



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos

Otimização da extração de compostos bioativos da folha de Moringa (Moringa oleífera Lam) e polpa da fruta Canistel-Pouteria campechiana (Kunth) Baehni utilizando métodos rápidos de extração

Juliana Mendes Garcia Pereira

MARINGÁ
2021

Juliana Mendes Garcia Pereira

Otimização da extração de compostos bioativos da folha de Moringa (Moringa oleífera Lam) e polpa da fruta Canistel-Pouteria campechiana (Kunth) Baehni utilizando métodos rápidos de extração

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutora em Ciência de Alimentos.

**MARINGÁ
2021**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

P436o

Pereira, Juliana Mendes Garcia

Otimização da extração de compostos bioativos da folha de Moringa (*Moringa oleífera* Lam) e polpa da fruta *Canistel-Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni utilizando métodos rápidos de extração. / Juliana Mendes Garcia Pereira. -- Maringá, PR, 2022.
96 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Marquetotti Salcedo Vieira.

Coorientador: Prof. Dr. Evandro Bona.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2022.

1. Planejamento de misturas. 2. Polifenóis. 3. UPLC-TQD espectrômetro de massa . 4. HAE. 5. UAE. I. Vieira, Angélica Marquetotti Salcedo , orient. II. Bona, Evandro, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDD 23.ed. 664

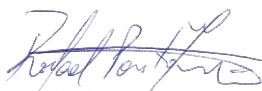
JULIANA MENDES GARCIA PEREIRA

“Otimização da extração de compostos bioativos da folha de Moringa (Moringa oleífera Lam) e polpa da fruta Canistel-Pouteria campechiana (Kunth) Baehni utilizando métodos rápidos de extração.”

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.



Profa. Dra. Aline Takaoka Alves Baptista



Prof. Dr. Rafael Porto Ineu



Profa. Dra. Andresa Carla Feihmann



Prof. Dra. Raquel Gomes Guttierres



Profa. Dra. Angelica Marquetotti Salcedo Vieira
Orientadora

Orientador

Profa. Dra. Angélica Marquetotti Salcedo Vieira

Co-orientador

Prof. Dr. Evandro Bona

BIOGRAFIA

Juliana Mendes Garcia Pereira nasceu em 12 de novembro de 1988, na cidade de Votuporanga-SP. Possui graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Tecnológica Federal de Paraná (2015). Mestre em Tecnologia de Alimentos na Universidade Tecnológica Federal de Paraná (2017). Doutoranda em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Maringá. Atuou profissionalmente, por dois anos e meio, em uma Indústria de Alimentos na área de Qualidade e Produção. Tem experiência na Implantação dos Procedimentos Operacionais Padrões; Implantação de Autocontrole Industrial; Treinamento de Colaboradores; Programação e Controle da Produção; Controle e Melhoramento de Processos; Análises Laboratoriais e Auditorias.

Dedico

A Deus, meu Pai!

Ao meu esposo Marcio, pelo apoio, amor e cuidado.

Aos meus filhos, Lauro e Olivia por serem a luz da minha vida.

A minha família, pelo amor e admiração mútua.

Aos meus amigos, por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço imensamente e divido com vocês essa conquista!

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor principal da minha vida, ao qual deposito toda minha confiança, amor e gratidão.

A minha amada família, por sempre me apoiar, acreditando que eu era capaz e não me deixando sozinha nunca.

À Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela parceria e apoio na utilização dos laboratórios.

A professora Dra. Angélica Marquetotti Salcedo Vieira, pela confiança e orientação.

Ao professor Dr Evandro Bona, pela indispensável orientação, incentivo e apoio ao longo destes quatro anos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos pelos conhecimentos transmitidos e a secretária do programa Marilda Ferreira Magalhães pelo apoio.

Aos meus amigos, pelo valioso apoio e companhia indispensável durante toda minha vida e trajetória acadêmica, especialmente à Patrícia Casarin de Lima, Franciele Leila Giopato Viell, Maysa Formigoni Fasolin e Natara Tosoni.

À professora Dra Suzana Lucy Nixdorf da Universidade Estadual de Londrina e ao Dr. Lycio Shinji Watanabe pelo apoio e suporte analítico.

