento e da estabilidade dos compostos fenólicos concentrados após 120 dias de armazenamento sob refrigeração e temperatura

## **ESTRUTURA DO DOCUMENTO**

Este documento está apresentado na forma de capítulos, para facilitar a leitura e dar uma sequência lógica aos conteúdos abordados, esta tese está dividida da seguinte maneira: o capítulo 1 consiste na introdução geral. No capítulo 2 está apresentada uma breve revisão bibliográfica na qual será introduzida uma abordagem geral sobre os compostos fenólicos, as folhas de goiabeira e os processos de separação por membranas. No capítulo 3 faz-se uma abordagem sobre a nanofiltração, com análise de seus declínios de fluxo, desenvolvimento de resistências e características gerais do extrato concentrado obtido. No capítulo 4 o principal foco foi a atividade farmacológica do extrato concentrado, onde avaliou-se a estabilidade do mesmo frente ao armazenamento e a simulação gastrointestinal, bem como a manutenção da atividade citotóxica. Por fim, no capítulo 5 serão apresentadas as conclusões gerais do trabalho.

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a busca por alimentos que proporcionem uma dieta rica em compostos biologicamente ativos como, por exemplo, os compostos fenólicos, tem se intensificado. Isto se deve às diversas propriedades funcionais intrínsecas a esses compostos, como a redução de diversas doenças degenerativas e efeito antiproliferativo em células de câncer (BIESALSKI et al., 2009; DÍAZ-DE-CERIO et al., 2017a).

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma planta nativa das áreas tropicais e subtropicais, principalmente América do Sul. Suas partes, como folhas e frutas, são amplamente conhecidas por suas propriedades antidiarreicas, antimicrobianas, antitumorais, anti-inflamatórias, redutoras de biofilme dental, entre outras (DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016, 2017a).

De acordo com Barbalho et al. (2012) o Brasil é um dos maiores produtores de goiaba. Sua produtividade é majoritariamente destinada para a indústria de doces, sucos, geleias e polpas congeladas, resultando no descarte de folhas, sementes e cascas. De acordo com Souza, Natale e Rozane (2011) aproximadamente 8 % dos frutos processados são resíduos, o que corresponde a aproximadamente 4,5 mil toneladas. A deposição dessas folhas e demais frações é um dos maiores desafios da indústria de alimentos, uma vez que o descarte possui um elevado impacto ambiental (CASTRO-MUÑOZ; YÁÑEZ-FERNÁNDEZ; FÍLA, 2016).

Prudêncio et al. (2012) relataram que a produção de extratos aquosos a partir de resíduos industriais tem sido tema de diversos estudos, uma vez que esses podem ser excelentes fontes de compostos fenólicos. Porém, os extratos obtidos necessitam ser submetidos a processos de concentração, uma vez que os efeitos farmacológicos desses compostos são dose-dependentes.

A concentração destes extratos através de processos tradicionais como, por exemplo, a liofilização e a evaporação a vácuo, possuem como principais desvantagens o alto consumo de energia e as elevadas temperaturas de processamento. A utilização de altas temperaturas, por longos períodos de tempo, pode ocasionar reação de Maillard e, também, degradação dos compostos fenólicos, reduzindo a qualidade sensorial e nutricional do produto (GALANAKIS, 2013).

Neste contexto, o desenvolvimento de novas tecnologias para a concentração de compostos fenólicos é uma área em crescente desenvolvimento. Os processos de separação por membranas, com destaque para a nanofiltração, se apresentam como uma alternativa por possuírem diversas vantagens comparados aos processos convencionais. Segundo Castro-Muñoz, Yáñez-Fernández e Fíla (2016) destacam-se o baixo consumo de energia, as baixas temperaturas de processamento, a facilidade de operação e a ausência de transição de fase. Todas essas vantagens, coletivamente, facilitam a concentração dos compostos fenólicos dos extratos obtidos além de manter suas características nutricionais.

Embora a qualidade nutricional dos extratos das folhas de goiabeira já tenha sido estudada (BARBALHO et al., 2012; BRAGA et al., 2014; DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016, 2017a; JAIARJ et al., 1999; KANERIA; CHANDA, 2011; RAHIM et al., 2010; SINGH, 2011), não foram encontrados na literatura relatos da utilização dos processos de separação por membranas para a concentração desses extratos de folhas de goiabeira. Além disso, o processo de concentração pode modificar a atividade farmacológica, uma vez que pode existir uma atividade sinérgica entre os compostos presentes no extrato, que pode ser alterada pelo processo de concentração (LIU, 2004). Deste modo, torna-se interessante a avaliação da viabilidade dos processos de separação por membranas para a concentração destes.

A partir das informações acima citadas, justifica-se o desenvolvimento desta tese para avaliar a eficiência da nanofiltração para a concentração dos compostos bioativos fenólicos presentes no extrato aquoso de folhas de goiabeira. O processo e as características das frações obtidas foram estudados buscando uma elucidação completa do sistema.

## **1.1 Objetivo Geral**

Avaliar o processo de nanofiltração para a concentração dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de folhas de goiabeira (*Psidium guajava*), caracterizando o processo em relação ao declínio de fluxo e resistências ao fluxo permeado e as frações finais obtidas em relação aos seus compostos bioativos e atividade farmacológica.

## 1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o processo de nanofiltração do extrato aquoso de folhas de goiabeira para a concentração de compostos fenólicos compreendendo o comportamento das resistências envolvidas no declínio de fluxo permeado.
- b) Avaliar o efeito desse processo nas características bioativas dos extratos aquosos concentrados.
- c) Avaliar a biodisponibilidade *in vitro* dos compostos fenólicos dos extratos aquosos após o processo de concentração.
- d) Avaliar a atividade citotóxica dos extratos aquosos concentrados e não concentrados, bem como após o armazenamento e simulação gastrointestinal.
- e) Avaliar o comportamento dos perfis quantitativos dos compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante dos extratos aquosos concentrados durante armazenamento em diferentes condições, por tempo determinado.

## REFERÊNCIAS

BARBALHO, S. M. et al. Psidium Guajava (Guava): A Plant of Multipurpose Medicinal Applications. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 01, p. 1–6, 2012.

BIESALSKI, H. K. et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, p. 1202–1205, 2009.

BRAGA, T. V. et al. Antioxidant, Antibacterial and Antitumor Activity of Ethanolic Extract of the Psidium guajava Leaves. **American Journal of Plant Sciences**, v. 05, n. 23, p. 3492–3500, 2014.

CASTRO-MUÑOZ, R.; YÁÑEZ-FERNÁNDEZ, J.; FÍLA, V. Phenolic compounds recovered from agro-food by-products using membrane technologies: An overview. **Food Chemistry**, v. 213, p. 753–762, 2016.

DÍAZ-DE-CERIO, E. et al. Exploratory characterization of phenolic compounds with demonstrated anti-diabetic activity in guava leaves at different Oxidation States. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, 2016.

DÍAZ-DE-CERIO, E. et al. Health Effects of Psidium guajava L. Leaves: An Overview of the Last Decade. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 897, 2017.

GALANAKIS, C. M. Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 575–579, 2013.

JAIARJ, P. et al. Anticough and antimicrobial activities of Psidium guajava Linn. leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 2, p. 203–212, 1999.

KANERIA, M.; CHANDA, S. Phytochemical and Pharmacognostic Evaluation of Leaves of Psidium guajava L. (Myrtaceae). **Pharmacognosy Journal**, v. 3, p. 41–45, 2011.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3479S–3485S, 2004.

MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 533–539, 2010.

PRUDÊNCIO, A. P. A. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 399–405, 2012.

RAHIM, N. et al. Antibacterial activity of Psidium guajava leaf and bark against multidrug-resistant vibrio cholerae: Implication for cholera control. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p. 271–274, 2010.

SINGH, S. P. Guava (*Psidium guajava* L.). In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2011. p. 213–246.

SOUZA, H. A.; NATALE, W.; ROZANE, D. E. Agronomic evaluation of application of residue of the guava industry in a guava orchard. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 35, n. 3, p. 969–979, 2011.

## CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Folhas de Goiabeira (*Psidium guajava*)

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é um membro da família Myrtaceae, cujo gênero possui mais de 150 espécies (POMMER; MURAKAMI, 2009). Segundo Piedade-Neto, Malagutti e Dondelli (2003), a goiabeira é considerada uma planta arbórea de pequeno porte, que pode atingir de 3 a 5 metros de altura.

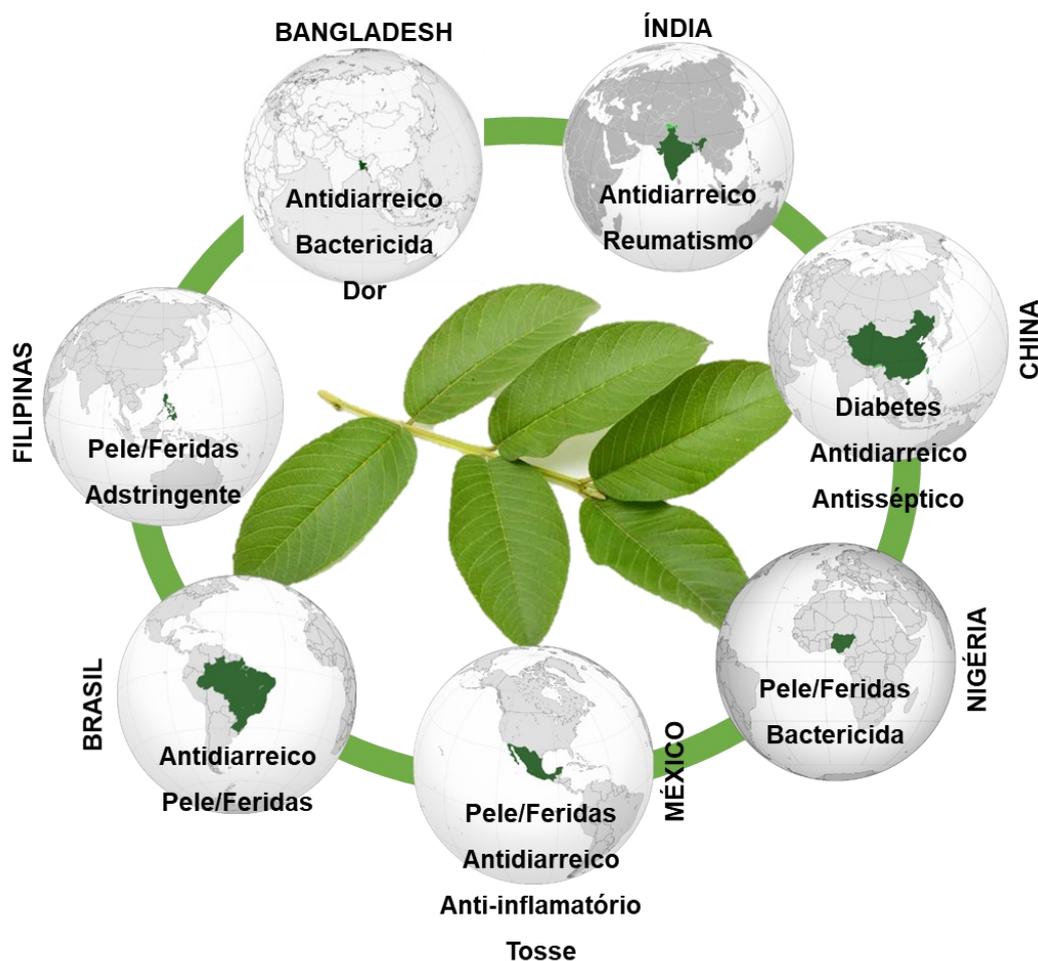
O cultivo da goiabeira apresenta destaque no agronegócio brasileiro pela sua importância social, econômica e alimentar, estando seus frutos entre os 20 com maior produção, totalizando 424.305 toneladas em 2016 (KIST et al., 2017; PIEDADE NETO; MALAGUTTI; DONDELLI, 2003). De acordo com Singh (2011) a grande adaptabilidade da goiabeira a diferentes climas e solos permitiu a sua expansão em climas tropicais e subtropicais em todo o mundo.

Diferentes trabalhos vêm sendo realizados com base nas propriedades medicinais da goiabeira, sendo que os primeiros estudos realizados datam dos anos 1940. Além de possuir frutos com elevado valor nutricional, extratos de raízes, talos e folhas também vêm sendo investigados com propósitos medicinais na América Central e na África (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008)

Suas folhas são opostas, inteiras, de formato oblongo-elípticas a ovaladas, de 7,0 a 15,0 cm de comprimento e 3,0 a 6,0 cm de largura (ANVISA, 2017) Gutiérrez, Mitchell e Solis (2008) relataram a presença de 6 % de óleo volátil, 3,15 % de resina, 8,5 % de taninos, além de lipídios, celulose, clorofila e sais minerais. O teor de umidade das folhas moídas é de 8,5 % e o conteúdo de cinzas totais de 7,65 % (Kanerla e Chanda, 2011). Além disso, também foi relatada a presença de flavonoides e saponinas (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008).

Díaz-de-Cerio et al. (2017) relataram diversas aplicações medicinais em diferentes continentes, como por exemplo, redução da diarreia, diabetes e tosse na Índia, China e Paquistão, ou como agente bactericida na Nigéria. Na Figura 1 é possível observar os principais efeitos relatados em alguns países.

Figura 1: Efeitos medicinais associados às folhas de goiabeira nos principais países produtores



Fonte: Adaptado de Díaz-de-Cerio et al. (2017)

O uso de extratos de folhas de goiabeira pode variar entre oral ou tópico, conforme o efeito desejado, sendo que esses extratos são obtidos, principalmente, por meio de infusões ou decocção (DÍAZ-DE-CERIO et al., 2017a). De acordo com Deguchi e Miyazaki (2010), a empresa Yakult (Bansoureicha®, Yakult Honsha, Tokyo, Japão) já possui disponível comercialmente um produto elaborado com extrato aquoso de folhas de goiabeira, aprovado como “*Food for Specified Health Uses*” (FOSHU), em tradução literal, alimento para usos específicos de saúde. No Tabela 1 estão descritos alguns dos trabalhos já realizados avaliando-se os efeitos medicinais dos extratos de folha de goiabeira obtidos por meio de diferentes métodos de extração e do uso de diferentes solventes.

Tabela 1: Efeitos medicinais de extratos de folhas de goiabeira obtidos por meio de diferentes técnicas de extração e diferentes solventes

<b>Extração</b>	<b>Efeitos medicinais</b>	<b>Referência</b>
<b>Não relatou o método de extração</b>	Efeito antiespasmódico com nenhum efeito adverso relatado pelos pacientes	(LOZOYA et al., 2002)
<b>Infusão aquosa</b>	Efeito hepatoprotetor aos danos agudos e crônicos e à necrose de fígado.	(ROY; KAMATH; ASAD, 2006)
<b>Maceração com solução de diclorometano e metanol</b>	Efeito citotóxico em células de fibrosarcoma de ratos e células de carcinoma de mama benignas, porém sem efeitos significativos em células metastáticas.	(KAILEH et al., 2007)
<b>Maceração com metanol, acetona ou dimetilformamida</b>	O extrato com acetona inibiu as 91 cepas de bactérias estudadas, e os outros dois extratos foram mais efetivos em bactérias gram-positivas.	(NAIR; CHANDA, 2007)
<b>Maceração com solução etanólica 50%</b>	Efeitos citotóxicos em células de adenocarcinoma de cólon de útero	(KAWAKAMI et al., 2009)
<b>Maceração com solução metanólica 75%</b>	Inibição das células de <i>Vibrio cholerae</i> e inibição da liberação gastrointestinal de acetilcolina	(RAHIM et al., 2010)
<b>Maceração com éter, metanol e água</b>	Efeito citotóxico em células de cânceres de colo de útero, mama e osteosarcoma	(SUL'AIN; ZAZALI; AHMAD, 2012)

<b>Extratos aquosos e etanólicos obtidos por infusão e maceração, respectivamente</b>	Efeito imunoestimulante	(LAILY et al., 2015)
<b>Extratos etanolicos obtidos por ultrassom</b>	Efeito hipoglicêmico devido à melhora no metabolismo da glicose e de lipídeos.	(DÍAZ-DE-CERIO et al., 2017b)
<b>Extratos obtidos por de hidrodestilação</b>	Efeito larvicida com taxa de mortalidade de aproximadamente 90 %.	(MENDES et al., 2017)
<b>Extratos aquosos obtidos por ultrassom</b>	Elevação da antiglicação com inibição máxima de aproximadamente 99 % para $\alpha$ -glucosidade	(LUO et al., 2018)

Fonte: O autor.

Além disso, é importante salientar que estudos já foram realizados buscando avaliar a toxicidade do consumo deste extrato. Kobayashi et al. (2005) avaliaram o consumo oral de doses diárias de extrato aquoso de folhas de goiabeira (200 e 2000 mg.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), durante um mês, e nenhum efeito adverso foi verificado; Gutiérrez, Mitchell e Solis (2008) relataram o mesmo comportamento, quando um consumo prolongado do extrato de goiaba não mostrou efeitos adversos.

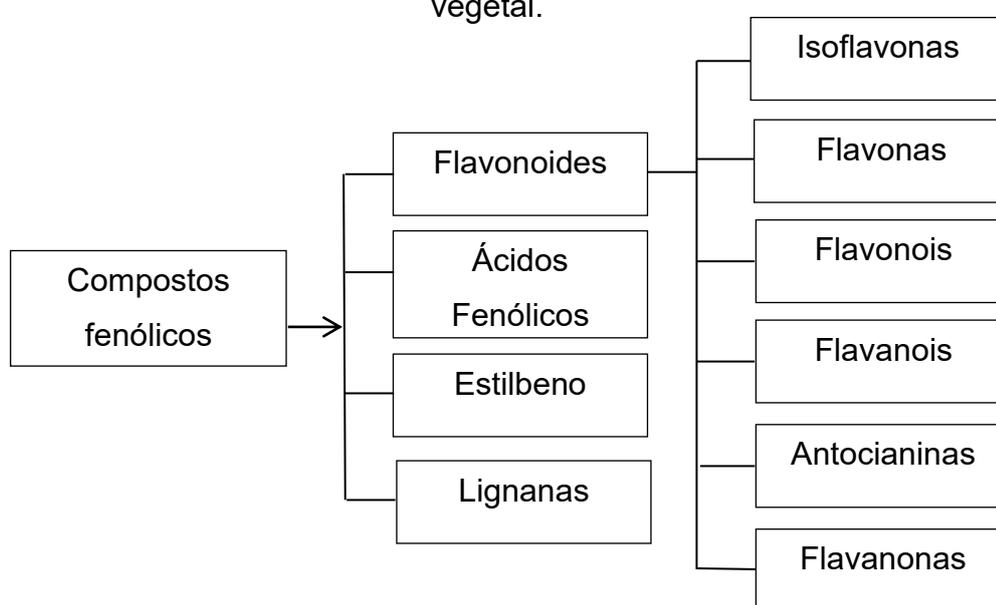
## 2.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários essenciais para o crescimento e para a reprodução das plantas. São produzidos em condições de estresse, como por exemplo, no caso de infecções, ferimentos, radiação UV intensa, falta de água, falta de nutrientes, entre outros (ANGELO; JORGE, 2007). De acordo com Pandey e Rizvi (2009) e Tylkowski et al. (2017), mais de 8 mil compostos

fenólicos já foram identificados, sendo encontrados principalmente em frutas, vegetais, especiarias e grãos.

Em relação à sua estrutura química, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes, que podem ser substituintes hidroxílicos ou seus grupos funcionais (ANGELO; JORGE, 2007). Devido a essa grande possibilidade de substituições, esses compostos foram divididos em quatro classes, conforme pode ser visualizado na Figura 2.

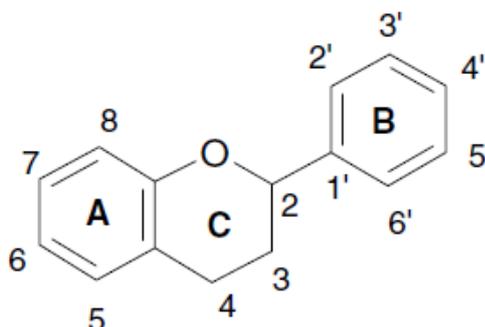
Figura 2: Subdivisões dos compostos fenólicos presentes em alimentos de origem vegetal.



Fonte: Carratù e Sanzini (2005)

Aproximadamente 50% dos compostos fenólicos são representados pelos flavonoides, sendo também a classe mais estudada (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; PANDEY; RIZVI, 2009). Esta classe engloba compostos de baixo peso molecular com estrutura básica constituída de 15 carbonos organizados na configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, formando então dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um anel heterocíclico oxigenado, conhecido por núcleo flavano (C), representados na Figura 3 (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 3: Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: Balasundram, Sundram e Samman (2006)

Os flavonóides são divididos em diferentes categorias de acordo com o seu nível de oxidação e pelas substituições no núcleo flavano (anel C), sendo que são diferenciados entre si pelas substituições nos anéis A e B, que podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfuração (ANGELO; JORGE, 2007; PIETTA, 2000).

Estas variações de estruturas são determinantes da sua atividade antioxidante e estão relacionadas a habilidade do flavonoide de eliminar radicais livres, doar átomos de hidrogênio e estabilizar cátions metálicos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

De acordo com Pietta (2000) e Soobrattee et al. (2005), as principais substituições que contribuem para o incremento da atividade antioxidante são:

- a) a presença de um grupo hidroxil nas posições 3-, 4- e 5- no anel B;
- b) uma ligação dupla entre C-2 e C-3, conjugada com o grupo 4-oxo no anel C;
- c) uma ligação dupla entre C-2 e C-3 combinada com um grupo hidroxila em C3 no anel C;
- d) substituição do(s) grupo(s) hidroxila(s) no anel B por grupos metoxila(s).

