



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

LARISSA DE BONA GAMBIN

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS
EXTRAÍDOS DA GOIABA-SERRANA (*Acca sellowiana*) EM CÉLULAS DE
MELANOMA CUTÂNEO SK-Mel-28**

LARANJEIRAS DO SUL

2020

LARISSA DE BONA GAMBIN

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS
EXTRAÍDOS DA GOIABA-SERRANA (*Acca sellowiana*) EM CÉLULAS DE
MELANOMA CUTÂNEO SK-Mel-28**

Dissertação de mestrado, apresentada para o Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Bender
Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli
Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo

LARANJEIRAS DO SUL

2020

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Gambin, Larissa de Bona
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE COMPOSTOS
FENÓLICOS EXTRAÍDOS DA GOIABA-SERRANA (*Acca sellowiana*)
EM CÉLULAS DE MELANOMA CUTÂNEO SK-Mel-28 / Larissa de
Bona Gambin. -- 2020.
85 f.:il.

Orientador: Dr. João Paulo Bender
Coorientadores: Dr. Guilherme Martinez Mibielli, Dr.
Wagner Luiz Priamo
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Laranjeiras do Sul, PR, 2020.

1. Ciência e tecnologia de alimentos. I. Bender, João
Paulo, orient. II. Mibielli, Guilherme Martinez,
co-orient. III. Priamo, Wagner Luiz, co-orient. IV.
Universidade Federal da Fronteira Sul. V. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LARISSA DE BONA GAMBIN

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS
EXTRAÍDOS DA GOIABA SERRANA (*Acca sellowiana*) EM CÉLULAS DE
MELANOMA CUTÂNEO SK-MEL-28**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação *Stricto sensu*, da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, para obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

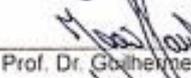
Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

17/12/2020

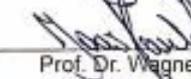
BANCA EXAMINADORA¹



Prof. Dr. João Paulo Bender (UFFS – presidente/orientador)



Prof. Dr. Guilherme Martínez Mibielli (UFFS – coorientador)



Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo (IFRS – coorientador)



Prof.ª Dra. Margarete Dulce Bagatini (UFFS – 1º membro)

Prof.ª Dra. Anieli Pinto Kempla (UFFS – 2º membro)



Prof.ª Dra. Leda Battestin Quast (UFFS – suplente)

¹“Em função da Pandemia do Coronavírus e as medidas de afastamento tomadas pela UFFS, esta Folha de Aprovação foi assinada pelo Presidente da Banca, como representante dos demais membros”.

À minha mãe, Marilene De Bona,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Fronteira Sul e aos professores do PPGCTAL;

À estação experimental de São Joaquim/SC, da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), pela doação dos frutos, o qual viabilizou o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul pela realização das análises de HPLC e PLE;

À Universidade Comunitária da Região de Chapecó (Unochapecó), pela liofilização dos extratos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Paulo Bender que sempre esteve presente, pela amizade, dedicação e contribuições ao longo destes dois anos;

Aos meus coorientadores, Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli e Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo pela disponibilidade, e que, de igual maneira, contribuíram fortemente para a realização desta pesquisa;

À Msc, Denise Bilibio, pela disponibilidade e engajamento para a realização das análises de HPLC;

À Jaine Führ, pelas horas de laboratório compartilhadas e pelo auxílio durante a execução dos experimentos;

À Prof. Dra. Margarete Dulce Bagattini que, desde o início, se prontificou a participar e a contribuir com esta pesquisa;

À Beatriz e a Filomena pela realização das análises celulares, além do conhecimento compartilhado. Foi muito gratificante aprender sobre os ensaios com vocês.

Aos técnicos da CLAB do *Campus* Chapecó: Odinei, Tiago, Gustavo e Jonas, pela ajuda dispensada no período da execução dos experimentos;

Aos colegas de mestrado, em especial à Cíntia e a Rúbia, pelas inúmeras caronas no período das aulas em Laranjeiras do Sul; à Jessica Salles pela estadia em Laranjeiras do Sul; À colega de mestrado e amiga Vanessa Alves pelo apoio e pelo crescimento que desenvolvemos juntas. Compartilhamos bons momentos!

À minha querida amiga, Fernanda dos Anjos pelo incentivo e estadia no período em que precisei residir em Chapecó;

À minha família, em especial à minha mãe, Marilene De Bona, pelo suporte incondicional em todas as minhas escolhas. Não consigo expressar em palavras todo meu amor e gratidão.

Aos familiares, amigos e colegas que acompanharam essa etapa, muito obrigada pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

“A imaginação é mais importante que o conhecimento”.

Albert Einstein

RESUMO

A goiaba-serrana (*Acca sellowiana*), popularmente conhecida como feijoa é uma fruta nativa brasileira considerada uma fruta rica em compostos bioativos (CB). Estes compostos bioativos se destacam pelas propriedades que exercem como atividade antioxidante, anti-inflamatória, e de agentes coadjuvantes no tratamento de doenças. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição fenólica e a atividade antioxidante do extrato da goiaba-serrana, genótipo Alcântara, por meio da técnica de extração por ultrassom e líquidos pressurizados (LP), e investigar a ação anticancerígena do extrato em células de melanoma (MC) cutâneo da linhagem SK-Mel-28. Os frutos foram secos em estufa com circulação de ar a 40 °C até massa constante. Posteriormente foram triturados em moinho de facas e peneirados na faixa de 30 a 60 *mesh*. A goiaba triturada foi submetida ao processo de extração por ultrassom indireto, onde se avaliou, com o auxílio da técnica de planejamento de experimentos as seguintes variáveis de processo: temperatura (°C), concentração de etanol (%), razão sólido/líquido (mg/mL) e potência de ultrassom (%). Os extratos foram avaliados quanto aos compostos fenólicos totais (CFT) - pelo método de *Folin-Ciocalteu* - atividade antioxidante total (AAT) - pelo método de DPPH - e por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foram quantificados quanto à presença de quatro compostos bioativos: pirocatecol, ácido siríngico, ácido ferúlico e flavona. A atividade anticancerígena foi avaliada pelo método da migração celular expondo as células de MC ao extrato da goiaba-serrana (100, 500, 1000, 5000 e 10000 µg/mL) por 24 e 72 horas. Pelo método de ultrassom o teor de CFT variou entre 11,2 a 34,9 mg AGE/g fruta seca e o maior valor AAT foi de 290,2 µmol TE/g fruta seca. A extração por LP foi o melhor método para a extração dos CFT, atingindo 59,4 mg AGE/g fruta seca. Foi observado que as condições de extração influenciaram na quantificação dos compostos individuais, sendo que a flavona foi o CB majoritário dos extratos, a qual foi detectada em 100% das condições avaliadas. Para a extração dos CFT a concentração de etanol apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), enquanto para AAT a potência de ultrassom apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). O extrato da goiaba-serrana na concentração de 10000 µg/mL foi efetivo para impedir a migração celular das células SK-Mel-28, demonstrando potencial como agente coadjuvante para o tratamento de câncer melanoma cutâneo.

Palavras-chave: migração celular; atividade antioxidante total; câncer; DCCR, compostos bioativos

ABSTRACT

The feijoa (*Acca sellowiana*), popularly known as pineapple guava, is a native Brazilian fruit considered a fruit rich in bioactive compounds (BC). These bioactive compounds stand out for their properties as antioxidant, anti-inflammatory, and supporting agents in the treatment of diseases. In this context, the aim of this work was to evaluate the phenolic composition and antioxidant activity of the extract of the feijoa, Alcântara genotype, by means of the extraction technique by ultrasound and pressurized liquids (PL), and to investigate the anticancer action of the extract in cells of cutaneous melanoma (CM) of the SK-Mel-28 strain. The fruits were dried in an oven with air circulation at 40 ° C until constant mass. Subsequently, they were crushed in a knife mill and sieved in the range of 30 to 60 mesh. The crushed feijoa was subjected to the extraction process by indirect ultrasound, where the following process variables were evaluated, with the aid of the design of experiments: temperature (° C), ethanol concentration (%), solid/liquid ratio (mg/mL) and ultrasound potency (%). The extracts were evaluated for total phenolic compounds (TPC) - by the *Folin-Ciocalteu* method - total antioxidant activity (TAA) - by the DPPH method - and by high performance liquid chromatography (HPLC) were quantified for the presence of four compounds bioactive: pyrocatechol, siríngic acid, ferulic acid and flavone. The anticancer activity was evaluated by the cell migration method exposing the CM cells to the extract of the mountain feijoa (100, 500, 1000, 5000 and 10000 µg/mL) for 24 and 72 hours. By the ultrasound method, the TPC content varied between 11.2 to 34.9 mg AGE/g dried fruit and the highest TAA value was 290.2 µmol TE/g dried fruit. PL extraction was the best method for TPC extraction, reaching 59.4 mg AGE/g dried fruit. It was observed that the extraction conditions influenced the quantification of individual compounds, with flavone being the major BC of the extracts, which was detected in 100% of the evaluated conditions. For the extraction of TPC, the concentration of ethanol showed a significant difference ($p < 0,05$), while for TAA, the ultrasound power showed a significant difference ($p < 0,05$). The extract of feijoa at a concentration of 10000 µg/mL was effective in preventing cellular migration of SK-Mel-28 cells, demonstrating its potential as a supporting agent for the treatment of skin CM.

Keywords: cell migration; total antioxidant activity; cancer; DCCR; bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A Goiaba-serrana.....	34
Figura 2 – Mecanismo do rompimento da parede celular na extração por ultrassom...	38
Figura 3 – Estrutura química dos flavonoides e seus derivados.....	41
Figura 4 – O radical DPPH.....	43
Figura 5 – Etapas da formação do câncer: iniciação, promoção e propagação.....	44
Figura 6 – Genótipo da goiaba-serrana utilizada nesta pesquisa – Alcântara.....	47
Figura 7 – Peneirador eletromagnético.....	50
Figura 8 – Representação esquemática do extrator PLE.....	53
Figura 9 – Porcentagem de partículas retidas em função da abertura da peneira pela série <i>Taylor</i>	59
Figura 10 – Total acumulado de gramas de partículas retidas em função do tamanho de <i>mesh</i>	59
Figura 11 – Pareto com os efeitos para compostos fenólicos totais do planejamento PB.....	62
Figura 12 – Pareto com os efeitos para atividade antioxidante total do planejamento PB.....	63
Figura 13 – Pareto dos efeitos padronizados e as interações para compostos fenólicos totais pelo DCCR.....	66
Figura 14 – Pareto com os efeitos padronizados e as interações para atividade antioxidante pelo DCCR.....	68
Figura 15 – Superfícies de resposta para compostos fenólicos totais a partir da relação das variáveis estudadas.....	71
Figura 16 – Superfícies de respostas para atividade antioxidante total a partir da relação das variáveis estudadas.....	73
Figura 17 – Correlação de Pearson (<i>r</i>) entre compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total do extrato da goiaba-serrana.....	75
Figura 18 – Avaliação da migração celular em células de MC SK-Mel-28 após 24 horas de tratamento com extrato hidroalcoólico da goiaba-serrana nas concentrações de 100 a 10000 µg/mL.....	86
Figura 19 – Avaliação da migração celular em células de MC SK-Mel-28 após 72 horas de tratamento com extrato hidroalcoólico da goiaba-serrana nas concentrações	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal de um genótipo da goiaba-serrana.....	35
Tabela 2 – Classes de compostos fenólicos e polifenólicos e suas respectivas estruturas básicas.....	40
Tabela 3 – Classificação dos ensaios antioxidantes conforme a natureza da reação....	42
Tabela 4 – Variáveis e níveis do primeiro planejamento experimental – PB.....	51
Tabela 5 – Variáveis e níveis do planejamento DCCR.....	52
Tabela 6 – Condições utilizadas na extração para a liofilização do extrato.....	55
Tabela 7 – Modo gradiente de concentração de B em função do tempo empregado na determinação dos compostos bioativos.....	57
Tabela 8 – Matriz do planejamento experimental PB e os resultados obtidos para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total.....	61
Tabela 9 – Matriz DCCR e os resultados obtidos para a determinação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total para duas horas de extração.....	65
Tabela 10 – Parâmetros analíticos do método de quantificação dos compostos individuais por HPLC-LCMS.....	78
Tabela 11 – Diferentes condições experimentais avaliadas e os resultados obtidos para CFT, AAT e compostos fenólicos individuais por HPLC-MS.....	80
Tabela 12 – Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante total com as diferentes condições de extração.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATT. – Atividade antioxidante total

AGE. – ácido gálico equivalente

CFT. – Compostos fenólicos totais

CB. – Compostos bioativos

DCCR. – Delineamento central composto rotacional

DMEN. – Meio Dulbecco

DPPH. – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EPAGRI. – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

GS. – Goiaba-serrana

HPLC. – *High performance liquid chromatography* do inglês: cromatografia líquida de alta eficiência

IBGE. – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INCA. – Instituto Nacional de Câncer

kHz. – Quilo-hertz

LCMS. – *Liquid chromatography mass spectrometry* do inglês: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LP. – Líquidos pressurizados

MC. – Melanoma cutâneo

mL. – mililitro

mg. – miligrama

mm. – milímetro

NaClO – hipoclorito de sódio

nm. – nanômetro

PB – *Plackett-Burmann*

ppm. – parte por milhão

Sup. Resp. – Superfície de resposta

TE. – Trolox equivalente

µg. – micrograma

µL. – microlitro

µmol. – micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
1.1	OBJETIVOS	32
1.1.1	Objetivo geral	32
1.1.2	Objetivos específicos	33
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
2.1	GOIABA SERRANA	34
2.2	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	36
2.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1	MATERIAL	46
3.1.2	Reagentes	47
3.1.3	Equipamentos	47
3.1.4	Padrões cromatográficos	48
3.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	49
3.2.1	Secagem dos frutos	49
3.2.2	Determinação da granulometria das partículas	49
3.2.3	Planejamento experimental para obtenção do extrato	50
3.2.3.2	Métodos de extração	52
3.2.3.2.1	<i>Banho de ultrassom</i>	52
3.2.3.2.2	<i>Extração por líquidos pressurizados</i>	52
3.2.4	Métodos analíticos	53
3.2.4.1	Determinação dos compostos fenólicos totais	54
3.2.4.2	Avaliação da atividade antioxidante total por DPPH	54
3.2.5	Liofilização do extrato	55
3.2.6	Avaliação da atividade anticancerígena dos extratos	55
3.2.6.1	Cultivo celular	55
3.2.6.2	Avaliação da migração celular	56
3.2.6	Perfil dos compostos bioativos por HPLC-MS	56
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	SECAGEM DOS FRUTOS	58

4.2	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, E AS RELAÇÕES COM A EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	60
4.2.1	Superfícies de resposta	70
4.3	PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS DA GOIABA-SERRANA HPLC-MS	77
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DO EXTRATO DA GOIABA-SERRANA.....	85
	CONCLUSÃO.....	91
	TRABALHOS FUTUROS	92
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura brasileira colabora com 33 bilhões de reais de valor bruto inserido na produção agrícola, o que coloca o Brasil como o terceiro produtor mundial de frutas, sendo superado apenas pela China e Índia, respectivamente. Devido à grande diversidade de frutas, a área de cultivo corresponde à 2 milhões de hectares distribuídos por todo o Brasil. Embora a fruticultura demonstre um significativo resultado em termos de geração de empregos no campo e na agroindústria, a maior parte da produção está voltada para a citricultura, que se sobrepõe à produção de frutas frescas e seus derivados (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018).

Ainda que o Brasil detenha uma ampla diversidade de frutas, o estudo intitulado “Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil” feito por meio da Pesquisa de Orçamento Familiar, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), indica que menos de 10% da população atinge as recomendações de consumo diário de frutas (IBGE, 2011). Neste contexto, ações do Ministério da Saúde estão sendo desenvolvidas no sentido de resgatar os alimentos regionais como alternativa para difundir a alimentação saudável e promover a valorização social dos produtores, tendo em vista que os consumidores estão transformando a percepção da alimentação, identificando nos alimentos as relações de saúde com a prevenção de doenças. As frutas aparecem neste panorama por apresentarem, em sua composição, uma diversidade de vitaminas, compostos bioativos e antioxidantes (BRASIL, 2015; SUN-WATERHOUSE et al., 2013).

Em virtude disso, pode-se destacar como espécie regional a goiaba-serrana, *Acca sellowiana* (Berg.), sinônimo *Feijoa sellowiana* Berg, também conhecida como goiabeira-do-mato, goiabeira-do-campo ou feijoa. Esta frutífera pertence à família das *Myrtaceae*, é nativa do bioma da Mata Atlântica e ocorre no planalto meridional brasileiro. Por muito tempo foi negligenciada em termos de pesquisa e, por este motivo, o uso e a disseminação da goiaba-serrana é recente (MORETTO; NODARI, 2014). O Ministério do Meio Ambiente definiu a goiaba serrana como a fruta de maior potencial econômico do sul do Brasil (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2001, EPAGRI, 2019) e, além disso, crescem os estudos que demonstram diversas propriedades. Dentre as propriedades encontradas na goiaba serrana destacam-se a anticancerígena (BONTEMPO et al., 2007), a antibacteriana (BASILE et al., 2010), além da multiplicidade de componentes bioativos de interesse tecnológico (ácidos fenólicos e flavonoides, óleos essenciais, vitamina C e fibra dietética) (ZHU, 2018).

Para ter acesso aos componentes bioativos oriundos da matéria-prima vegetal utilizam-se métodos de extração, e para isto normalmente são necessárias etapas de preparação da amostra a fim de isolar a substância da matriz da planta. A escolha do método para extrair estes componentes depende da estabilidade térmica e natureza dos compostos a serem analisados. As metodologias tradicionais, como percolação, maceração, soxhlet, destilação a vapor, entre outras, são comumente empregadas para esta finalidade. Entretanto, a presença de mais de uma fase no sistema pode restringir a utilização destas técnicas devido às limitações quanto à transferência de massa (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA, 2004; SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012b). Outros pontos importantes são os prolongados tempos de extração e o alcance de temperaturas elevadas, os quais podem influenciar negativamente o potencial de ação dos compostos termolábeis.