Agradeço também ao pesquisador, Evandro Silva por todo auxílio durante o trabalho no UHPLCQ-TOF-MS/MS.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e CNPq pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não
trata com leviandade, não se ensoberbece.
Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se
irrita, não suspeita mal;
Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;
Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.”*

Coríntios 13:4-7

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está apresentada na forma de dois artigos científicos e um capítulo de livro

CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO; J.M.G. Pereira, M. Formigoni, F.L.G. Viell, G.C. Pante, E. Bona, A.M.S.V. Vieira, Aditivos alimentares naturais emergentes: Uma revisão, in: Real. e Perspect. Em Ciência Dos Aliment., **Pantanal Editora**, 2020: pp. 46–84. <https://doi.org/10.46420/9786588319031cap3>

ARTIGO PUBLICADO: J.M.G. Pereira, F.L.G. Viell, P.C. Lima, E. Silva, E.J. Pilau, R.C.G. Corrêa, E. Bona, A.M.S. Vieira, Optimization of the extraction of antioxidants from Moringa leaves: A comparative study between ultrasound- and ultra-homogenizer-assisted extractions, **J. Food Process. Preserv.** 45 (2021). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15512>

ARTIGO EM ANDAMENTO: Juliana Mendes Garcia Pereira; Anielle de Oliveira; Suzana Lucy Nixdorf; Lycio Shinji Watanabe; Evandro Bona; Angélica Marquetotti Salcedo Vieira. Otimização do processo de extração de compostos antioxidantes da fruta exótica Canistel-Pouteria campechiana (Kunth) Baehni. **Ultrasonics Sonochemistry**.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION. There is an increased demand for healthy foods or foods with natural appeal. Additives are a class of chemical substances added to processed foods to improve the characteristics of the final product. They can be divided into natural and synthetic. Where the former can occur naturally in food or be retrieved from a natural source. The synthetic class, on the other hand, is the most used class in the industry due to its chemical stability, easy application and low cost. However, in recent years, the use of natural substances in food products as a substitute for synthetic ones has come to represent one of the main trends and challenges in the food industry. While natural additives have their merits for the food industries, their use requires a strict food safety policy. The search for new sources of antioxidants is a living concern these days, and exotic fruits are increasingly explored for this purpose. Optimization of the extraction process is a major challenge, including choice of extraction methodology, process time and temperature, sample/solvent ratio, solvent mix, solvent toxicity, and preservation of bioactive compounds during the process. Thus, the *Moringa oleifera* fruit (*Moringa*) and the *Canistel-Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni were studied through experimental planning and chemometric tools as antioxidation sources.

OBJECTIVES. The objective of these works was to carry out research on new approaches (emerging) to obtain food additives in a natural way and to optimize the process of extracting bioactive compounds from moringa leaves and *Canistel-Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni fruit pulp.

MATERIAL AND METHODS. To optimize the process of extracting compounds from the moringa leaf, RCCD (rotational central composite design) was used to evaluate the effects of solvent composition and the solids/solvent ratio on the dependent variables of Total Phenolics (TPC), Total Flavonoids (TFC).), antioxidant capacity. All statistical analyzes were performed using the TIBCO Statistica™. As for *Canistel-Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni, the planning used was the centroid-simplex and the answers were in terms of TPC, TFC, and antioxidant capacity. The identification, and for *Canistel* the quantification of the compounds, was done by chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS).

RESULTS AND DISCUSSION. The models obtained for yield were statistically significant ($P < .05$) for the two extraction methods and none of the models presented lack of fit (Lack of fit) ($p > .05$). For UAE and HAE, the binary solid/solvent interaction effect and the water/ethanol ration were not statistically significant, so these coefficients were removed from the model. The throughput for UAE was slightly higher, but the high cost of the equipment is a