Devido ao seu potencial antioxidante, os flavonoides são de grande interesse para as indústrias de alimentos e farmacêutica. Ainda, esses compostos têm sido relacionados com a inibição da proliferação de células cancerígenas, e proteção em doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose e condições neurodegenerativas (CASTRO-MUÑOZ; YÁÑEZ-FERNÁNDEZ; FÍLA, 2016; PANDEY; RIZVI, 2009)

Além disso, a identificação de novas fontes de flavonoides, e de compostos fenólicos em geral, tem se tornado uma área em crescente desenvolvimento. De acordo com Castro-Muñoz, Yáñez-Fernández e Fíla (2016) há evidências de que diversos resíduos da indústria de alimentos podem ser utilizados como fontes de compostos fenólicos, como demonstrado por Prudêncio et al. (2012) que estudaram o aproveitamento de talos residuais da erva-mate, e Díaz-de-Cerio et al. (2016) o de folhas de goiabeira, ambas com altos teores destes compostos.

### 2.2.1 Atividade antioxidante

Atualmente, verifica-se um crescente interesse por alimentos ricos em compostos antioxidantes. Este comportamento se deve ao fato de que, os antioxidantes naturais são de grande importância na indústria de alimentos, pois além de prevenir a oxidação dos alimentos, também possuem efeitos benéficos na saúde humana, fator muito importante para agregação de valor a produtos alimentícios (GÜLÇİN, 2012).

O fornecimento destes antioxidantes através da alimentação são de extrema importância, pois agem interrompendo os processos oxidativos, que são os responsáveis por muitos problemas, como por exemplo, o câncer, doenças degenerativas cardíacas, envelhecimento, diabetes, entre outros (BARREIROS; DAVID, 2006).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada à estrutura química dos mesmos. De modo geral, esses compostos possuem a estrutura ideal para que ocorra o sequestro de radicais, onde o grupo hidroxila é doado aos radicais livres, neutralizando seu efeito (BARREIROS; DAVID, 2006).

Segundo Sanchez-Moreno (2002), o crescente interesse na determinação da atividade antioxidante dos alimentos, levou ao desenvolvimento de diferentes métodos para a determinação da atividade antioxidante. Os métodos se diferenciam entre si pelos mecanismos de ação, podendo ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC e TRAP) ou do radical orgânico (ABTS e DPPH), no poder de redução de um metal (FRAP) ou na peroxidação de lipídeos, onde os produtos formados são quantificados (co-oxidação do  $\beta$ -caroteno). Segundo Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2006), o comportamento dos compostos antioxidantes podem variar em meios aquosos ou lipofílicos, sendo que fatores como o tipo de solvente e a

polaridade do mesmo podem alterar significativamente os valores de atividade antioxidante. Além disso, o valor de pH do meio pode promover a protonação ou a dissociação de prótons dos compostos antioxidantes, alterando a sua atividade (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

O método do DPPH é bastante utilizado para a determinação da atividade antioxidante de frutos. Este método consiste na redução da coloração violeta escura para a cor amarela, durante a reação com o agente antioxidante. A vantagem desse método é a estabilidade do radical livre (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995), sendo um método altamente influenciável pelo solvente e pelo pH do meio reacional (HUANG; OU; PRIOR, 2005). De acordo com Schaich, Tian e Xie (2015), o método do DPPH para a determinação da atividade antioxidante de misturas sempre subestima o valor real da atividade da solução, apresentando então valores inferiores nas análises de células ou alimentos.

O método que utiliza o reagente de cor ABTS é baseado na inibição do radical ABTS pela adição de uma amostra. Esse método se baseia na mudança de cor do radical, variando do azul-escuro ao verde. O comprimento de onda de 734 nm é utilizado para que a interferência dos reagentes seja reduzida (MAGALHÃES et al., 2008). Deste modo, o método ABTS deve ser utilizado para monitorar mudanças devido ao processamento e ao armazenamento, porém não deve ser utilizado como método para determinar diferenças de atividade antioxidante devido a mudanças estruturais de compostos, entre outras (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

Um outro método de grande importância e representatividade se baseia na capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), e a principal vantagem é o monitoramento ao longo do tempo, sendo representativo para o processo que ocorre *in vivo*. Este método é baseado na capacidade das amostras de proteger a fluoresceína dos radicais de peróxido criados pela adição do AAPH (2, 2'-azobis-2-methylpropanimidamide, dihydrochloride). Sua principal desvantagem é a complexidade de execução e o controle das variáveis, as quais podem influenciar significativamente os valores de atividade antioxidante (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

Nenhum dos métodos citados acima é capaz de demonstrar completamente a atividade antioxidante de uma amostra. Mesmo o método ORAC, que possui medições ao longo do tempo, pode sofrer importantes variações devido a fatores intrínsecos e extrínsecos. Desta maneira, recomenda-se a utilização de mais de um

método para a determinação da atividade antioxidante (CAPOCASA et al., 2008; SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

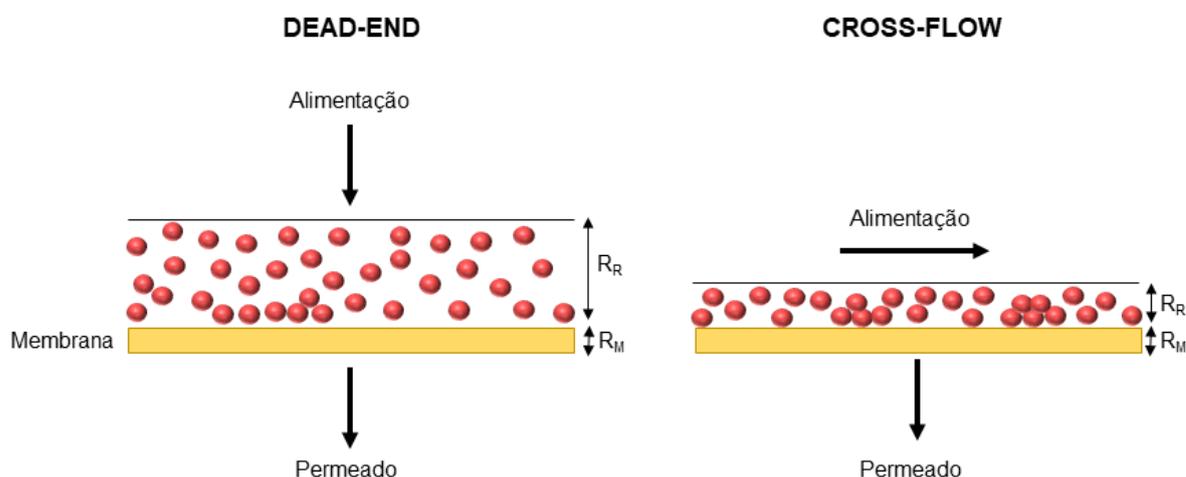
### 2.3 Processos de separação por membranas

Uma membrana é definida como uma barreira seletiva responsável pela transferência de massa dos solutos que chegam a sua superfície (CHERYAN, 1998). De acordo com Scott (1995), durante o processo, a solução alimentada é dividida em duas correntes distintas, sendo essas, a corrente que atravessa a membrana, chamada de permeado, e a corrente chamada de retido ou concentrado, que possui os sólidos em suspensão e os solutos maiores que os poros da membrana.

Os processos de separação por membranas (PSM) surgiram como uma alternativa à evaporação, destilação, centrifugação, absorção e troca iônica (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Esta substituição vem ocorrendo devido às diversas vantagens inerentes aos PSM, por exemplo, a alta seletividade, a simplicidade de operação e de escalonamento, utilização de temperaturas amenas, resultando na preservação dos compostos termolábeis, e também menores gastos energéticos (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006; MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010b).

Os PSM podem ser classificados em relação à sua configuração de escoamento (*dead-end* ou *cross-flow*). Durante a filtração *dead-end*, o fluido esco perpendicularmente à membrana, o que favorece o depósito de solutos na superfície da mesma, com conseqüente redução do fluxo permeado e necessidade de limpezas mais frequentes. Na filtração *cross-flow*, o fluido esco paralelamente à membrana em alta velocidade, assim os solutos depositados são arrastados da superfície da membrana e o declínio de fluxo permeado não se apresenta tão acentuado (CHERYAN, 1998; MULDER, 2000). Na Figura 4 estão demonstradas essas configurações de escoamento.

Figura 4: Esquema ilustrativo da filtração *dead-end* e *cross-flow*, onde  $R_R$  é a resistência do depósito formado na superfície da membrana e  $R_M$  é a resistência da membrana.



Fonte: Adaptado de Cheryan (1998)

Além disso, as membranas também podem ser classificadas em relação ao seu material de fabricação, podendo ser classificadas em membranas inorgânicas e orgânicas. As membranas inorgânicas possuem maior facilidade de limpeza e maior vida útil e podem ser preparadas a partir de materiais cerâmicos, principalmente alumina e zircônia (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Já as membranas orgânicas são preparadas a partir de materiais poliméricos puros ou em misturas com outros polímeros ou aditivos inorgânicos, que lhes conferem maior estabilidade estrutural e química, tornando-as, mais ou menos hidrofílicas, com mais ou menos cargas, por exemplo. Segundo Cheryan (1998), tanto as membranas orgânicas quanto as inorgânicas podem ser classificadas quanto à sua morfologia, em densas ou porosas, e em relação à sua estrutura, em simétricas ou assimétricas.

Uma membrana é classificada como densa quando o transporte dos solutos envolve um processo de difusão através do material da membrana, podendo ser inorgânica ou polimérica. Nas membranas porosas, a separação dos compostos é realizada, principalmente, pela diferença entre o tamanho dos poros da membrana e dos compostos da solução (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Para que ocorra a movimentação dos componentes através da membrana é necessário que uma força motriz externa seja aplicada no sistema, podendo ser uma

diferença de potencial químico (pressão, concentração, temperatura) ou de potencial elétrico (CHERYAN, 1998). Os processos de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF) e nanofiltração (NF) utilizam a diferença de pressão como força motriz, sendo que esses processos apresentam nessa mesma sequência uma redução no tamanho do poro, e conseqüentemente, torna-se necessário um aumento da pressão aplicada (CHERYAN, 1998; MIERZWA et al., 2008).

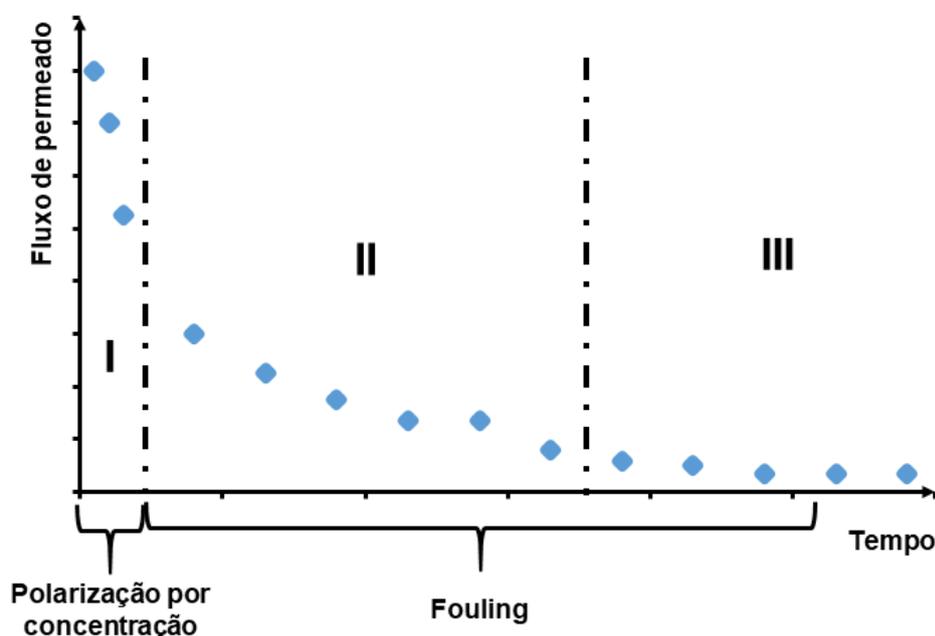
O processo de nanofiltração vem sendo aplicado com sucesso na área de alimentos para a concentração de compostos bioativos de extratos vegetais (MACHADO; MELLO; HUBINGER, 2013), vinhos (BANVOLGYI et al., 2006) e de suco de morango (AREND et al., 2017), entre outros. Esse processo é caracterizado pela capacidade de separação de sais bivalentes e de solutos orgânicos com massa molar entre 500 e 2000 g.mol<sup>-1</sup>. Geralmente, os processos de nanofiltração utilizam pressões de 1,5 a 40 bar, sendo aos processos economicamente favorecidos, quando comparados com processos que utilizam maiores pressões, como a osmose inversa (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006; SCHÄFER; FANE; WAITE, 2005).

Durante o processo de filtração pode ocorrer a redução do fluxo permeado, resultante dos fenômenos de polarização por concentração e incrustação irreversível (*fouling*), além do incremento da pressão osmótica (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). O controle de alguns fatores, como temperatura, pressão e velocidade de escoamento, podem melhorar a eficiência do processo de filtração (CHERYAN, 1998).

### 2.3.1 Declínio de fluxo permeado

Como descrito acima, os efeitos da polarização por concentração e *fouling* influenciam no fluxo permeado, fazendo com que o mesmo seja reduzido ao longo do tempo de processamento. O processo de nanofiltração possui uma curva típica de permeação através da membrana (Figura 5), descrita em três estágios: o primeiro estágio consiste em uma queda brusca no fluxo permeado nos primeiros minutos de filtração devido à polarização por concentração na superfície da membrana; no segundo estágio, inicia-se o acúmulo dos solutos na superfície da membrana e também o bloqueio dos poros; no terceiro estágio, ocorre a consolidação do processo, que é definida por uma queda de fluxo mais lenta, porém contínua (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Figura 5: Variação esquemática no fluxo permeado em função do tempo de filtração

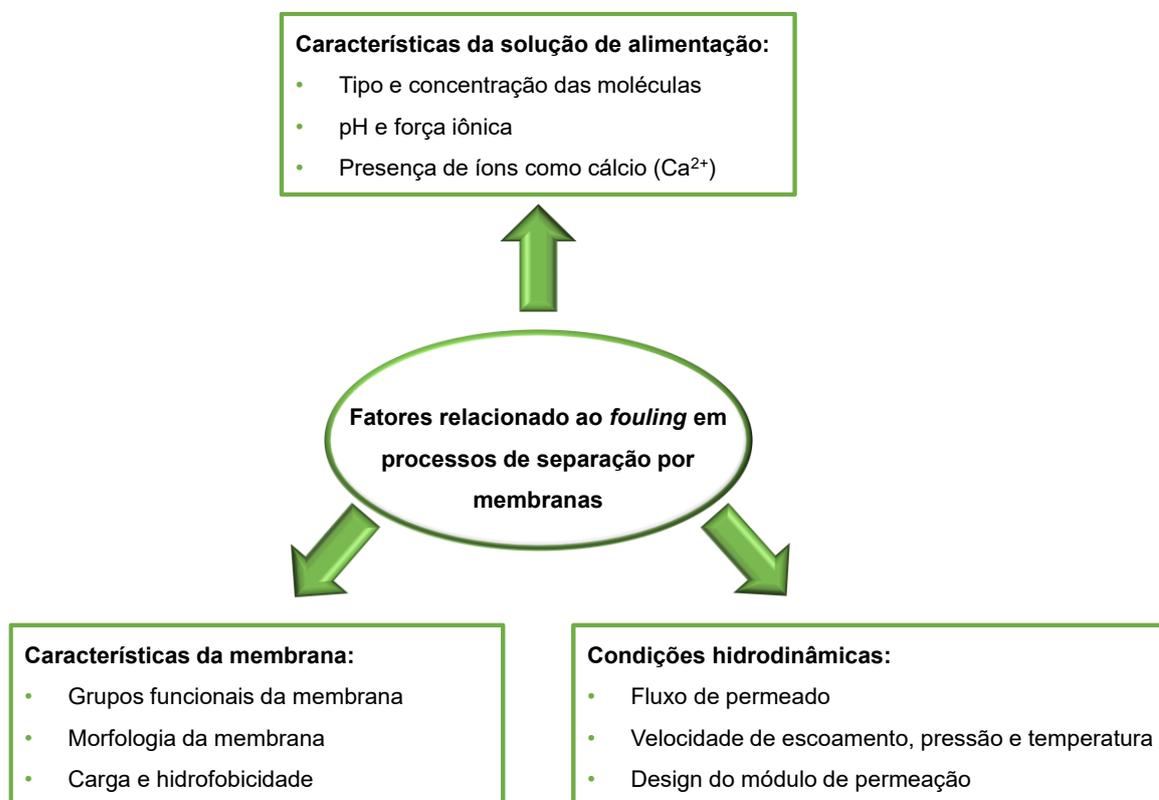


Fonte: Adaptado de Habert, Borges e Nobrega (2006)

Durante os PSM, um declínio de fluxo pode ser observado no decorrer do tempo de processamento, fator este relacionado às condições favoráveis ao entupimento da membrana. Como a membrana é uma barreira seletiva, os solutos que possuem tamanho superior aos poros da membrana são retidos e irão se acumular na superfície da membrana. Forma-se então um gradiente de concentração, já que a quantidade de solutos próximos à superfície da membrana torna-se maior que no seio da solução. Conseqüentemente, uma resistência adicional ao fluxo permeado é adicionada, conhecida como polarização por concentração. Essa camada de polarização pode formar uma camada gel polarizada quando a concentração dos solutos junto à membrana se torna constante (MELLO, 2012).

O *fouling* é um fenômeno complexo que está diretamente ligado ao entupimento dos poros e envolve a interação entre a solução de alimentação, as propriedades da membrana e as condições operacionais, conforme pode ser verificado na Figura 6 (MOHAMMAD et al., 2015).

Figura 6: Fatores que influenciam o *fouling* em processos de separação por membranas



Fonte: Adaptado de Tang, Chong e Fane (2011)

Como o desenvolvimento dos fenômenos descritos acima tem influência direta nos PSM, podem ser usados parâmetros para caracterizar funcionalmente o desempenho e a eficiência destes processos. Dentre os parâmetros mais usados destacam-se o fluxo permeado, o índice de retenção da membrana e o fator de redução volumétrico. Segundo Habert, Borges e Nobrega (2006), o fluxo permeado ( $J$ ) ( $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ ) pode ser definido como o volume (litros) de produto permeado que atravessa a área da membrana ( $m^2$ ), em um determinado tempo ( $h$ ), de acordo com a Equação 1:

$$J = \frac{V_P}{t \times A}$$

Equação 1

onde:  $J$  = fluxo permeado

$V_P$  = volume de permeado (L)

$t$  = tempo (h)

A = área da membrana (m<sup>2</sup>)

O índice de retenção da membrana (R (%)) é outro fator importante, definido como a capacidade da membrana em reter um determinado componente em determinada condição. Este índice é obtido pela Equação 2 que estabelece a relação entre a concentração de um determinado componente no concentrado (C<sub>R</sub>) e no permeado (C<sub>P</sub>), sendo este parâmetro então definido como índice de retenção (R (%)) (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

$$R (\%) = 1 - \frac{C_P}{C_R} \quad \text{Equação 2}$$

onde: R (%) = índice de retenção

C<sub>P</sub> = concentração do componente no permeado (mg.mL<sup>-1</sup>)

C<sub>R</sub> = concentração do componente no concentrado (mg.mL<sup>-1</sup>)

Além disso, o fator de redução volumétrico (FRV) quantifica a redução de volume atingido no processo de filtração, sendo que em alguns casos, ele pode ser usado como delimitador do final do processo. Este fator é obtido pela Equação 3, que estabelece a relação entre o volume de alimentação e o volume de concentrado ao final do processo.

$$FRV = \frac{V_A}{V_R} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: FRV = fator de redução volumétrico

V<sub>A</sub> = volume de alimentação do processo (L)

V<sub>R</sub> = volume de concentrado ao final do processo (L)

### 2.3.2 Modelagem matemática para predição de fluxo permeado

Dentre os fatores que controlam o desempenho dos processos de separação por membranas, o fluxo permeado é um dos parâmetros mais fácil de ser estudado e de fácil obtenção. A análise deste parâmetro é de fundamental importância para que

consiga a manutenção do fluxo permeado e a qualidade do concentrado, uma vez que limpezas muito frequentes elevam o tempo de processamento e podem danificar a membrana. Além disso, o entendimento completo do declínio de fluxo é necessário para a definição do protocolo de limpeza do sistema e também para um aumento de escala, quando necessário (SAID et al., 2015).

Assim, diversos modelos foram elaborados para tentar descrever e prever o fluxo permeado através da membrana uma vez que, em um processo de concentração por membranas, várias resistências estão envolvidas (CHERYAN, 1998). Segundo Habert, Borges e Nobrega (2006), as principais resistências visualizadas são a da membrana ( $R_M$ ); a resistência reversível ( $R_R$ ), que corresponde à polarização por concentração; e a resistência irreversível ( $R_{IR}$ ), que corresponde ao *fouling*.

Na Equação 4 está expressa a relação entre o fluxo permeado e a diferença de pressão aplicada ao sistema. A resistência total ( $R_T$ ) foi calculada de acordo com a Equação 5.

$$J = \frac{P}{\mu \times R_T} \quad \text{Equação 4}$$

sendo que:

$$R_T = R_M + R_R + R_{IR} \quad \text{Equação 5}$$

onde:  $J$  = fluxo permeado ( $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ )

$P$  = gradiente de pressão (kPa)

$\mu$  = viscosidade da solução (Pa.s)

$R_M$  = resistência da membrana

$R_R$  = resistência reversível

$R_{IR}$  = resistência irreversível

Além disso, outros modelos podem ser utilizados para descrever o declínio de fluxo durante o processo de filtração tangencial à pressão constante, como o modelo sugerido por Hermia (1982) e adaptado por Field et al. (1995), descrito na Equação 6. Estes modelos semi-empíricos, nos quais os parâmetros têm um significado físico, podem apresentar resultados satisfatórios para explicar o mecanismo de incrustação (CHERYAN, 1998).

$$-\frac{dJ}{dt}(J^{n-2}) = k(J - J^*) \quad \text{Equação 6}$$

onde: J = fluxo permeado ( $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ )

t = tempo (h)

n = constante que varia de acordo com o modelo de obstrução da membrana

k = constante do processo

J\* = fluxo permeado crítico no período de fluxo constante ( $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ )

A partir da Equação 6, diversas equações foram formuladas levando-se em consideração as particularidades de cada processo e o tipo de obstrução ocorrida na membrana (FIELD et al., 1995a). Na Tabela 2 constam as diferentes equações, bem como as suas respectivas constantes.