Dentre os diversos métodos para a obtenção de compostos bioativos presentes em matrizes vegetais, o uso de ultrassom e a técnica de emprego de líquidos pressurizados vem emergindo como abordagens potenciais, visando à máxima recuperação destes compostos, aliada à alta estabilidade e baixo custo energético. A tecnologia de ultrassom utiliza energia das ondas ultrassônicas que são transmitidas em frequência superior à capacidade auditiva humana (acima de 20 kHz), aumentando as taxas de transferência de massa e possibilitando a ruptura da parede celular devido à formação de microcavidades, levando a maiores rendimentos com tempo e consumo de solventes reduzidos. Na extração com líquidos pressurizados podem ser alcançadas altas taxas de transferência de massa devido ao aumento da solubilidade dos compostos, bem como uma redução no consumo de solventes. (BARRALES et al., 2018; IRAKLI; CHATZOPOULOU; EKATERINIADOU, 2018; SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012a).

É importante observar que, uma vez obtidos os extratos, identificados e quantificados seus compostos, é imprescindível avaliar o potencial de ação frente a um determinado objetivo, a fim de que possam ser justificados os esforços demandados na etapa de obtenção. Como mencionado, o espectro de ação dos extratos pode ser amplo e abarcar principalmente o combate às doenças de grande preocupação. O câncer é a doença que mais causa mortes no mundo, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial. Especificamente no Brasil, o câncer de pele - melanoma cutâneo (MC) representou no ano de 2018, 1,4% e 1,7% de novos casos em homens e mulheres, respectivamente, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2020). Embora este tipo de câncer não seja o principal agente causador de mortalidade, o melanoma cutâneo é a forma mais agressiva de câncer de pele. Ainda que diversos tratamentos para este tipo de

câncer estejam disponíveis, o aumento da resistência sobre as drogas utilizadas ressalta a importância do desenvolvimento de novas abordagens que possam combater o melanoma e isto, consequentemente, inclui os compostos oriundos de matrizes vegetais (CHINEMBIRI et al., 2014). Por este motivo, há a necessidade de se buscar novas fontes de coadjuvantes para o tratamento de doenças cancerígenas. Frente ao exposto, percebe-se que há uma lacuna científica a ser preenchida voltada para a investigação do potencial anticancerígeno em células de melanoma cutâneo a partir do extrato da goiaba-serrana, sob a qual recaem valorosos indicativos de atividade antitumoral.

Para melhor compreensão, esta dissertação de mestrado está organizada da seguinte forma: no capítulo dois será revisada a literatura sobre a goiaba-serrana, composição e o perfil de seus compostos bioativos; os métodos de extração utilizados nesse trabalho; a classificação e a importância dos compostos bioativos; funções exercidas pelos compostos bioativos, como a atividade antioxidante e, por fim, uma síntese sobre o câncer e como os compostos bioativos podem atuar como coadjuvantes no tratamento dessa doença. No capítulo 3 serão apresentadas as metodologias utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho, o desenvolvimento do planejamento experimental, variáveis investigadas e sua execução para a obtenção do extrato, os métodos analíticos e a atividade anticancerígena do extrato. No capítulo 4 serão apresentados os resultados obtidos da execução do capítulo 3. Neste momento, serão expostos os resultados do planejamento experimental e a influência das variáveis na quantificação dos compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total do extrato; perfil dos CB no extrato quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência e, os resultados obtidos utilizando o extrato da goiaba-serrana no tratamento de células cancerígenas do tipo melanoma SK-Mel-28.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a composição fenólica e a atividade antioxidante do extrato da goiaba-serrana, genótipo Alcântara, por meio da técnica de extração por ultrassom e líquido pressurizado, e investigar a ação anticancerígena do extrato em células de melanoma cutâneo da linhagem SK-Mel-28.

1.1.2 Objetivos específicos

a) Aplicar a técnica de planejamento experimental para avaliar a influência das variáveis de processo temperatura (°C), razão sólido/líquido (g/mL), concentração de etanol e potência de ultrassom, na obtenção do extrato da goiaba utilizando a técnica de extração por ultrassom;

b) Determinar a composição dos compostos fenólicos totais nas diferentes condições experimentais avaliadas;

c) Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos nas diferentes condições experimentais avaliadas;

d) Selecionar a melhor condição experimental com base na atividade antioxidante total e investigar o potencial do extrato frente à linhagem celular de melanoma cutâneo SK-Mel-28.

e) Realizar um experimento utilizando a técnica de extração por líquidos pressurizados em uma condição específica para fins comparativos ao método de ultrassom;

f) Caracterizar os extratos em relação aos compostos bioativos individuais por cromatografia líquida de alta eficiência;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GOIABA SERRANA

A goiaba serrana (Figura 1) é uma das frutas nativas mais promissoras do sul do Brasil em termos comerciais (AMARANTE et al., 2008; EPAGRI, 2020) e no estado de Santa Catarina vem sendo estudada desde 1986 pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). Por meio destas pesquisas foi possível o desenvolvimento de quatro novas cultivares: Alcântara, Helena, Mattos e Nonante (AMARANTE; SANTOS, 2011).

Figura 1 – A Goiaba-serrana



Fonte: EPAGRI, (2020).

Foto: Aires Mariga.

O formato da fruta varia de alongado a redondo, o peso varia de 20 g a 250 g, quando madura. A casca, a qual é aderente à fruta, varia entre lisa ou rugosa, podendo ter espessura de até 1,3 cm nos frutos rugosos. A coloração pode variar entre tons de verde cinza até verde oliva (MORETTO; NODARI, 2014). A Tabela 1 apresenta a composição aproximada de um genótipo da goiaba-serrana.

Comparada a outras frutas, como maçã e a laranja, a goiaba ainda está longe de representar os mesmos indicadores de produção. Pesquisas de adaptação da planta para a produção em larga escala estão sendo desenvolvidas, principalmente na Ásia e Oceania, onde

a utilização da fruta para a elaboração de produtos como, chocolate, vinho, cerveja, geleia, produtos de panificação e iogurte, têm sido descrito (ZHU, 2018).

Tabela 1 – Composição centesimal de um genótipo da goiaba-serrana

Nutriente	Unidade	Conteúdo (%)
Água	g	83,28 %
Energia	kcal	61 %
Proteína	g	0,71 %
Lipídios	g	0,42 %
Carboidratos	g	15,21 %
Fibra total	g	6,4 %
Açúcares	g	8,2 %
Cálcio	mg	17 %
Ferro	mg	0,14 %
Magnésio	mg	9 %
Fósforo	mg	19 %

Fonte: ZHU (2018).

Apesar de ser uma espécie nativa do Brasil, a produção da goiaba-serrana em outros países é oriunda majoritariamente de cultivares não brasileiras, como acontece na Nova Zelândia, onde a fruta é muito valorizada pelos seus aromas, polpa doce e succulenta, além do potencial nutracêutico devido aos seus compostos bioativos (BARIŞ TUNCEL; YILMAZ, 2013; BERTOLDO et al., 2017; WESTON, 2010; ZHU, 2018).

No tocante aos compostos bioativos, diferentes estudos têm demonstrado a diversidade da atividade biológica dos extratos: a atividade antioxidante foi encontrada na casca (AMARANTE et al., 2017); nos frutos (KELES et al., 2012; PASQUARIELLO et al., 2015) e nas folhas (MOSBAH et al., 2018), a partir de diferentes solventes, como, etanol, metanol, acetona e extrato aquoso. Testes *in vivo* demonstraram o efeito anti-inflamatório do suco de goiaba composto com mucilagem (MONFORTE et al., 2014). Extratos metanólicos da fruta e folhas apresentaram efeito antidepressivo (MAHMOUDI et al., 2015).

Ao avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos acetônicos da fruta e folhas da goiaba, foi identificado que a flavona é um dos principais compostos antimicrobiano presentes no extrato (BASILE et al., 2010). Estudos recentes evidenciam que a fração de

proantocianidina presente no extrato acetônico da goiaba apresentou atividade citotóxica contra linhagens celulares humanas de carcinoma de células escamosas (AOYAMA; SAKAGAMI; HATANO, 2018).

A composição de polifenóis da goiaba é bastante diversificada. Monforte et al (2014) demonstraram que a polpa da goiaba continha catequina, ácido gálico, quercetina, ácido elágico, rutina, ácido siríngico, eriodictil, pirocatecol e eriocitrina.

2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os métodos tradicionais de extração que utilizam solventes como lixiviadores ainda são os métodos mais utilizados, pois estas metodologias são relativamente simples e de baixo custo. As principais desvantagens decorrem da alta quantidade de solvente, além do uso de altas temperaturas que podem degradar compostos termolábeis da amostra. A partir disso, novas técnicas estão sendo desenvolvidas a fim de amenizar os efeitos das técnicas convencionais (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998).

2.2.1 Extração por líquidos pressurizados

As técnicas emergentes de extração, como a extração por líquidos pressurizados, são convenientes para a extração de compostos nutracêuticos, ou seja, para os compostos que desempenham funções metabólicas, pois se trata de um método automatizado, adequado para matrizes sensíveis ao oxigênio e a luz. Entre os compostos nutracêuticos, podem-se citar os compostos fenólicos e antioxidantes, aminoácidos, ácidos graxos poli-insaturados, proteínas e minerais. A utilização da extração sob pressão se justifica pela redução do tempo de extração e consumo de solventes, bem como o tratamento mínimo de preparo da amostra (MUSTAFA; TURNER, 2011).

Inicialmente, a extração por líquidos pressurizados era utilizada para a extração de poluentes contidos em sedimentos, solo e lodo de esgoto. O avanço da tecnologia difundiu este método de extração para outras áreas, como a biologia, indústria farmacêutica e de alimentos, devido à eficiência, seletividade e confiabilidade do método. Como a técnica utiliza solventes a alta pressão e temperatura sem atingir o ponto crítico, a viscosidade do solvente é reduzida, aumentando a sua habilidade de penetrar na matriz e de solubilizar os compostos. Este sistema pode ser operado de forma dinâmica e estática, ou combinando os dois métodos. No modo estático, a amostra e o solvente permanecem em condições de

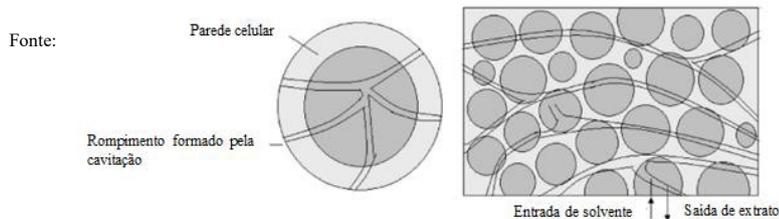
extração fixadas de tempo e temperatura, por sua vez, no modo dinâmico o solvente flui pela matriz continuamente (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005).

Uma grande vantagem da extração neste formato é a utilização de solventes (etanol e água) reconhecidos como seguros e efetivos quando comparados a outros solventes comumente utilizados que são classificados como tóxicos, a citar o metanol, clorofórmio e acetona, por exemplo. Além disso, alguns métodos que empregam estes solventes necessitam de processos posteriores de filtração, dessulfuração e concentração dos extratos (MONRAD et al., 2010). Estudos têm demonstrando a eficiência da extração PLE para compostos fenólicos de diversas fontes, como da casca da laranja (BARRALES et al., 2018), casca de romã (SUMERE et al., 2018), amora preta (MACHADO et al., 2015), de folhas de *Piper gaudichaudianum* Kunth (PÉRES et al., 2006). É interessante observar nestes estudos que, muitas vezes, a extração PLE é acompanhada de métodos que intensificam a extração dos compostos de interesse, como a extração assistida por ultrassom.

2.2.2 Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom é considerada uma técnica alternativa de extração. Pode ser utilizada tanto como pré-tratamento de amostras ou acoplada a outros métodos, convencionais ou não, com a finalidade de aumentar a eficiência e redução do tempo dos processos extrativos (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012b). Pode ser utilizada em pequena e larga escala, pois é de custo relativamente baixo ao qual não requer instrumentos complexos (DAI; MUMPER, 2010). A intensificação da extração é ocasionada pelas ondas de ultrassom que se propagam na matéria, criando meios de compressão e expansão, fazendo com que as moléculas se afastem e se aproximem diversas vezes (BARRALES et al., 2018; LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003; SUMERE et al., 2018). A sonicação ocasionada pelas ondas de ultrassom resulta no fenômeno denominado de cavitação, demonstrado na Figura 2.

Figura 2 – Mecanismo do rompimento da parede celular na extração por ultrassom



Adaptado de SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012a.

Conforme a Figura 2, quando a onda ultrassônica se propaga, ela induz a mudanças de pressão e compressões nas moléculas. Esta compressão ocasiona a criação, a expansão e, por fim, o colapso das microbolhas em meios líquidos (TIWARI, 2015). Estudos têm demonstrado a eficiência do método para extrair compostos bioativos (CARNIEL et al., 2018; CONTE et al., 2016; POODI et al., 2018a).

Além disso, os métodos de extração abordados podem ser combinados a fim de aumentar a eficiência da extração. Os processos que utilizam PLE e ultrassom são considerados técnicas verdes de extração porque comparada as técnicas convencionais causam menores impactos ambientais devido ao menor consumo de energia e pela redução do consumo de solventes orgânicos, os quais podem ser substituídos por água, por exemplo (SUMERE et al., 2018). Ademais, a etapa de extração propriamente dita é de suma importância para otimizar a extração dos compostos bioativos. Os mecanismos que envolvem este processo ainda não estão completamente elucidados, pois fatores estruturais e da composição da matriz podem ser comprometidos durante a extração. Alguns dos fatores geralmente estudados que exercem influência são: cultivar, tamanho da partícula do material, temperatura, razão de água na solução de extração, tempo de extração e razão sólido-líquido (TUNCEL; YILMAZ, 2015)

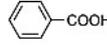
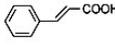
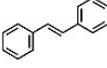
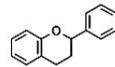
2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas como resultado do sistema de defesa (BORGES et al., 2013) contra a radiação ultravioleta e agressão por patógenos. Ainda são responsáveis pela coloração (DAI; MUMPER, 2010) e pelas características sensoriais (SAGAR et al., 2018). Nos últimos anos, o aumento de estudos que exploram a diversidade de compostos fenólicos extraídos de matrizes vegetais é justificado pelo fato de que moléculas destes componentes podem desempenhar efeitos biológicos benéficos à saúde, como ação antibacteriana e antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica e anticarcinogênica. Desta forma, os compostos fenólicos são considerados agentes terapêuticos potenciais contra doenças, como diabetes, câncer, doenças inflamatórias e no combate ao envelhecimento (BORGES et al., 2013).

Os compostos fenólicos são constituídos por estruturas químicas formadas por anel aromático e grupos hidroxila. Apresentam-se na forma simples ou de polímero (Tabela 2) e, ainda, podem estar na forma livre ou complexada a açúcares e proteínas. Em função do número e posicionamento dos grupos de hidroxila no anel aromático, bem como da modificação da conformação destes grupos, ocorrem alterações nas propriedades exercidas pelos compostos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007; BORGES et al., 2013). Estes compostos subdividem-se em duas classes principais: compostos fenólicos flavonoides ($C_6C_3C_6$) e não-flavonoides (C_6C_1) que por meio de rotas metabólicas complexas originam os demais grupos fenólicos, como os ácidos fenólicos, taninos e flavonoides (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

A goiaba serrana destaca-se por apresentar em sua composição essas classes de compostos fenólicos. A diversidade destes compostos pode variar em função da variedade da fruta e da parte analisada e estão distribuídos na casca, fruta, polpa e folhas, como por exemplo, o ácido gálico, ácido elágico, ácido siríngico, catequina, quercetina, elagitaninos, flavonas, entre outros. (ZHU, 2018).

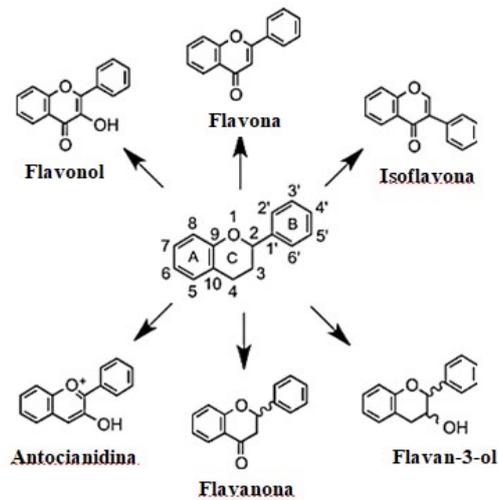
Tabela 2 – Classes de compostos fenólicos e polifenólicos e suas respectivas estruturas básicas

Classe	Número de Carbonos	Estrutura
Fenólicos simples	C ₆	
Ácidos fenólicos	C ₆	
Ácidos hidroxicinâmicos	C ₆ -C ₁	
Acetofenol	C ₆ -C ₂	
Ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂	
Nafitoquinonas	C ₆ -C ₃	
Xantonas	C ₆ -C ₄	
Estilbenos	C ₆ -C ₁ -C ₆	
Flavonoides, isoflavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆	
Cumarinas	C ₆ -C ₃	

Fonte: Adaptado de ANGELO; JORGE, 2007; CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009 e GARCIA-SALAS et al., 2010.

Os flavonoides são compostos de baixa massa molecular formado pelo esqueleto difenilpropano, conforme a Figura 3. Consistem em 15 átomos de carbono – formado por dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, interligados por três carbonos que formam o anel heterocíclico, denominado C. Estes compostos onipresentes nas plantas contêm grupos hidroxílicos fenólicos ligados às estruturas do anel, atribuindo à atividade antioxidante. A família dos compostos flavonoides inclui os flavonoides monoméricos, flavonóis, flavonas, flavononas, catequinas, isoflavonas e antocianidinas, formados pela substituição do anel C. Substituições do anel A e B originam outros compostos dentro de cada classe de flavonoides (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 3 – Estrutura química dos flavonoides e seus derivados.



Fonte: Adaptado de DEL RIO et al, 2013.

Os polifenóis denominados de taninos subdividem-se conforme a estrutura, em taninos hidrolisáveis e taninos condensáveis. O primeiro grupo é formado a partir do chiquimato, onde a esterificação dos grupos hidroxilas do açúcar com os ácidos fenólicos resultam em ésteres de ácidos gálico e elágicos glicosilados. Os representantes do segundo grupo são os taninos condensáveis – as proantocianidinas. Estes compostos são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina). Estes compostos são produtos do metabolismo do fenilpropanol. As proantocianidinas apresentam uma gama de diversidade estrutural, ocasionada por substituições entre unidades flavânicas e da diversidade das posições entre suas ligações (ANGELO; JORGE, 2007).