disadvantage compared to HAE. It was also observed that increasing the solid/solvent ratio decreases yield. The TPC values were slightly higher for UAE compared to HAE, this is due to the equipment applying a high shear rate in a few seconds and allowing the rupture of plant cell structures, promoting the release of metabolics such as phenolic compounds. Vegetable sources have represented the main matrix for obtaining natural aromatic compounds, such as phenolic compounds. The regression models for TPC of Moringa leaves were statistically significant ($p < .05$) for both extraction equipment. However, the HAE model did not show a good predictive ability. It was observed that the mixture of water and ethanol had higher TPC values, which suggests that solvents with intermediate polarities are more suitable for extracting phenolic compounds from plant matrices. It was not possible to obtain a valid model to obtain TFC for HAE. However, for UAE the model was statistically significant. The attempt to adapt to the current consumer market has driven researchers to search for sources of natural additives and emerging recovery techniques. Antioxidants is one of the most researched additive categories and was evaluated by two methods, DPPH and ABTS, as the phytochemicals act by different mechanisms and each one has a specific target within the reaction matrix. For the DPPH method, the models obtained for both equipment were statistically significant, and had no lack of adjustment. By the model, it can also be observed that the increase in leaf mass in the extraction did not increase the values of antioxidant activity through the DPPH assay. For ABTS, only the model for UAE was statistically significant. Again, the model showed an inverse relationship between leaf quantity and antioxidant concentration. Antioxidants used as food additives are used in order to prolong the shelf life of food, preventing rancidity, loss of color, development of odors, loss of texture, among other phenomena that occur in food products. The reactions that protect food are the same ones that protect cells from biological organisms and have a specific objective, to prevent oxidation, allowing the food to remain in good condition for longer. The extracts that showed the best results in terms of extraction yield and antioxidant activity were selected for characterization via UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS. The analysis of mass spectral (MS) chromatograms showed great similarity between the profiles of bioactive compounds of all evaluated extracts. Up to 30 components were detected in Moringa leaf extracts, corresponding to polyphenols, alkaloids and lignins. As for the extraction carried out on the pulp of the canistel fruit, it was possible to observe that the greater the amount of acetone, the better the extraction. For all responses, the coefficients were statistically significant ($P < 0.05$) and with good ability. Furthermore, the standard error estimate was very low when compared to the values obtained experimentally, with no lack of adjustment in the

model ($p > 0.05$). These data demonstrate that the values obtained in the special cubic model represent the experimental values very well.

CONCLUSIONS. As these new perspectives are presented, it is possible to conclude that the replacement of synthetic additives related to food structuring is quite possible, since additive sources can be found in abundance in nature. Both plant matrices proved to be good sources of antioxidants

KEY WORDS. UPLC-TQD mass spectrometer; polyphenols;

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO. Há um aumento da demanda por alimentos saudáveis ou com apelos naturais. Os aditivos são uma classe de substâncias químicas adicionadas aos alimentos processados para melhorar as características do produto final. Eles podem ser divididos em naturais e sintéticos. Onde o primeiro, pode ocorrer naturalmente no alimento ou serem recuperados de uma fonte natural. Já a classe dos sintéticos, é a classe mais utilizada na indústria devido a sua estabilidade química, fácil aplicação e baixo custo. No entanto, nos últimos anos, a utilização de substâncias naturais em produtos alimentícios como substituto aos sintéticos passou a representar uma das principais tendências e desafios da indústria de alimentos. Embora os aditivos naturais tenham seus méritos para as indústrias de alimentos, seu uso requer uma política rigorosa de segurança alimentar. A busca de novas fontes de antioxidantes são uma preocupação vivida nos dias de hoje, e as frutas exóticas são cada vez mais explorada com esse propósito. A otimização do processo de extração é um importante desafio, incluindo a escolha da metodologia de extração, tempo e temperatura do processo, razão amostra/solvente, mistura de solventes, toxicidade dos solventes, e a preservação dos compostos bioativos durante o processo. O planejamento experimental e ferramentas quimiométrias são importantes ferramentas capazes de encurtar o caminho das análises e determinar corretamente o número de experimentos necessários para que se possa chegar a uma conclusão. Sendo assim a folha da *Moringa oleífera* (Moringa) e a polpa da fruta *Canistel-Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni foram estudadas por meio de planejamentos experimentais e ferramentas quimiométricas como fontes de antioxidantes.

OBJETIVOS. O objetivo destes trabalhos foi realizar pesquisas sobre as novas abordagens (emergentes) para obtenção de aditivos alimentares de forma natural e otimizar o processo de extração dos compostos bioativos de folhas de *Moringa oleífera* e da polpa da fruta *Canistel-Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni.