Tabela 2: Equações para modelagem de bloqueio de poro em processos de separação por membranas

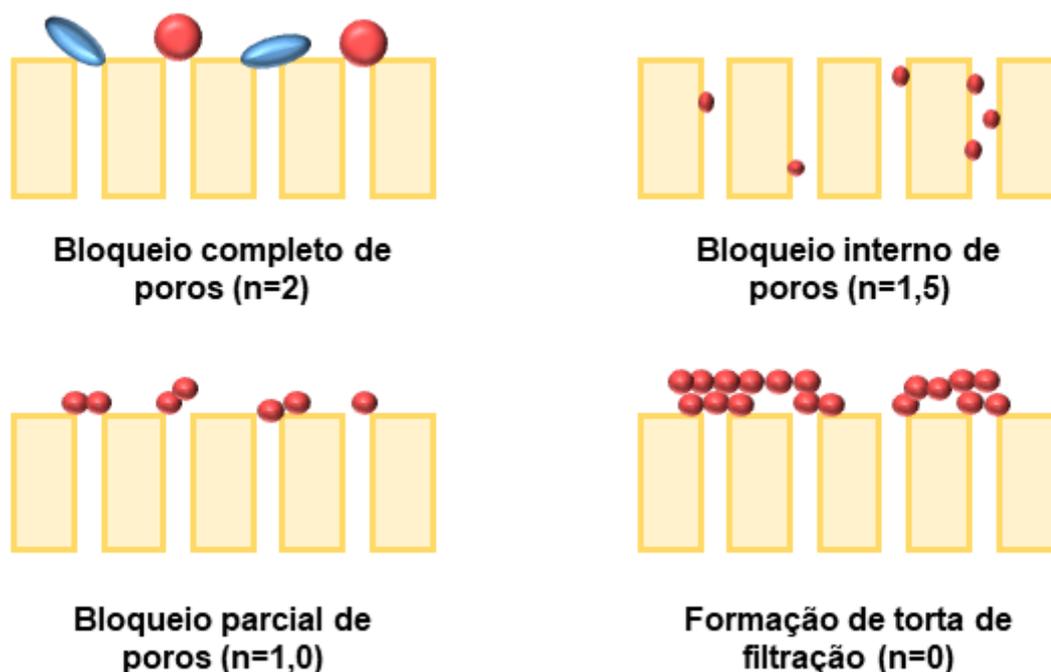
Mecanismos de bloqueio de poro	n	Equação final	Constante
Bloqueio de poro completo	2	$J = J^* + (J_0 - J^*)e^{(-k_a \cdot t)}$	$k_a = \frac{J_0 \cdot \sigma}{\varepsilon_0}$
Bloqueio interno de poro	1,5	$\frac{1}{J^2} = \frac{1}{J_0^2} + k_b \cdot t$	$k_b = \frac{k_1}{2} \cdot A^{\frac{1}{2}}$
Bloqueio parcial de poro	1	$k_c \cdot t = \frac{1}{J^*} \ln \left( \frac{J}{J_0} \cdot \frac{(J_0 - J^*)}{(J - J^*)} \right)$	$k_c = \sigma$
Formação de camada polarizada	0	$k_d \cdot t = \frac{1}{J^{*2}} \left[ \ln \left( \frac{J_0}{J} \cdot \frac{(J_0 - J^*)}{(J - J^*)} \right) \right] - J^* \left( \frac{1}{J} - \frac{1}{J_0} \right)$	$k_d = \frac{\alpha \cdot k_t}{J_0 \cdot R_M}$

Fonte: Adaptado de Brião e Tavares (2012)

Na Figura 7 estão demonstrados os diferentes mecanismos de incrustação. Segundo Vela et al. (2009), o bloqueio completo de poros (n=2) ocorre quando as partículas são maiores que os poros da membrana, e ao alcançarem a superfície da

mesma, bloqueiam completamente a entrada dos poros. O bloqueio interno de poro ( $n=1,5$ ) é causado por moléculas menores que o tamanho dos poros, que são então adsorvidas na parede do poro, causando a redução do seu volume. O modelo de bloqueio parcial de poro ( $n=1$ ) é menos restritivo que o bloqueio completo, considerando que as moléculas se aproximam dos poros abertos e os obstruem; porém, elas podem se depositar sobre outras previamente depositadas. Para o modelo da formação de camada polarizada ( $n=0$ ), considera-se que uma camada polarizada é formada na superfície da membrana por solutos maiores que seus poros, sendo que esses podem se depositar na superfície e também sobre os sólidos já depositados.

Figura 7: Ilustração dos mecanismos de bloqueio de poro para processos de separação por membranas



Fonte: Adaptado de Vela et al. (2009)

Geralmente, ao se analisar dados de declínio de fluxo, apenas um destes modelos é assumido. Porém, em soluções complexas com diferentes propriedades químicas e físicas e ampla distribuição de massa molecular, a aplicação de apenas um modelo é ineficiente, pois os solutos podem ser tanto adsorvidos no interior dos

poros da membrana, quanto ser depositados na superfície (HWANG; CHIANG, 2014).

O modelo sugerido por Ho e Zydney (2000) assume que uma deposição uniforme das partículas ocorre na superfície da membrana, e que os mecanismos de bloqueio de poro não acontecem de maneira isolada, e sim conjuntamente. Para isso, o modelo descrito na Equação 7 foi utilizado para avaliar o efeito combinado entre os fenômenos de bloqueio de poro e formação da torta de filtração

$$Q = Q_0 \left[ \exp\left(-\frac{\alpha PC}{\mu R_M} t\right) + \frac{R_M}{R_M + R_R} \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{\alpha PC}{\mu R_M} t\right)\right) \right] \quad \text{Equação 7}$$

O primeiro termo desta equação fornece um declínio exponencial simples, equivalente ao modelo de Hermia; porém, tempos mais longos de filtração são dominados pelo segundo termo da equação, proporcional à resistência da membrana e à resistência total (HO; ZYDNEY, 2000).

### 2.3.3 Concentração de extratos vegetais por membranas

Atualmente, o desperdício de alimentos engloba não somente o excedente de produção e as perdas por manuseio inadequado, como também o descarte de partes menos nobres dos alimentos, como talos, folhas, sementes e cascas, considerados como resíduos da indústria de alimentos (SANTOS, 2017). Segundo Wooton-Beard e Ryan (2011), a utilização dos alimentos como um todo é uma alternativa para enriquecer a alimentação diária com nutrientes, fibras, sais minerais e principalmente compostos bioativos.

Castro-Muñoz, Yáñez-Fernández e Fila (2016) relataram que diversos tipos de compostos bioativos de alto valor agregado são recuperados de resíduos da indústria de alimentos, tal como os compostos fenólicos. Porém, uma das principais desvantagens deste processo é a obtenção de extratos diluídos, sendo então necessário um processo de concentração, uma vez que os efeitos nutricionais e medicinais destes compostos são dose-dependentes (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007; PRUDÊNCIO et al., 2012).

Para que a implementação dessas técnicas de reuso sejam de longa duração nas indústrias, torna-se importante e indispensável o uso de tecnologias de baixo

custo, eficazes, que não agredam o meio ambiente e, principalmente, que não degradem o produto (BOAVENTURA, 2015). A utilização de técnicas tradicionais de concentração, como liofilização, evaporação e evaporação a vácuo, apresentam como desvantagens alto consumo de energia e altas temperaturas de processamento, não sendo então indicadas para produtos termolábeis (GALANAKIS, 2013).

Neste contexto, a aplicação de tecnologias mais recentes para a concentração de compostos bioativos de origem vegetal é uma área em constante desenvolvimento. A nanofiltração se mostra uma importante alternativa aos métodos convencionais de processamento. Mohammad et al. (2015) descreveram a concentração do suco de groselha-preta utilizando um sistema integrado de membranas e relataram uma redução de 43% do valor de operação em comparação com um evaporador de múltiplos estágios. Saidi et al. (2014) estudaram a aplicação de PSM ao resíduo de uma indústria de processamento de atum para fracionamento e concentração de peptídeos de diferentes tamanhos utilizando membranas de ultrafiltração e de nanofiltração.

Diferentes autores utilizaram membranas de nanofiltração para concentrar compostos fenólicos presentes em diversos extratos aquosos. A Tabela 3 mostra um resumo dos processos de concentração de extratos aquosos de diferentes matérias-primas vegetais.

Uma análise dos resultados constantes na bibliografia consultada demonstra que o processo de nanofiltração é eficiente para a concentração de diferentes extratos vegetais. Tendo em vista a grande variedade de membranas existentes, com diferentes seletividades, sabe-se que essas podem separar uma ampla gama de compostos (MACHADO; MELLO; HUBINGER, 2013), incluindo os compostos fenólicos.

Tabela 3: Aplicação dos processos de separação por membranas para a concentração de extratos aquosos

Membrana	Alimentação	Principais resultados e conclusões	Referência
<b>Membranas de ultrafiltração e nanofiltração de materiais poliméricos, cerâmicos e poliamida com MMC de 150 a 1000 Da</b>	Extrato aquoso de bagaço de uva fermentado	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentração de compostos fenólicos entre 3,5 a 6,3 vezes superior ao alimentado</li> <li>- Incremento da atividade antioxidante entre 3,5 a 6,4 vezes superior ao alimentado</li> <li>- Todas as membranas apresentaram rejeições similares</li> <li>- Processo eficiente para recuperação de resíduos de vinicultura.</li> </ul>	(DÍAZ-REINOSO et al., 2009)
<b>Membrana de nanofiltração com rejeição de 98% ao MgSO<sub>4</sub></b>	Extrato aquoso de própolis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentração de 4,1 vezes o teor de flavonóides</li> <li>- Concentração de 2,7 vezes o teor de compostos fenólicos totais</li> </ul>	(MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010a)
<b>Membranas de nanofiltração de poliamida, polietersulfona e polipiperazina com MMC de 180 a 1000 Da</b>	Licor de prensagem de laranjas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentração de compostos fenólicos entre 1,5 a 2,5 vezes superior ao alimentado</li> <li>- Concentração de antocianinas entre 1,6 e 2,6 vezes superior ao alimentado</li> <li>- Bons valores de fluxo utilizando-se baixas pressões</li> </ul>	(CONIDI; CASSANO; DRIOLI, 2012)

<b>Membrana de nanofiltração com MMC de 150 a 300 Da</b>	<b>de</b>	Extrato aquoso de cascas dos caules de erva-mate	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentração de 6,8 vezes o teor de compostos fenólicos</li> <li>- Incremento de até 8,44 vezes na atividade antioxidante</li> <li>- Processo eficiente para a concentração de compostos fenólicos</li> </ul>	(PRUDÊNCIO et al., 2012)
<b>Membrana de nanofiltração com MMC de 150 a 300 Da</b>	<b>de</b>	Extrato aquoso de folhas de erva-mate	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentração de 3,4 vezes o teor de compostos fenólicos</li> <li>- Concentração de 3,2 vezes o teor de clorofila</li> <li>- Processo eficiente para a concentração de compostos fenólicos</li> </ul>	(MURAKAMI et al., 2013)
<b>Membrana de nanofiltração com MMC de 150 a 300 Da.</b>	<b>de</b>	Soro de tofu	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incremento de 10 vezes da atividade antioxidante pelo método FRAP</li> <li>- Incremento de 2,5 vezes da atividade antioxidante pelo método ABTS</li> <li>- Incremento de 3,9 vezes do teor de isoflavonas totais</li> </ul>	(BENEDETTI et al., 2013)
<b>Membrana de nanofiltração de poliamida com MMC de 200 a 300 Da.</b>	<b>de</b>	Extratos aquoso e alcoólico de pequi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentração do teor de fenólicos totais de 1,05 e 1,5 vezes para os extratos alcoólico e aquoso, respectivamente</li> <li>- Concentração dos carotenoides de 1,07 e 1,7 vezes para os extratos alcoólico e aquoso, respectivamente.</li> <li>- Incremento da atividade antioxidante de 1,04 e 1,3 vezes para os extratos alcoólico e aquoso, respectivamente.</li> </ul>	(MACHADO; MELLO; HUBINGER, 2013)

---

<b>Membranas de nanofiltração de 250 a 1000 Da.</b>	Extrato aquoso de sementes de jamelão	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentração do teor de fenólicos totais de 1,5 vezes</li> <li>- Concentração de 1,2 vezes o teor de flavonoides</li> <li>- Incremento de 1,04 vezes da atividade antioxidante pelos métodos de DPPH E FRAP</li> </ul>	(BALYAN; SARKAR, 2016)
---	---------------------------------------	---	------------------------

<b>Membrana de nanofiltração de 150 a 300 Da.</b>	Suco de morango	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de 20 % no teor de compostos fenólicos</li> <li>- Aumento de 60 % no teor de antocianinas</li> <li>- Incremento da atividade antioxidante entre 60 e 100 % pelos métodos ABTS e DPPH</li> </ul>	(AREND et al., 2017)
---	-----------------	--	----------------------

<b>Membranas de nanofiltração de 200 a 400 Da.</b>	Extrato aquoso de bagaço de mirtilo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de até 1,4 vezes o teor de antocianinas totais</li> <li>- Aumento de até 1,3 vezes o teor de flavonóis</li> <li>-Aumento de até 1,4 vezes o teor de ácido clorogênico</li> </ul>	(AVRAM et al., 2017)
--	-------------------------------------	---	----------------------

<b>Membrana de nanofiltração de 500 a 600 Da.</b>	Extrato aquoso de pequi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Retenção de aproximadamente 100 % dos compostos fenólicos</li> <li>- Aumento de até 2,3 vezes o teor de fenólicos totais</li> </ul>	(MAGALHÃES et al., 2019)
---	-------------------------	--	--------------------------

---

<b>Membrana de nanofiltração de 150 a 300 Da.</b>	Águas residuais de lavagem da produção de mostarda amarela	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Retenção de compostos fenólicos de até 87 % em condições ácidas</li> <li>- Retenção de compostos fenólicos de até 70 % em condições básicas</li> <li>- Aumento de até 2,8 vezes o teor de compostos fenólicos</li> </ul>	(SINICHI; SIAÑEZ; DIOSADY, 2019)
<b>Membrana de nanofiltração de 300 Da</b>	Águas residuais da produção de azeite de oliva	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Retenção de compostos fenólicos acima de 95 %</li> <li>- Aumento de até 6,5 vezes o teor de compostos fenólicos</li> </ul>	(OCHANDO-PULIDO et al., 2020)

Com relação aos estudos supracitados é possível inferir que, mesmo utilizando-se diferentes matérias-primas vegetais, em todos os casos os PSM se mostraram eficientes para a concentração de diferentes compostos, obtendo-se valores de concentração variando de 1 a 10 vezes.

Outro fator muito importante a ser destacado são as variações entre o incremento do teor dos compostos de interesse e da atividade antioxidante da solução. Segundo Liu (2004) pode ocorrer sinergia entre os compostos, que pode ser alterada pelo processo de concentração.

Diante do exposto, são notáveis a eficiência e o potencial dos PSM para a concentração de compostos de diferentes fontes vegetais, produzindo ingredientes que podem ser utilizados, tanto na indústria alimentícia como na indústria farmacêutica. Este comportamento favorece a busca de diferentes fontes de compostos bioativos, e no cenário brasileiro, as folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) são uma excelente alternativa devido aos seus já conhecidos efeitos farmacológicos e seus elevados valores de produção.

## REFERÊNCIAS

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 1–9, 2007.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Farmacopeia Brasileira**. 5<sup>o</sup> edição ed. Brasília: [s.n.].

AREND, G. D. et al. Concentration of phenolic compounds from strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) juice by nanofiltration membrane. **Journal of Food Engineering**, v. 201, p. 36–41, 2017.

AVRAM, A. M. et al. Concentrations of polyphenols from blueberry pomace extract using nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 106, p. 91–101, 2017.

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, p. 191–203, 2006.

BALYAN, U.; SARKAR, B. Integrated membrane process for purification and concentration of aqueous *Syzygium cumini* (L.) seed extract. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 29–43, 2016.

BANVOLGYI, S. et al. Concentration of red wine by nanofiltration. **Desalination**, v. 198, n. 1–3, p. 8–15, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113–123, 2006.

BENEDETTI, S. et al. Concentration of soybean isoflavones by nanofiltration and the effects of thermal treatments on the concentrate. **Food Research International**, v. 50, p. 625–632, 2013.

BOAVENTURA, B. C. B. **Atividade antioxidante e crioconcentração dos compostos bioativos do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

BRAND-WILLIAMS; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G. Pore blocking mechanism for the recovery of milk solids from dairy wastewater by ultrafiltration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 393–407, 2012.

CAPOCASA, F. et al. Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. **Food Chemistry**, v. 111, p. 872–878, 2008.

CARRATÙ, B.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 41, p. 7–16, 2005.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2007. p. 519–535.

CASTRO-MUÑOZ, R.; YÁÑEZ-FERNÁNDEZ, J.; FÍLA, V. Phenolic compounds recovered from agro-food by-products using membrane technologies: An overview. **Food Chemistry**, v. 213, p. 753–762, 2016.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. 2. ed. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1998.

CONIDI, C.; CASSANO, A.; DRIOLI, E. Recovery of phenolic compounds from orange press liquor by nanofiltration. In: **Food and Bioproducts Processing**. [s.l.] Institution of Chemical Engineers, 2012. v. 90p. 867–874.

DEGUCHI, Y.; MIYAZAKI, K. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of guava leaf extract. **Nutrition & Metabolism**, v. 7, p. 1–10, 2010.

DÍAZ-DE-CERIO, E. et al. Exploratory characterization of phenolic compounds with demonstrated anti-diabetic activity in guava leaves at different Oxidation States. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, 2016.

DÍAZ-DE-CERIO, E. et al. Health Effects of *Psidium guajava* L. Leaves: An Overview of the Last Decade. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 897, 2017a.

DÍAZ-DE-CERIO, E. et al. The hypoglycemic effects of guava leaf (*Psidium guajava* L.) extract are associated with improving endothelial dysfunction in mice with diet-induced obesity. **Food Research International**, v. 96, p. 64–71, 2017b.

DÍAZ-REINOSO, B. et al. Ultra- and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 587–593, 2009.

FIELD, R. W. et al. Critical flux concept for microfiltration fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 100, p. 259–272, 1995.

GALANAKIS, C. M. Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 575–579, 2013.

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

GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 1–27, 2008.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006.

HERMIA, J. Constant pressure blocking filtration laws – application to power-law non-newtonian fluids. **Icheme**, v. 60, p. 183–187, 1982.

HO, C.; ZYDNEY, A. L. A Combined Pore Blockage and Cake Filtration Model for Protein Fouling during Microfiltration. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 232, p. 389–399, 2000.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841–1856, 2005.

HWANG, K. J.; CHIANG, Y. C. Comparisons of membrane fouling and separation efficiency in protein/polysaccharide cross-flow microfiltration using membranes with different morphologies. **Separation and Purification Technology**, v. 125, p. 74–82, 2014.

KAILEH, M. et al. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 510–516, 2007.

KANERIA, M.; CHANDA, S. Phytochemical and Pharmacognostic Evaluation of Leaves of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). **Pharmacognosy Journal**, v. 3, p. 41–45, 2011.

KAWAKAMI, Y. et al. Antiproliferative activity of guava leaf extract via inhibition of prostaglandin endoperoxide H synthase isoforms. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 80, n. 5–6, p. 239–245, 2009.

KIST, B. B. et al. **Anuário Brasileiro da Fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2017.

KOBAYASHI, T. et al. Safety evaluations of guava leaves and unripe fruit of guava: single dose and 1 month repeated dose oral toxicity studies in rats. **Annu Rep Yakult Cent Inst Microbiol Res**, v. 21, p. 81–100, 2005.

LAILY, N. et al. The Potency of Guava *Psidium Guajava* (L.) Leaves as a Functional Immunostimulatory Ingredient. **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 301–307, 2015.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3479S–3485S, 2004.

LOZOYA, X. et al. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 19–24, 2002.

LUO, Y. et al. Ultrasound extraction of polysaccharides from guava leaves and their antioxidant and antiglycation activity. **Process Biochemistry**, v. 73, p. 228–234, 2018.

MACHADO, M. T. C.; MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 450–457, 2013.

MAGALHÃES, F. DE S. et al. Recovery of phenolic compounds from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit extract by membrane filtrations: Comparison of

direct and sequential processes. **Journal of Food Engineering**, v. 257, n. October 2018, p. 26–33, 2019.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1–19, 2008.

MELLO, B. C. B. DE S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 166–172, 2010a.

MELLO, B. C. B. S. **Extração de própolis em meio aquoso e concentração dos extratos por nanofiltração**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2012.

MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 533–539, 2010b.

MENDES, L. A. et al. Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. July, p. 684–689, 2017.

MIERZWA, J. C. et al. Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração: Avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 13, p. 78–87, 2008.

MOHAMMAD, A. W. et al. Nanofiltration membranes review: Recent advances and future prospects. **Desalination**, v. 356, p. 226–254, 2015.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**, center for membrane science and technology. 2nd Editio ed. Enschede: Kluwer Academic Publishers, 2000.

MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 60–65, 2013.

NAIR, R.; CHANDA, S. In-vitro antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 452–458, 2007.

OCHANDO-PULIDO, J. M. et al. Optimization of polymeric nanofiltration performance for olive-oil-washing wastewater phenols recovery and reclamation. **Separation and Purification Technology**, v. 236, n. October, p. 116261, 2020.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270–278, 2009.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791–800, 2006.

PIEDADE NETO, A.; MALAGUTTI, A. M.; DONDELLI, L. E. R. Potencialidades e perspectivas da cultura da goiabeira. In: COSTA, A. F. S.; COSTA, A. N. (Eds.). **Tecnologias para produção de goiaba**. Vitória: Incaper, 2003. p. 11–24.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035–1042, 2000.

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

PRUDÊNCIO, A. P. A. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 399–405, 2012.

RAHIM, N. et al. Antibacterial activity of *Psidium guajava* leaf and bark against multidrug-resistant vibrio cholerae: Implication for cholera control. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p. 271–274, 2010.

ROY, C. K.; KAMATH, J. V.; ASAD, M. Hepatoprotective activity of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 44, p. 305–311, 2006.