Os ácidos fenólicos são constituídos por um grupamento carboxílico, grupamentos de hidroxila e/ou metoxilica na molécula e o anel benzênico. Os ácidos fenólicos são constituídos de dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico. No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos incluem-se os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatetúico, vanílico e siríngico, que apresentam estrutura comum. Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com três carbonos, sendo os principais representantes os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico (ANGELO; JORGE, 2007)

A compreensão da composição e função dos compostos fenólicos é importante, uma vez que a determinação destes compostos é influenciada, principalmente, pela natureza do

composto, pelos métodos de extração e tamanho da amostra. Em geral, estes compostos são de grande polaridade, reativos e susceptíveis a ação de enzimas (ANGELO; JORGE, 2007).

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os compostos antioxidantes podem ser classificados como aqueles que estão presente em menor concentração em relação ao substrato anoxidado e que tenha a capacidade de retardar ou inibir a oxidação do substrato. Quanto à fonte podem ser naturais ou sintéticos (TIVERON et al., 2012). Esses compostos atuam inibindo os processos e reações que envolvem as espécies reativas de nitrogênio (RNS) e oxigênio (ROS) (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

O uso dos compostos antioxidantes, principalmente os de fontes naturais, é de grande interesse para diversos setores, como nutricional, médico e biológico. Estes compostos atuam no sistema biológico neutralizando o estresse oxidativo ocasionado pelas espécies reativas e, desta forma, prevenindo ou retardando doenças, como inflamações crônicas, diabetes mellitus, câncer e doenças degenerativas (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

Segundo o estudo de Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L (2005), as reações dos antioxidantes são classificadas em dois tipos: reações de que envolvem a transferência de um átomo de hidrogênio e reações que envolvem a transferência de elétrons. A Tabela 3 ilustra os ensaios que pertencem aos dois grupos.

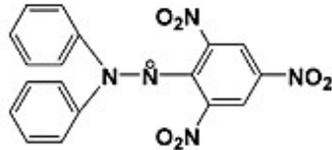
Tabela 3 – Classificação dos ensaios antioxidantes conforme a natureza da reação

Natureza das reações	
Transferência de átomo de hidrogênio (HAT)	Transferência de elétrons (ET)
ORAC - capacidade de absorção de radicais de oxigênio	CFT – Compostos fenólicos totais pelo Reagente de Folin-Ciocalteu
TRAP - parâmetro antioxidante de captura total de radicais	TEAC - capacidade antioxidante de equivalência Trolox
Inibição da autooxidação induzida de lipoproteínas de baixa densidade	FRAP - poder antioxidante de redução de íons férrico
Ensaio de branqueamento de cocina	DPPH - Ensaio potencial antioxidante total

Fonte: Adaptado de Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L, (2005).

Uma das metodologias utilizadas para quantificar a capacidade antioxidante é o ensaio do potencial antioxidante total por DPPH. O radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é reconhecido como um radical livre estável e um dos poucos radicais de nitrogênio (Figura 4). É muito utilizado para quantificar a atividade antioxidante de compostos naturais. Ao interagir com o radical livre DPPH, os antioxidantes transferem um elétron, neutralizando o DPPH. (NAIK et al., 2003).

Figura 4 – O radical DPPH



Fonte: Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L., (2005).

Entre os diversos métodos empregados, o DPPH visa mensurar a capacidade do extrato de eliminar os radicais livres. O Ensaio do ABTS ([2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)] pode medir a cinética da capacidade de eliminar os radicais livres e o radical ABTS é mais reativo do que o DPPH e ainda as reações com radicais ABTS ocorrem em menos de um milissegundo (NAIK et al., 2003).

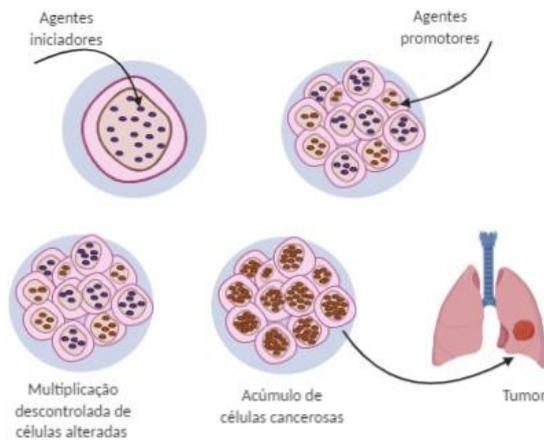
2.5 CÂNCER

O câncer configura-se como uma doença que atua de forma invasiva nos diferentes tipos de células do corpo. Essas células apresentam um crescimento desordenado e incontrolável, originando a formação de tumores, os quais podem migrar para outras regiões do corpo, desenvolvendo um processo denominado de metástase. O desenvolvimento do câncer é resultado da exposição a agentes cancerígenos (alguns componentes da alimentação ou hormônios, por exemplo) por um longo período de tempo (INCA, 2020).

Este processo é denominado de carcinogênese ou oncogênese. A carcinogênese é composta por três estágios, os quais estão exemplificados na Figura 5. A primeira etapa, denominada de iniciação é aonde os agentes cancerígenos atuam modificando alguns genes,

isto é, as células estão preparadas para a ação de um próximo grupo de genes no estágio seguinte, o qual se chama de promoção. Nesta etapa, as células “iniciadas” na primeira etapa serão transformadas em células malignas pela ação dos agentes cancerígenos, os oncopromotores. Para que isso aconteça, é necessário que as células iniciadas sejam expostas aos agentes cancerígenos por períodos longevos de exposição. Uma vez que as células consigam ultrapassar os estágios iniciais, se alcança o estágio da progressão. Aqui, ocorre a multiplicação descontrolada das células alteradas, até o aparecimento do tumor e das manifestações clínicas da doença (INCA, 2020).

Figura 5 – Etapas da formação do câncer: iniciação, promoção e propagação



Fonte: Elaborado pela autora*. Adaptado de Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2020.
*Biorender.

Entre os diversos tipos de cânceres existentes, o câncer de pele, subdivide-se em câncer de pele melanoma e não melanoma. Juntos, estes cânceres representam 30% dos casos no Brasil e são os mais frequentes (INCA, 2020). O câncer de pele do tipo melanoma, de menor incidência, tem se apresentado como a forma mais invasiva de câncer de pele pela elevada capacidade de formar metástases. Em decorrência disso, o melanoma cutâneo é classificado como o tipo de câncer com maior capacidade de ocasionar mortes pela característica extremamente invasiva, ocasionando o aumento do índice de mortalidade e de números de casos nos últimos anos (PELINSON et al., 2019).

A metástase ocasionada pelas células tumorais necessita de um processo denominado de migração celular. Embora os mecanismos envolvidos na modulação da migração celular não estão totalmente esclarecidos, este processo está diretamente relacionado em processos do desenvolvimento embrionário, em respostas imunes, e, principalmente, na invasão e na progressão de metástase de células tumorais (TASHIRO; IMOTO, 2016). Para que as células de câncer possam se espalhar pelo organismo, elas necessitam migrar por meio da matriz extracelular, alastrar-se pela corrente sanguínea, conseguir a fixação a um local distante e, por fim, extravasar para formar focos distantes. Por este motivo, o estudo da migração celular em células de câncer é de suma importância (JUSTUS et al., 2014).

Os compostos bioativos possuem a capacidade de atuar na modulação da migração celular e são importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos, pois podem modular funções biológicas das células vivas, demonstrando ação positiva em células tumorais, além de poderem ser utilizados como agentes coadjuvantes em processos de quimioterapia (TASHIRO; IMOTO, 2016). O uso dos compostos bioativos oriundos de plantas medicinais se torna viável pela alta eficiência, mínimos efeitos colaterais além do baixo custo (MAJUMDER et al., 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentadas as metodologias utilizadas para o desenvolvimento desta pesquisa visando a obtenção do extrato da goiaba-serrana, contemplando as etapas iniciais de preparo da matéria-prima, secagem e análise granulométrica, bem como, todo o planejamento experimental realizado. Em seguida, serão apresentados os métodos analíticos utilizados para a determinação de compostos fenólicos totais (CFT), para a avaliação da atividade antioxidante total (AAT), avaliação da viabilidade celular do extrato em células de melanoma cutâneo e o perfil dos compostos bioativos quantificados por cromatografia líquida. Os experimentos e procedimentos analíticos desta dissertação foram realizados nos Laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) *Campus* Chapecó, com a colaboração do Instituto Federal do Rio Grande do Sul, *Campus* Erechim e Sertão – RS, e Universidade Comunitária da Região de Chapecó (Unochapecó), no município de Chapecó – SC.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Matéria-prima

A matéria-prima foi gentilmente doada pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI, estação experimental de São Joaquim – SC (latitude -28.274578407176943, longitude -49.93111065832172). As frutas, do genótipo Alcântara (Figura 6), foram coletadas na segunda quinzena de abril de 2018. Os frutos foram transportados em caixas sob temperatura ambiente para o laboratório da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus* Chapecó, posteriormente, lavadas em água corrente, higienizadas com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 200 ppm e armazenadas no freezer (-18 °C) até o momento da utilização.

Figura 6 – Genótipo da goiaba-serrana utilizada nesta pesquisa - Alcântara



Fonte: elaborado pela autora.

3.1.2 Reagentes

- DPPH -2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Alfa Aesar, 95%);
- Trolox ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,6,7,9-tetrametilcromano-2-carboxílico (Sigma-Aldrich, 97%);
- Álcool etílico P.A (Neon, 99%);
- Reagente Folin-Ciocalteu (Êxodo Científica, 99%);
- Carbonato de sódio (Dinâmica; 99%)
- Ácido gálico (Êxodo Científica, 99%);
- Metanol (Tedia[®], grau HPLC);

3.1.3 Equipamentos

- Peneirador eletromagnético (Contenco);
- Balança (Shimadzu, AUX 320);
- Centrífuga (Sigma, 3-15KL);
- Cromatógrafo (Shimadzu HPLC-MS 2020);
- Espectrofotômetro (Shanghai Metash Instruments, UV-5300PC U);
- Estufa de secagem e esterilização com circulação e renovação de ar (American Lab, AL-102/480);
- Liofilizador de bancada (Solab, SL-404);
- Moinho de facas tipo willye (Fortinox, Star FT-50);

- Ultrassom (Ultronique, Q5.9/404)
- Microscópio Invertido de fluorescência (Nikon, Eclipse Ts2; câmera Nikon DS-Fi3 127 m);
- Estufa Incubadora (Thermo Scientific, 4131);
- Centrífuga de placas (Thermo Scientific);
- Leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan FC).

3.1.4 Padrões cromatográficos

- Ácido cafeico (Sigma-Aldrich, 99%);
- Mangiferina (Sigma-Aldrich, 99%);
- Kaempferol (Sigma-Aldrich, 99%);
- Ácido ferúlico (Sigma-Aldrich, 99%);
- Ácido p-cumárico (Sigma-Aldrich, 99%);
- Flavona (Sigma-Aldrich, >99%);
- Pirocatecol (Sigma-Aldrich, 99%);
- Ácido síringico (Sigma-Aldrich, 99%).

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Secagem dos frutos

Nesta etapa, os frutos inteiros foram descongelados e cortados em fatias longitudinais de aproximadamente 1 cm de espessura, mantendo a casca e a semente. As fatias, dispostas em bandejas plásticas, foram levadas à estufa de secagem com circulação e renovação forçada de ar à 40 °C/120 horas, até atingir massa (g) constante. Em paralelo, realizou-se a determinação da umidade conforme a metodologia 012/IV do Adolfo Lutz (2008). As análises foram realizadas em triplicata, e o resultado foi expresso como percentual de umidade (%) conforme a Equação 1.

$$Umidade (\%) = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100$$

(Equação 1)

Onde:

M_i = massa inicial da placa (g);

M_f = massa final da amostra mais a placa (g);

M_i = massa inicial da amostra (g).

3.2.2 Determinação da granulometria das partículas

Após a secagem, os frutos foram triturados em moinho de facas tipo Willye para a redução do tamanho das partículas e padronização da amostra, tendo em vista que o tamanho da partícula pode influenciar a composição do extrato. Depois de triturado, o pó resultante foi peneirado utilizando peneiras de série Tyler (Figura 7) de diferentes tamanhos de *mesh* (10, 16, 30, 40, 60, 100 e fundo). Cada uma das peneiras foi pesada separadamente e depois foram empilhadas, de modo decrescente de tamanho de *mesh*.

À primeira peneira foi adicionado 100,05 g da fruta seca triturada. Em seguida, as peneiras foram agitadas por 15 minutos a uma frequência de 70%. Decorrido este tempo, as peneiras foram pesadas novamente para definir a porcentagem de pó retido em cada peneira (Equação 2). A partir disso, foram selecionadas as partículas que ficaram retidas nas peneiras

entre 16 a 40 *mesh*. O pó da goiaba foi armazenado em pote de vidro envolto em papel alumínio, e acondicionado no freezer (-18 °C) até o momento da utilização.

$$retido (\%) = \frac{M_r}{M_i} \times 100$$

(Equação 2)

Onde:

M_r = massa retida na peneira em gramas;

M_i = massa inicial da amostra em gramas.

Figura 7 – Peneirador eletromagnético



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.3 Planejamento experimental para obtenção do extrato

O estudo da obtenção do extrato da goiaba-serrana foi realizado com o auxílio da técnica de planejamento de experimentos. A finalidade do emprego desta técnica foi compreender a influência das variáveis estudadas e encontrar a melhor condição de extração do processo, quantificando os compostos fenólicos totais, mas, principalmente, visando um extrato com alta atividade antioxidante. Para isso, realizou-se primeiramente um planejamento

Plackett-Burman e, posteriormente, um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) completo. A seguir, serão elucidadas as etapas do planejamento experimental, bem como o método de extração que foi utilizado.

3.2.3.1 Planejamento experimental

Nesta etapa iniciou-se o estudo do comportamento das variáveis sobre a composição do extrato. Inicialmente, optou-se pela realização de um delineamento experimental *Plackett-Burmann* (PB) a fim de compreender o efeito das variáveis e sua significância, totalizando 8 ensaios, composto de quatro variáveis, dois níveis e três repetições genuínas. A Tabela 4 apresenta as variáveis e níveis avaliados no primeiro planejamento experimental.

Tabela 4 – Variáveis e níveis do primeiro planejamento experimental - PB

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
Temperatura (°C)	20	50
Razão sólido/líquido (mg/mL)	40	80
Concentração de etanol (%)	30	70
Potência de ultrassom (%)	0	100

Fonte: elaborado pela autora.

A partir dos resultados obtidos no primeiro planejamento experimental, realizou-se um DCCR utilizando os pontos axiais, a fim de se avaliar o efeito quadrático das variáveis investigadas. Este delineamento foi um fatorial completo 2^4 , composto por quatro variáveis, dois níveis, pontos axiais e pontos centrais. Salienta-se que todos os ensaios foram realizados em duplicata e em ordem randômica, tanto para quantificação dos compostos fenólicos totais, como para a atividade antioxidante total do extrato. A Tabela 5 apresenta as variáveis e níveis do DCCR.

Tabela 5 – Variáveis e níveis do planejamento DCCR

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
Temperatura (°C)	20	35	50	65	80
Razão sólido/líquido (mg/mL)	10	25	40	55	70
Concentração de etanol (%)	00	20	40	60	80
Potência de ultrassom (%)	20	40	60	80	100

Fonte: elaborado pela autora.

Após a realização deste planejamento foi analisado o comportamento das variáveis e, a partir disso, foi selecionada uma condição de extração visando à obtenção de um extrato com alta atividade antioxidante.

3.2.3.2 Métodos de extração

3.2.3.2.1 Banho de ultrassom

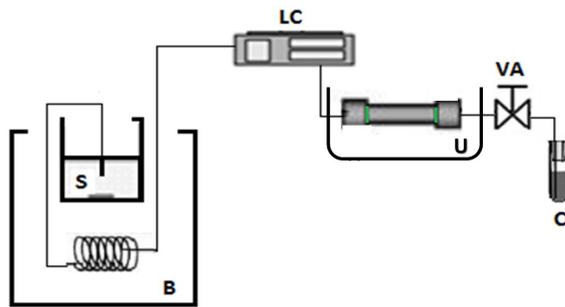
Todas as condições advindas do planejamento experimental foram realizadas em banho de ultrassom pelo tempo fixo de duas horas. O pó da goiaba foi aferido em tubo de ensaio com rosca (conforme as condições do delineamento experimental) e em seguida, adicionado 10 mL da solução de extração com as concentrações de etanol também definidas pelo planejamento experimental. Após este procedimento os tubos de ensaio devidamente fechados foram colocados no banho de ultrassom. A cada ensaio, a potência de ultrassom e a temperatura foram ajustadas conforme o experimento. Decorrido o tempo de extração, transferiu-se as amostras para tubos de *Falcon* e centrifugou-se por 5 minutos, na temperatura de 5 °C a 4800 rpm. Finalmente, desprezou-se o resíduo, e o extrato (sobrenadante) foi armazenado (tubos de *Falcon* envoltos em papel alumínio) em freezer (-18 °C) até o momento da realização das análises.

3.2.3.2.2 Extração por líquidos pressurizados

Depois de determinada a melhor condição de extração por ultrassom, realizou-se uma única extração utilizando líquido pressurizado, baseada na condição escolhida após a

execução do planejamento. Para a extração com esta metodologia foi utilizado um sistema extrativo em modo contínuo, demonstrado na Figura 8. O sistema é constituído basicamente de um reator em aço inox encamisado para a circulação de água; bomba de HPLC utilizada para deslocar solvente extrator; banho de ultrassom; válvula métrica tipo agulha e frasco coletor de amostras. Brevemente, a montagem do reator consistiu da adição de aproximadamente 10 g do pó de goiaba e interligação das conexões de água e solvente junto ao reator. Após, iniciou-se o fluxo do solvente (água:etanol, 60:40 v/v) até a visualização do completo preenchimento do reator. Após e a verificação de possíveis vazamentos (dado pela pressurização do reator), a temperatura do banho foi ajustada e aguardado o alcance do equilíbrio térmico. Decorrido este tempo, deu-se início a sonicação do sistema através do banho de ultrassom (potência máxima), o ajuste da pressão à 100bar (98,7 atm) e ao fluxo de 1 mL/min durante 1 hora. Finalmente, o sistema foi despressurizado e amostra coletada em tubos de *Falcon*, seguindo o mesmo procedimento referenciado anteriormente.

Figura 8 – Representação esquemática do extrator PLE



Fonte: CONTE et al, 2016.

Componentes do sistema: S: reservatório do solvente; B: banho termostático; LC: bomba de líquido; U: banho de ultrassom; E: célula de extração com camisa de aquecimento; VA: válvula de agulha; C: vaso de coleta.