MATERIAIS E MÉTODOS. Para a otimização do processo de extração dos compostos da folha de moringa, realizados pelos equipamentos Ultra-homogeneizador (HAE) e Ultrassom (UAE) foi utilizado RCCD (delineamento composto central rotacional) para avaliar os efeitos da composição do solvente e a razão sólidos/ solvente sobre as variáveis dependentes Fenólicos Totais (TPC), Flavonoides totais (TFC), capacidade antioxidante. Todas as análises estatísticas foram realizadas no TIBCO Statistica™. Já para *Canistel-Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni, o planejamento usado foi o simplex-centróide e as respostas foram em função TPC, TFC, e capacidade antioxidante. A identificação e quantificação dos compostos, foi feita por cromatografia acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO. Os modelos obtidos para o rendimento, foram estatisticamente significativos ($p < 0.05$) para os dois métodos de extração e nenhum dos modelos apresentaram falta de ajuste (*Lack of fit*) ($p > 0.05$). Para UAE e HAE, o efeito de interação binária sólido/ solvente e a razão água/ etanol não foram estatisticamente significativos, então esses coeficientes foram removidos do modelo. O rendimento para UAE foi ligeiramente maior, porém o alto custo do equipamento é uma desvantagem em relação ao HAE. Foi observado também que o aumento da proporção sólido/solvente diminui o rendimento. Os valores de TPC foram ligeiramente maiores para UAE em relação a HAE, isso é devido ao equipamento aplicar uma alta taxa de cisalhamento em poucos segundos e permite a ruptura das estruturas celulares da planta, promovendo a liberação de metabólicos, como os compostos fenólicos. Fontes vegetais têm representado a principal matriz para obtenção de compostos aromáticos naturais, como os compostos fenólicos. Os modelos de regressão para TPC das folhas de Moringa foram estatisticamente significativos ($p < .05$) para ambos os equipamentos de extração. Entretanto, o modelo de HAE, não apresentou uma boa capacidade preditiva. Foi observado que a mistura água e etanol obtiveram maiores valores de TPC, o que sugere que solventes com polaridades intermediárias são mais adequados para extração de compostos fenólicos em matrizes vegetais. Não foi possível obter um modelo válido para obtenção de TFC para HAE. Porém, para UAE o modelo foi estatisticamente significativo. A tentativa de adequação ao mercado consumidor atual tem impulsionado pesquisadores na busca por fontes de aditivos naturais e técnicas de recuperação emergentes. Os Antioxidantes, é uma das categorias de aditivos mais pesquisadas e foi avaliada por dois métodos, DPPH e ABTS, pois os fitocomponentes atuam por diferentes mecanismos e cada um possui um alvo específico dentro da matriz de reação. Para o método de DPPH, os modelos obtidos para ambos os equipamentos foram estatisticamente significativos, e não tiveram falta de ajuste. Pelo modelo, também pode-se observar que o aumento da massa de folha na extração não aumentou os valores de atividade antioxidante através do ensaio de DPPH. Para o ABTS, somente o modelo para UAE foi estatisticamente significativo. Novamente, o modelo mostrou relação inversa entre a quantidade de folha e concentração de antioxidantes. Os extratos que apresentaram os melhores resultados quanto ao rendimento de extração e atividade antioxidante, foram selecionados para a caracterização via UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS. A análise dos cromatogramas de espectro de massa (MS) mostrou grande semelhança entre os perfis de compostos bioativos de todos os extratos avaliados. Até 30 componentes foram detectados nos extratos de folha de Moringa, correspondendo a compostos polifenóis, alcaloides e ligninas. Em relação a caracterização da polpa canistel, foi possível observar que ela possui uma grande

quantidade de umidade e carboidratos e um pH básico. Já para o estudo da extração de antioxidantes foi possível observar que, quanto maior a quantidade de acetona, melhor foram as quantificações de antioxidantes, com exceção da análise de ORAC, que foi maior para extração realizada em proporções iguais de acetona e etanol. Para todas as respostas, os coeficientes foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$) e com boa capacidade. Além disso a estimativa de erro padrão foi muito baixa quando comparado aos valores obtidos experimentalmente, não havendo falta de ajuste no modelo ($p > 0,05$). Esses dados demonstram que os valores obtidos no modelo cúbico especial representa muito bem os valores experimentais.

CONCLUSÃO. Como essas novas perspectivas apresentadas, é possível concluir que a substituição dos aditivos sintéticos relacionados a estruturação dos alimentos é bastante possível, já que fontes de aditivos podem ser encontradas em abundância na natureza. Ambas as matrizes vegetais se mostraram boas fontes de antioxidantes

PALAVRAS CHAVES: Planejamento de misturas; UPLC-TQD espectrômetro de massa; polifenóis; UAE; HAE.