SAID, M. et al. Blocking mechanism of PES membrane during ultrafiltration of POME. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 182–188, 2015.

SAIDI, S. et al. Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. **Food Research International**, v. 65, n. PC, p. 453–461, 2014.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121–137, 2002.

SANTOS, C. D. **Extração, clarificação e estabilização de betalaínas provenientes de talos de beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.)**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

SCHÄFER, A. .; FANE, A. G.; WAITE, T. D. **Nanofiltration - Principles and Applications**. Inglaterra: Elsevier Advanced Technology, 2005.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 111–125, 2015.

SCOTT, K. **Handbook of Industrial Membranes**. Introduction to Membranes Separations. 1st editio ed. Oxford: Elsevier, 1995.

SINGH, S. P. Guava (*Psidium guajava* L.). In: YAHIA, E. M. (Ed.). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2011. p. 213–246.

SINICHI, S.; SIAÑEZ, A. V. L.; DIOSADY, L. L. Recovery of phenolic compounds from the by-products of yellow mustard protein isolation. **Food Research International**, v. 115, p. 460–466, 2019.

SOBRATTEE, M. A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1–2, p. 200–213, 2005.

SUL'AIN, M. D.; ZAZALI, K. E.; AHMAD, N. Screening on Anti-Proliferative Activity of Psidium Guajava Leaves Extract towards Selected Cancer Cell Lines. **Journal of US-China Medical Science**, v. 9, p. 30–37, 2012.

TANG, C. Y.; CHONG, T. H.; FANE, A. G. Colloidal interactions and fouling of NF and RO membranes: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 164, p. 126–143, 2011.

TYLKOWSKI, B. et al. Concentration and Fractionation of Polyphenols by Membrane Operations. p. 231–241, 2017.

VELA, M. C. V. et al. Analysis of membrane pore blocking models adapted to crossflow ultrafiltration in the ultrafiltration of PEG. **Chemical Engineering Journal**, v. 149, p. 232–241, 2009.

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 329–334, 2011.

## CAPÍTULO 3: CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE GOIABEIRA (*PSIDIUM GUAJAVA L.*) PELO PROCESSO DE NANOFILTRAÇÃO

### Resumo

A parte experimental deste trabalho foi realizada em uma unidade piloto de nanofiltração para a concentração do extrato aquoso de folhas de goiabeira, utilizando um fator de redução volumétrico (FRV) até 20. O processo foi avaliado em função do fluxo permeado, modelagem do fluxo e qualidade do extrato concentrado (caracterização qualitativa dos compostos, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante). Observou-se um rápido declínio no fluxo de permeado no início do processo, seguido por um estágio pseudo-estacionário próximo a  $15 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ . Os modelos matemáticos predominantes foram de torta de filtração ( $R^2=0,97$ ) e bloqueio incompleto de poros ( $R^2=0,99$ ). O modelo combinado de declínio de fluxo foi também avaliado e apresentou resultados satisfatórios para prever o declínio de fluxo, além de apresentar um bom ajuste ao modelo ( $R^2>0,9$ ). Além disso, o processo de nanofiltração foi eficiente para a concentração dos compostos bioativos com um aumento no teor de compostos fenólicos totais próximo a 20 vezes (FRV=20), chegando a aproximadamente  $45 \text{ mg GAE.mL}^{-1}$ . Seguindo o mesmo comportamento, houve um aumento da atividade antioxidante de aproximadamente 10 vezes (FRV=20). Por fim, o presente estudo comprovou que o extrato aquoso de folhas de goiabeira é rico em compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante e que o processo de nanofiltração demonstrou ser uma tecnologia eficiente para a concentração de compostos termolábeis.

Palavras-chave: Folhas de *Psidium guajava*, atividade antioxidante, fluxo permeado, HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS, modelagem matemática.

### 1. INTRODUÇÃO

A busca por alimentos que podem proporcionar uma dieta composta por compostos bioativos, como por exemplo os compostos fenólicos totais, vem se intensificando devido às propriedades funcionais intrínsecas desses compostos

(BIESALSKI et al., 2009; DÍAZ-DE-CERIO et al., 2017a). As folhas de goiabeira são utilizadas na medicina tradicional de vários países para o tratamento de diversas doenças (DÍAZ-DE-CERIO et al., 2017b). Almulaiky et al. (2018) e Díaz-de-Cerio et al. (2017a) relataram que o extrato de folhas de goiabeira possui várias atividades farmacológicas, como por exemplo ações antiespasmódica, antidiabética, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antidiarreica, citotóxica, entre outras.

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas envolvendo o estudo de plantas que sejam fonte de compostos bioativos. Entretanto, pouca atenção vem sendo dispensada para o impacto dos processos de concentração no teor de compostos bioativos ao final do processo. Dentre esses destacam-se os PSM, o qual tem sido investigado para a concentração de diversos extratos vegetais. Comumente, a evaporação em pressão normal é utilizada, porém ela pode reduzir a atividade antioxidante devido à exposição térmica. Assim sendo, tudo indica que os PSM são uma tecnologia promissora para a recuperação de compostos termolábeis em comparação com outros processos que utilizam altas temperaturas. Avram et al. (2017) verificaram que a tecnologia de membranas é vantajosa em relação aos processos convencionais para a recuperação de compostos bioativos de subprodutos agro-alimentares usando a nanofiltração. Entretanto, Balyan e Sarkar (2018) afirmaram que a maior desvantagem nos PSM é o *fouling*, o qual é associado ao declínio de fluxo permeado ao longo do tempo de filtração.

O *fouling* em membranas está relacionado a diversas causas, como adsorção, bloqueio pelo soluto e formação de camada de deposição na superfície da membrana, bem como composição do extrato. Neste sentido, a modelagem matemática é necessária para quantificar o declínio de fluxo permeado durante o processo de concentração, o que permite prever o comportamento ao longo do processo (BALYAN; SARKAR, 2018). Alguns dos melhores modelos foram descritos por Hermia (1982) e Ho e Zydney (2000), os quais podem ser bastante úteis para compreender as principais razões relacionadas ao declínio de fluxo e também podem ser de grande auxílio para aumentos de escala. De acordo com Balyan e Sarkar (2018), estão disponíveis na literatura poucos estudos considerando a ocorrência de mais de um mecanismo de *fouling* e que seja capaz de explicar o declínio de fluxo ao longo de todo o processo. Além disso, a eficiência do processo de nanofiltração não pode ser avaliada apenas em função do fluxo permeado e do declínio de fluxo, mas também em função da qualidade final dos compostos

bioativos.

Até a data deste trabalho, não foram encontrados na literatura trabalhos que estudaram o processo de nanofiltração para a concentração de compostos bioativos de folhas de goiabeira ou suas frações resultantes. Com base no descrito acima, este trabalho foi elaborado para suprir estas lacunas, avaliando o processo de nanofiltração para a concentração do extrato aquoso de folhas de goiabeira, bem como o produto final. Assim, o presente estudo teve como objetivos: (i) concentrar o extrato aquoso de folhas de goiabeira em diferentes fatores de redução volumétricos (FRV); (ii) quantificar o declínio de fluxo e o desenvolvimento do *fouling* reversível e irreversível durante o processo de nanofiltração; e (iii) identificar e quantificar os compostos fenólicos e a atividade antioxidante deste extrato.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Preparo das amostras**

As folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) foram colhidas em Biguaçu, (latitude, 27° 29' 39" S; longitude, 48° 39' 20" W; altitude 2 m acima do nível do mar), Santa Catarina, Brasil, em julho de 2017. Foram reconhecidas por comparação pelo herbário da Universidade Federal de Santa Catarina (Flor) com exsicata código FLOR67263. As folhas foram colhidas, limpas, branqueadas (90 °C por 3 minutos, seguido de banho de gelo até resfriamento total) e secas em estufa com circulação de ar forçada (FABBE, 171, São Paulo, Brasil) a 45 °C, durante 3 h. As folhas secas foram moídas em moinho de facas (Marconi, MA-580, Piracicaba, Brasil). As amostras foram então armazenadas em sacos plásticos protegidos com pacotes de alumínio e mantidas a -18 °C, até a preparação do extrato aquoso de folhas de goiabeira.

### **2.2 Preparo do extrato aquoso de folhas de goiabeira**

O extrato de folhas de goiabeira foi produzido de acordo com Laily et al. (2015), utilizando 20 g de folhas moídas suspensas em 1 L de água destilada a 95 °C, sob agitação constante. Após 10 min, o extrato foi filtrado com filtro de nylon (poro de 125 µm), e o volume foi completado para 1 L com água destilada.

### 2.3 Características físico-químicas

Os teores de umidade, cinzas totais e lipídios foram determinados de acordo com IAL (2005). O teor de proteínas foi determinado de acordo com AOAC (2016), utilizando 6,25 como fator de conversão. O teor total de carboidratos foi obtido pela diferença entre a massa total de amostra e a soma da massa dos demais compostos. O potencial Zeta da solução foi medido em equipamento Stabino (Stabino Control® 2.00.23 – Particle Metrix) e os resultados expressos em milivolts (mV).

### 2.4 Concentração por nanofiltração

A concentração do extrato aquoso de folhas de goiabeira foi realizada utilizando um sistema piloto de filtração tangencial equipado com uma membrana espiral de nanofiltração de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Osmonics, Minnetonka, MN), com massa molar de corte (MMC) de aproximadamente 150-300 g.mol<sup>-1</sup>, e área de filtração de 1,2 m<sup>2</sup>. Os parâmetros de operação do processo foram temperatura de 35 ± 1 °C e pressão de 800 kPa, em diferentes fatores de redução volumétrico (FRV) e o fluxo permeado (L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>) foi medido a cada 5 min.

Após o processo de nanofiltração, a membrana foi limpa através de uma etapa de limpeza física (utilizando água destilada) e uma etapa de limpeza química (hidróxido de sódio a 45 °C) e foram determinadas as resistências ao fluxo permeado: reversível (Equação 1), irreversível (Equação 2) e da membrana (Equação 3). Todas as resistências foram calculadas em relação à resistência total (Equação 4), que corresponde a 100 %.

$$R_r = R_t - R_m - R_{ir} \quad (1)$$

$$R_{ir} = \left( \frac{P_t}{\mu w * J_w f} \right) - R_m \quad (2)$$

$$R_m = \left( \frac{P_t}{\mu w * J_w} \right) \quad (3)$$

$$R_m = \left( \frac{P_T}{\mu_p * J_f} \right) \quad (4)$$

Onde:  $R_r$  é a resistência reversível ( $m^{-1}$ ),  $R_t$  é a resistência total ( $m^{-1}$ ),  $R_m$  é a resistência da membrana ( $m^{-1}$ ),  $R_{ir}$  é a resistência irreversível ( $m^{-1}$ ).  $P_T$  é a pressão total utilizada no experimento (Pa),  $\mu_w$  é a viscosidade da água (Pa.s),  $\mu_p$  é a viscosidade do permeado (Pa.s),  $J_{wf}$  é o fluxo de água no final do experimento ( $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ ),  $J_w$  é o fluxo de água ( $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ ) e  $J_f$  é o fluxo final com o extrato aquoso de folhas de goiabeira ( $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ ).

A avaliação dos mecanismos de *fouling* durante o processo de nanofiltração foi realizada de acordo com o modelo sugerido por Hermia (1982) e adaptado por Field et al. (1995). A equação diferencial utilizada está descrita na Equação (5):

$$-dJ/dt (J^{n-2}) = K(J - J^*) \quad (5)$$

Onde  $J^*$  é o fluxo permeado no período pseudo-estacionário (mesma unidade que fluxo)  $K$  é uma constante fenomenológica do modelo com significado físico e  $n$  é um parâmetro do modelo, o qual é dependente do mecanismo de *fouling*.

De acordo com Garcia-Ivars et al. (2017) quando  $n=2$ , o modelo de bloqueio completo de poros é assumido, resultando no fato que cada partícula participa do bloqueio dos poros sem passar através da estrutura porosa. Quando  $n=1,5$ , as partículas com tamanho menor do que os poros da membrana podem passar através dos poros, reduzindo a eficácia do tamanho dos poros, comportamento característico do bloqueio padrão. Quando  $n=1$ , o mecanismo de *fouling* é representado pelo bloqueio incompleto de poros, no qual as partículas não podem entrar na estrutura porosa e se depositam umas sobre as outras, formando multicamadas. Por fim, quando o valor de  $n=0$ , os bloqueios de poro são negligenciados e ocorre a formação de uma torta de filtração devido ao acúmulo de partículas na superfície da membrana (GARCIA-IVARS et al., 2017). Além disso, para avaliar o efeito combinado dos diferentes bloqueios de poro e da torta de filtração, o modelo sugerido por Ho e Zydney (2000) foi utilizado (Equação 6).

$$Q = Q_0 \left[ \exp\left(-\frac{\alpha \Delta PC}{\mu R_m} t\right) + \frac{R_m}{R_m + R_p} X \left(1 - \exp\left(-\frac{\alpha \Delta PC}{\mu R_m} t\right)\right) \right] \quad (6)$$

Onde  $Q_0$  é a vazão inicial ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $\alpha$  é o parâmetro de bloqueio de poro ( $\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ ),  $\Delta P$  é a pressão transmembrana (Pa),  $C$  é a concentração de carboidratos na alimentação, descrita no Item 2.3, a qual foi considerada  $0,5 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  para o extrato aquoso de folhas de goiabeira,  $\mu$  é a viscosidade do permeado (Pa.s),  $R_m$  é a resistência da membrana ( $\text{m}^{-1}$ ) e  $t$  é o tempo de filtração (s). O ajuste de todas as equações foi realizado com uma rotina para programa Matlab (R2013a, MathWorks Inc, MA, USA), utilizado a função `nlinfit`.

## 2.5 Compostos Fenólicos Totais (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). A solução permaneceu em ambiente escuro por 2 h e a absorbância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (UV-Vis mini-1241, Tokyo, Japan). Água destilada foi utilizada como branco. Ácido gálico foi utilizado para construção de curva padrão e os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg GAE} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

## 2.6 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das amostras foi analisada pelos métodos DPPH e ABTS. A atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi realizada de acordo com Rufino et al. (2007), pela reação da amostra com a solução metanólica do DPPH. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 515 nm, e metanol foi utilizado como branco. Para a determinação por ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico)], Rufino et al. (2007a) propuseram um método baseado na reação do ABTS com a amostra. Etanol foi utilizado como branco e as absorbâncias foram medidas a 734 nm em espectrofotômetro (UV-Vis mini-1240, Tóquio, Japan). Os resultados foram obtidos pela comparação com a curva padrão de ácido gálico, e expressos como equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg GAE} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

Um terceiro método baseado na captura do radical de oxigênio (ORAC) foi utilizado para a determinação da atividade antioxidante. Este método sugerido por Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001) foi realizado com a adição de 25 µL de amostra, ou solução de Trolox®, em solução tampão de fosfato de potássio 75 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,4), incubados durante 10 min a 37 °C, com posterior adição de 150 µL de solução de fluoresceína dissódica (81 nmol.L<sup>-1</sup>), utilizada como indicador e de 25 µL de AAPH (152 mmol.L<sup>-1</sup>), adicionado como gerador de radicais de peróxido.

A fluorescência das amostras foi quantificada a cada minuto (comprimentos de onda de emissão e de excitação de 530 ± 25 e 485 ± 20 nm, respectivamente) a 37 °C, durante 90 min. Os valores de ORAC foram obtidos em comparação com uma curva padrão de Trolox® com concentrações entre 0 e 96 µmol.L<sup>-1</sup>, e com o cálculo da área abaixo da curva (AUC) de redução de fluoresceína.

Os resultados foram expressos como µmol equivalentes de Trolox® por mL de amostra e a AUC foi obtida através da Equação (7)

$$AUC = 1 + f^1/f_0 + f^2/f_0 + f^3/f_0 + \dots f^n/f_0 \quad (7)$$

Onde:

$f_n$  = fluoresceína em um ciclo de leitura (1 min)

$f_0$  = fluoresceína no tempo zero

## 2.7 Quantificação e caracterização dos compostos fenólicos e outros compostos polares

A quantificação e caracterização dos compostos fenólicos e outros compostos polares foi realizada por meio de análises em HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS, de acordo com Díaz-De-Cerio et al. (2016). Para isso, foi utilizado um sistema Agilent 1200-LC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado com degaseificador a vácuo, amostrador automático, bomba binária e detector de matriz de diodos UV-Vis (DAD). Uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (4.6 mm x 100 mm, tamanho de partícula 2.7 µm) (Agilent Technologies) foi utilizada para separar os

compostos das amostras. A fase móvel constituiu-se de água contendo ácido acético 1 % como solvente A e acetonitrila como solvente B e o seguinte gradiente de eluição foi utilizado 0 min, 0,8% B; 2,5 min, 0,8% B; 5,5 min, 6,8% B; 11 min, 14,4% B; 17 min, 24% B; 22 min, 40% B; 26 min, 100% B; 30 min, 100% B; 32 min, 0,8% B; e 34 min, 0,8% B. O volume de amostra injetado foi de 5  $\mu\text{L}$ , vazão de 0.8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , e a coluna foi mantida a 25  $^{\circ}\text{C}$ . As análises de massas foram realizadas utilizando o equipamento 6540 Agilent Ultra-High-Definition Accurate-Mass Q-TOF-MS acoplado ao HPLC, equipado com interface de ionização por eletro-pulverização Agilent Dual Jet Stream no modo de ionização negativa nas seguintes condições: fluxo do gás de secagem ( $\text{N}_2$ ), 12.0  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; pressão do nebulizador, 50 psi; temperatura do gás de secagem, 370  $^{\circ}\text{C}$ ; voltagem capilar, 3,500 V; e voltagem do fragmentador e faixa de varredura, 3,500 V e 50-1,500 m/z, respectivamente. A janela de detecção foi ajustada para 100 ppm. A integração e elaboração dos dados foram realizadas com o programa Hunter Workstation software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

## **2.8 Análise Estatística**

A nanofiltração e demais análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram avaliados utilizando-se o programa STATISTICA versão 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA). ANOVA e teste de Tukey foram utilizados para determinar diferenças significativas. As diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ . Os valores de  $R^2$  foram calculados para verificar o ajuste dos modelos aos dados experimentais.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Nanofiltração do extrato aquoso de folhas de goiabeira**

De acordo com Verma and Sarkar (2015), o principal problema nos processos de separação por membranas é o declínio do fluxo permeado ao longo do tempo. Este declínio é atribuído, principalmente, ao acúmulo de macromoléculas ou espécies coloidais na superfície da membrana, demonstrando a importância de se

conhecer a composição química do extrato aquoso de folhas de goiabeira, que está apresentado na Tabela 4.

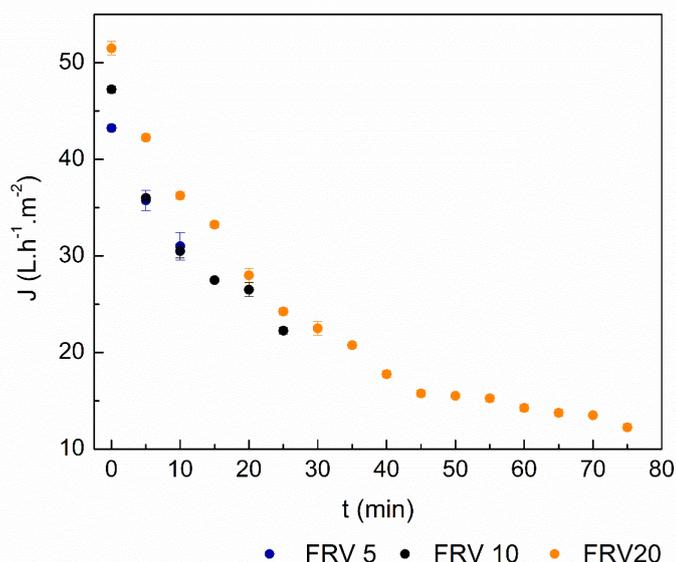
Tabela 4: Características físico-químicas do extrato aquoso de folhas de goiabeira ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ).

Composto	Teor
Carboidratos	$0,50 \pm 0,07$
Lipídios	$0,25 \pm 0,01$
Proteínas	$0,46 \pm 0,05$
Cinzas	$0,13 \pm 0,04$
Umidade	$98,67 \pm 0,15$

Os constituintes majoritários das folhas de goiabeira são os carboidratos ( $0.5 \pm 0.07 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) e proteínas ( $0.46 \pm 0.05 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), os quais são relatados como sendo os principais agentes responsáveis pelo *fouling* em PSM (VERMA; SARKAR, 2015; WANG; TANG, 2011). Além disso, Prudêncio et al. (2012), ao avaliarem as cascas de caules de erva mate encontraram resultados similares, tendo relatado como principais constituintes fibras e proteínas.

O extrato aquoso de folhas de goiabeira foi concentrado até atingir um fator de redução volumétrico (FRV) máximo de 20. Durante o processo de nanofiltração do extrato, dois estágios diferentes foram verificados conforme mostra a Figura 8. Primeiramente, verificou-se um rápido declínio do fluxo permeado nos primeiros 15 min do processo, que está relacionado com a retenção de moléculas, que foram acumuladas e adsorvidas na superfície e no interior dos poros da membrana; após, em tempos mais longos de filtração, ocorreu um declínio gradual do fluxo permeado, até que o FRV 20 foi alcançado. Nesse FRV, foi alcançado o equilíbrio entre a deposição e o arraste de partículas da superfície da membrana, alcançando valores de fluxo permeado quase constantes. Com base na composição do extrato aquoso de folhas de goiabeira, pode-se inferir que a primeira causa para a redução do fluxo permeado pode estar relacionada com a deposição de carboidratos e proteínas na superfície da membrana, uma vez que estes foram os compostos majoritários encontrados nas análises físico-químicas do extrato aquoso de folhas de goiabeira. O mesmo comportamento foi descrito por Verma e Sarkar (2015) para o declínio de fluxo permeado do suco de maçã.