3.2.4 Métodos analíticos

Ao término de cada planejamento experimental realizou-se a determinação dos compostos fenólicos totais e a avaliação da atividade antioxidante total. A seguir, serão descritas as metodologias que foram utilizadas para estas análises.

3.2.4.1 Determinação dos compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais dos extratos da goiaba serrana foram determinados pelo método espectrofotométrico pelo reagente de *Folin-Ciocalteu*, conforme a metodologia descrita por Carniel et al (2016). Inicialmente, as amostras foram diluídas em metanol (proporção 1:40 v/v). Para o extrato obtido por PLE, a diluição foi de 1:100 (v/v). A partir da diluição foi coletada uma alíquota de 0,5 mL das amostras para tubos de ensaio, em triplicata. Aos tubos, foi adicionada alíquotas de 2,5 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu* (10%, v/v) e 2 mL de carbonato de sódio (7,5% v/v). Os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria a 50 °C por 5 minutos, e depois colocados em banho de gelo, pelo mesmo tempo. Posteriormente, foi determinada a leitura da absorbância das amostras no espectrofotômetro, no comprimento de onda 760 nm. Os resultados foram expressos como miligrama de ácido gálico equivalente por g de biomassa seca (mg AGE/g fruta seca) a partir da curva padrão de diferentes concentrações (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 µg/mL) da solução estoque de ácido gálico (1000 µg/mL).

3.2.4.2 Avaliação da atividade antioxidante total por DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pela metodologia de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), adotando o procedimento de Brand-Williams e Berset (1995), e Roesler et al. (2007), com modificações. O DPPH foi diluído em metanol a fim de obter uma solução 4%. Em seguida, as amostras foram diluídas em metanol (1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:80, 1:100). Para o extrato obtido pela extração por PLE, a diluição foi de 1:150. O branco foi preparado adicionando 600 µL de metanol e 3 mL da solução de DPPH 4 %. Após, transferiu-se 600 µL das diluições para tubos de ensaios e 3 mL da solução de DPPH 4 %. As amostras permaneceram por 30 minutos no escuro e decorrido o tempo, realizou-se as leituras em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 517 nm. O equipamento foi zerado com metanol. Os resultados foram expressos como micro mol Trolox Equivalente por grama de amostra seca (µmol TE/g seca) e as amostras foram comparadas a curva padrão de Trolox 1500 µM de diferentes concentrações (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 e 225 µL).

3.2.5 Liofilização do extrato

Após a definição da melhor condição de extração, obtida pelo planejamento experimental, e com base nos resultados encontrados para CFT E ATT realizaram-se extrações sucessivas a fim de obter um volume suficiente para, posteriormente, liofilizar o extrato. O procedimento foi idêntico ao descrito na seção 3.2.4.1, alterando as condições de extração conforme a Tabela 6, exemplificada abaixo. Ao término das extrações, obteve-se um volume aproximado de 2,8 L de extrato. Este volume foi liofilizado e armazenado em ultra temperatura até o momento da realização da análise de migração celular.

Tabela 6 – Condições utilizadas na extração para a liofilização do extrato

Variáveis	Condição
Temperatura (°C)	65
Razão sólido/líquido (mg/mL)	25
Concentração de etanol (%)	40
Potência de ultrassom (%)	100

Fonte: elaborado pela autora.

3.2.6 Avaliação da atividade anticancerígena dos extratos

3.2.6.1 Cultivo celular

O cultivo celular foi realizado de forma semelhante ao descrito por Pelinson et al. (2019). As células de melanoma cutâneo da linhagem SK-Mel-28, passagem 41, foram cultivadas em frascos com meio de cultura DMEM (Dulbecco Modificado) suplementado com soro fetal bovino 10%, enriquecido com glicose e L-glutamina, além de antibiótico e antifúngico. Após, as células foram mantidas em estufa incubadora umidificada, com controle de CO₂ a 5% e temperatura de 37 °C. O processo de renovação do meio de cultura foi realizado a cada dois dias até atingir o crescimento desejado das células nos frascos.

A solução mãe do extrato de goiaba-serrana foi preparada com 0,4 g do extrato liofilizado com 4 mL do meio DMEM (tratamento). A partir da solução mãe foram feitas as demais concentrações (100, 500, 1000, 5000, 10000 ug/mL).

3.2.6.2 Avaliação da migração celular

O ensaio da migração celular foi realizado conforme a metodologia descrita por Justus et al (2014), com modificações. Após o crescimento das células, foram adicionadas tripsina e penicilina às células para inibir o crescimento de bactérias e fungos. Em seguida, as células foram ressuspensas com meio DMEN. Em cada poço da placa de seis poços foi inoculado uma concentração aproximada de 1×10^6 células até atingir 100% de confluência. Aos poços, foi adicionado 1000 uL de meio DMEN e 500 μ L de células SK-MEL-28. Com auxílio de uma ponteira, foi feita uma ferida no fundo da placa, no centro. Os poços foram lavados com solução salina. Em seguida, foram realizadas as fotografias do tempo zero (horas). Após as fotos iniciais no tempo zero, foi colocado em cada poço 500 uL dos tratamento nas diferentes concentrações do extrato (100, 500, 1000, 5000 e 10000 ug/mL) da goiaba-serrana. As fotografias foram feitas com 24 e 72 horas de exposição, em microscópio eclipse TS2, e processadas pelo programa NIS2 (nis-elements)D.

3.2.6 Perfil dos compostos bioativos por HPLC-MS

Os compostos bioativos foram determinados utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu acoplado ao detector de massa (HPLC-MS) com fonte de ionização por eletrospray (ESI (-)) seguindo a metodologia descrita por Arruda et al (2018), com adaptações. A coluna utilizada foi Shim-pack VP-ODS fase reversa (150mm x 2,0 mm (i.d) x 4,6 μ m). Utilizou-se como fase móvel A o ácido fórmico 0,3% e fase móvel B o metanol 50%. Utilizou-se modo gradiente conforme a Tabela 7, a um fluxo de 0,4 mL/min e a temperatura do forno a 40 °C. A curva padrão foi realizada diluindo os padrões, individualmente, em metanol na concentração de 1000 ppm. A partir destas soluções foi preparada a mistura dos padrões nas concentrações de 1,5; 3,12; 6,25; e 12,5 ppm. Foram avaliados dez padrões, sendo eles: ácido cafeico, ácido ferrúlico, ácido p-cumárico, ácido siríngico, flavona, kaempferol, mangiferina, pirocatecol, quercetina e rutina. A identificação dos compostos foi avaliada conforme o tempo de retenção dos padrões injetados. A concentração dos compostos foi expressa como ppm/g de fruta seca.

Tabela 7 – Modo gradiente de concentração de B em função do tempo empregado na determinação dos compostos bioativos

Tempo*	Concentração de B em ppm
0,01	5%
1,00	5%
4,00	60%
7,00	70%
10,00	100%
11,5	100%
12,5	5%
15,0	5%
15,0	Stop

Fonte: elaborado pela autora.

*: tempo em minutos; ppm: parte por milhão.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Protimiza®, executando análise de variância e o teste de comparação das médias pelo teste de Tukey com $\alpha = 5\%$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão expostos e discutidos os resultados encontrados na execução deste trabalho. Primeiramente, serão apresentados os resultados das etapas iniciais de preparação da matéria-prima. Posteriormente, serão apresentados os resultados do planejamento experimental, os métodos analíticos e o perfil dos compostos bioativos do extrato por HPLC. Por fim, será demonstrada a aplicação do extrato obtido para a avaliação da migração celular.

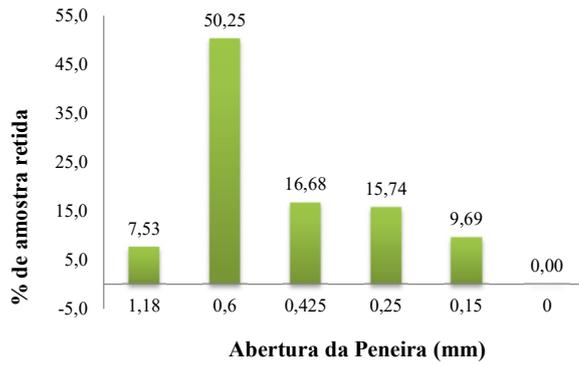
4.1 SECAGEM DOS FRUTOS

A primeira etapa de preparação da amostra foi a secagem dos frutos, importante para garantir que a amostra permaneça estável durante o armazenamento, evitando o crescimento de microrganismos, bem como para prevenir uma possível perda dos compostos bioativos. Por este motivo, a secagem foi realizada a temperatura de 40 °C, de acordo com o procedimento descrito por Tuncel e Ylmaz (2015), a fim de evitar a exposição prolongada da matéria-prima a temperaturas mais elevadas, o que poderia ocasionar a perda de compostos bioativos. Ao término do processo de secagem, verificou-se que os frutos apresentaram um teor de umidade de 80,72%. Na revisão de Zhu (2018), o teor de umidade descrito foi de 83,28%, valor muito semelhante ao determinado neste trabalho. Esta variação pode estar relacionada ao genótipo da fruta, que determina sutis diferenças na composição.

Outra etapa avaliada, após o processo de secagem, foi a definição do tamanho das partículas que se desejaria trabalhar no processo de extração. Como foi escolhido trabalhar com a fruta inteira, visando um processo de maior rendimento, a nível industrial, esta etapa foi importante, pois o tamanho da partícula pode ocasionar alterações na composição do extrato, interferindo na transferência de massa durante a extração (COSTA; BUCEK, 2017). Para minimizar este efeito, optou-se por definir uma faixa de *mesh*.

Após o processo de moagem no moinho de facas, o pó resultante não apresentava homogeneidade no tamanho das partículas. Observou-se que havia partículas maiores, que ficaram retidas na malha de 16 *mesh*. Em menor quantidade, partículas menores, que ficaram retidas na malha de 60 *mesh*. A Figura 9 apresenta a distribuição das partículas em função do tamanho do diâmetro da malha. A determinação e padronização dos tamanhos de partículas pelo método de peneiramento, por meio das peneiras série *Tylor* é reportada na literatura (COSTA; BUCEK, 2017).

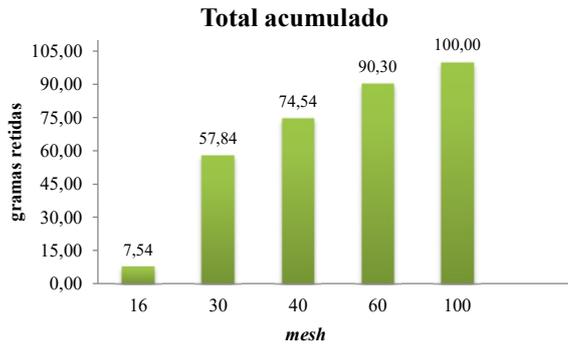
Figura 9 – Porcentagem de partículas retidas em função da abertura da peneira pela série Tylor.



Fonte: elaborado pela autora. 0: fundo das peneiras.

Analisando os dados da Figura 9, observa-se que aproximadamente 50% das partículas ficaram retidas na malha de 0,6 mm, correspondendo ao *mesh* de 30, ou seja, as partículas maiores ficaram retidas nesta malha. A Figura 10 apresenta o total acumulado em função da abertura da peneira. Neste gráfico se confirma a falta de homogeneidade no tamanho das partículas. Ainda que 50% das partículas tenham ficado retidos na malha de 30 *mesh*, a faixa de *mesh* entre 40 a 100 (tamanho menor de partícula) representa 42%, valor ao qual não poderia ser desconsiderado.

Figura 10 – Total acumulado de gramas de partículas retidas em função do tamanho de *mesh*



Fonte: elaborado pela autora.

Baseado nisso, e a fim de evitar a interferência das partículas menores e maiores na extração, ocasionando resultados duvidosos, uma vez que as partículas menores tendem a agitar mais, foi escolhida a faixa intermediária de *mesh*, entre 30 a 60 *mesh*. No estudo de Maksimovica, Ivanovica e Skalaa (2012) ao avaliar a extração supercrítica do óleo essencial de menta, os autores identificaram que o tamanho das partículas exerceu forte influência sobre a cinética de transferência de massa. Altas taxas de transferências foram atingidas utilizando partículas menores. Em menor tamanho, as partículas liberam maior quantidade de soluto.

Embora conste na literatura o benefício de partículas menores para os processos extrativos, a faixa intermediária foi escolhida pelo rendimento proporcionado em número de experimentos, e para garantir a presença de todas as partes da fruta no processo extrativo. Além disso, em testes preliminares, onde se determinou compostos fenólicos totais do extrato, utilizando diferentes granulometrias, obtiveram-se melhores resultados de análise as amostras que continham à mistura na faixa de 30 a 60 *mesh*.

4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, E AS RELAÇÕES COM A EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A execução de um trabalho por meio da técnica de planejamento de experimentos consiste em aprimorar, desenvolver e otimizar os processos, tendo por base a utilização da matemática e estatística. Sua aplicação é de grande avalia na área industrial, onde, geralmente, há a necessidade de aprimorar projetos e produtos que sofrem interferência de distintas variáveis que, no final, irão influenciar na qualidade ou no desempenho de determinado produto ou processo (COMPARINI, et al., 2012). O primeiro planejamento de experimentos executado foi um *Plackett-Burman* (PB) de 8 ensaios. O *screening* proporcionado por este planejamento permitiu compreender a influência e o efeito das principais variáveis e quais delas seriam significativas sobre a quantidade de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total do extrato, os quais são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Matriz do planejamento experimental PB e os resultados obtidos para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total

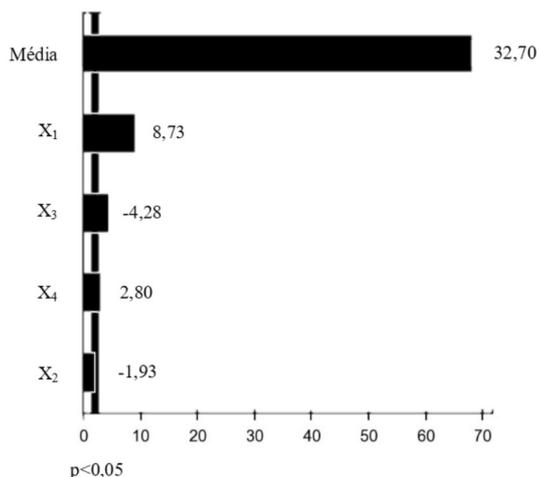
Ensaio	Temperatura (°C)	Razão sólido/líquido (mg/mL)	[] de etanol (%)	Potência de Ultrassom (%)	CFT (mg AGE/g fruta seca)*	AAT (µmol TE/g fruta seca)*
1	50 (1)	40 (-1)	30 (-1)	100 (1)	43,3±3,1	139,3±15,4
2	50 (1)	80 (1)	30 (-1)	0 (-1)	37,1±2,6	130,9±2,3
3	50 (1)	80 (1)	70 (1)	0 (-1)	32,4±3,1	123,1±7,1
4	50 (-1)	80 (1)	70 (1)	100 (1)	27,8±1,3	127,2±9,0
5	50 (1)	80 (-1)	70 (1)	100 (1)	35,5±1,6	163,8±23,1
6	20 (-1)	80 (1)	30 (-1)	100 (1)	29,7±1,5	115,4±11,0
7	20 (-1)	80 (-1)	70 (1)	0 (-1)	26,6±1,7	109,7±5,5
8	20 (-1)	80 (-1)	30 (-1)	0 (-1)	29,3±1,0	134,6±31,1

Fonte: elaborado pela autora.

*valores da média das triplicatas ± desvio padrão; mg AGE/g fruta seca: miligramas de ácido gálico equivalente por grama de fruta seca; µmolTE/g amostra: micro mol de Trolox equivalente por grama de amostra seca. [] de etanol (%): concentração de etanol.

Analisando os resultados da Tabela 8 para compostos fenólicos totais, observa-se que os resultados variaram de 29,26 a 43,36 mg de ácido gálico equivalente/g de fruta seca (AGE/g fruta seca). Pelo gráfico de Pareto (Figura 11) foi possível observar que, para compostos fenólicos totais CFT, a temperatura e a potência de ultrassom foram significativas ($p < 0,05$) a 95% de confiança, com efeito positivo, ou seja, aumentando os valores destas variáveis, é possível aumentar a extração de compostos fenólicos totais.

Figura 11 – Pareto com os efeitos para compostos fenólicos totais do planejamento PB



Fonte: elaborado pela autora.

X₁: Temperatura (°C); X₂ Razão sólido/líquido (mg/mL); X₃: Concentração de etanol (%); X₄: Potência de ultrassom (%).

Em decorrência disso, observa-se na Figura 11 que o ensaio 1 foi o melhor ensaio para a extração de compostos fenólicos totais, enquanto o ensaio 8 foi o menos efetivo para a extração destes compostos, constatando que existe diferença dos resultados em função das variáveis.

A concentração de etanol também apresentou influência significativa, contudo, com efeito negativo, indicando uma tendência a aumentar a extração dos compostos fenólicos reduzindo a concentração de etanol da solução de extração. A variável razão sólido/líquido não apresentou influência significativa, mas exerceu efeito negativo, indicando que a extração é favorecida reduzindo a concentração de matéria vegetal em relação a solução de extração.

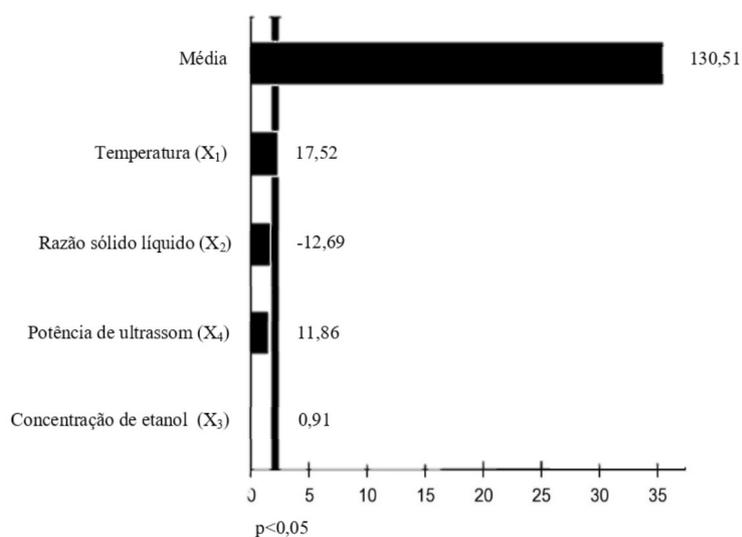
Ainda, avaliando os resultados encontrados no planejamento PB, observa-se na Tabela 8 que para a atividade antioxidante os resultados apresentaram uma variação de 109,73 a 163,77 $\mu\text{mol TE/g}$. A condição 7 foi a menos efetiva para a atividade antioxidante total do extrato. Observa-se que nesta condição, a potência de ultrassom foi igual a zero, ou seja, não houve agitação no sistema. O ensaio número 5 foi o mais efetivo para aumentar a atividade antioxidante total do extrato.