Capítulo III

Aditivos alimentares naturais emergentes: Uma revisão

Recebido em: 17/07/2020

Aceito em: 01/08/2020

10.46420/9786588319031cap3

Juliana Mendes Garcia Pereira^{1*}

Maysa Formigoni¹

Franciele Leila Giopato Viell¹

Giseli Cristina Pante¹

Evandro Bona²

Angélica Marquetotti Salcedo Vieira^{1,3}

INTRODUÇÃO

Aditivos alimentares são substâncias químicas incorporadas aos alimentos processados ou bebidas para melhorar as características organolépticas e atender às necessidades de produção, processamento, armazenamento e distribuição do produto. De acordo com seu uso industrial, os aditivos são classificados em 25 classes, que incluem uma infinidade de compostos com funcionalidades específicas que podem ser utilizados seguindo a legislação particular de cada país e uma política de segurança alimentar (Carocho et al., 2014; Carocho et al., 2018; Martins et al., 2019).

Os aditivos alimentares podem ser naturais ou sintéticos. Os primeiros, podem ocorrer naturalmente no alimento ou serem recuperadas de uma fonte natural, já os sintéticos, são definidos como substâncias artificialmente sintetizadas (Zeece, 2020) e representam a classe de aditivos mais utilizados na indústria devido sua estabilidade química, fácil aplicação e baixo custo. No entanto, nos últimos anos, a utilização de substâncias naturais em sistemas alimentares como substitutos às substâncias sintéticas passou a representar uma das principais tendências e desafios

¹Pós-graduação em Ciência de alimentos, departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Brasil.

²Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campo Mourão, Brasil.

³Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Brasil.

*Autor de correspondência: juliana_mendes_88@hotmail.com

da indústria de alimentos, principalmente devido à alta toxicidade e aos problemas alergênicos associados aos aditivos artificialmente sintetizados.

Este cenário tem impulsionado pesquisadores na busca por novas fontes naturais com potencial uso como aditivo alimentar. Corantes, aromatizantes, antioxidantes e agentes de corpo estão entre os aditivos mais comuns incorporados aos alimentos. Ainda que cheias de aspectos desafiadores, numerosas pesquisas têm sido realizadas e diversas fontes naturais têm sido testadas para obtenção de novos aditivos (Cuevas-Glory et al., 2020; Giuffrida et al., 2020; He et al., 2020; Jahurul et al., 2020; Lombardelli et al., 2020; Pataro et al., 2020; Böcker et al., 2020; Pardilhó et al., 2020; Dini et al., 2020; De Biaggi et al., 2020; Fidelis et al., 2020; Bernaerts et al., 2019).

Embora os aditivos naturais tenham seus méritos para as indústrias de alimentos, seu uso requer uma política rigorosa de segurança alimentar. A *European Food Safety Authority* (EFSA) e a *Food and Drug Administration* (FDA) são importantes órgãos governamentais que mundialmente legislam e supervisionam a aprovação e a regulamentação de novos aditivos alimentares. No Brasil, o órgão responsável por essa regulamentação é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Antes de ser autorizado o uso de um aditivo, este deve ser submetido a uma adequada avaliação toxicológica, em que se deve levar em conta, dentre outros aspectos, qualquer efeito acumulativo, sinérgico e de proteção, decorrente do seu uso (ANVISA, 2020).

Neste capítulo, apresentamos as recentes pesquisas relacionadas a novas abordagens para obtenção de aditivos alimentares de fontes naturais possíveis de suprir a demanda mundial de novos ingredientes. Este estudo fornece uma compilação de pesquisas relevantes que podem auxiliar o leitor em identificar tendências para a indústria de alimentos ou novas áreas de pesquisa.

FONTES NATURAIS EMERGENTES

Nos últimos anos, uma mudança significativa no perfil de consumo da população foi observada. Grande parte dos consumidores passou a se preocupar com os ingredientes contidos nos alimentos, tanto em relação a suas origens quanto ao destino assumido por estes quando ingeridos. Decorrente a isso, houve uma crescente percepção de que a ingestão de alimentos naturais ou pouco processados, associada a hábitos saudáveis, contribui para uma melhor qualidade de vida e conseqüentemente menor propensão a doenças metabólicas como obesidade, diabetes, dentre outras. Rótulos limpos, ou seja, sem a adição de aditivos sintéticos passaram a representar uma das principais tendências e desafios da indústria de alimentos.