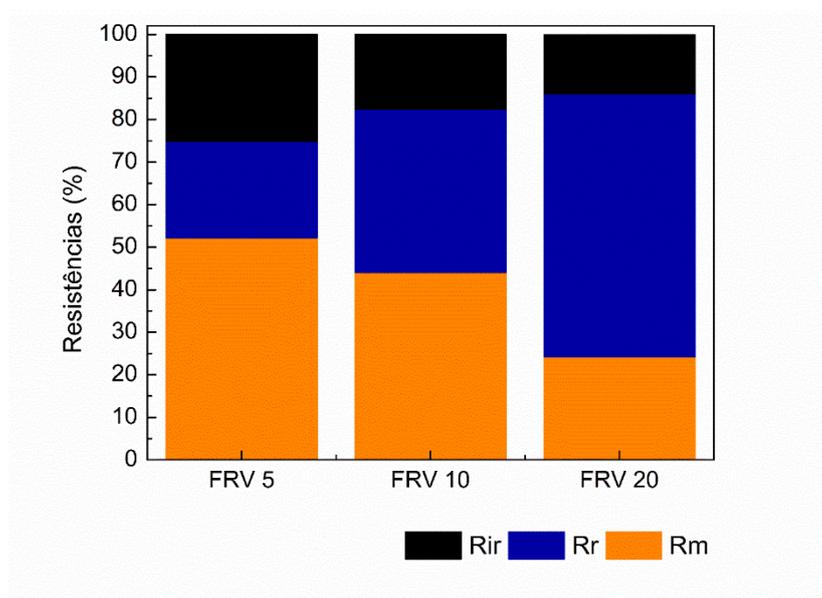
Figura 8: Declínio de fluxo permeado durante a nanofiltração do extrato aquoso de folhas de goiabeira a 35 °C e 800 kPa, em sistema aberto, usando os fatores de redução volumétrico (FRV) de 5, 10 e 20.



Nguyen et al. (2019) relataram que o declínio de fluxo permeado compreende o *fouling* reversível e irreversível, sendo que a diferença entre estes baseiam-se no grau de ligação dos compostos com a superfície da membrana, onde o *fouling* irreversível possui um grau superior de ligação com a membrana, e portanto, mais difícil de ser removido. A resistência irreversível ( $R_{ir}$ ) pode ser visualizada no declínio acentuado do fluxo nos primeiros momentos do processo de nanofiltração para os três FRV, com valores entre 14 e 25 %. Neste trabalho, o FRV 20 foi responsável pelo desenvolvimento de resistências adicionais, devido aos maiores tempos de filtração e também devido ao maior teor de sólidos presentes em solução, uma vez que o extrato está sendo concentrado. As resistências envolvidas nos processos de nanofiltração podem ser visualizadas na Figura 9. Quando se comparam os valores de resistência da membrana, podemos verificar uma redução de 52 para 24 % com o aumento dos valores de FRV. Este comportamento está relacionado com o desenvolvimento da resistência reversível, que apresentou um incremento de aproximadamente 39 % em tempos de filtração mais longos. A resistência reversível pode ser revertida utilizando-se uma força de cisalhamento suficiente que irá remover o *fouling* reversível; porém, o mesmo não pode ser

visualizado para o *fouling* irreversível. Said et al. (2015) verificaram que, após 60 min de filtração, o fluxo permeado reduziu e esses autores relacionaram tal comportamento ao *fouling* reversível. Neste trabalho, observou-se que, devido à deposição na superfície da membrana, o fluxo de permeado reduziu, principalmente para o FRV 20, onde o período de filtração foi superior.

Figura 9: Influência do percentual da resistência reversível (polarização por concentração) ( $R_r$ ), resistência da membrana ( $R_m$ ) e resistência irreversível ( $R_{ir}$ ) no fluxo permeado para os FRV 5, 10 e 20.



Os mecanismos de bloqueio da membrana durante a nanofiltração do extrato aquoso de folhas de goiabeira foram estimados pelo modelo de Hermia o qual foi modificado por Field et al. (1995), e o ajuste foi avaliado utilizando-se os valores de  $R^2$ . Os resultados dos ajustes para o modelo estudado estão apresentados na Tabela 5.

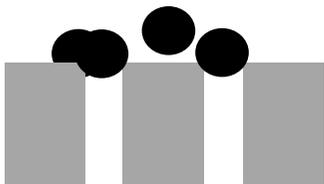
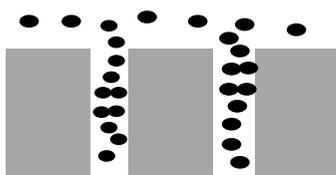
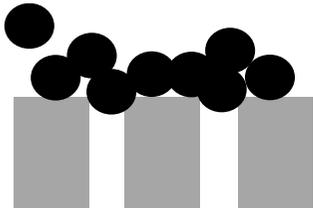
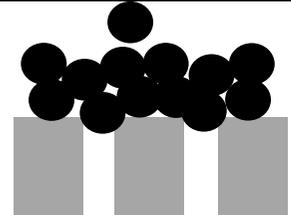
Primeiramente, quando se avalia o processo em função dos coeficientes fenomenológicos, tem-se uma redução dos valores com o passar do tempo de filtração, com exceção do coeficiente da torta de filtração, o qual apresentou um aumento para maiores tempos. O coeficiente para o bloqueio completo de poros é analisado em função dos valores de área bloqueada por volume permeado e da porosidade da superfície, fatores esses que vão se alterando com o passar do

tempo, uma vez a área restante para ser bloqueada é menor em longos tempos de filtração, o que reduz também a porosidade superfície (BRIÃO; TAVARES, 2012).

A constante de bloqueio padrão apresenta como parâmetros uma constante ( $k_1$ ) e a área da membrana, a qual é constante. Sabe-se então que essa constante tem seus valores reduzidos ao longo do tempo de filtração, reduzindo conseqüentemente a constante do bloqueio padrão. O mesmo comportamento pode ser verificado para a constante de bloqueio parcial, a qual é dependente da área bloqueada em função do volume permeado. O comportamento dessa constante confirma o que foi descrito anteriormente para a constante de bloqueio completo, ou seja, tempos mais longos de filtração reduzem a área restante a ser bloqueada em função do volume de permeado, justificando os menores valores encontrados para o FRV 20.

Por fim, para a torta de filtração, os valores da constante aumentaram, uma vez que essa é analisada em função de valores de fluxo inicial e resistência da membrana (ambos constantes), de uma constante relacionada a massa da torta e ao volume permeado e da resistência da torta. Tempos mais longos de filtração estão relacionados a um maior desenvolvimento da torta de filtração, o que acaba elevando os valores da constante (maior a massa em maiores tempos de permeação) e a resistência da torta, uma vez que esta se torna maior.

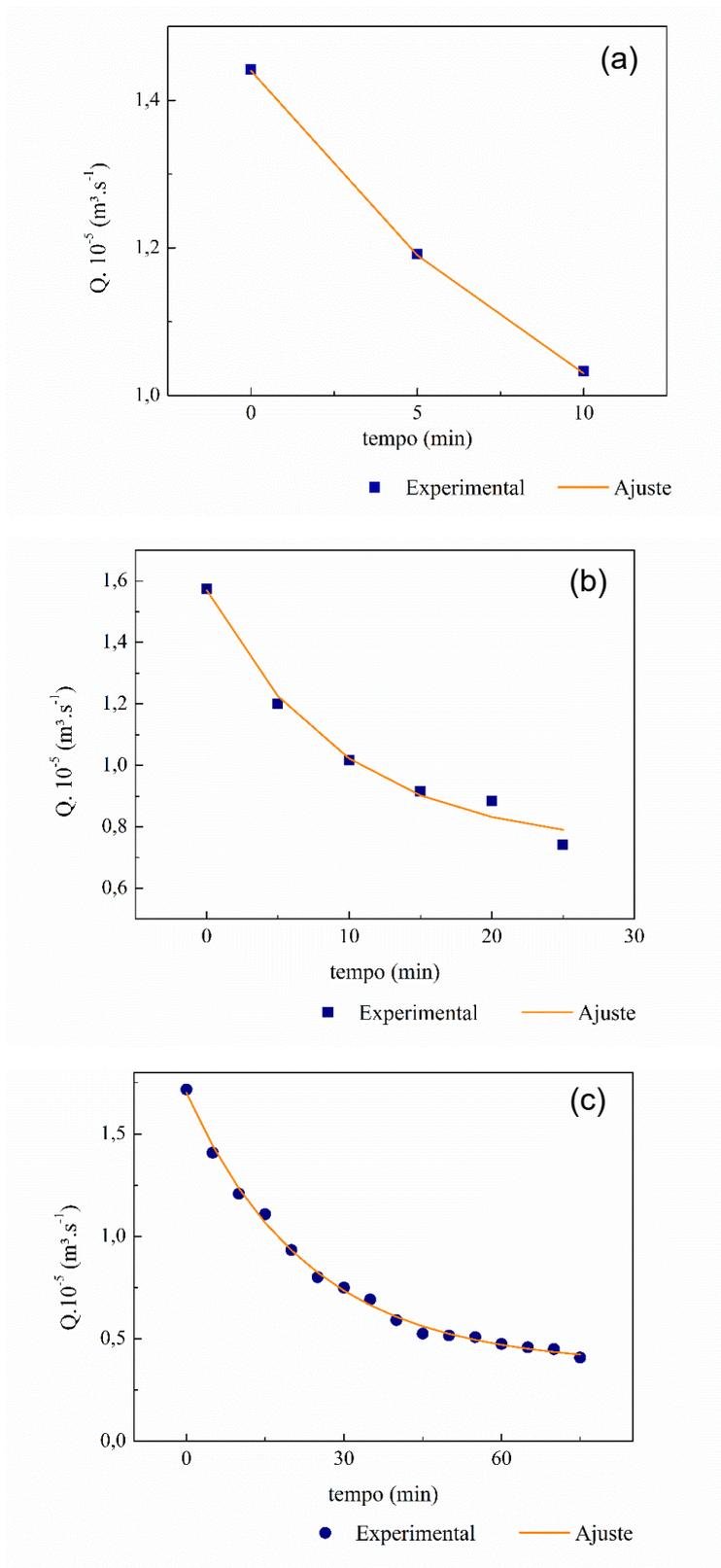
Tabela 5: Constante fenomenológica (K) e valores de  $R^2$  para o modelo de Hermia, adaptado por Field et al. (1995), para o processo de nanofiltração do extrato aquoso de folhas de goiabeira para os fatores de redução volumétricos (FRV) de 5, 10 e 20.

Mecanismo de <i>fouling</i>	FRV	K	$R^2$	Diagrama Esquemático
Bloqueio completo ( $n = 2$ ) ( $s^{-1}$ )	5	0.0330	0.993	
	10	0.0274	0.939	
	20	0.0183	0.945	
Bloqueio padrão ( $n = 1,5$ ) ( $m^{-0.5} s^{-0.5}$ )	5	0.0028	0.997	
	10	0.0024	0.957	
	20	0.0019	0.973	
Bloqueio incompleto ( $n = 1$ ) ( $m^{-1}$ )	5	0.0008	0.999	
	10	0.0007	0.968	
	20	0.0007	0.986	
Torta de filtração ( $n = 0$ ) ( $s m^{-2}$ )	5	0.00005	1.000	
	10	0.00006	0.965	
	20	0.00008	0.975	

Em relação aos valores de  $R^2$ , observa-se que quando o FRV é igual a 5, o modelo de torta de filtração é o mais importante. Este modelo considera que o mecanismo de *fouling* é externo e ocorre na superfície da membrana (CORBATÓN-BÁGUENA; ÁLVAREZ-BLANCO; VINCENT-VELA, 2015). Brião e Tavares (2012) reportaram que o mecanismo de *fouling* externo à membrana ocorre devido à diferença entre o tamanho molecular do soluto e o tamanho dos poros da membrana. Entretanto, para ambos os FRV 10 e 20, o bloqueio incompleto apresentou o melhor ajuste, seguido pelo modelo de torta de filtração. Estas sequências confirmam que, primeiramente, ocorreu um rápido declínio de fluxo, seguido por um declínio gradual, que é característico do desenvolvimento da torta de filtração na superfície da membrana ao longo do processo de nanofiltração. Este mesmo comportamento foi verificado por Balyan e Sarkar (2018), durante a concentração do extrato de folhas de jambelão (*Syzygium cumini* L.), sendo que o bloqueio incompleto foi diretamente relacionado à resistência reversível. Portanto, este comportamento corrobora os resultados obtidos para as resistências ao fluxo (Figura 9), onde a resistência reversível (camada polarizada) foi a principal responsável pelo declínio de fluxo.

De acordo com Sousa, Lora-Garcia e López-Pérez (2018), de maneira geral, a permeabilidade do sistema reduz durante ambos os estágios de bloqueio de poros. Assim, durante o período de bloqueio inicial, a redução na permeabilidade da membrana pode estar relacionada a um bloqueio progressivo da membrana, até o período em que a torta de filtração é iniciada. A partir de então, a redução da permeabilidade da membrana é causada pela formação da torta e de uma camada de gel (SOUSA; LORA-GARCIA; LÓPEZ-PÉREZ, 2018). Entretanto, um único modelo de bloqueio não é suficiente para fornecer uma descrição eficiente do processo de filtração completo. Então, um modelo de bloqueio combinado incluindo, tanto o bloqueio completo de poro quanto a torta de filtração, foi desenvolvido por Ho e Zydney (2000). Os dados experimentais e o modelo matemático estão apresentados na Figura 10. Observa-se que o modelo apresentou bom ajuste aos dados experimentais durante todo o período de filtração, para as três condições de FRV, com um  $R^2 \geq 0,96$ .

Figura 10: Dados experimentais mostrando vazão ( $Q$ ) *versus* tempo ajustados com o modelo combinado de bloqueio completo de poro e torta de filtração para os FRV de 5 (a), 10 (b) e 20 (c). Curva sólida representa o modelo matemático.



A Figura 10 também mostra um comportamento transiente do fluxo permeado e o crescimento da torta de filtração ao longo do tempo para os três diferentes valores de FRV. Nota-se que nos casos em que os FRV 5 e FRV 10 foram alcançados, o ponto de transição não é visível durante o processo. Entretanto, para o FRV 20 foi possível utilizar o modelo combinado para prever o declínio do fluxo permeado em função do tempo de filtração. O modelo combinado apresentou bom ajuste aos dados experimentais para a filtração do extrato aquoso de folhas de goiabeira. De acordo com Hou, Wang e Song (2017), o ponto de transição pode ser visualizado após o declínio dos momentos iniciais de filtração e durante o período em que os valores são mantidos praticamente constantes, demonstrando que o *fouling* mudou para torta de filtração próximo ao quarto ponto experimental. Inicialmente, um rápido declínio da taxa de fluxo foi visualizado, e após se tornou gradualmente constante, revelando a transição entre os mecanismos de *fouling*, do bloqueio completo e formação da torta de filtração, para uma única camada de torta.

Kumar et al. (2016) relataram que visando se obter uma maior vida útil das membranas, a torta de filtração é importante para facilitar o *fouling* externo, prevenindo o *fouling* irreversível. Dessa forma, é importante salientar que o predomínio do *fouling* reversível em longos tempos de permeação do extrato em estudo é interessante para a indústria, uma vez que é possível contornar a resistência à transferência de massa pela alteração das condições operacionais (pressão, velocidade tangencial ou temperatura) ou pela limpeza física, reduzindo os ciclos de limpeza e aumentando a vida útil da membrana. Isso se reflete em economia energética, em tempo de limpeza e na redução do uso de água e produtos químicos usados para a limpeza da membrana.

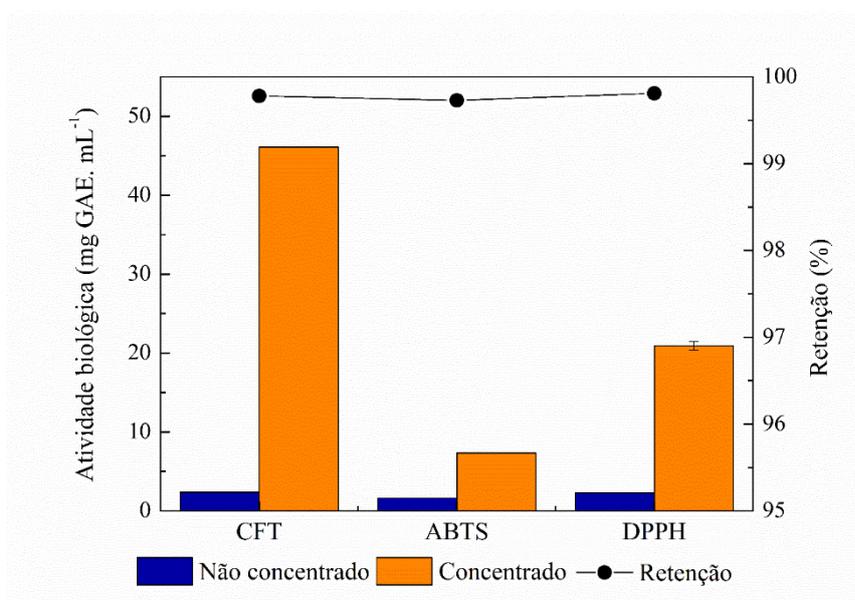
### **3.2 Características bioativas do extrato**

Devido às razões descritas anteriormente, o comportamento das amostras em relação ao teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e quantificação e caracterização de compostos fenólicos bioativos do extrato aquoso de folhas de goiabeira foram determinadas apenas para o FRV=20.

Neste sentido, a Figura 11 mostra o teor de compostos fenólicos totais (CFT), a atividade antioxidante e a retenção dos compostos bioativos e de outros compostos polares do extrato aquoso de folhas de goiabeira, bem como do seu

respectivo concentrado (FRV 20). O processo de nanofiltração foi responsável por um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no teor de compostos fenólicos, próximo a 20 vezes. Este processo também contribuiu para um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da atividade antioxidante em 4 e 9 vezes, quando a mesma foi quantificada pelos métodos de ABTS e DPPH, respectivamente. Além disso, os coeficientes de retenção foram superiores a 99%, demonstrando a eficiência da membrana para a concentração desses compostos.

Figura 11: Teores de compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante (métodos ABTS e DPPH) e valores de retenção dos compostos fenólicos bioativos do extrato aquoso de folhas de goiabeira e do respectivo concentrado obtido pelo processo de nanofiltração (FRV = 20).



Os elevados valores de retenção dos CFT durante o processo de nanofiltração podem ser atribuídos principalmente ao tamanho molecular e a grande quantidade de elétrons no anel aromático destes compostos (MURAKAMI et al., 2013).

De acordo com Said et al. (2015), a retenção dos CFT pode ser atribuída à combinação dos efeitos estéricos e de Donnan. O efeito estérico é baseado na rejeição de compostos pelo tamanho de partículas, sendo importante enfatizar que os CFT podem interagir uns com os outros, resultando em partículas maiores, com consequente aumento da MMC e melhoria do processo de concentração (VERMA;

SARKAR, 2015). Além disso, a permeação de soluções aquosas pode promover a hidratação/solvatação dos poros da membrana, reduzindo o tamanho efetivo dos poros e elevando a retenção dos CFT (CASSANO et al., 2017). Avram et al. (2017) e Tylkowski et al. (2011) observaram, respectivamente, um aumento nos teores de CFT em extratos de bagaço de mirtilo e de *Sideritis* spp., utilizando o processo de nanofiltração. De acordo com estes autores, sabe-se que os principais fenômenos responsáveis pela redução da permeabilidade são a concentração por polarização e o bloqueio de poros (propriedades da membrana), bem como a aglomeração, a adsorção e a precipitação de compostos fenólicos (composição da solução de alimentação).

O efeito de Donnan descreve o balanço entre a carga da solução e carga da superfície da membrana. De acordo com Kim et al. (1996), em valores de pH entre 3,5 e 7, as membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) são carregadas negativamente. Além disso, a solução de alimentação e a solução concentrada apresentaram valores de potencial zeta próximos a  $-28.79 \pm 0.81$  e  $-29.37 \pm 1.74$  mV, respectivamente. De acordo com a Lei de Coulomb, componentes com cargas similares se repelem entre si devido à repulsão eletrostática. Este fato corrobora o comportamento das resistências apresentadas pela membrana em estudo, ou seja, baixo índice de resistência irreversível, que é relacionado com as interações que ocorrem entre a membrana e a solução.

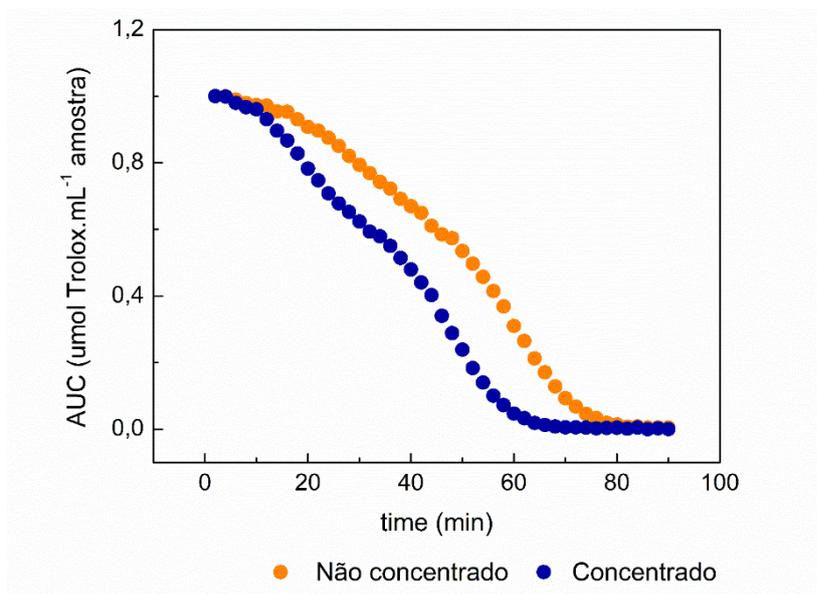
É importante ressaltar que o elevado teor dos CFT do extrato concentrado de folhas de goiabeira é o principal responsável pela alta atividade antioxidante dos mesmos. Estes resultados demonstram que a atividade antioxidante é diretamente proporcional ao teor dos CFT. Porém, mesmo que a atividade antioxidante tenha sido similar para ambos os métodos, a comparação entre as mesmas é difícil, uma vez que nenhum método é totalmente eficiente para prever a atividade antioxidante de uma amostra e diferentes mecanismos de reação estão envolvidos no processo (CAPOCASA et al., 2008). Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2006) relataram que a atividade antioxidante é dependente de fatores como o tipo de solvente e polaridade dos compostos (no caso deste trabalho majoritariamente polares ou com polaridade intermediária). O pH do meio também pode alterar a atividade através da protonação ou a dissociação de prótons dos compostos antioxidantes, alterando a sua atividade (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Além disso, os maiores valores de atividade visualizados no método DPPH podem estar relacionados ao tempo de reação, que varia de 6 min para o ABTS para 30 min para o DPPH. De acordo com Schaich, Tian e Xie (2015) um dos principais problemas do método DPPH está relacionado com as taxas de reação, pois essas não refletem a capacidade de interromper os radicais reativos que estão naturalmente presentes em sistemas e em alimentos, sendo que essa capacidade é totalmente perdida em procedimentos rápidos de ensaio.