Comparando esta condição à melhor condição de extração dos compostos fenólicos totais (ensaio 1), observa-se que a única variável diferente foi a concentração de etanol, ao

qual os valores da concentração de etanol no solvente de extração foram antagônicos, indicando que a composição da solução de extração pode favorecer a extração de determinados compostos. Os estudos de Peng, Bishop, e Quek (2019) citam que a polaridade do solvente pode favorecer a extração para a obtenção de determinados compostos de interesse. Ao aumentar a concentração de etanol na solução aquosa de extração, a polaridade do sistema diminui. Além disso, este estudo sugere que há diferentes polaridades dos compostos fenólicos contidos na fruta. Os CFT contidos na polpa apresentam uma polaridade maior em relação àqueles encontrados na casca da fruta.

Ainda sobre a atividade antioxidante, das quatro variáveis estudadas apenas a temperatura apresentou influência significativa. A Figura 12 apresenta o Pareto dos efeitos das variáveis para atividade antioxidante.

Figura 12 – Pareto com os efeitos para atividade antioxidante total do planejamento PB



Fonte: elaborado pela autora.

X₁: Temperatura (°C); X₂: Razão sólido/líquido (mg/mL); X₃: Concentração de etanol (%); X₄: Potência de ultrassom (%).

Observa-se na Figura 12 que, para AAT, apenas a variável temperatura apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) a 95% de confiança, com efeito positivo, ou seja, aumentando a temperatura, há uma tendência de aumentar a atividade antioxidante total do extrato. As

variáveis, potência de ultrassom e concentração de etanol demonstraram efeito positivo. Isto pode ser explicado em função da potência do ultrassom ocasionar uma maior agitação das partículas. Maksimovica, Ivanovica e Skalaa (2012) observaram que quanto menor o diâmetro médio da partícula combinado com uma maior agitação do sistema, foi possível aumentar o rendimento da extração. Embora a razão sólido/líquido não tenha apresentado significância, esta variável apresentou efeito negativo, sugerindo que uma menor quantidade de material sólido beneficia a extração. Isso está relacionado com a concentração do extrato no solvente, pois este tende a chegar na saturação e não ocorrer mais a extração.

Ao término deste planejamento, concluiu-se que o ensaio que demonstrou maior presença de compostos fenólicos totais, em termos de quantidade, não foi o mesmo para a atividade antioxidante total, e que houve diferença nas variáveis significativas em cada análise. Enquanto para AAT a temperatura foi a variável significativa, para compostos fenólicos três variáveis foram significativas: a temperatura, a concentração de etanol e a potência de ultrassom.

Baseado nestes resultados, e tendo em vista que o planejamento executado foi um PB, ou seja, não prevê a execução de todas as combinações experimentais, não foi possível obter uma análise quanto aos efeitos de interação entre as variáveis. Esta triagem inicial permitiu entender o comportamento das variáveis e o sentido dos seus efeitos. Sendo assim, a partir destes resultados, realizou-se o delineamento composto central rotacional (DCCR) visando aumentar a extração de compostos fenólicos e, principalmente, a atividade antioxidante do extrato. Para isso, os níveis das variáveis foram ajustados conforme o efeito demonstrado por elas no planejamento anterior. A Tabela 9 apresenta os resultados da execução do planejamento DCCR.

Tabela 9 – Matriz DCCR e os resultados obtidos para a determinação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total para duas horas de extração

Ensaio	Temperatura (°C)	[] de etanol (%)	Razão sólido/líquido (mg/mL)	Ultrasom (%)	CFT (mg AGE/g fruta seca)	AAT (µmol TE/g fruta seca)
1	35 (-1)	20(-1)	25 (-1)	40(-1)	20,8±0,3	121,5±1,0
2	65 (1)	20(-1)	25(-1)	40(-1)	22,1±1,2	139,5±4,1
3	35(-1)	60(1)	25 (-1)	40(-1)	26,1±0,9	130,4±4,3
4	65 (1)	60(1)	25 (-1)	40(-1)	29,2±0,3	140,2±2,7
5	35 (-1)	20(-1)	55 (1)	40(-1)	21,8±1,3	188,9±7,1
6	65 (1)	20(-1)	55 (1)	40(-1)	28,1±0,5	97,5±1,5
7	35(-1)	60(1)	55(1)	40(-1)	23,2±0,2	183,0±8,0
8	65(1)	60(1)	55 (1)	40(-1)	28,2±1,3	205,0±6,5
9	35(-1)	20(-1)	25(-1)	80 (1)	26,4±2,0	288,2±4,1
10	65(1)	20(-1)	25(-1)	80 (1)	32,7±0,2	253,9±37,2
11	35 (-1)	60 (1)	25 (-1)	80(1)	25,2±0,1	290,2±4,5
12	65(1)	60 (1)	25(-1)	80(1)	28,6±1,3	290,2±15,1
13	35(-1)	20(-1)	55(1)	80(1)	24,6±0,3	217,0±15,4
14	65(1)	20(-1)	55(1)	80(1)	26,2±2,2	185,6±15,4
15	35(-1)	60(1)	55(1)	80(1)	22,6±1,8	119,3±0,7
16	65(1)	60(1)	55(1)	80(1)	28,1±0,4	258,0±4,9
17	20(-2)	40(0)	40(0)	60(0)	22,6±0,5	163,9±0,9
18	80(2)	40(0)	40(0)	60(0)	30,4±0,2	241,3±0,1
19	50(0)	0(-2)	40(0)	60(0)	11,2±0,1	162,7±0,8
20	50(0)	80(2)	40(0)	60(0)	30,0±5,8	149,9±22,0
21	50(0)	40(0)	10(-2)	60(0)	34,0±6,3	222,1±1,1
22	50(0)	40(0)	70(2)	60(0)	34,9±1,7	185,7±1,2
23	50(0)	40(0)	40(0)	20(-2)	22,1±0,4	224,8±0,8
24	50(0)	40(0)	40(0)	100(2)	33,5±3,8	253,9±14,4
		50(0)	40(0)	60(0)	28,12±0,7	185,5149±24,0
25	50(0)	40(0)	40(0)	60(0)	28,05±0,7	187,314±24,0
	50(0)	40(0)	40(0)	60(0)	29,34±0,7	227,9748±24,0

Fonte: elaborado pela autora

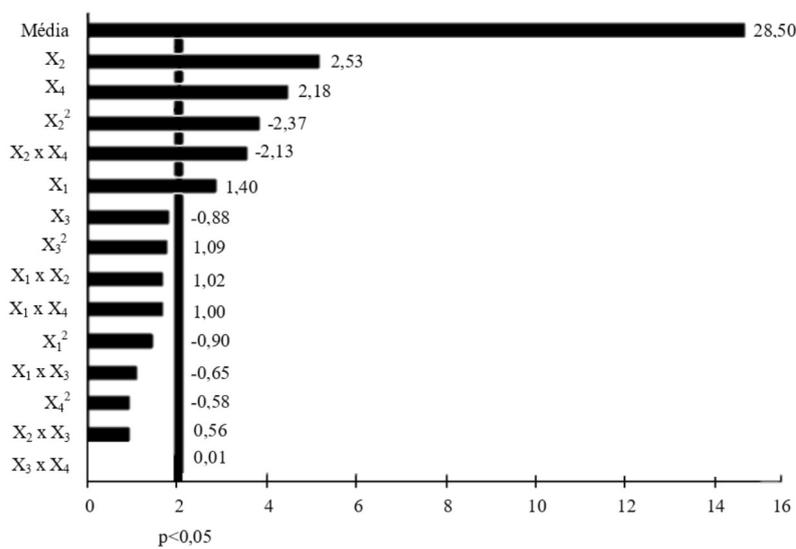
*valores da média das duplicatas ± desvio padrão; [] de etanol (%): concentração de etanol (%); mg AGE/g fruta seca: miligramas de ácido gálico equivalente por grama de fruta seca; µmolTE/g amostra: micro mol de trolox equivalente por grama de amostra seca.

Avaliando os resultados da Tabela 9, para compostos fenólicos totais, verificou-se que os resultados variaram de 11,2 a 34,9 mg AGE/g fruta seca. Observa-se que o ensaio 22, o qual apresentou melhor resultado, foi inferior ao encontrado no planejamento PB. As condições de extração do ensaio 19 foram menos efetivas para a extração de compostos

fenólicos totais. Há de se ressaltar com relação a este último ensaio que a solução de extração não continha etanol, ou seja, a extração foi realizada somente com água. Embora os ensaios tenham demonstrado uma tendência a aumentar a extração com uma menor porcentagem de álcool etílico no solvente, a ausência de álcool etílico não foi benéfica para a extração. Sun-waterhouse et al (2013) mostraram que a condição de extração com 50% de etanol na temperatura de 20 a 50°C apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos no extrato da casca da goiaba-serrana.

Analisando a Figura 13, observa-se que das quatro variáveis principais, três demonstraram a 95% de confiança, significância para a extração de compostos fenólicos totais, sendo as mesmas variáveis que foram significativas no planejamento PB. Uma variável quadrática foi significativa (concentração de etanol) e uma interação.

Figura 13 – Pareto dos efeitos padronizados e as interações para compostos fenólicos totais pelo DCCR



Fonte: Elaborado pela autora.

Variáveis: X₁: Temperatura (°C); X₂: concentração de etanol (%); X₃: razão sólido/líquido (mg/mL); X₄: potência de ultrassom (%).

A concentração de etanol foi a variável mais significativa, com efeito positivo, embora muito pequeno. Solventes alcóolicos com frequência são utilizados para extrações, principalmente o etanol pela baixa toxicidade. Ao comparar a eficiência da extração de CFT e AAT da goiaba-serrana Tuncel e Yilmaz (2015) não observaram diferença significativa entre as extrações entre metanol e o etanol. Contudo, os extratos obtidos com uma mistura de metanol:acetona (50:50, v/v) apresentaram os menores teores de CFT e as menores AAT quando comparados a extração realizada com metanol:acetona:água (40:40:20, v/v), ou seja, parece que a ausência de água influenciou negativamente a extração de CFT e a AAT. Dessa forma, pela sua polaridade e propriedades químicas únicas a água deve ser usada nas misturas de extração, em proporções adequadas (TUNCEL; YILMAZ, 2015).

A segunda variável significativa foi a potência de ultrassom, também com efeito positivo. Contudo, a interação destas variáveis (X_2 com X_4), a qual foi significativa, resultou em efeito negativo, ou seja, aumentar o valor destas variáveis resulta na queda da resposta.

A variável principal temperatura também apresentou efeito significativo positivo. É possível observar a significância do efeito quadrático da variável concentração de etanol, no sentido negativo. Pela Figura 13, verifica-se que as demais interações e variáveis não demonstraram efeito significativo na extração dos compostos fenólicos.

A partir destes resultados, a 95% de confiança, o modelo matemático codificado de segunda ordem para a extração de compostos fenólicos foi validado (Equação 3) pela análise de variância, onde o F_{calc} (8,3) foi quatro vezes maior que o F_{tab} , possibilitando a obtenção de uma superfície de resposta.

$$\begin{aligned}
 Y_1 = & 28,50 + 1,40 x_1 - 0,90 x_1^2 + 2,53 x_2 - 2,37 x_2^2 - 0,88 x_3 + 1,09 x_3^2 \\
 & + 2,18 x_4 - 0,58 x_4^2 + 1,02 x_1 x_2 - 0,65 x_1 x_3 + 1 x_1 x_4 + 0,56 x_2 x_3 \\
 & - 2,13 x_2 x_4 + 0,01 x_3 x_4
 \end{aligned}$$

(Equação 3)

Onde:

X_1 = temperatura (°C);

X_2 = concentração de etanol (%)

X_3 = Razão sólido/líquido (g/mL)

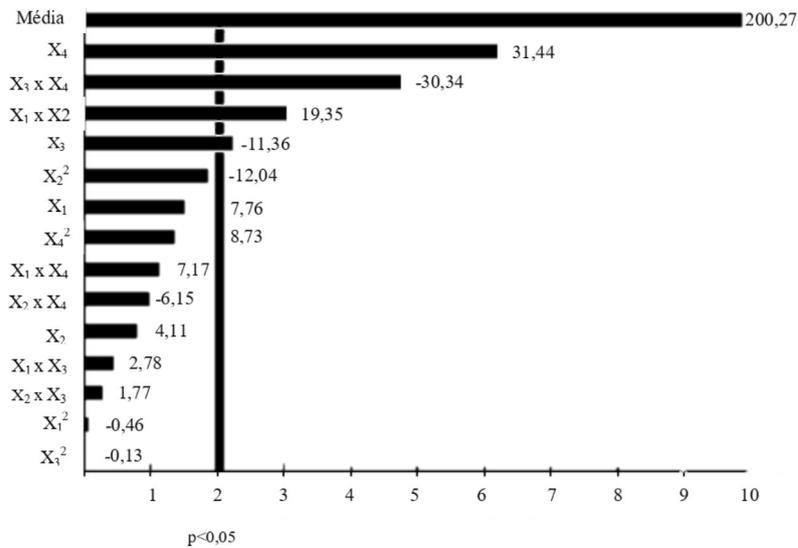
X_4 = Potência de ultrassom (%)

Retomando à Tabela 9, observa-se que, para a atividade antioxidante total, os valores da resposta variaram de 97,47 $\mu\text{mol TE/g}$ fruta seca para o ensaio menos efetivo, e 290,20

$\mu\text{mol TE/g}$ fruta seca para o ensaio mais efetivo. Comparando os resultados deste planejamento com o PB, observa-se que a atividade antioxidante total do extrato aumentou, e que 47% dos ensaios atingiram valores superiores a $200 \mu\text{mol TE/g}$ fruta seca, valores estes que não foram alcançados no primeiro planejamento.

Foi possível observar que a variável potência de ultrassom foi importante para aumentar a atividade antioxidante do extrato. Analisando os ensaios da Tabela 8, observa-se que os ensaios em que a potência de ultrassom foi de 40%, as respostas foram menores quando comparadas a maioria dos ensaios onde a potência de ultrassom foi de 80%. Para melhor ilustração, a Figura 14 apresenta as variáveis e interações resultantes para AAT.

Figura 14 – Pareto com os efeitos padronizados e as interações para atividade antioxidante pelo DCCR



Fonte: elaborado pela autora.

Variáveis: X_1 : Temperatura ($^{\circ}\text{C}$); X_2 : concentração de etanol (%); X_3 : razão sólido/líquido (mg/mL); X_4 : potência de ultrassom (%).

É possível observar na Figura 14 que a potência de ultrassom exerceu forte efeito positivo sobre a atividade antioxidante total do extrato, no sentido de que, quanto maior a potência utilizada, maior será a atividade antioxidante do extrato. Observa-se que a variável

razão sólido/líquido foi significativa, com efeito negativo, ou seja, uma menor quantidade de pó para o mesmo volume de solvente favorece a extração. A interação entre as variáveis potência de ultrassom e concentração de etanol foi significativa, com efeito negativo. Isso demonstra que o aumento da potência de ultrassom e o aumento da concentração de etanol não resultaram no aumento da atividade antioxidante total do extrato. Diferentemente do outro planejamento e comparado aos resultados de compostos fenólicos, a temperatura não foi significativa neste planejamento.

Em relação à concentração de etanol, a qual não foi significativa, nossos resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Irakli, Chatzopoulou e Ekateriniadou (2018). Os autores, ao avaliar a extração de oleuropeína das folhas de oliveira foi identificado que a extração aquosa apresentou menores resultados do que a extração que continha mistura de solvente orgânico na concentração de 50 a 70%, aumentando a concentração dos compostos no extrato. Dessa forma, a mistura de solventes se torna mais efetiva para a extração dos CFT e ATT. Isto porque, quanto menor a polaridade, maior o peso molecular do solvente. Dessa forma, é possível extrair diferentes substâncias que apresentem a mesma massa molecular (IRAKLI; CHATZOPOULOU; EKATERINIADOU, 2018).

Em relação às variáveis potência de ultrassom e concentração de etanol, estudos tem demonstrado que a presença de água tem beneficiado os processos extrativos realizados por ultrassom, pois favorece o aumento da intensidade da cavitação das ondas pelo aumento da tensão superficial e decréscimo da viscosidade. Contudo, extrações com quantidade de água superior a 60% podem prejudicar a extração pelo fato do ultrassom induzir ao aumento dos radicais de dissociação da água (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012). Neste sentido, a presença da água auxilia na quebra da matriz e na ligação matriz-analito (hidrogênio) (MUSTAFA; TURNER, 2011.)

Conte et al (2015) quando realizaram extração por ultrassom de álamo preto, verificaram que a porcentagem de etanol, razão sólido-líquido e a potência de ultrassom exerceram diferença significativa na extração, e que a temperatura não apresentou diferença significativa, corroborando com esta pesquisa.

Para a atividade antioxidante, algumas análises apresentaram variabilidade acima do esperado. Isto pode ser consequência da escolha do método. O método do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) como forma de medir a atividade antioxidante de extratos vegetais é bastante disseminada na literatura (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; HAMINIUK et al., 2011; MACHADO et al., 2015; POODI et al., 2018b). A avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH consiste em medir por espectrofotômetro o

decréscimo na concentração do DPPH pela reação deste radical com um antioxidante. Este método, mesmo em sistemas simples, apresenta diversas dificuldades que podem alterar o resultado das análises, como, por exemplo, a quantidade e o tipo do solvente utilizado para a dissolução antioxidante, o teor de água e as concentrações de íons metálicos no sistema interferem diretamente na quantidade de DPPH não reagida. Embora o reagente DPPH seja reconhecido como estável, é reportado na literatura seu lento desaparecimento com o tempo (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA; OLSZOWY, 2012).