Complementarmente, a atividade antioxidante foi avaliada pelo método ORAC ao longo do tempo. A Figura 12 mostra a atividade do extrato não concentrado e o extrato concentrado de folhas de goiabeira.

Figura 12: Atividade antioxidante obtida pelo cálculo da área abaixo da curva (AUC) no método ORAC para o extrato aquoso de folhas de goiabeira não concentrado e do respectivo concentrado obtido pelo processo de nanofiltração (FRV = 20).

Diluição do FRV 20 de 80 vezes.



O método ORAC é baseado na redução de fluorescência do indicador fluoresceína pelos radicais peróxido. A presença de compostos antioxidantes reduz a perda da fluorescência devido à transferência de hidrogênio ou à adição de radicais, sendo que a perda da fluorescência é medida ao longo do tempo (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015). O extrato concentrado FRV 20 foi diluído 80 vezes, mantendo um comportamento semelhante ao encontrado para o extrato não

concentrado, demonstrando a eficiência do processo de nanofiltração para a concentração de compostos bioativos e aumento da atividade antioxidante.

Uma grande maioria das técnicas de determinação de atividade antioxidante, incluído as técnicas abordadas neste trabalho, possuem alta correlação com o teor de compostos bioativos, sendo que no caso do extrato aquoso de folhas de goiabeira, com os compostos fenólicos. Deste modo, os métodos ABTS, DPPH e ORAC forneceram resultados comparáveis nas medidas da atividade antioxidante do extrato aquoso de folhas de goiabeira, tanto do não concentrado quanto do concentrado.

A atividade antioxidante reflete um efeito cumulativo de todos os compostos antioxidantes presentes no extrato (GHISELLI et al., 2000). Deste modo, todos os métodos estudados neste trabalho se mostraram eficientes para avaliar possíveis mudanças. O método ORAC se destaca por fornecer resultados mais próximos ao real comportamento *in vivo*, pois são obtidos ao longo do tempo (THAIPONG et al., 2006).

### 3.3 Quantificação e caracterização dos compostos fenólicos totais e outros compostos polares

A Tabela 6 mostra os CFT e outros compostos polares do extrato aquoso de folhas de goiabeira e o seu respectivo extrato concentrado. Observa-se que, todos os compostos apresentaram um incremento significativo ( $p < 0,05$ ) após a concentração (FRV 20) por nanofiltração. A catequina foi o principal composto em ambos os extratos, apresentando um fator de concentração de 31 vezes. Gadkari e Balaraman (2015) relataram que este composto ocorre com bastante frequência em plantas e é extensivamente utilizado como um nutracêutico para melhoria da saúde humana e em formulações farmacêuticas. Dong et al. (2011) destacaram que, alimentos que possuem elevados teores de catequina são considerados importantes fontes de antioxidantes naturais.

O segundo composto majoritário encontrado foi a vescalagina, isômero da castalagina, apresentando um incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de aproximadamente 22 vezes. Rojas-Garbanzo et al. (2019) relataram a vescalagina como composto predominante em frutos de goiaba cultivadas na Costa Rica. Esses mesmos autores analisaram folhas de goiabeira e descreveram diversos constituintes, sendo os

principais quercetina, catequina e ácido elágico e seus derivados, corroborando os resultados obtidos no presente estudo.

Ainda, destaca-se a a eficiência da nanofiltração para a concentração de compostos como o isômero trimérico de procianidina, estenofilanina A, casuarinina-estaquiurina/isômero de casuarictina, miricetina arabinosídeo/isômero de xilopiranosídeo e isômero de quercetina glucosídeo os quais foram encontrados abaixo do limite de quantificação (<LOQ) nos extratos de folhas de goiabeira não concentrados, e apresentaram concentrações de aproximadamente 0,9 a 8 mg.mL<sup>-1</sup> para o extrato concentrado.

Além disso, as evidências dos efeitos biológicos e dos mecanismos da quercetina e seus derivados podem ser relacionadas com atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (LESJAK et al., 2018). Neste contexto, o perfil de CFT do extrato de folhas de goiabeira pode possuir não apenas numerosos efeitos farmacológicos quando adicionado como parte da dieta diária, mas também pode trazer benefícios econômicos para os produtores de goiaba ao ser visto como um subproduto oriundo da produção.

Tabela 6: Compostos fenólicos e outros compostos polares (mg.mL<sup>-1</sup>) para o extrato aquoso de folhas de goiabeira e seu respectivo concentrado obtido no processo de nanofiltração (FRV = 20).

CLASSE	COMPOSTO	NÃO CONCENTRADO	CONCENTRADO
Ácidos Fenólicos	Ácido Gálico	1,989 <sup>b</sup> ± 0,026	9,490 <sup>a</sup> ± 0,063
	HHDP isômero de glicose 1	1,017 <sup>b</sup> ± 0,003	21,369 <sup>a</sup> ± 1,257
	HHDP isômero de glicose 2	1,299 <sup>b</sup> ± 0,001	28,911 <sup>a</sup> ± 1,257
Taninos	HHDP isômero de glicose 3	0,982 <sup>b</sup> ± 0,010	17,409 <sup>a</sup> ± 0,314
	Pedunculagina	0,818 <sup>b</sup> ± 0,015	26,083 <sup>a</sup> ± 0,503
	Vescalagina	10,710 <sup>b</sup> ± 0,128	104,331 <sup>a</sup> ± 1,885
	Isômero de Geraniin	0,559 <sup>b</sup> ± 0,001	7,353 <sup>a</sup> ± 0,057
	Pedunculagina	4,258 <sup>b</sup> ± 0,026	42,864 <sup>a</sup> ± 0,503
	Vescalagina	12,954 <sup>b</sup> ± 0,230	295,395 <sup>a</sup> ± 6,285
	Pedunculagina	3,468 <sup>b</sup> ± 0,051	34,567 <sup>a</sup> ± 1,257
	Isômero de Tellimagrandin I	0,838 <sup>b</sup> ± 0,001	10,684 <sup>a</sup> ± 2,514
	Estenofilanina A <sup>b</sup>	< LOQ	5,091 <sup>a</sup> ± 0,1257
	Casuarinina-Estacurina <sup>b</sup>	< LOQ	8,170 <sup>a</sup> ± 1,257
	Isômero de Tellimagrandin I	0,892 <sup>b</sup> ± 0,051	13,827 <sup>a</sup> ± 1,257
	Guavin B	2,728 <sup>b</sup> ± 0,102	61,153 <sup>a</sup> ± 0,251
	Isômero dímero de Prodelfinidina	1,275 <sup>b</sup> ± 0,102	47,137 <sup>a</sup> ± 1,257
	Isômero dímero de Prodelfinidina	2,550 <sup>b</sup> ± 0,255	104,331 <sup>a</sup> ± 4,399
	Galocatequina	4,641 <sup>b</sup> ± 0,026	43,995 <sup>a</sup> ± 0,189

	Galocatequina	2,244 <sup>b</sup> ± 0,051	29,854 <sup>a</sup> ± 0,566
	Mirciafenona B	6,171 <sup>b</sup> ± 0,178	122,557 <sup>a</sup> ± 1,257
	Isômero de Procianidina B	5,100 <sup>b</sup> ± 0,255	113,758 <sup>a</sup> ± 0,628
	Isômero de Procianidina B	0,892 <sup>b</sup> ± 0,102	25,768 <sup>a</sup> ± 0,628
	Isômero trimérico de Procianidina <sup>a</sup>	< LOQ	5,254 <sup>a</sup> ± 0,057
	Isômero trimérico de Procianidina	3,060 <sup>b</sup> ± 0,128	86,733 <sup>a</sup> ± 0,628
Flavonoides	Catequina	19,309 <sup>b</sup> ± 0,013	594,561 <sup>a</sup> ± 0,628
	Isômero de Procianidina galato	1,963 <sup>b</sup> ± 0,026	98,674 <sup>a</sup> ± 0,628
	Mirricetina-arabinósido <sup>c</sup>	< LOQ	2,011 <sup>a</sup> ± 0,251
	Isômero de quercetina glicosídeo <sup>c</sup>	< LOQ	0,918 <sup>a</sup> ± 0,050
	Mirricetina-arabinósido <sup>c</sup>	< LOQ	2,514 <sup>a</sup> ± 0,063
	Desoxihexósido do Ácido Elágico	2,165 <sup>b</sup> ± 0,018	79,505 <sup>a</sup> ± 0,566
	Hiperina	0,665 <sup>b</sup> ± 0,008	20,678 <sup>a</sup> ± 0,063
	Ácido Elágico	0,408 <sup>b</sup> ± 0,051	26,648 <sup>a</sup> ± 0,314
	Isoquercitrina	0,745 <sup>b</sup> ± 0,008	27,905 <sup>a</sup> ± 0,188
	Morina	2,295 <sup>b</sup> ± 0,051	77,620 <sup>a</sup> ± 0,566
	Reinourina	0,546 <sup>b</sup> ± 0,010	33,059 <sup>a</sup> ± 0,188
	Guajaverina	1,066 <sup>b</sup> ± 0,015	84,219 <sup>a</sup> ± 0,628
	Quercitrina	2,573 <sup>b</sup> ± 0,005	95,532 <sup>a</sup> ± 0,628
Avicularina	1,810 <sup>b</sup> ± 0,051	106,216 <sup>a</sup> ± 1,257	

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). LOQ = valor limite de quantificação. LOQ = 0.22 mg/L; <sup>b</sup>LOQ = 0.12 mg/L; <sup>c</sup>LOQ = 0.11 mg/L.

#### 4. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Durante o processo de nanofiltração do extrato aquoso de folhas de goiabeira, nos primeiros minutos, foi possível verificar um declínio acentuado no fluxo permeado. Com o passar do tempo, verificou-se uma tendência ao estágio pseudo-estacionário, o qual é caracterizado pelo surgimento de uma resistência adicional ao fluxo permeado, com valores entre 23 e 62 %. Além disso, o bloqueio da membrana foi causado pela ocorrência simultânea de diversos mecanismos de *fouling*. Para o FRV de 20, o modelo de bloqueio incompleto foi o que apresentou melhor ajuste. O modelo combinado de bloqueio de poro e torta de filtração também apresentou adequado ajuste aos dados experimentais durante a filtração do extrato de folhas de goiabeira, apresentando um  $R^2$  superior a 0,93.

A resistência reversível foi a principal responsável pelo declínio de fluxo, podendo-se inferir então que, em processos com maior tempo de filtração, como os que ocorrem na indústria de alimentos, torna-se mais fácil recuperar a permeabilidade hidráulica da membrana e aumentar o tempo de vida útil da mesma.

Uma concentração de aproximadamente 20 vezes foi obtida para o extrato concentrado (FRV 20) em relação ao extrato não concentrado. A atividade antioxidante apresentou o comportamento semelhante ao teor de compostos fenólicos totais, elevando a atividade antioxidante em aproximadamente 3 (ORAC), 4 (ABTS) e 9 (DPPH) vezes após a concentração do extrato, sendo que a catequina foi o principal composto encontrado.

Por fim, estes achados não apenas elucidam os mecanismos de *fouling* envolvidos no processo de nanofiltração do extrato de folhas de goiabeira, auxiliando na escolha da membrana correta e das condições de operação, como também contribuíram para o aumento do conhecimento relativo à concentração dos compostos bioativos.

## REFERÊNCIAS

ALMULAIKY, Y. et al. Assessment of antioxidant and antibacterial properties in two types of Yemeni guava cultivars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 90–97, 2018.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of the AOAC International**. 20th ed. ed. Maryland/USA: [s.n.].

AVRAM, A. M. et al. Concentrations of polyphenols from blueberry pomace extract using nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 106, p. 91–101, 2017.

BALYAN, U.; SARKAR, B. Analysis of flux decline using sequential fouling mechanisms during concentration of *Syzygium cumini* (L.) leaf extract. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 130, p. 167–183, 2018.

BIESALSKI, H. K. et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, p. 1202–1205, 2009.

BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G. Pore blocking mechanism for the recovery of milk solids from dairy wastewater by ultrafiltration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 393–407, 2012.

CAPOCASA, F. et al. Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. **Food Chemistry**, v. 111, p. 872–878, 2008.

CASSANO, A. et al. Effect of polyphenols-membrane interactions on the performance of membrane-based processes. A review. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 351, p. 45–75, 2017.

CORBATÓN-BÁGUENA, M.-J.; ÁLVAREZ-BLANCO, S.; VINCENT-VELA, M.-C. Fouling mechanisms of ultrafiltration membranes fouled with whey model solutions. **Desalination**, v. 360, p. 87–96, 2015.

DÍAZ-DE-CERIO, E. et al. Exploratory characterization of phenolic compounds with demonstrated anti-diabetic activity in guava leaves at different Oxidation States. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, 2016.

DÍAZ-DE-CERIO, E. et al. Health Effects of *Psidium guajava* L. Leaves: An Overview of the Last Decade. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 897, 2017a.

DÍAZ-DE-CERIO, E. et al. The hypoglycemic effects of guava leaf (*Psidium guajava* L.) extract are associated with improving endothelial dysfunction in mice with diet-induced obesity. **Food Research International**, v. 96, p. 64–71, 2017b.

DONG, J. J. et al. Isolation of antioxidant catechins from green tea and its decaffeination. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 62–66, 2011.

FIELD, R. W. et al. Critical flux concept for microfiltration fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 100, p. 259–272, 1995.

GARCIA-IVARS, J. et al. Nanofiltration as tertiary treatment method for removing trace pharmaceutically active compounds in wastewater from wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 125, p. 360–373, 2017.

GHISELLI, A. et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 11, p. 1106–1114, 2000.

HERMIA, J. Constant pressure blocking filtration laws – application to power-law non-newtonian fluids. **Icheme**, v. 60, p. 183–187, 1982.

HO, C.; ZYDNEY, A. L. A Combined Pore Blockage and Cake Filtration Model for Protein Fouling during Microfiltration. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 232, p. 389–399, 2000.

HOU, L.; WANG, Z.; SONG, P. A precise combined complete blocking and cake filtration model for describing the flux variation in membrane filtration process with BSA solution. **Journal of Membrane Science**, v. 542, p. 186–194, 2017.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841–1856, 2005.

IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4 ed. ed. Brasília: Editora MS, 2005.

KIM, K. J. et al. Evaluation of electroosmosis and streaming potential for measurement of electric charges of polymeric membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 116, n. 2, p. 149–159, 1996.

KUMAR, D. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of ultra-filtered fractions of camel milk protein hydrolysates under in-vitro condition. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 87, n. 11, p. 1391–1395, 2016.

LAILY, N. et al. The Potency of Guava *Psidium Guajava* (L.) Leaves as a Functional Immunostimulatory Ingredient. **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 301–307, 2015.

LESJAK, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods journal**, v. 40, p. 68–75, 2018.

MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 60–65, 2013.

NGUYEN, T. T. et al. Critical flux-based membrane fouling control of forward osmosis: Behavior, sustainability, and reversibility. **Journal of Membrane Science**, v. 570–571, p. 380–393, 2019.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619–4626, 2001.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791–800, 2006.

PRUDÊNCIO, A. P. A. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 399–405, 2012.

ROJAS-GARBANZO, C. et al. Characterization of phytochemicals in Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum* -Nied.) fruit and stability of main compounds during juice processing - (U)HPLC-DAD-ESI-TQD-MSn. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 75, n. September 2018, p. 26–42, 2019.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 127, p. 1–4, 2007a.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 128, p. 1–4, 2007b.

SAID, M. et al. Blocking mechanism of PES membrane during ultrafiltration of POME. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 182–188, 2015.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 111–125, 2015.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enology Viticulture**, v. 16, p. 44–58, 1965.

SOUSA, M. R. S.; LORA-GARCIA, J.; LÓPEZ-PÉREZ, M. F. Modelling approach to an ultrafiltration process for the removal of dissolved and colloidal substances from treated wastewater for reuse in recycled paper manufacturing. **Journal of Water Process Engineering**, v. 21, n. November 2017, p. 96–106, 2018.

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, set. 2006.

TYLKOWSKI, B. et al. Concentration of biologically active compounds extracted from *Sideritis* ssp. L. by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 307–314, 2011.

VERMA, S. P.; SARKAR, B. Analysis of flux decline during ultrafiltration of apple juice in a batch cell. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 147–157, 2015.

WANG, Y. N.; TANG, C. Y. Fouling of nanofiltration, reverse osmosis, and ultrafiltration membranes by protein mixtures: The role of inter-foulant-species interaction. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 15, p. 6373–6379, 2011.

## **CAPÍTULO 4: INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO E DA SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL NOS EFEITOS CITOTÓXICOS DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE GOIABEIRA (NÃO CONCENTRADOS E CONCENTRADOS POR NANOFILTRAÇÃO) EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO**

### **Resumo**

Os extratos aquosos de folha de goiabeira foram concentrados utilizando uma membrana de nanofiltração até fatores de redução volumétrica (FRV) 10 e 20, sendo que o respectivo extrato não concentrado foi utilizado como controle (SC). A estabilidade desses extratos foi avaliada em função da quantificação dos teores de compostos fenólicos totais durante o armazenamento refrigerado e ambiente (126 dias) e durante o processo de simulação gastrointestinal. Além disso, seus efeitos citotóxicos, antes e depois do armazenamento e das etapas gastrointestinais também foram avaliados. Com relação a estabilidade frente ao armazenamento, extrato concentrado 20 vezes, quando refrigerado, foi o mais estável, mantendo a concentração de compostos fenólicos totais até o final do processo. No que diz respeito à simulação gastrointestinal, as amostras não concentradas e concentradas tiveram seus teores de compostos fenólicos totais reduzidos (1,2 e 1,4 vezes), e a atividade antioxidante também (1,2 e 1,5 vezes). Porém para o extrato concentrado FRV 20 esta redução foi mais acentuada devido ao maior teor destes compostos. Em relação à atividade citotóxica, a amostra concentrada FRV 10 foi a mais eficiente ( $IC_{50}$  entre 0,3 e 4,1), uma vez que foi efetiva na inibição de células tumorais, sem provocar danos as células não tumorais, mesmo após a simulação gastrointestinal e armazenamento. Por fim, o presente estudo demonstrou que o extrato aquoso de folhas de goiabeira é rico em compostos fenólicos totais e possui elevada atividade antioxidante, auxiliando na manutenção da estabilidade do extrato ao longo da simulação gastrointestinal e armazenamento. Além disso, o extrato concentrado (FRV 10) apresentou efeitos expressivos contra células tumorais, sendo o extrato concentrado uma opção com importante atividade farmacológica.

## 1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em 2013 um documento relatando que, em todo o mundo, a medicina tradicional é amplamente utilizada para cuidados básicos ou complementares de saúde, incentivando o uso destas estratégias desde que as indicações de uso sejam baseadas em evidências (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Vários grupos étnicos costumam prevenir ou tratar diversas doenças por meio do uso de infusões de folhas de goiabeira (*Psidium guajava*). Alguns dos efeitos farmacológicos relatados são antidiabético, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, antiespasmódico e citotóxico (ALMULAIKY et al., 2018; CORREA; COUTO; TEODORO, 2016; DÍAZ-DE-CERIO et al., 2017b).

Apesar de todos os benefícios destas infusões, uma formulação apropriada é necessária para garantir a biodisponibilidade e a resistência à degradação dos seus compostos bioativos (MORENO; COCERO; RODRÍGUEZ-ROJO, 2018). O uso de processos com membranas visando o incremento do teor de compostos bioativos tem sido amplamente utilizado devido às vantagens intrínsecas desses processos, tais como manutenção de compostos termolábeis, baixo consumo de energia, baixas temperaturas de processamento, facilidade de operação e inexistência de transição de fases (CASTRO-MUÑOZ; YÁÑEZ-FERNÁNDEZ; FÍLA, 2016).

Diversos autores já estudaram a concentração de extratos aquosos de vegetais. Murakami et al. (2013) e Balyan e Sarkar (2016) avaliaram a concentração dos extratos de erva mate e de sementes de jambolão, respectivamente. Embora a qualidade nutricional dos extratos de folhas de goiabeira já esteja sendo estudada (ANDRADE-VIEIRA et al., 2017; CHEN; YEN, 2007; CORREA; COUTO; TEODORO, 2016; JAIARJ et al., 1999; LUO et al., 2018; TAKAHASHI et al., 2015; WANG; DU; SONG, 2010), não há relatos na literatura da utilização de PSM para a concentração dos compostos fenólicos destes extratos. Adicionalmente, é importante salientar que muitas condições de fabricação e armazenamento, como a temperatura, resultam na diminuição dos teores de compostos fenólicos. (VICENTE et al., 2014).

Compostos fenólicos apresentam uma baixa biodisponibilidade, uma vez que apenas uma pequena porção dessas moléculas, após a digestão oral,

permanece disponível para ser absorvida no intestino, conduzida para a corrente sanguínea e entregue ao local necessário (SPÍNOLA et al., 2019). Esta característica é geralmente avaliada por métodos de digestão *in vitro*, os quais detectam a liberação dos compostos a partir da matriz alimentar e sua conversão durante as diferentes etapas da digestão (CASTRO-MUÑOZ; YÁÑEZ-FERNÁNDEZ; FÍLA, 2016). Um composto bioativo pode apresentar determinada atividade farmacológica *in vitro*, mas quando avaliada *in vivo* ele pode não estar biodisponível ou ser rapidamente metabolizado e excretado, tornando-se ineficaz (HORST; LAJOLO, 2007). Nesse sentido, o conceito de biodisponibilidade pode ser definido como a fração que é liberada a partir da matriz alimentar, atravessando o trato gastrointestinal e se tornando disponível para absorção (GUNATHILAKE; RANAWEERA; RUPASINGHE, 2018).

De acordo com Jara-Palacios et al. (2018), recomenda-se que o primeiro passo para avaliar os possíveis efeitos de um composto bioativo seja avaliar sua estabilidade durante a digestão gastrointestinal. A avaliação *in vitro* é um método simples, acessível, livre de quaisquer considerações éticas e adequado à triagem de uma ampla gama de amostras em diferentes condições fisiológicas. De acordo com Spínola et al. (2019), os resultados fornecem um conhecimento útil sobre os efeitos relativos às mudanças de pH e enzimas digestivas, bem como à matriz alimentar e às interações com outros componentes. Até onde se sabe, não existem estudos disponíveis sobre a biodisponibilidade dos compostos fenólicos das folhas de goiabeira durante a simulação gastrointestinal.

Outro importante fator que merece destaque está relacionado ao crescimento exponencial do câncer ao longo dos anos. Em 2017, no Brasil, esta doença alcançou 115 mil óbitos para o sexo masculino, sendo o principal câncer o de traqueia, brônquios e pulmões, enquanto para mulheres esse valor foi de aproximadamente 103 mil, sendo o principal o câncer de mama, seguido por traqueia, brônquios e pulmões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Segundo o INCA (2020), no ano de 2020 estes valores devem chegar a aproximadamente 309 e 316 mil para homens e mulheres, respectivamente. O desenvolvimento de medicamentos oriundos de plantas corresponde a aproximadamente 48 % do total de drogas aprovadas (NEWMAN; CRAGG, 2012) e encontra-se em constante crescimento. A goiabeira é uma fonte de compostos naturais que tem sido amplamente estudada devido às

suas propriedades funcionais, porém ainda se tem pouca informação a respeito de suas propriedades antitumorais.

Dada a importância deste tópico, o objetivo dessa pesquisa foi determinar a atividade citotóxica dos extratos aquosos de folhas de goiabeira concentrados pelo processo de nanofiltração, bem como seu extrato não concentrado, antes e após a simulação gastrointestinal. Além disso, a estabilidade dos CFT durante o armazenamento refrigerado e em temperatura ambiente foi avaliada para verificar os efeitos das temperaturas nos teores de CFT.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Produção do extrato aquoso de folhas de goiabeira**

As folhas de goiabeira (*Psidium guajava*) foram colhidas em Biguaçu, Santa Catarina, Brasil. Foram reconhecidas por comparação pelo herbário da Universidade Federal de Santa Catarina (Flor) com exsicata código FLOR67263. As folhas coletadas foram lavadas, branqueadas (90 °C durante 3 min seguidas de banho de gelo até resfriamento total), secas em forno de ar forçado (FABBE, 171, São Paulo, Brazil) por 3 horas a 45 °C e, então, moídas com um moinho de facas (Marconi, MA-580, Piracicaba, Brazil).

O extrato aquoso de folhas de goiabeira foi produzido de acordo com Laily et al. (2015) utilizando a proporção 1:50 (folhas:água) a 95 °C, durante 10 minutos, com agitação constante. O extrato aquoso foi filtrado com um filtro de nylon (tamanho de poro de 125 µm) e o volume ajustado com água destilada.

### **2.2. Processo de nanofiltração**

O processo de nanofiltração foi realizado para a concentração dos compostos bioativos do extrato aquoso de folhas de goiabeira. A nanofiltração foi realizada utilizando um sistema de filtração com escoamento tangencial equipado com membrana espiral de nanofiltração de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Osmonics, Minnetonka, MN). A membrana possui massa molar de corte entre 150-300 Da, com uma área de filtração de 1,2m<sup>2</sup>. A concentração foi realizada em sistema aberto, ou

seja, com remoção de permeado para que fosse possível concentrar de acordo com fator de redução volumétrico pretendido (FRV). Os parâmetros operacionais foram previamente testados (dados não apresentados) quando definiu-se a temperatura de  $35 \pm 1$  °C e a pressão de 800 kPa. O processo foi realizado até que os FRV de 10 e 20 fossem atingidos.

### 2.3 Determinação da estabilidade durante o armazenamento

A estabilidade do extrato aquoso de folhas de goiabeira foi determinada mantendo as amostras em temperatura de refrigeração ( $4 \pm 2$  °C) e a temperatura ambiente ( $25 \pm 5$  °C) durante 126 dias. As amostras foram armazenadas em frascos âmbar individuais. A cada 15 dias uma amostra foi coletada e congelada a  $-16 \pm 2$  °C até o momento das análises. O extrato não concentrado de folhas de goiabeira foi utilizado como amostra controle e comparado com as amostras concentradas FRV 10 e 20 vezes. Após 126 dias de armazenamento, as amostras foram avaliadas quanto ao teor de CFT, atividade antioxidante e efeito citotóxico frente células tumorais humanas de câncer de pulmão (linhagem A549). Para melhor entendimento, as amostras serão denominadas como: não concentrada refrigerada (SCR) e não concentrada temperatura ambiente (SCA), concentrada FRV 10 refrigerada (C10R), concentrada FRV10 temperatura ambiente (C10A), concentrada FRV 20 refrigerada (C20R) e concentrada FRV 20 temperatura ambiente (C20A).

### 2.4 Simulação gastrointestinal

A simulação gastrointestinal *in vitro* foi realizada sequencialmente de acordo com Verruck et al. (2015). É importante enfatizar que todas as soluções enzimáticas foram preparadas no dia da análise e esterilizadas usando uma membrana de 0,22 µm (MF-Millipore, Billerica MA, EUA). Para simular a temperatura corporal ( $37 \pm 1$  °C) e a intensidade dos movimentos peristálticos em cada compartimento digestivo do corpo humano, utilizou-se um banho-maria com agitação mecânica (Dist DI950M, Florianópolis SC, Brasil). A análise foi realizada utilizando 1 mL da amostra diluída em 4 mL de água destilada. Para a etapa da boca, as amostras foram homogeneizadas com soluções de 48 µL  $\alpha$ -amilase ( $100 \text{ U.mL}^{-1}$  de  $\alpha$ -amilase em 1

mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>) por 2 min, com agitação constante de 200 rpm. No estômago, o pH das amostras foi reduzido gradualmente até 2,0 e foram adicionados um total de 50 µL de solução de pepsina (25 mg.mL<sup>-1</sup> em 0,1 mol.L<sup>-1</sup> HCl) em diferentes porções ao longo do tempo, reagindo por 1,5 h com agitação constante de 130 rpm. Em seguida, simulando o duodeno, o pH foi elevado para 5,0 e as amostras foram misturadas com 250 µL de sais biliares bovinos + solução de pancreatina (2 g.L<sup>-1</sup> de pancreatina e 12 g.L<sup>-1</sup> de sais biliares bovinos em 0,1 mol.L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>) durante 20 min a 45 rpm. Finalmente, para a etapa do íleo, o pH foi elevado para 6,5 e as amostras permaneceram incubadas por 90 min a 45 rpm. O volume final foi ajustado para 10 mL com água destilada e as amostras digeridas foram armazenadas a -16 ± 2 °C até o momento das análises. O percentual de recuperação dos compostos fenólicos totais foi calculado através da Equação 1.

$$\% \text{ recuperação} = \frac{CE * 100}{CI} \quad (1)$$

Onde CE é a concentração de compostos fenólicos totais na etapa correspondente e CI a concentração de compostos fenólicos totais na etapa inicial.

## 2.5 Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com método sugerido por Singleton e Rossi (1965), que consiste na reação das amostras dos extratos de folhas de goiabeira com carbonato de sódio (20 %) e reagente Folin-Ciocalteu. A solução foi armazenada em local escuro por 2 h e as absorbâncias medidas em espectrofotômetro (UV-Vis mini-1241, Tóquio, Japão) a 765 nm. A água destilada foi utilizada como branco e os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg GAE·mL<sup>-1</sup>).

## 2.6 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) de acordo com Rufino et al. (2007b). A solução etanólica do ABTS e as amostras foram deixadas em ambiente escuro

durante 6 min e, em seguida, as absorvâncias foram medidas a 734 nm em espectrofotômetro (UV-Vis mini-1240, Tóquio, Japão), utilizando etanol como branco. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg GAE·mL<sup>-1</sup>).

## 2.7 Determinação da viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de Sulforodamina B (SRB), descrito por Vichai e Kirtikara (2006) e padronizado no Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) por Silva (2009). Este ensaio consiste em um método *in vitro*, que se fundamenta na capacidade de SRB (corante solúvel em água) de ligar-se a componentes proteicos de células (resíduos de aminoácidos básicos), previamente fixados com ácido tricloroacético (TCA), possibilitando a classificação proteica, já que o conteúdo proteico é diretamente proporcional a viabilidade celular.

Suspensões de células A549 (ATCC: CCL 185 – linhagem celular imortalizada A549: células epiteliais basais de adenocarcinoma alveolar humano) e VERO (ATCC: CCL 81 – linhagem celular contínua VERO: células epiteliais saudáveis de rim de macaco-verde da África), contendo 10<sup>4</sup> células/cavidade, foram cultivadas em placas de 96 cavidades (100 µL/ cavidade), com meio MEM (Minimal Essential Medium, Cultilab) adicionado a 10 % de SFB (soro fetal bovino, Gibco), a 37 °C, em atmosfera umedecida de 5 % de CO<sub>2</sub>, por 24 h, até obtenção de confluência. Em seguida, o meio MEM foi substituído por 200 µL das amostras diluídas em MEM. Após, as placas foram novamente incubadas por 48 h, nas mesmas condições de temperatura e CO<sub>2</sub>. A seguir, as células foram fixadas por meio da adição de 100 µL de uma solução aquosa de TCA a 10 % (p/v) em cada cavidade e as placas foram incubadas por 60 min a 4 °C. As cavidades foram lavadas cuidadosamente 4 vezes com água destilada e deixadas 24 h à temperatura ambiente para secagem. Após, as células fixadas foram coradas com 100 µL da solução ácida de SRB (0,057 % p/v) por 30 min. O corante não ligado as proteínas foi removido por meio de quatro lavagens sucessivas com uma solução aquosa de ácido acético a 1 % (v/v) e as placas foram secas por 24 h. Procedeu-se a extração do corante ligado às proteínas com a adição de 100 µL, em cada cavidade, de uma solução tampão de Tris-Base

10 mM (pH 10,5). As placas foram agitadas por 10 min à temperatura ambiente para que todo o corante fosse dissolvido e as absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro (Spectra MD2, Sunny Vale, CA, EUA) a 510 nm. Os valores das absorbâncias medidas para cada amostra foram transformados para percentual de viabilidade celular (X %), em relação ao controle celular, o qual é considerado 100 % viável, pela Equação 2.

$$X \% = \frac{DO \text{ amostra} \times 100}{DO \text{ controle celular}} \quad (2)$$

Onde DO representa a densidade óptica

Em seguida, os percentuais calculados para as amostras foram inseridos em um gráfico e por análise de regressão não linear, foi possível calcular os valores de CC50, ou seja, a concentração de cada amostra que reduziu em 50 % a viabilidade celular. Os valores de CC<sub>50</sub> representam a média de três experimentos independentes e o desvio padrão. A seletividade (IS) de cada amostra foi calculada como sendo a razão entre os valores de CC<sub>50</sub> dos fibroblastos VERO e das células A549.

## 2.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados avaliados utilizando o programa STATISTICA (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA). A análise de variância unidirecional (ANOVA) e o teste de Tukey foram utilizados para determinar diferenças significativas, que foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Os dados representam a média e o desvio padrão.

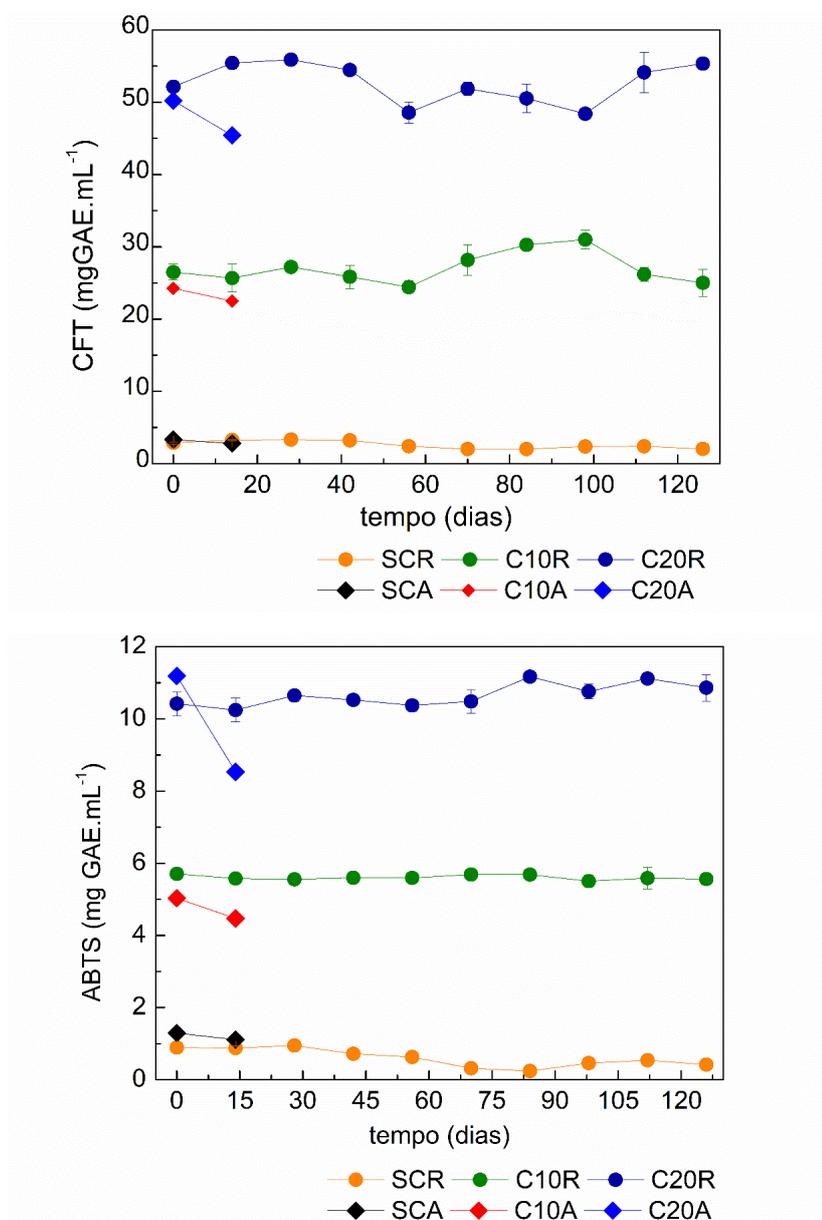
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Estabilidade ao armazenamento

A estabilidade ao longo do tempo de armazenamento foi avaliada durante um período de 126 dias (aproximadamente 4 meses) em temperatura de

refrigeração ( $4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e temperatura ambiente ( $25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) utilizando o extrato não concentrado como amostra controle, bem como o extrato concentrado de folhas de goiabeira, em ambos os FRV (10 e 20). Os resultados relativos aos teores de CFT e atividade antioxidante obtida pelo método de ABTS, estão mostrados na Figura 13.

Figura 13: Teores de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante medida pelo método do ABTS dos extratos não concentrado (SC) de folhas de goiabeira, bem como de seus respectivos extratos concentrados (C10 e C20), durante a avaliação da estabilidade em temperatura refrigerada (R) e temperatura ambiente (A), por 126 dias.



Nenhuma perda significativa ( $p < 0,05$ ) de CFT foi detectada sob temperatura de refrigeração para ambos os extratos concentrados (C10R e C20R). Normalmente, espera-se que todas as amostras sofram alguma degradação química, que irá impactar nos teores de CFT devido ao longo período de armazenamento. Este comportamento foi detectado para a amostra não concentrada (SCR) e para a amostra com FRV 10 (C10R), ambas no armazenamento refrigerado, nas quais uma redução de aproximadamente 6 e 30 % foi verificada, respectivamente. Quando armazenados em temperatura ambiente, visualizou-se uma redução máxima de 15 % para o teor de CFT. Porém, o experimento foi interrompido após 14 dias de armazenamento devido ao desenvolvimento fúngico na superfície do líquido, não concentrado e concentrado, impedindo que demais amostras fossem analisadas.

Diversos fatores podem estar relacionados com estes diferentes comportamentos ao longo do armazenamento. Zhang et al. (2020) concluíram que o teor de CFT pode ser conservado e, em alguns casos, sofrer algum aumento devido à produção de novos compostos durante o período de armazenamento. Tsali and Goula (2018) também relataram que durante o período de armazenamento o perfil de CFT possivelmente sofra mudanças devido à hidrólise de compostos fenólicos conjugados. Alguns desses compostos podem ser degradados, e consequentemente, novos compostos podem ser formados.

Além disso, também é importante lembrar que o extrato concentrado em estudo possui elevado teor de CFT e, consequentemente, atividade antioxidante. Sabe-se que, na indústria alimentícia, compostos antioxidantes são principalmente utilizados para evitar possíveis modificações na matriz alimentar, permitindo um aumento na vida de prateleira do produto (ALZATE-ARBELÁEZ et al., 2019). Este comportamento pode ser verificado quando, com o aumento da concentração do extrato, os valores de degradação de CFT são menores, comprovando que esses agem como substâncias protetoras

O mesmo comportamento observado no presente estudo foi observado para distintos extratos vegetais. Por exemplo, Zhang et al. (2020) observaram um aumento de até 140 % no teor de CFT para o suco de oxicoco e Moreno, Cocero e Rodríguez-Rojo (2018) detectaram um aumento próximo a 140 % para os CFT de bagaço de uva, ambos analisando diferentes condições de armazenamento.

Como pode ser visualizado também na Figura 13, o comportamento da atividade antioxidante foi similar ao apresentado pelo teor de CFT. Para o extrato não concentrado refrigerado foi verificada uma redução (52 %) na atividade antioxidante, e tal valor foi menor para a amostra C10R (3%), sendo que o extrato concentrado 20 vezes (C20R) apresentou um incremento de aproximadamente 4 %. Quando avaliado em relação à amostra armazenada em temperatura ambiente, uma redução de até 20 % para a atividade antioxidante foi detectada; porém, como descrito anteriormente, o experimento foi encerrado devido ao desenvolvimento fúngico nas amostras.

De acordo com Alzate-Arbeláez et al. (2019), a atividade antioxidante dos CFT pode ser instável em algumas condições ambientais, como por exemplo temperatura, presença de luz e oxigênio. Além disso, esta atividade é dependente da composição química do extrato, uma vez que os CFT e demais metabólitos secundários são unidos por ligações duplas que podem levar a modificações estruturais, justificando o diferente comportamento verificado entre as amostras. Para o armazenamento refrigerado, pode-se afirmar que quanto maior o processo de concentração do extrato de folhas de goiabeira, a estabilidade dos CFT melhorou, durante o tempo de armazenamento (126 dias), devido a manutenção dos teores de CFT e da atividade antioxidante.

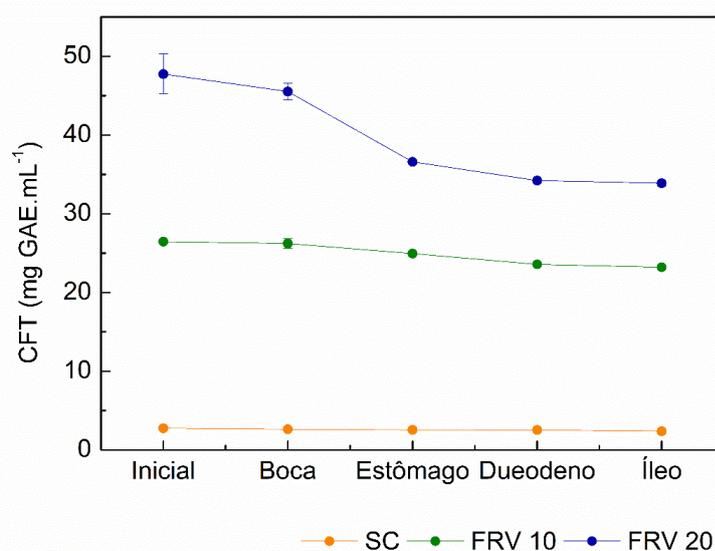
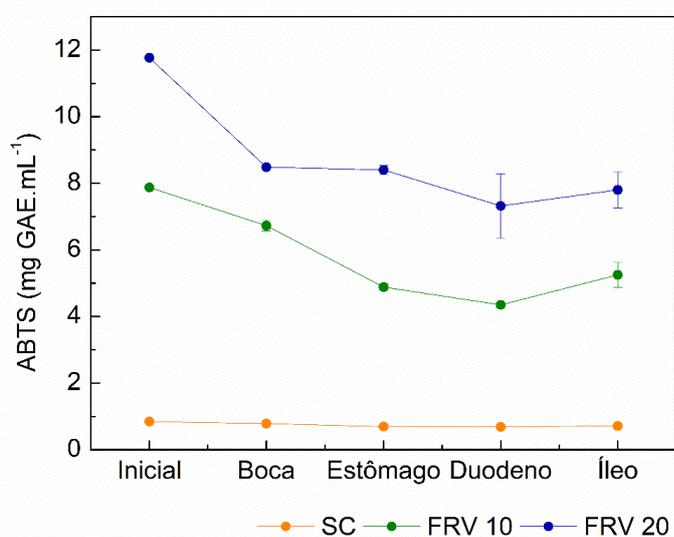
### **3.2 Simulação gastrointestinal**

A determinação do teor de compostos bioativos não é suficiente para prever os efeitos destes compostos *in vivo*. A avaliação da biodisponibilidade dos CFT pode ser realizada por métodos *in vitro*, incluindo análises de suas respostas fisiológicas (KARASÍ et al., 2017). O teor de CFT e o comportamento da atividade antioxidante em cada etapa da simulação gastrointestinal estão apresentados na Figura 14.