No estudo de Correia et al (2012), os autores observaram que a atividade antioxidante do extrato de acerola, com alto teor de atividade antioxidante pudesse exercer uma influência positiva sobre o DPPH. Mas foi observado que a acerola reduziu menos o radical DPPH, comparado ao jamelão que apresentou menor atividade antioxidante

As demais variáveis principais, interações, e efeitos quadráticos não demonstraram significância. Contudo, estes resultados permitiram a 95% de confiança, a validação do modelo matemático de segunda ordem para a atividade antioxidante total do extrato, conforme a Equação 5. Pela análise de variância, o valor de o F_{calc} (6,7) foi três vezes maior que F_{tab} . Estes resultados permitiram a visualização da superfície de resposta.

$$Y_2 = 200,27 + 7,76 x_1 - 0,46 x_1^2 + 4,11 x_2 - 12,04 x_2^2 - 11,36 x_3 - 0,13 x_3^2 \\ + 31,44 x_4 + 8,73 x_4^2 + 19,35 x_1 x_2 + 2,78 x_1 x_3 + 7,17 x_1 x_4 \\ + 1,77 x_2 x_3 - 6,15 x_2 x_4 - 30,34 x_3 x_4$$

(Equação 4)

Onde:

X_1 = temperatura (°C);

X_2 = concentração de etanol (%);

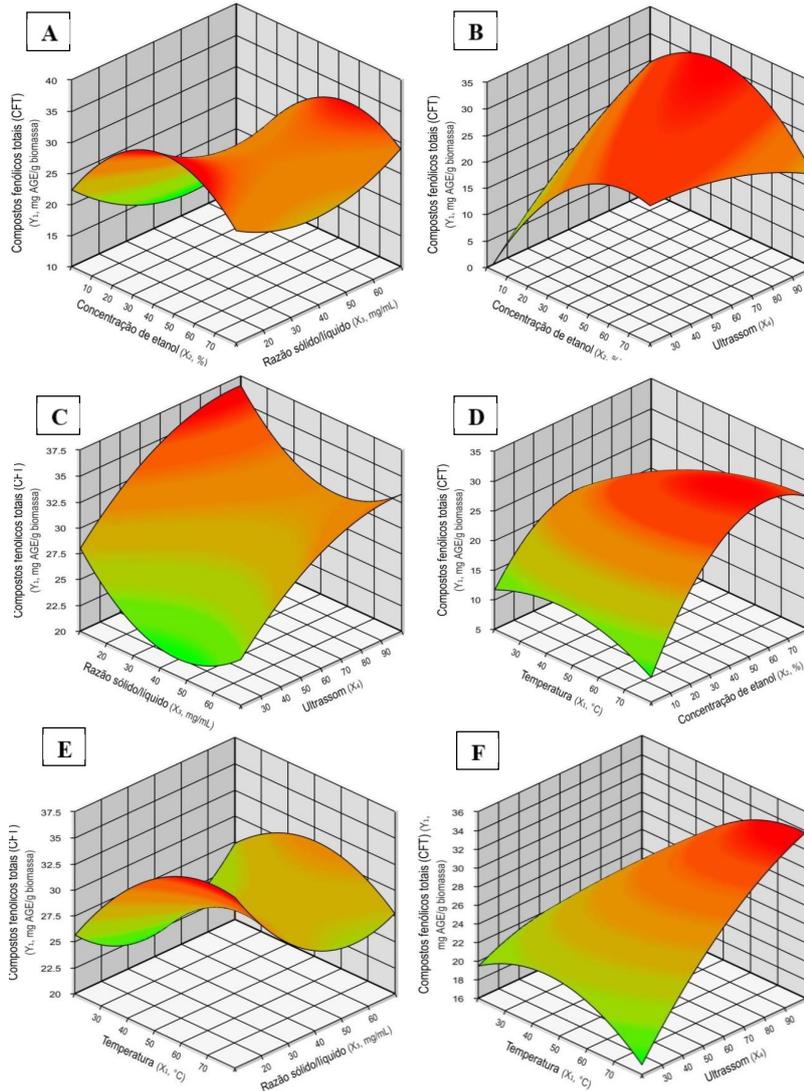
X_3 = Razão sólido/líquido (g/mL)

X_4 = Potência de ultrassom (%).

4.2.1 Superfícies de resposta

Após a validação do modelo matemático de segunda ordem, as superfícies de resposta do planejamento foram reproduzidas para os compostos fenólicos totais (Figura 15). Para compostos fenólicos totais, três variáveis foram significativas: temperatura, concentração de etanol e potência de ultrassom.

Figura 15 – Superfícies de resposta para compostos fenólicos totais a partir da relação das variáveis estudadas



Fonte: elaborado pela autora.

mgAGE/g fruta seca: miligrama de ácido gálico equivalente por grama de fruta seca. Sup. resp. relacionando as variáveis: Figura A: temperatura (X₁) e ultrassom (X₄); Figura B: concentração de etanol (X₂) e razão sólido/líquido (X₃); Figura C: concentração de etanol (X₂) e ultrassom (X₄); Figura D: temperatura (X₁) e razão sólido/líquido (X₃); Figura E: temperatura (X₁) e razão sólido/líquido (X₃); Figura F: temperatura (X₁) e ultrassom (X₄).

Analisando a Figura 15-D, verifica-se que a temperatura exerceu pouca influência quando a extração foi realizada a concentrações de etanol inferiores a 30%. Na faixa de temperatura de 50 a 80 °C, a concentração de etanol entre 50 a 65% na solução aquosa apresenta as melhores condições para a obtenção dos compostos fenólicos totais.

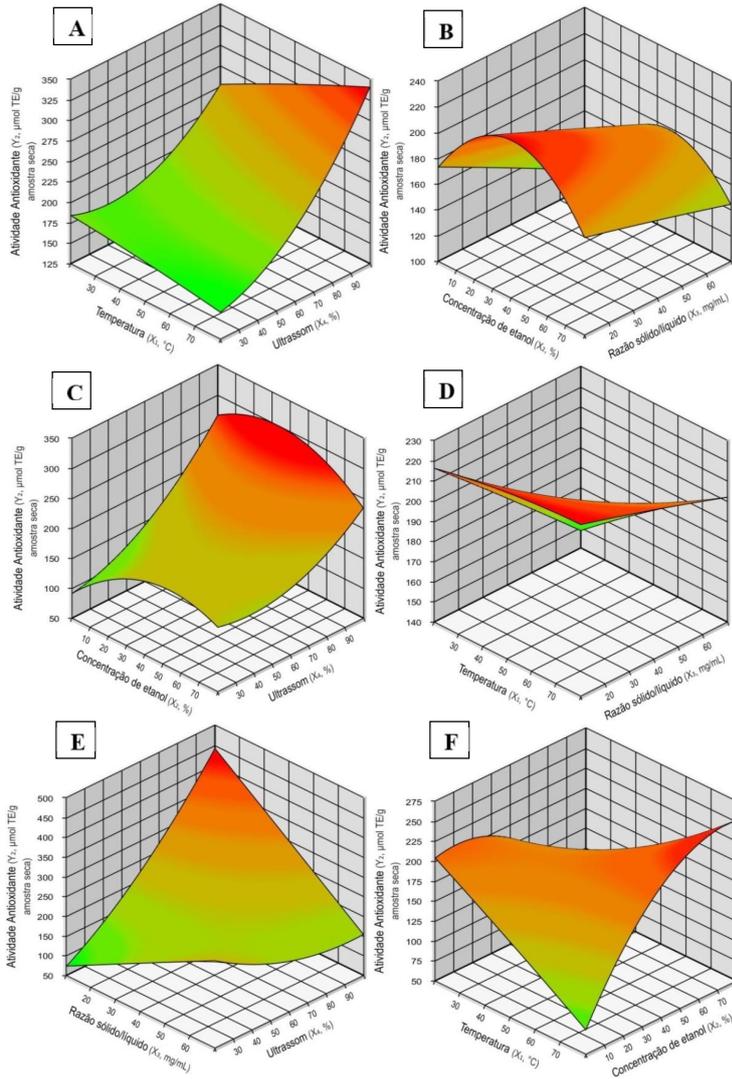
Em relação à composição do solvente, Tabart et al (2007) encontraram melhores resultados para CFT e AAT quando a mistura do solvente de extração continha acetona. Também demonstraram que, a composição da solução de extração afeta mais a extração dos compostos fenólicos do que a atividade antioxidante. Contudo, a extração com etanol é amplamente aceita pela indústria de alimentos, além de ser menos tóxico comparado a outros solventes.

No estudo de Peng, Bishop, Quek (2019) a concentração de etanol foi o fator mais significativo para a extração dos compostos fenólicos da polpa, casca e toda a fruta da goiaba-serrana. Os autores encontraram a melhor condição de extração na concentração de 50% de etanol para a casca, e de 70% de etanol para a polpa e fruta inteira.

No tocante à temperatura de extração, usualmente, as extrações são realizadas a temperatura não superiores a 50 °C a fim de evitar possíveis perdas dos compostos fenólicos (BARIŞ TUNCEL; YILMAZ, 2015). Contudo, no estudo conduzido por Spigno et al (2006), onde foi realizada cinética de extração do bagaço de uva, os maiores rendimentos em termos de compostos fenólicos e atividade antioxidante foram a temperatura de 60 °C, quando comparado aos resultados a 45 °C. Perdas dos compostos foram observadas somente após 20 horas de extração. A partir destes resultados, observou-se neste estudo que o perfil dos compostos fenólicos contidos na goiaba-serrana, bem como os compostos que exercem a atividade antioxidante total toleram temperaturas acima de 50 °C de extração apresentando bons resultados.

Em relação a atividade antioxidante total, no planejamento conduzido nesta pesquisa, para a AAT duas variáveis apresentaram influência significativa, a potência de ultrassom e a razão sólido/líquido. A Figura 16 apresenta as superfícies de resposta para atividade antioxidante total do extrato da goiaba-serrana. .

Figura 16 – Superfícies de resposta para atividade antioxidante total a partir da relação das variáveis estudadas.



Fonte: elaborado pela autora.

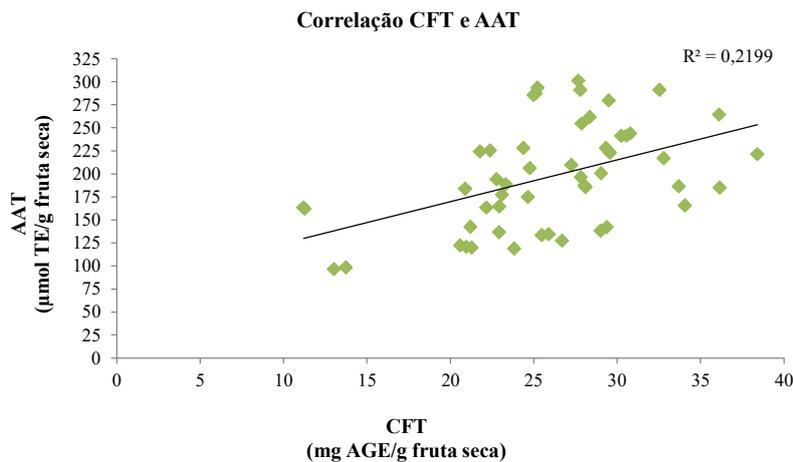
µmol Trolox equivalente: micromol Trolox equivalente por grama de amostra. Sup. resp. relacionando as variáveis: Figura A: temperatura (X₁) e ultrassom (X₄); Figura B: concentração de etanol (X₂) e razão sólido/líquido (X₃); Figura C: concentração de etanol (X₃) e ultrassom (X₄); Figura D: Sup. resp. temperatura (X₁) e razão sólido/líquido (X₂); Figura E: razão sólido/líquido (X₃) e potência de ultrassom (X₄); Figura F: temperatura (X₁) e concentração de etanol (X₂).

Analisando a Figura 16 é possível verificar que as superfícies de resposta 16-A e 16-C indicam o aumento da atividade antioxidante do extrato com o aumento da potência de ultrassom. Na figura 16-A verifica-se o efeito ocasionado pelo ultrassom, onde, mesmo que a temperatura esteja elevada (70 °C), as melhores respostas foram obtidas a partir de 60% da potência de ultrassom. O mesmo efeito pode ser verificado na Figura 16-C. Já na Figura 16-E, onde se relacionam as duas variáveis significativas, observa-se que a máxima razão sólido/líquido (60 mg/mL) com a máxima potência de ultrassom (100%) não resultaram na máxima recuperação da atividade antioxidante total do extrato.

Em relação a razão sólido/líquido, que também foi significativa, observa-se na Figura 16-B o efeito produzido relacionando-a com a concentração de etanol. Uma maior razão sólido-líquido não apresentou melhores resultados, pelo contrário, diminui a resposta em todas as condições de concentração de etanol. As melhores respostas são obtidas até 40 mg/mL de soluto. Desta forma, verifica-se que a concentração de etanol entre 20 a 50% são as melhores concentrações para a melhor recuperação da AAT do extrato. Observa-se também na Figura 16-E que a uma concentração de etanol de até 10% a uma potência de ultrassom até 50% representam as piores condições para a recuperação da AAT do extrato.

Outro ponto a ser comentado, é que este planejamento demonstrou melhores resultados para a atividade antioxidante total do que para a extração dos compostos fenólicos totais, em termos de quantidade. Este fato foi observado pelos resultados das respostas de cada condição experimental avaliada, e que nem sempre o aumento de quantidade de AAT representou o aumento da CFT proporcionalmente. Para verificar a correlação entre as análises foi realizada a correlação de Pearson (r) entre CFT e AAT. A correlação de Pearson (r) estima a linearidade entre duas variáveis. Os valores de correlação podem variar de 1 a -1, onde 1 significa uma forte correlação direta, e -1 representa uma forte correlação inversa. Caso a correlação for igual a zero, significa que as variáveis não podem ser correlacionadas. A Figura 17 apresenta a correlação para CFT e ATT do extrato da goiaba-serrana.

Figura 17 – Correlação de Pearson (r) entre compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total do extrato da goiaba-serrana



Fonte: elaborado pela autora.

AAT: Atividade antioxidante total; CFT: compostos fenólicos totais. µmol TE/g fruta seca: micromol de Trolox equivalente por grama de fruta seca; mg AGE/g fruta seca: miligrama de ácido gálico equivalente por grama de fruta seca.

De acordo com a Figura 17 as variáveis TPC e AAT demonstraram moderada correlação (0,468964). A falta de correlação entre os valores encontrados para CFT e ATT pode ser resultado das diferentes condições de extração avaliadas pelo planejamento, tendo em vista que as variáveis significativas foram diferentes para estes compostos.

A falta de correlação entre CFT e ATT é descrita na literatura como sendo resultado da interação de uma gama de fatores, como o estágio de maturação da fruta, genótipo, condições ambientais, sistema de plantio e fertilidade do solo, além dos fatores de quantificação destes compostos, como o método de extração, tamanho da amostra, tempo e tipo de armazenamento, além da escolha dos reagentes e a presença de interferentes na amostra, como gorduras, açúcares e ceras (VIDAL TALAMINI DO AMARANTE et al., 2008). Outro fator, é que o DPPH pode reagir com outros compostos não avaliados e que estão contidos no extrato, como, por exemplo, a vitamina C, a qual exerce alta atividade antioxidante (BARRALES et al., 2018). A goiaba-serrana é reconhecida pelo alto conteúdo de vitamina C, 32,9 mg/100 g (ZHU, 2018), podendo chegar a 40 mg/100 g, dependendo do genótipo (PASQUARIELLO et al., 2015).

Tiveron et al (2012) ao avaliarem a correlação dos compostos fenólicos com a atividade antioxidante de 23 hortaliças, utilizando para isso diferentes métodos de determinação da atividade antioxidante (DPPH, FRAP, ABTS, Rancimat, β -caroteno), também verificaram que não houve relação direta da atividade antioxidante com a quantidade de compostos fenólicos totais. Sendo que a relação dos compostos fenólicos com o método Rancimat demonstrou a menor correlação ($r=0,18$), enquanto DPPH e FRAP apresentaram, respectivamente, as melhores correlações ($r=0,89$ e $0,82$).

Ainda sobre o estudo de Tiveron et al (2012) os autores citam que a falta de correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante pode ser explicada pela alta variedade de compostos fenólicos e não fenólicos que exercem atividade antioxidante, e que nem sempre a presença elevada dessa variedade de compostos resultará em uma maior atividade antioxidante do extrato (TIVERON et al., 2012).

Na otimização da extração da goiaba-serrana, Tuncel e Yilmaz (2015) encontraram a melhor condição de extração para goiaba-serrana com razão sólido líquido de 60:1, solvente de extração (acetona:água 80:20 v/v), temperatura 40°C, obtendo como resposta CFT de 18,56 a 32,57 mg AGE/g fruta seca, e AAT 165 a 465,7 mM TE/g de fruta seca, na polpa e casca, respectivamente. Ao avaliar 12 genótipos de goiaba cultivada na Itália, Pasquarello et al (2015) identificaram uma variação de 93-251 mg de ácido gálico/100 g fruta fresca e 14-33 mg equivalentes de catequina/100 g de fruta fresca para compostos fenólicos totais e flavonoides, respectivamente. Comparando estes resultados aos obtidos neste trabalho, observa-se que os resultados para CFT são semelhantes ao encontrado por Tuncel e Yilmaz (2015) e superiores aos de Pasquarello (2015). Em relação a AAT, os valores de AAT são inferiores aos determinados por Tuncel e Yilmaz (2015).

Por fim, neste trabalho, a condição escolhida como ideal para a extração dos compostos fenólicos e atividade antioxidante total por ultrassom foi temperatura 65 °C, razão sólido/líquido 25 mg/mL, concentração de etanol 40%, potência de ultrassom 100%, obtendo $32,41 \pm 2,41$ mg AGE/g fruta seca e $223,40 \pm 30,63$ μ mol TE/g fruta seca para CFT e ATT, respectivamente. De posse desses resultados, a etapa seguinte foi determinar o perfil dos compostos fenólicos dos extratos.

4.2.2 Extração por líquidos pressurizados

Neste trabalho foi realizada uma extração por líquidos pressurizados em uma condição específica para fins comparativos ao método de extração por ultrassom. Os resultados obtidos para

CFT e AAT foram $59,4 \pm 9,3$ mg AGE/g de fruta seca e $195,8 \pm 11,3$ $\mu\text{mol TE/g}$ fruta seca. Observa-se que nesse método o valor obtido para CFT totais foi superior a todas as condições avaliadas no planejamento experimental. Já para AAT, o resultado obtido foi superior a 52% das condições avaliadas pelo planejamento experimental. No estudo de Santos et al (2019), ao realizar extrações da casca da goiaba-serrana proveniente do processamento de suco da goiaba, os autores identificaram que a extração por líquidos pressurizados também foi o melhor método para CFT, encontrando valor máximo de 66 mg AGE/g de fruta seca.

O teor de CFT encontrado nesta pesquisa foi superior ao estudo de Barrales et al (2018). Os autores demonstram em seus estudos que a condição de processo utilizando 75% de etanol a 65°C foi a responsável pela maior extração dos compostos fenólicos do bagaço da laranja, recuperando 14,9 a 15,2 mg AGE/g de fruta seca para dois lotes distintos, sendo a extração por esse método mais efetiva comparada a ultrassom e ao método tradicional por Soxhlet. Segundo os autores, a alta recuperação dos CFT por PLE associada à temperatura mais elevada pode ser justificada pela redução da tensão superficial, o que permitiu a maior penetração do solvente nos poros das amostras sólidas. Além disso, a temperatura aumenta a difusividade dos compostos fenólicos no solvente. Ademais, em relação à composição do solvente, os autores avaliaram que o aumento da porcentagem de água no solvente pode ter contribuído para o aumento dos CFT. Contudo, os autores avaliam que estes componentes sejam compostos de interferência, como carboidratos e açúcares. No mesmo estudo, a atividade antioxidante por PLE foi superior à extração por ultrassom e Soxhlet (BARRALES et al., 2018).

A goiaba-serrana na extração por líquido pressurizado apresentou maior conteúdo para CFT e AAT que a amora preta. No estudo de Machado et al (2015), os autores verificaram que a extração por PLE nas condições de extração de 100°C , solvente 50% etanol:água (v/v) foi mais efetiva que a extração por maceração e Soxhlet, recuperando 7,36 mg AGE/g de CFT e $79,03 \mu\text{mol TE/g}$ fruta seca pelo método DPPH. Neste estudo, o aumento da temperatura aumentou o AAT do extrato.

4.3 PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS DA GOIABA-SERRANA HPLC-MS

Muitas técnicas são utilizadas para a detecção de compostos fenólicos, como a cromatografia de fase reversa, alta performance, cromatografia líquida acoplada ao detector

de arranjo de diodos. Contudo, alguns dos compostos fenólicos são constituídos de estrutura muito similar, ocasionando espectros de UV semelhante, dificultando a identificação dos compostos. A cromatografia líquida acoplada ao detector de massas permite identificar diferenças nas estruturas dos compostos de interesse (SUN et al., 2007). Neste trabalho, utilizou-se HPLC-LCMS para a quantificação dos compostos. As condições analíticas do cromatógrafo estão exemplificadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Parâmetros analíticos do método de quantificação dos compostos individuais por HPLC-LCMS

Composto fenólico	Tempo de retenção*	Fragmentos <i>m/z</i>	Modo SIM	Equação de regressão	R ²
Ácido cafeico	6,167	178,90	(-)	$f(x)=483185*x+1.59111e+006$	0,97
Pirocatecol	4,892	109,1	(-)	$f(x)=13914.5*x-4264.20$	0,99
Ácido síringico	6,333	197,05	(-)	$f(x)=11611.1*x+30158.6$	0,96
Mangiferina	6,645	423,05	(+)	$f(x)=698062*x+2.26047e+006$	0,98
Kaempferol	8,501	286,9	(+)	$f(x)=742189*x+2.78984e+006$	0,96
Ácido p-cumárico	6,668	162,9	(-)	$f(x)=46230.9*x+73484.9$	0,99
Ácido ferrúlico	6,669	194,95	(+)	$f(x)=658895*x-494798$	0,79
Flavona	10,003	223; 445,1; 467,15	(+)	$f(x)=5.44966e+006*x+4.04029e+007$	0,81

Fonte: elaborado pela autora

*: tempo de retenção em minutos,

A partir das condições analíticas utilizadas para os compostos padrões, realizou-se a análise das amostras do extrato da goiaba-serra. A Tabela 11 apresenta os resultados da quantificação dos compostos individuais relacionando-os com todas as condições experimentais avaliadas, CFT e AAT. Dos oito compostos individuais analisados por HPLC-MS, quatro foram identificados nos extratos da goiaba-serrana: pirocatecol, ácido síringico,

ácido ferúlico e flavona. Verifica-se que o perfil dos compostos fenólicos do extrato hidroalcoólico é constituído principalmente de ácidos fenólicos e flavonas.

Tabela 11 – Diferentes condições experimentais avaliadas e os resultados obtidos para CFT, AAT e compostos fenólicos individuais por HPLC-MS

Ensaio	Condições de extração				Análises		Compostos fenólicos individuais ppm/g de fruta seca			
	Temperatura (°C)	[] de etanol (%)	Razão sólido/ líquido (mg/mL)	Ultrassom (%)	CFT (mg AGE/g fruta seca)	AAT (µmol TE/g fruta seca)	Pirocatecol	Ácido siringico	Ácido ferúlico	Flavona
1	35 (-1)	20 (-1)	25 (-1)	40 (-1)	20,8±0,3	121,5±1,0	0,038±0,00	N.D	0,063±0,01	0,556±0,09
2	65 (1)	20 (-1)	25 (-1)	40 (-1)	22,1±1,2	139,5±4,1	0,022±0,01	0,067±0,00	0,812±1,05	0,746±0,00
3	35 (-1)	60 (1)	25 (-1)	40 (-1)	26,1±0,9	130,4±4,3	N.D	N.D	0,081±0,02	0,960±0,01
4	65 (1)	60 (1)	25 (-1)	40 (-1)	29,2±0,3	140,2±2,7	0,025±0,01	0,361±0,05	0,065±0,02	1,010±0,04
5	35 (-1)	20 (-1)	55 (1)	40 (-1)	21,8±1,3	188,9±7,1	0,018±0,00	0,191±0,01	N.D	0,499±0,00
6	65 (1)	20 (-1)	55 (1)	40 (-1)	28,1±0,5	97,5±1,5	0,014±0,00	0,117±0,00	0,039±0,00	0,355±0,02
7	35 (-1)	60 (1)	55 (1)	40 (-1)	23,2±0,2	183,0±8,0	0,009±0,00	N.D	N.D	0,693±0,00
8	65 (1)	60 (1)	55 (1)	40 (-1)	28,2±1,3	205,0±6,5	N.D	0,265±0,01	N.D	0,703±0,01
9	35 (-1)	20 (-1)	25 (-1)	80 (1)	26,4±2,0	288,2±4,1	0,028±0,00	N.D	0,068±0,00	0,947±0,07
10	65 (1)	20 (-1)	25 (-1)	80 (1)	32,7±0,2	253,9±37,2	N.D	0,175±0,01	0,077±0,00	0,752±0,01
11	35 (-1)	60 (1)	25 (-1)	80 (1)	25,2±0,1	290,2±4,5	N.D	N.D	0,080±0,02	0,990±0,01
12	65 (1)	60 (1)	25 (-1)	80 (1)	28,6±1,3	290,2±15,1	0,033±0,01	0,415±0,02	0,050±0,01	1,030±0,06
13	35 (-1)	20 (-1)	55 (1)	80 (1)	24,6±0,3	217,0±15,4	N.D	0,214±0,09	N.D	0,400±0,01
14	65 (1)	20(-1)	55 (1)	80 (1)	26,2±2,2	185,6±15,4	N.D	0,137±0,02	N.D	0,399±0,05
15	35 (-1)	60 (1)	55 (1)	80 (1)	22,6±1,8	119,3±0,7	N.D	N.D	0,044±0,00	0,665±0,02
16	65 (-1)	60 (1)	55 (1)	80 (1)	28,1±0,4	258,0±4,9	N.D	0,291±0,01	N.D	0,706±0,01
17	20 (-2)	40 (0)	40 (0)	60 (0)	22,6±0,5	163,9±0,9	0,015±0,00	N.D	0,042±0,00	0,645±0,01

18	80 (2)	40 (0)	40 (0)	60 (0)	30,4±0,2	241,3±0,1	N.D	0,449±0,08	0,050±0,02	0,766±0,02
19	50 (0)	0 (-2)	40 (0)	60 (0)	11,2±0,1	162,7±0,8	N.D	N.D	N.D	0,061±0,06
20	50 (0)	80 (2)	40 (0)	60 (0)	30,0±5,8	149,9±22,0	0,016±0,00	0,181±0,00	0,034±0,01	0,813±0,01
21	50 (0)	40 (0)	10 (-2)	60 (0)	34,0±6,3	222,1±1,1	N.D	0,119±0,02	0,122±0,00	1,518±0,12
22	50 (0)	40 (0)	70 (2)	60 (0)	34,9±1,7	185,7±1,2	N.D	N.D	0,027±0,01	0,541±0,02
23	50 (0)	40 (0)	40 (0)	60 (0)	22,1±0,4	224,8±0,8	0,013±0,00	0,097±0,01	0,036±0,01	0,725±0,01
24	50 (0)	40 (0)	40 (0)	60 (0)	33,5±3,8	253,9±14,4	N.D	0,079±0,00	0,043±0,00	0,707±0,00
25	50 (0)	40 (0)	40 (0)	60 (0)	28,5±0,7	200,3±24,0	0,019±0,01	N.D	0,047±	0,718±0,02
PLE	60	40	10	100	59,4±9,3	195,8±11,3	N.D	N.D	N.D	4,921±0,02
CE1	65	40	25	100	33±2,7	240,8±26,9	0,040±0,00	0,333±0,00	N.D	0,788±0,01

Fonte: elaborado pela autora.

Resultados expressos como a média da duplicata ± desvio padrão. Condições de extração: 1 a 25: extrações realizadas por ultrassom pelo DCCR; PLE: extração realizada por líquidos pressurizados; CE1: Condição escolhida para a realização dos ensaios celulares por ultrassom; Variáveis: [] de etanol (%): Concentração de etanol (%) na solução de extração; CFT (mg AGE/g fruta seca): compostos fenólicos totais por grama de fruta seca; AAT (µmol TE/g fruta seca): atividade antioxidante total por grama de fruta seca; ppm: parte por milhão.

Sun-waterhouse et al. (2013), demonstraram nas análises por HPLC que o extrato da casca da goiaba apresenta prevalência de ácidos e flavonoides como a catequina, ácido protocateúrico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, quercetina, naringenina, epicatequina, procianidina dímero B1, ácido 2,4-hidroxibenzoico. Na otimização da extração da goiaba-serrana, Baris e Tuncel (2015) também identificaram a presença de ácidos fenólicos nos extratos acetônicos, como de ácido síringico, ferúlico, o-cumárico, e trans-cinâmico. Poodi et al (2018) identificaram ácido gálico, catequina, ácido ferúlico, quercetina e apigenina como os constituintes em maior quantidade no extrato das folhas da goiaba-serrana.

A quantificação dos compostos fenólicos mostrou que a flavona, flavonoide não glicosilado, foi o maior composto presente nos extratos da goiaba-serrana, sendo detectada em 100% de todas as condições avaliadas, inclusive na extração por PLE. Aoyama, Sakagami, Hatano (2018) quantificaram 21 compostos no extrato metanólico da goiaba-serrana, e, assim como no presente estudo, a flavona e a isoquercetina foram identificadas em maior quantidade, com conteúdo de 57,2 µg/10 mg de extrato. No estudo de Monforte et al (2014), as análises de HPLC para o extrato metanólico da goiaba-serrana confirmaram a presença de catequina, quercetina, ácido elágico, rutina, ácido gálico, ácido síringico, pirocatecol e eriocitrina.

Ainda sobre a flavona, as condições de extração do ensaio 21, 12 e 4 apresentaram, respectivamente, as maiores quantidades para a flavona (1,158 ppm, 1,030 ppm e 1,010 ppm). Estas condições de extração utilizaram baixa razão sólido/líquido, 10, 25 mg/mL e 25 mg/mL, respectivamente. O ensaio o ensaio 19 apresentou a pior condição de extração para recuperação de CFT, AAT, tendo quantificado apenas a flavona dos compostos individuais avaliados.

O ensaio 6 apresentou a menor quantidade de flavona no extrato. Nesta condição a utilização da média potência de ultrassom de 40% pode ter influenciado o sistema. Além disso, verifica-se que esta condição apresentou AAT baixa em relação ao encontrado nas demais condições, demonstrando que não necessariamente uma maior atividade antioxidante vai conter a maior quantidade do composto individual. No estudo de Poodi et al (2018) onde a extração por ultrassom utilizando etanol foi combinada a pré-tratamento, a quantificação do extrato por HPLC identificou ácido gálico como o polifenol de maior presença (123 mg/g), seguido por ácido ferúlico (69 mg/g), catequina (57 mg/g), apigenina 1947 mg/g) e rutina (38 mg/g).

Não foi detectado ácido ferúlico nessa condição de extração. A condição de extração do ensaio 4 detectou os quatro compostos na composição do extrato, contudo apresentou baixa atividade antioxidante, média 140,21 ($\mu\text{mol TE/g}$ fruta seca).

A extração por líquido pressurizado foi a melhor condição para a detecção da flavona, sendo o valor encontrado quatro vezes maior em relação aos resultados determinados por ultrassom. Ou seja, parece que o método foi eficiente para concentrar este composto. Em contrapartida, os demais compostos não foram detectados. Para a detecção dos demais compostos seria necessária uma razão sólido/líquido mais alta, pois estes compostos podem estar em menor concentração no extrato. A extração por líquido pressurizado foi a mais eficiente para a determinação dos CFT do extrato e para a AAT os resultados foram semelhantes aos demais resultados determinados pela extração por ultrassom.

Embora a temperatura não tenha sido significativa para AAT, o DCCR indicou que o aumento da temperatura seria benéfico para o aumento da ATT do extrato da goiaba-serrana. Os autores Machado et al (2015) explicam que o aumento da AAT do extrato com o aumento da temperatura pode ser justificado pela formação de produtos pela Reação de *Maillard*. Compostos como hidroximetilfurfural, carboximetil-lisina e pentosidina que podem ser formados a temperaturas de 80 a 140 °C induzem ao aumento da AAT. A reação dos aminoácidos com açúcares pode formar melanoidinas, de cor marrom escuro, com alta capacidade antioxidante, especificamente na extração por PLE, a temperaturas mais elevadas, onde os autores evidenciaram pela correlação e pela cor marrom escura do extrato.

No estudo de Santos et al (2019) os autores identificaram a presença de ácido ferúlico (0,253 mg/g), ácido procateúrico (0,027 mg/g), ácido gálico (0,305 mg/g), ácido elágico (0,321 mg/g) na quantificação por HPLC-MS no extrato da casca da goiaba-serrana. A extração por PLE a 40 °C, 100 bar, extraiu três vezes mais compostos fenólicos comparado aos métodos de baixa pressão, principalmente quando o solvente de extração foi uma mistura de etanol e água.

Com os resultados obtidos na Tabela 11, foi verificada a correlação entre o conteúdo de CFT e AAT a partir dos resultados do planejamento experimental (ensaios 1 a 25) com cada composto fenólico individual quantificado, conforme a Tabela 12.

Tabela 12 – Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante total com as diferentes condições de extração

Extrato da goiaba-serrana na extração por ultrassom*	
Parâmetros	Ultrassom
CFT vs. pirocatecol	0,32
CFT vs. ácido siríngico	0,23
CFT vs. flavona	0,84
CFT vs. ácido ferúlico	-0,29
AAT vs. pirocatecol	0,32
AAT vs. ácido siríngico	0,37
AAT vs. flavona	0,11
AAT vs. ácido ferúlico	-0,18

Fonte: elaborado pela autora

*resultado da extração por ultrassom obtida do planejamento experimental DCCR. CFT: compostos fenólicos totais; AAT: atividade antioxidante total.

Observa-se na Tabela 12 que, de modo geral, os resultados apresentaram baixa a moderada correlação, tanto para CFT como para AAT, com exceção da correlação entre CFT vs flavona. Para este composto, observa-se uma boa correlação com a extração do CFT, indicando que a modulação das condições de extração para CFT pode beneficiar a presença da flavona no extrato, e que as condições de extração da AAT não apresentaram correlação com a presença da flavona no extrato. Observa-se que tanto para CFT quanto para AAT o ácido ferúlico demonstrou baixa correlação negativa.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DO EXTRATO DA GOIABA-SERRANA

Nesta etapa, avaliou-se a atividade anticancerígena do extrato obtido pela condição ideal de extração (CE1). Muitos medicamentos têm sido desenvolvidos no combate ao câncer, contudo, algumas drogas são citotóxicas para células normais (AOYAMA; SAKAGAMI; HATANO, 2018). Por isso, o estudo de compostos naturais para o tratamento desse tipo de doença é investigado (BAGATINI et al., 2018; LERI et al., 2018; TAPIERO; D.; G., 2002). Essa técnica avalia a capacidade do extrato inibir o crescimento celular no local onde propositalmente se faz uma ferida. Em suma, verifica-se se o extrato exerce citotoxicidade sobre as células analisadas.

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos para o tratamento das células SK-Mel-28 com diferentes concentrações do extrato da goiaba-serrana para 24 horas de tratamento. As fotografias do tempo zero indicam o momento em que foi aplicado o extrato nas feridas (menos no controle negativo), em diferentes concentrações.

Figura 18 – Avaliação da migração celular em células de MC SK-Mel-28 após 24 horas de tratamento com extrato hidroalcolólico da goiaba-serrana nas concentrações de 100 a 10000 $\mu\text{g/mL}$



Fonte: elaborado pela autora.

Analisando a Figura 18, observa-se que no tempo inicial (de 0 a 24 horas) não houve crescimento celular, evidenciado através da visualização homogênea do centro da placa. Entretanto, comparando-as com as fotografias após 24 horas de tratamento, foi possível observar que no controle negativo e para as concentrações de 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL houve a migração de células para o centro da placa. Já os extratos nas concentrações de 5000 µg/mL e 10000 µg/mL foi possível observar a inibição do crescimento celular.

Comparando estes resultados com o tratamento de 72 horas, exemplificados na Figura 19, verifica-se que as células do controle negativo apresentaram um crescimento elevado, o que era esperado. As concentrações de 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL apresentaram menor efetividade para conter o crescimento celular. Entretanto, a concentração de 5000 µg/mL inibiu o crescimento celular, e a concentração de 10000 µg/mL foi muito eficiente, sendo possível verificar que as células não migraram para o centro além de ocasionar uma redução no número de células.