Para os extratos não concentrado e para ambos os concentrados (FRV 10 e 20) foi possível observar uma redução no teor dos CFT durante a simulação gastrointestinal. O teor dos CFT reduziu em torno de 7 %, 6 % e 23 % para os extratos não concentrado e concentrados 10 e 20 vezes, respectivamente, quando avaliado em relação ao inicial e estômago (fase gástrica). Para a etapa que compreende o duodeno e íleo (fase intestinal), a redução foi de aproximadamente

7% para todas as amostras. Dutra et al. (2017) relataram que os teores de CFT obtidos de umbú-caja, siriguela e mangaba foram menores que os da concentração inicial, após serem submetidos ao processo de simulação gastrointestinal. Também, Lucas-González et al. (2018) relataram a redução de 11 compostos fenólicos ao final da fase correspondente ao íleo, para a farinha de caqui.

Figura 14: Teores dos compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante medida pelo método do ABTS dos extratos não concentrado (SC) e concentrados (FRV 10 e 20) de folhas de goiabeira, durante as etapas da simulação gastrointestinal.



A redução dos teores dos CFT, quando comparadas as etapas iniciais e do íleo, pode ser, principalmente, atribuída às condições químicas, que ocorrem durante a simulação gastrointestinal, uma vez que suas estruturas são altamente sensíveis e podem sofrer modificações como hidrólise, conversão e rupturas.

Diversos podem ser os fatores relacionados com as variações verificadas ao longo do processo de simulação gastrointestinal. Thomas-Valdés et al. (2019) e Spínola et al. (2019) relataram que alguns fatores, como oxidação, polimerização, variação de pH e interações com enzimas digestivas, pancreatina e sais biliares, podem ser responsáveis por esta variação comportamental das amostras entre as diferentes etapas. Complementarmente, estes autores indicaram que os CFT podem interagir com alguns constituintes alimentares, como por exemplo, ferro, fibras, pectina e proteínas.

Na Tabela 7 estão apresentados os percentuais de recuperação dos CFT em cada etapa da simulação gastrointestinal, para as diferentes amostras.

Tabela 7: Percentuais de recuperação de compostos fenólicos totais (CFT) nas diferentes etapas da simulação gastrointestinal, para as diferentes amostras (não concentrada e concentradas FRV 10 e 20).

Etapa	% de recuperação dos CFT		
	Não concentrado	FRV 10	FRV 20
Inicial	100	100	100
Boca	96	99	95
Estômago	92	94	77
Duodeno	92	89	72
Íleo	86	88	71

Com base nos valores de recuperação observados, constatou-se que o extrato concentrado FRV 20 foi o que apresentou menores valores de recuperação. Como este extrato possui maior concentração de CFT, esses estão mais disponíveis em solução e acabam sofrendo maiores danos devido à presença de enzimas e demais compostos.

Com relação a atividade antioxidante, reduções de 15, 34 e 33 % foram verificada para os extratos não concentrado e concentrados FRV 10 e 20, respectivamente. Diversos fatores podem estar relacionados com tais reduções,

porém, é importante lembrar que a atividade antioxidante tem correlação direta com o teor de CFT, o qual reduziu 14, 12 e 30 % para os extratos não concentrado e concentrados FRV 10 e 20, respectivamente.

Esta redução também pode estar relacionada com a degradação de compostos que possuem elevada atividade antioxidante. A estrutura química dos CFT tem um papel fundamental em tal atividade, neste sentido, a interação entre esses compostos e outros constituintes alimentares da matriz alimentar podem reduzir a solubilidade dos CFT e, conseqüentemente, a atividade antioxidante (GUNATHILAKE; RANAWEERA; RUPASINGHE, 2018).

Os resultados obtidos demonstram que, no extrato onde houve maior concentração dos CFT, a redução destes compostos foi maior. Para o extrato concentrado, mesmo apresentando uma redução significativa é possível afirmar que aproximadamente 70 % destes compostos permaneceram intactos após passar pelo trato gastrointestinal, de modo que eles podem permanecer disponíveis para serem absorvidos, distribuídos e para exercer sua atividade farmacológica. Neste momento, é de fundamental importância retornarmos ao termo bioacessibilidade, que define a fração de compostos que é liberada da matriz, percorre o trato gastrointestinal e encontra-se disponível para a absorção (GUNATHILAKE; RANAWEERA; RUPASINGHE, 2018). No caso dos extratos concentrados FRV 10 e 20, em torno de 71 e 88 % dos CFT ingeridos permaneceram disponíveis para serem absorvidos e destinados aos seus lugares de ação. Consumos de CFT de 6,4 a 4854 mg.dia<sup>-1</sup> foram relatados por Minatel et al. (2017), demonstrando a eficiência do extrato em estudo, onde no FRV 20 após a simulação gastrointestinal obtêm-se valores de aproximadamente 35 mg.mL<sup>-1</sup>, demonstrando que seriam necessários apenas 138 mL para suprir o nível superior relatado.

### 3.3 Efeito citotóxico

O uso de plantas medicinais, algumas delas também conhecidas como alimentos funcionais, está relacionado à prevenção ou ao controle da proliferação de células cancerígenas (BRAGA et al., 2014). Além disso, a avaliação dos efeitos citotóxicos de extratos vegetais frente a células tumorais também deve ser realizada em células não tumorais para se determinar a seletividade (IS) das amostras testadas.

De acordo com Sul'ain; Zazali e Ahmad (2012) e Braga et al. (2014), extratos de folhas de goiabeira com valores de IC<sub>50</sub> abaixo de 20-30 µg.mL<sup>-1</sup> podem ser considerados citotóxicos. Para as células tumorais A549, as amostras não concentradas e concentradas (FRV 10 e 20) apresentaram valores de CC<sub>50</sub> abaixo de 20 µg.mL<sup>-1</sup>, tanto após a simulação gastrointestinal quanto após o armazenamento.

Vários trabalhos mostraram que os CFT de folhas de goiabeira têm a capacidade de suprimir a proliferação de uma ampla variedade de linhagens celulares, mas o mecanismo exato de ação ainda não foi elucidado (PENG et al., 2011). Kawakami et al. (2009) ao estudarem a inibição da proliferação de células de carcinoma do cólon humano, relacionaram-na com a inibição das isoformas da prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS). Braga et al. (2014) relacionaram a inibição da proliferação das linhagens celulares de carcinoma cervical (HeLa), carcinoma colorretal (RKO-AS45-1) e fibroblastos pulmonares (Wi-26VA4) com a redução do estresse oxidativo e da atividade antioxidante, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, onde valores mais baixos de CC<sub>50</sub> foram obtidos para as amostras com maior atividade antioxidante e maior teor de CFT. Esses mesmos autores explicaram que os compostos fenólicos podem inibir a proteína cinase (PK) e a transdução dos sinais de proliferação celular, e como consequência o ciclo celular é interrompido por modulação da atividade de PKs ativadas por mitógenos (MAPK). Além disso, alguns compostos fenólicos foram capazes de induzir a morte apoptótica de células cancerígenas pela ativação de vias intrínsecas (PENG et al., 2011).

Correa, Couto e Teodoro (2016) relataram em seu trabalho de revisão diversos trabalhos visando a inibição de células cancerígenas com extratos obtidos de folhas de goiabeira. Foram encontrados trabalhos que estudaram a inibição de células humanas de cânceres: cervical (HeLa), próstata metastática (DU145), boca (KB), mama (MCF7), leucemia (AML) e cólon (HT-29). Os extratos de folhas de goiabeira apresentaram atividade citotóxica dentre as células, onde os efeitos relatados variaram desde a inibição de respostas celulares, bem como a indução da apoptose. Não foram encontrados na literatura trabalhos que estudassem a inibição de linhagens celulares de adenocarcinoma alveolar humanos (A549), demonstrando a importância dos resultados obtidos neste estudo.

Tabela 8: Efeitos citotóxicos do extrato de folhas de goiabeira não concentrados (SC) e concentrado (FRV 10 e FRV 20) em células tumorais humanas de câncer de pulmão (A549) e fibroblastos renais de macaco-verde da África (VERO) pelo ensaio da Sulforrodamina B, após simulação gastrointestinal (AG) e após armazenamento de 126 dias (AA). Os resultados estão expressos como valores de  $CC_{50}$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e índice de seletividade (IS).

Amostras	A549	VERO	IS
	Amostras concentradas		
SC	5,32 ± 1,15	29,46 ± 10,28	5,53
FRV 10	0,27 ± 0,24	27,04 ± 4,64	100,14
FRV 20	0,83 ± 1,01	>50	>60,24
Após simulação gastrointestinal			
SC	18,35 ± 30,09	37,80 ± 10,27	2,05
FRV 10	4,17 ± 2,73	28,84 ± 24,83	6,91
FRV 20	2,49 ± 1,22	16,97 ± 10,09	6,81
Após 126 dias de armazenamento			
SC	0,16 ± 0,23	0,42 ± 0,93	2,62
FRV 10	0,45 ± 0,37	2,10 ± 2,56	4,66
FRV 20	0,26 ± 0,34	0,66 ± 1,39	2,53

Para a linhagem celular não tumoral (VERO), os extratos concentrados (FRV 10 e 20) e não concentrado apresentaram baixa citotoxicidade, valores entre 27 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , contra esta linhagem. Esse comportamento demonstra que essas amostras têm menor capacidade de inibir o desenvolvimento de células não tumorais (SUL'AIN; ZAZALI; AHMAD, 2012). Como consequência, os índices de seletividade das amostras concentradas FRV 10 e 20 apresentaram valores de 100 e >60, respectivamente. De acordo com Bastos (2017) valores de IS superiores a 2,0 são considerados significativos, demonstrando que o composto é duas vezes mais ativo nas células tumorais. Destaca-se o concentrado FRV 10 o qual apresentou índice de seletividade 100 vezes superior para a linhagem tumoral.

No entanto, sabe-se que a digestibilidade é um fator extremamente importante que pode alterar a quantidade de CFT disponíveis para absorção após passarem pelo trato gastrointestinal. Após estudo *in vitro* de simulação

gastrointestinal, o efeito citotóxico destes extratos, para a linhagem A549 o  $CC_{50}$  aumentou para todas as amostras, demonstrando uma redução da bioatividade do extrato, o que corrobora com os resultados obtidos no tópico 3.2, no qual a atividade antioxidante e o teor de CFT reduziram. Este aumento nos valores de  $CC_{50}$  teve como consequência uma redução no índice de seletividade (IS) das amostras, sendo que a amostra concentrada FRV 10 foi a que apresentou maior índice de seletividade após a simulação gastrointestinal, com valores de atividade 6 vezes superiores para as células tumorais.

Outro fator de grande importância está relacionado a estabilidade frente ao armazenamento, uma vez que as alterações ocorridas durante os 126 dias melhoraram o efeito citotóxico, reduzindo o  $CC_{50}$  à valores próximos à  $0,45 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para o FRV 10 e  $0,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para o FRV 20. As mudanças estruturais resultantes do armazenamento para ambas as amostras concentradas também alteraram a citotoxicidade para as células não-tumorais, reduzindo os valores de  $CC_{50}$  a uma faixa de  $0,42$  a  $2,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Com isso, os valores de IS também reduziram, ficando em uma faixa de  $2,53$  e  $4,66$ . O nível máximo do índice de seletividade ( $4,66$ ) foi encontrado para o concentrado FRV 10, demonstrando que a eficiência deste composto para a inibição de células tumorais se manteve 4 vezes superior a inibição de células não tumorais, o que comprova sua eficiência como composto com atividade farmacológica.

Neste sentido, importante ressaltar que alguns estudos já foram realizados em relação a toxicidade de extratos de folhas de goiabeira. Metwally et al. (2011) relataram que nenhum efeito prejudicial a curto prazo, para camundongos e ratos foi verificado com o consumo de doses de  $5 \text{ g.Kg}^{-1}$ . Estes autores também indicaram que, ao se avaliar um consumo agudo ou com doses repetitivas (1 mês), o consumo de  $0,2$  e  $2 \text{ g.Kg}^{-1}$  não causou nenhum efeito anormal em ratos, sem produzir mutações cromossômicas em eritrócitos do sangue.

Algumas descobertas de extrema importância que devem ser ressaltadas e que são destaque neste trabalho estão relacionadas ao fato que, mesmo passando pelo sistema gastrointestinal, quando os compostos analisados chegam à etapa do íleo, continuaram apresentando elevada atividade citotóxica. Esse comportamento demonstra que mesmo ocorrendo o contato com enzimas e condições de pH adversas, os compostos se mantiveram em solução para serem posteriormente

absorvidos. Complementarmente, o armazenamento da amostra também provocou mudanças, melhorando a atividade citotóxica e comprovando que, mesmo armazenada por um longo período de tempo, este extrato não perde sua atividade farmacológica.

#### 4. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Este estudo comparou dois tipos de extratos (não concentrado e concentrados) de folhas de goiabeira, em relação ao tempo de armazenamento e a simulação gastrointestinal, bem como o efeito desses processos na citotoxicidade desses extratos. Os resultados mostram que, os extratos concentrados apresentaram maior estabilidade durante os 126 dias de armazenamento e também durante a simulação gastrointestinal, provavelmente devido ao alto teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Além disso, a amostra concentrada FRV 10 apresentou valores mais altos de índice de seletividade, 100, 6,91 e 4,66 para a amostra concentrada, após a simulação gastrointestinal e após 126 dias de armazenamento, respectivamente. A simulação gastrointestinal e o tempo de armazenamento, devido as mudanças estruturais que ocorreram pelo estudo de diferentes condições a quais foram submetidas, bem como a adição de enzimas e a variação do pH alteraram o comportamento frente à células tumorais e não-tumorais. Além disso, devido ao baixo teor de compostos fenólicos no extrato não concentrado essas alterações não foram significativas. Os resultados obtidos sugerem que o extrato concentrado (FRV 10) de folhas de goiabeira pode ser utilizado como alimento farmacológico, devido a sua resistência frente ao armazenamento e a simulação gastrointestinal, mantendo importantes índices de seletividade frente a células epiteliais de adenocarcinoma alveolar humano.

## REFERÊNCIAS

- ALMULAIKY, Y. et al. Assessment of antioxidant and antibacterial properties in two types of Yemeni guava cultivars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 90–97, 2018.
- ALZATE-ARBELÁEZ, A. F. et al. Immobilization of Andean berry (*Vaccinium meridionale*) polyphenols on nanocellulose isolated from banana residues: A natural food additive with antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 294, n. September 2018, p. 503–517, 2019.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Evaluation of the antimutagenic potential of *Psidium guajava* L. extracts via plant bioassays. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 443–448, 2017.
- BALYAN, U.; SARKAR, B. Integrated membrane process for purification and concentration of aqueous *Syzygium cumini* (L.) seed extract. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 29–43, 2016.
- BASTOS, M. L. C. **Avaliação da citotoxicidade e seletividade do extrato, frações e alcaloide de *Geissospermum sericeum* (Apocynaceae) em linhagens celulares ACP02, HepG2 e VERO.** [s.l.] Universidade Federal do Pará, 2017.
- BRAGA, T. V. et al. Antioxidant, Antibacterial and Antitumor Activity of Ethanollic Extract of the *Psidium guajava* Leaves. **American Journal of Plant Sciences**, v. 05, n. 23, p. 3492–3500, 2014.
- CASTRO-MUÑOZ, R.; YÁÑEZ-FERNÁNDEZ, J.; FÍLA, V. Phenolic compounds recovered from agro-food by-products using membrane technologies: An overview. **Food Chemistry**, v. 213, p. 753–762, 2016.
- CHEN, H. Y.; YEN, G. C. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 686–694, 2007.
- CORREA, M. G.; COUTO, J. S.; TEODORO, A. J. Anticancer properties of *Psidium guajava* - a mini-review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 9, p. 4199–4204, 2016.
- DÍAZ-DE-CERIO, E. et al. The hypoglycemic effects of guava leaf (*Psidium guajava* L.) extract are associated with improving endothelial dysfunction in mice with diet-induced obesity. **Food Research International**, v. 96, p. 64–71, 2017.
- DUTRA, R. L. T. et al. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 100, p. 650–657, 2017.
- GUNATHILAKE, K. D. P. P.; RANAWEERA, K. K. D. S.; RUPASINGHE, H. P. V. Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of selected edible green leaves. **Food Chemistry**, v. 245, p. 371–379, 2018.
- HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: **Biodisponibilidade de Nutrientes**. Barueri: Manole, 2007.

- INCA, I. N. DE C. **Estimativa de Câncer no Brasil**, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>.
- JAIARJ, P. et al. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 2, p. 203–212, 1999.
- JARA-PALACIOS, M. J. et al. Effects of in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. **Food Research International**, v. 109, p. 433–439, 2018.
- KARAŚ, M. et al. Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 291–305, 2017.
- KAWAKAMI, Y. et al. Antiproliferative activity of guava leaf extract via inhibition of prostaglandin endoperoxide H synthase isoforms. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 80, n. 5–6, p. 239–245, 2009.
- LAILY, N. et al. The Potency of Guava *Psidium Guajava* (L.) Leaves as a Functional Immunostimulatory Ingredient. **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 301–307, 2015.
- LUCAS-GONZÁLEZ, R. et al. Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (*Diospyros kaki*) co-products during in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 256, p. 252–258, 2018.
- LUO, Y. et al. Ultrasound extraction of polysaccharides from guava leaves and their antioxidant and antiglycation activity. **Process Biochemistry**, v. 73, p. 228–234, 2018.
- METWALLY, A. M. et al. Monograph of *Psidium guajava* L. leaves. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, n. 21, p. 89–104, 2011.
- MINATEL, I. O. et al. Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. In: **Phenolic Compounds - Biological Activity**. [s.l.] InTech, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, M. **Sistema de Informação sobre Mortalidade**, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>.
- MORENO, T.; COCERO, M. J.; RODRÍGUEZ-ROJO, S. Storage stability and simulated gastrointestinal release of spray dried grape marc phenolics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 112, p. 96–107, 2018.
- MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 60–65, 2013.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 23 mar. 2012.
- PENG, C.-C. et al. The aqueous soluble polyphenolic fraction of *Psidium guajava* leaves exhibits potent anti-angiogenesis and anti-migration actions on DU145 cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.
- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 128, p. 1–4, 2007.

- SILVA, I. T. DA. **Triagem Anti-Herpética de alguns taxons da biodiversidade Brasileira: Fracionamento biomonitorado de Cecropia glaziovii Sneth., Urticaceae (embaúba)**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enology Viticulture**, v. 16, p. 44–58, 1965.
- SPÍNOLA, V. et al. Changes in the phenolic compositions of *Elaeagnus umbellata* and *Sambucus lanceolata* after in vitro gastrointestinal digestion and evaluation of their potential anti-diabetic properties. **Food Research International**, v. 122, n. January, p. 283–294, 2019.
- SUL'AIN, M. D.; ZAZALI, K. E.; AHMAD, N. Screening on Anti-Proliferative Activity of Psidium Guajava Leaves Extract towards Selected Cancer Cell Lines. **Journal of US-China Medical Science**, v. 9, p. 30–37, 2012.
- TAKAHASHI, Y. et al. Inhibition of leukocyte-type 12-lipoxygenase by guava tea leaves prevents development of atherosclerosis. **Food Chemistry**, v. 186, p. 2–5, 2015.
- THOMAS-VALDÉS, S. et al. Effect of simulated gastrointestinal digestion on polyphenols and bioactivity of the native Chilean red strawberry (*Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis* f. *patagonica*). **Food Research International**, v. 123, n. January, p. 106–114, 2019.
- TSALI, A.; GOULA, A. M. Valorization of grape pomace: Encapsulation and storage stability of its phenolic extract. **Powder Technology**, v. 340, p. 194–207, dez. 2018.
- VERRUCK, S. et al. The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of Bifidobacterium BB-12 under invitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1179–1183, 2015.
- VICENTE, S. J. V. et al. Stability of phenolic compounds and antioxidant capacity of regular and decaffeinated coffees. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 1, p. 110–118, 2014.
- VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.
- WANG, H.; DU, Y. J.; SONG, H. C.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of guava leaves. **Food Chemistry**, v. 123, n. 1, p. 6–13, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). **Traditional Medicine Strategy**. Geneva, Switzerland: [s.n.], 2013.
- ZHANG, J. et al. Effect of spray drying on phenolic compounds of cranberry juice and their stability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 269, p. 109744, 2020.

## CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a eficiência da nanofiltração para a concentração dos compostos fenólicos do extrato de folhas de goiabeira. Elevada concentração de compostos fenólicos foi obtida no FRV 20 aumentando a concentração em aproximadamente 19 vezes em relação ao valor inicial. O mesmo comportamento foi verificado para a atividade antioxidante, apresentando maiores valores de atividade antioxidante com o aumento da concentração de compostos fenólicos. Porém, para a atividade antioxidante obteve-se uma concentração máxima de aproximadamente 10 vezes para o método de DPPH, indicando também uma correlação positiva entre a atividade antioxidante com o aumento da concentração de compostos fenólicos.

Valores de fluxos iniciais aproximados de  $45 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  foram obtidos, sendo que ao final do processo uma redução de aproximadamente 75 % foi visualizada. Para o FRV 20, a principal resistência encontrada foi a resistência reversível, ou polarização por concentração. Além disso, o bloqueio da membrana foi causado pela ocorrência simultânea de diversos mecanismos de *fouling*. O modelo de bloqueio incompleto foi o que apresentou melhor ajuste, sendo que, complementarmente, o modelo combinado de bloqueio de poro e torta de filtração também apresentou bom ajuste aos dados experimentais durante a filtração, apresentando um  $R^2$  superior a 0,93.

Os extratos concentrados de folhas de goiabeira apresentaram melhor inibição da linhagem celular tumoral e quase nenhum efeito contra as células não-tumorais. Após o armazenamento e a simulação gastrointestinal, devido as mudanças estruturais, adição de enzimas e a variação do pH, alterou-se o comportamento contra as células tumorais e aumentou os danos para as linhagens não-tumorais. Além disso, devido ao pequeno número de compostos fenólicos no extrato *in natura*, essas alterações não foram tão significativas.

Por fim a nanofiltração se mostrou uma tecnologia alternativa com potencial para a concentração de compostos fenólicos do extrato de folhas de goiabeira. Mesmo após um armazenamento prolongado e variações de comportamento na simulação gastrointestinal, o mesmo manteve sua atividade biológica sendo efetivo para a inibição de células tumorais.