Figura 19 - Avaliação da migração celular em células de MC SK-Mel-28 após 72 horas de tratamento com extrato hidroalcolólico da goiaba-serrana nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ a 10000 $\mu\text{g/mL}$

Tempo Zero – 72 horas



Controle negativo



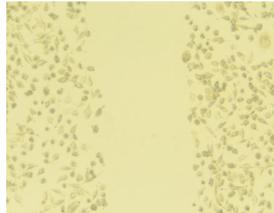
Goiaba 100 $\mu\text{g/mL}$



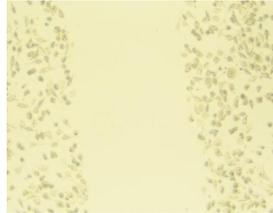
Goiaba 500 $\mu\text{g/mL}$



Goiaba 1000 $\mu\text{g/mL}$



Goiaba 5000 $\mu\text{g/mL}$



Goiaba 10000 $\mu\text{g/mL}$

Após 72 horas



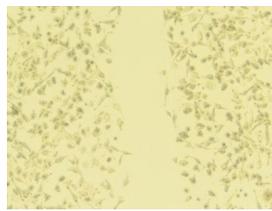
Controle negativo



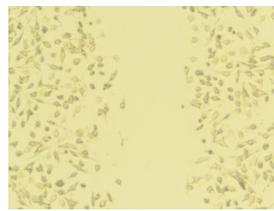
Goiaba 100 $\mu\text{g/mL}$



Goiaba 500 $\mu\text{g/mL}$



Goiaba 1000 $\mu\text{g/mL}$



Goiaba 5000 $\mu\text{g/mL}$



Goiaba 10000 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: elaborado pela autora.

O estudo de Bontempo et al (2007), apresentou, pela primeira vez, que o extrato acetônico da goiaba-serrana demonstrou efeitos positivos para o tratamento do câncer, e os autores identificaram neste estudo que a flavona foi o composto responsável por induzir a apoptose. Isso pode sugerir que, nesse estudo com células de câncer da linhagem SK-Mel-28, a flavona tenha sido a maior responsável pelo efeito anticancerígeno do extrato.

No estudo de Pelinson et al (2019), foi investigado a ação do ácido cafeico sobre a linhagem SK-mel-28 e os autores verificaram que o composto nas concentrações de 100 uM, 150 uM, e 200 uM, exibiram 15%, 45% e 46% de inibição comparado ao controle negativo. Comparado a dacarbazina, droga frequentemente utilizada como quimioterápêutico, apresentou 60% de inibição comparada ao controle. Outro ponto interessante, é que o tratamento com ácido cafeico, nas células mononucleares de sangue periférico, para todas as concentrações foi capaz de aumentar a viabilidade celular comparado às células que não receberam o tratamento, evidenciando que esse composto foi citotóxico para células tumorais, porém não ocasionaram danos as células saudáveis, indicando que essa citotoxicidade seletiva é o ideal para compostos que apresentam propriedade antitumoral.

Essa característica também foi encontrada no extrato da goiaba-serrana. No estudo de Ayoama et al (2018), o extrato acetônico da goiaba-serrana foi testado em células de carcinoma epidermoide humano e em células orais normais humanas – fibroblastos. Os autores sugerem que uma fração da proantocianidina oligomérica obtida da parte solúvel do resíduo da goiaba seria um dos compostos responsáveis pela propriedade citotóxica positiva nas células avaliadas, não apresentando citotoxicidade para as células normais humanas.

Comparado a outros estudos, as concentrações que apresentaram maior toxicidade são superiores ao demonstrado por outras espécies vegetais. Ao avaliar o efeito citotóxico do extrato metanólico as folhas *Bidens pilosa*, os autores identificaram que este vegetal apresentou citotoxicidade significativa contra células de carcinoma epidermoide humano, linhagem BK-3-1 com IC₅₀ de 99,56 ug/mL, entre três linhagens avaliadas (células de câncer cervical carcinoma hepatológico humano) nas concentrações de 1-200 µg/mL. A concentração de 200 ug/mL reduziu a viabilidade celular a aproximadamente 20% para a linhagem KB-3-1. A mesma concentração não foi efetiva para diminuir a viabilidade celular das outras linhagens. Isso indica que a concentração utilizada depende muito da linhagem celular (SINGH et al., 2017).

O extrato acetônico da goiaba, rico em polifenóis (10-200 ug/mL) demonstrou forte proteção contra a toxicidade induzida pelo mercúrio (HgCl₂) e ao estresse oxidativo em células eritrócitos humanos intactos (EHI). O mercúrio liga-se a grupos tiol, de forma

irreversível, sequestrando antioxidantes endógenos, como a glutatona. O extrato da casca demonstrou um efeito protetor maior em relação ao extrato da polpa. Isso pode ser explicado pela maior diversidade de polifenóis contidos na casca da goiaba-serrana (TORTORA et al., 2019).

Ao avaliar o extrato hidroalcoólico de *C. jamacaru* (mandacaru) em células de linfócitos humanos e sarcoma 180 nas concentrações de 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, os autores observaram que após 24 horas as concentrações de 10 µg/mL e 50 µg/mL reduziram a viabilidade celular dos linfócitos. Contudo, a concentração de 100 µg/mL promoveu a proliferação celular dos linfócitos, não induzindo a citotoxicidade após 48 horas. Em contrapartida, todas as concentrações testadas reduziram de forma significativa a viabilidade celular de sarcoma 180 (VENCIONECK DUTRA et al., 2018) corroborando a toxicidade seletiva dos compostos bioativos.

Ao avaliar o efeito de *Dendrobium moniliforme*, uma espécie de orquídea, os autores Paudel et al (2018) identificaram que o extrato na concentração máxima avaliada de 800 µg/mL mostrou o maior efeito de inibição (76,68%) contra e células de câncer cervical e que a mesma concentração foi a mais efetiva para a inibição de células de câncer de cabeça (51,95%).

Embora que as concentrações efetivas tenham sido as mais elevadas, o extrato da goiaba-serrana demonstrou potencial para o desenvolvimento de alimentos, fármacos, como produtos encapsulados, pela capacidade antioxidante e no combate à prevenção de doenças.

CONCLUSÃO

A técnica de planejamento de experimentos permite modular condições específicas para a obtenção de compostos específicos. Para compostos fenólicos totais a temperatura, concentração de etanol e potência de ultrassom exerceu diferença significativa ($p < 0,05$). Já para AAT as variáveis potência de ultrassom e razão sólido/líquido exerceu diferença significativa ($p < 0,05$). Em relação aos métodos de extração, a extração por líquidos pressurizados foi a melhor técnica para a extração dos compostos fenólicos totais.

O extrato da goiaba-serrana demonstrou resultados positivos para o tratamento de células de melanoma cutâneo SK-Mel-28 em concentrações mais altas (5000 a 10000 $\mu\text{g/mL}$), indicando que os compostos bioativos podem atuar como coadjuvantes no tratamento de doenças. Até o presente momento, não foi encontrado na literatura estudos avaliando o potencial do extrato da goiaba-serrana em células de melanoma cutâneo, especificamente em células da linhagem SK-Mel-28.

Este trabalho sugere que a flavona seja a maior responsável pela atividade antitumoral do extrato. Contudo sugere-se avaliar o potencial dos compostos identificados individualmente. Ademais, esta pesquisa demonstra potencial de continuidade, necessitando de aprofundamentos em relação aos mecanismos envolvidos e aos compostos que de fato estão contribuindo para inibir a migração celular da linhagem SK-Mel-28, além de oportunizar campo para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios, fármacos e encapsulados.

TRABALHOS FUTUROS

Tendo em vista o potencial da goiaba-serrana, sugerem-se as seguintes etapas para complementar e avançar na pesquisa com goiaba-serrana:

- Realizar as análises de viabilidade celular e migração celular para o extrato obtido pela extração com líquidos pressurizados, o qual aumentou a concentração de CFT, a fim de verificar se menores concentrações do extrato seriam suficientes para demonstrar citotoxicidade às células SK-Mel-28.
- Realizar as análises de viabilidade celular e migração celular para cada composto químico padrão que foi quantificado por HPLC;
- Comparar com células normais do sangue (fibroblastos) para verificar se o extrato possui alguma toxicidade para estas células e realizar ensaios celulares complementares, como análise do ciclo celular e estresse oxidativo, para consolidar, de fato, o potencial do extrato.
- Aplicar a condição otimizada de extração para as demais variedades da goiaba serrana;
- Avaliar o potencial do extrato em outras linhagens de células cancerígenas.
- Realizar análises de atividade antioxidante por outros métodos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARANTE, C. V. T. DO et al. Phenolic content and antioxidant activity of fruit of Brazilian genotypes of feijoa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 12, p. 1223–1230, 2017.
- ARRUDA, H. S. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora Mart.*) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, p.738-749. 2018.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p.1-9, 2007.
- AOYAMA, H.; SAKAGAMI, H.; HATANO, T. Three new flavonoids, proanthocyanidin, and accompanying phenolic constituents from *Feijoa sellowiana*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 31–40, 2018.
- BAGATINI, M. D. et al. $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D₃ alters ectonucleotidase expression and activity in human cutaneous melanoma cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, n. September, 2018.
- BARRALES, F. M. et al. Recovery of phenolic compounds from citrus by-products using pressurized liquids — An application to orange peel. **Food and Bioproducts Processing**, v. 112, p. 9–21, 2018.
- BASILE, A. et al. Antibacterial and antifungal properties of acetonic extract of *Feijoa sellowiana* fruits and its effect on *Helicobacter pylori* growth. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 1, p. 189–195, 2010.
- BERTOLDO, J. G. et al. Revista brasileira de tecnologia agropecuária. **Revista Brasileira de Tecnologia Agropecuária**, v. 1, n. 2, p. 97–104, 2017.
- BONTEMPO, P. et al. *Feijoa sellowiana* derived natural flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1902–1914, 2007.
- BORGES, A. et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, p. 256–265, 2013.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Respostas Perceptivas E. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995a.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Alimentos regionais brasileiros. 2. ed. Brasília : Ministério da Saúde, p. 484. 2015.
- CARABIAS-MARTÍNEZ, R. et al. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and

- biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1–2, p. 1–17, 2005.
- CARNIEL, N. et al. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids from *Physalis angulata*. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 3, p. 1–11, 2017.
- CARNIEL, N. et al. The effects of ultrasound-assisted extraction on polyphenolics compounds obtained from *physalis angulata* using response surface approach. **Acta Scientiarum**, v. 40, p. 4–9, 2018.
- CARNIEL, N. et al. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids from *Physalis angulata*. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 3, p. 1–11, 2017.
- CHINEMBIRI, T. N. et al. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. **Molecules**, v. 19, p. 11679–11721, 2014.
- COMPARINI, A. et al. **Metodologia de superfície de resposta: uma introdução nos softwares r e estatística**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: < <https://repositorio.usp.br/item/002277072> >. Acesso em: 25/11/2020.
- CONTE, R. et al. Ultrasound-assisted extraction of total polyphenols from Black Poplar (*Populus nigra*) and evaluation of antioxidant potential. **Indian Journal of Advances in Chemical Science**, n. ii, p. 25–30, 2016b.
- CONTE, R. et al. Pressurized liquid extraction and chemical characterization of safflower oil: A comparison between methods. **Food Chemistry**, v. 213, p. 425–430, 2016a.
- CORADIN, Lídio.; SIMINSKI, Alexandre.; REIS, Ademir (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília: MMA, 2011. 934 p.
- CORREIA, R. T. et al. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 6, p. 539–547, 2012.
- COSTA, M. G.; BUCEK, E. U. Enemp 2017. v. d, p. 1–7, 2017.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.
- DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D. PLE in the analysis of plant compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 5, p. 1161–1165, 2004.
- DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1037–1043, 2012.

DEL RIO, D. et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–92, 2013.

EPAGRI: Projeto da Epagri quer popularizar a goiaba-serrana no Brasil: Disponível em: <<https://www.epagri.sc.gov.br/index.php/2020/03/20/projeto-da-epagri-quer-popularizar-a-goiaba-serrana-no-brasil/>> Acesso em: 01/06/2020.

GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813–8826, 2010.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 7, p. 1529–1537, 2011.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

IRAKLI, M.; CHATZOPOULOU, P.; EKATERINIADOU, L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 382–388, 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 2: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 2008. p. 21-22.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil/ Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro : IBGE, 2011. 150 p

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estatísticas de câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>> Acesso em: 29 abr. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. O que é o câncer. Disponível em: . <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>> Acesso em: 29/05/2020

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Como surge o câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>> Acesso em 28/05/2020

JUSTUS, C. R. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Journal of Visualized Experiments**, n. 88, p. 1–8, 2014.

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

KELES, H. et al. The effects of *Feijoa sellowiana* fruits on the antioxidant defense system, lipid peroxidation, and tissue morphology in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 3, p. 318–325, 2012.

LERI, M. et al. Bioactive compounds from *posidonia oceanica* (L.) delile impair malignant cell migration through autophagy modulation. **Marine Drugs**, v. 16, n. 4, 2018.

- LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41–47, 2003.
- LUQUE DE CASTRO, M. .; GARCÍA-AYUSO, L. . Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1–2, p. 1–10, ago. 1998.
- MACHADO, A. P. D. F. et al. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus L.*) residues: A comparison with conventional methods. **Food Research International**, v. 77, p. 675–683, 2015.
- MAHMOUDI, M. et al. Antidepressant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 13, 2015.
- MAJUMDER, M. et al. Ricinus communis L. fruit extract inhibits migration/invasion, induces apoptosis in breast cancer cells and arrests tumor progression in vivo. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.
- MAKSIMOVIC, S.; IVANOVIC, J.; SKALA, D. Supercritical extraction of essential oil from *Mentha* and mathematical modelling- the influence of plant particle size. **Procedia Engineering**, v. 42, n. August, p. 1767–1777, 2012.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Plano Nacional de desenvolvimento da fruticultura. p. 49. [S. l.: s. n.], 2018.
- MONFORTE, M. T. et al. *Feijoa sellowiana* Berg fruit juice: Anti-inflammatory effect and activity on superoxide anion generation. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 4, p. 455–461, 2014.
- MONRAD, J. K. et al. Subcritical solvent extraction of procyanidins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4014–4021, 2010.
- MORETTO, S. P.; NODARI, E. S. **A disseminação da feijoa (*Acca sellowiana*)**. 2014 [s.l.]. Disponível em: <http://www.encontro2014.sc.anpuh.org/resources/anais/31/1403366922_ARQUIVO_Artigo_Samira.pdf>. Acesso em: 1 out. 2018.
- MOSBAH, H. et al. Phytochemical characterization, antioxidant, antimicrobial and pharmacological activities of *Feijoa sellowiana* leaves growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 112, n. December 2017, p. 521–531, 2018.
- MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8–18, out. 2011.
- NAIK, G. H. et al. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in ayurvedic medicine. **Phytochemistry**, v. 63, n. 1, p. 97–104, 2003.
- PASQUARIELLO, M. S. et al. Agronomic, nutraceutical and molecular variability of feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) germplasm. **Scientia Horticulturae**, v. 191, p. 1–9, 2015.

- PAUDEL, M. R. et al. Antioxidant and cytotoxic activities of *Dendrobium moniliforme* extracts and the detection of related compounds by GC-MS. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2018.
- PELINSON, L. P. et al. Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. **Molecular Biology Reports**, v. 4, 2019
- PENG, Y.; BISHOP, K. S.; QUEK, S. Y. Extraction optimization, antioxidant capacity and phenolic profiling of extracts from flesh, peel and whole fruit of New Zealand Grown Feijoa Cultivars. **Antioxidants**, v. 8, n. 5, p. 141, 2019.
- PÉRES, V. F. et al. Comparison of Soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Journal of chromatography. A**, v. 1105, n. 1–2, p. 115–8, 2006.
- POODI, Y. et al. Intensification of bioactive compounds extraction from Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.) leaves using ultrasonic waves. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 37–50, 2018.
- RICE-EVANS, C; MILLER, NJ; PAGANGA, G. Review Article. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.
- ROESLER, R., et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 27, p. 53–60. 2007.
- SAGAR, N. A. et al. Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 512–531, 2018.
- SANTOS, P. H. et al. Extraction of bioactive compounds from feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) peel by low and high-pressure techniques. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, p. 219–227, 2019.
- SHIMADZU. **Análise qualitativa e quantitativa de compostos fenólicos empregando o LCMS-8040**. 2018.
- SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10–23, mar. 2012
- SINGH, G. et al. Pharmacological potential of *Bidens pilosa* L. and determination of bioactive compounds using UHPLC-QqQLIT-MS/MS and GC/MS. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2017.
- SPIGNO, G., TRAMELLI, L., DE FAVERI, D. M. TABART J, et al. Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from *black currant* leaves and buds and of stability during storage. **Food Chemistry** 105:1268–1275 2007. v: 81, n 1., p. 200-208. 2007.
- SUMERE, B. R. et al. Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.). **Ultrasonics**

Sonochemistry, v. 48, n. January, p. 151–162, 2018.

SUN-WATERHOUSE, D. et al. Utilisation Potential of Feijoa Fruit Wastes as Ingredients for Functional Foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 12, p. 3441–3455, 2013.

SUN, J. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 679–693, 2007.

TABART J, et al. Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from *black currant* leaves and buds and of stability during storage. **Food Chemistry** 105:1268–1275 2007.

TAPIERO, H.; D., K.; G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 56, n. 4 SRC-GoogleScholar, p. 200–207, 2002.

TASHIRO, E.; IMOTO, M. Chemistry and biology of the compounds that modulate cell migration. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2–3, p. 213–219, 2016.

TIVERON, A. P. et al. Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8943–8957, 2012.

TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100–109, 2015.

TORTORA, F. et al. Phenol-rich *feijoa sellowiana* (Pineapple guava) extracts protect human red blood cells from mercury-induced cellular toxicity. **Antioxidants**, v. 8, n. 7, 2019.

TUNCEL, N. B.; YILMAZ, N. Optimizing the extraction of phenolics and antioxidants from feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 141–150, 13 jan. 2015.

VENCIONECK DUTRA, J. C. et al. *Cereus jamacaru* D.C. hydroalcoholic extract promotes anti-cytotoxic and antitumor activity. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 4, p. 1–18, 2018.

VIDAL TALAMINI DO AMARANTE, C. et al. De Armazenamento E Ao Tratamento Com 1-Metilciclopropeno. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1683–1689, 2008.

VIDAL TALAMINI DO AMARANTE, C.; LOUISE DOS SANTOS, K. **REVISTA BRASILEIRA DE FRUTICULTURA Goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v33n1/42.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

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

ZHU, F. Chemical and biological properties of feijoa (*Acca sellowiana*). **Trends in Food Science & Technology**, v. 81, p. 121–131, 2018.