A tentativa de adequação ao mercado consumidor atual tem impulsionado pesquisadores na busca por fontes de aditivos naturais e técnicas de recuperação emergentes. Pesquisas recentes têm demonstrado o potencial de diversas fontes naturais para extração ou recuperação de aditivos, ainda que repletos de aspectos desafiadores, como a estabilidade e sua interação com os compostos do alimento e no organismo. Antioxidantes, corantes, compostos aromáticos e agentes de corpo são as categorias de aditivos mais pesquisadas e novas abordagens acerca destes aditivos naturais foram revisadas neste capítulo.

Fontes vegetais têm representado a principal matriz para obtenção de compostos aromáticos naturais (Cuevas-Glory et al., 2020; Giuffrida et al., 2020; He et al., 2020; Jahurul et al., 2020; Kim et al., 2020; Liu et al., 2020; Mohd Ali et al., 2020), enquanto os pigmentos podem ser obtidos principalmente de resíduos industriais (Lombardelli et al., 2020; Pataro et al., 2020), algas ou microalgas marinhas (Böcker et al., 2020; Pardilhó et al., 2020), dentre outras (Dini et al., 2020; Silva et al., 2019). A pesquisa para extração de antioxidantes naturais tem sido extensiva e inúmeras matrizes têm sido avaliadas. Como para pigmentos e aromas, fontes vegetais (De Biaggi et al., 2020), subprodutos e resíduos industriais (Fidelis et al., 2020; Schneider et al., 2020) são os mais estudados. Algas ou microalgas e matrizes vegetais como flores tem sido estudadas para a recuperação de aditivos naturais que podem ser utilizados como agentes de corpo (Bernaerts et al., 2019).

Fontes naturais para obtenção de antioxidantes

A definição mais aceitável de um antioxidante se dá por ser "uma substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou impede a oxidação do mesmo" (Halliwell, 1990). Esta é uma definição universal e é válida para diferentes ações dos antioxidantes, como, por exemplo, a de combate aos radicais livres no organismo ou ação antioxidante em alimentos atuando nos processos de conservação como um aditivo alimentar.

Todas as substâncias antioxidantes seguem um dos sete mecanismos de ação que variam de acordo com o tipo de oxidante e atuam em: a) sequestro de radicais livres do meio; b) quelação de íons metálicos; c) inibição de enzimas produtoras de radicais livres; d) ativação de enzimas antioxidantes endógenas; e) prevenção de peroxidação lipídica; f) prevenção de danos ao DNA; g) prevenção de modificação de proteínas e destruição de açúcar (Carocho et al., 2018).

Os antioxidantes usados como aditivos alimentares são empregados com a finalidade de prolongar a vida útil dos alimentos, impedindo a rancificação, a perda de cor, desenvolvimento de odores, perda de textura, entre outros fenômenos que ocorrem em produtos alimentícios. As reações que protegem os alimentos são as mesmas que protegem as células dos organismos biológicos e têm um objetivo específico, evitar a oxidação, permitindo que os alimentos estejam em boas condições por mais tempo (Wu et al., 2019).

Os antioxidantes permitidos pela Anvisa para uso como aditivos alimentares são: ascorbatos (E300 - E304), tocoferóis (E306 - E309), galatos (E310 - E312), erytrobatos (E315 – E316), butilatos (E319 - E321), lactatos (E270, E325-E327), citratos e tartaratos (E330-E333; E380), tartaratos (E334 - E337; E353 - E354), fosfatos (E338-E345), malatos (E350 - E352), adipatos (E355 - E357); ácido succínico (E363), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (385), extratos de alecrim (E392) (Carocho et al., 2018).

O emprego de antioxidantes sintéticos se tornou muito popular nas indústrias alimentícia, médica, agrícola e farmacêutica. No entanto, diversos estudos demonstram a grande toxicidade de alguns destes compostos. Por este motivo, surge a necessidade cada vez maior de desenvolver metodologias de extração e purificação e estabilização visando à obtenção e utilização de antioxidantes naturais, especialmente de fontes vegetais (Júnior et al., 2019; Shahet al., 2014; Wu et al., 2019).

A Figura 1 esboça a classificação dos antioxidantes naturais e os principais subgrupos de compostos com propriedades antioxidantes.

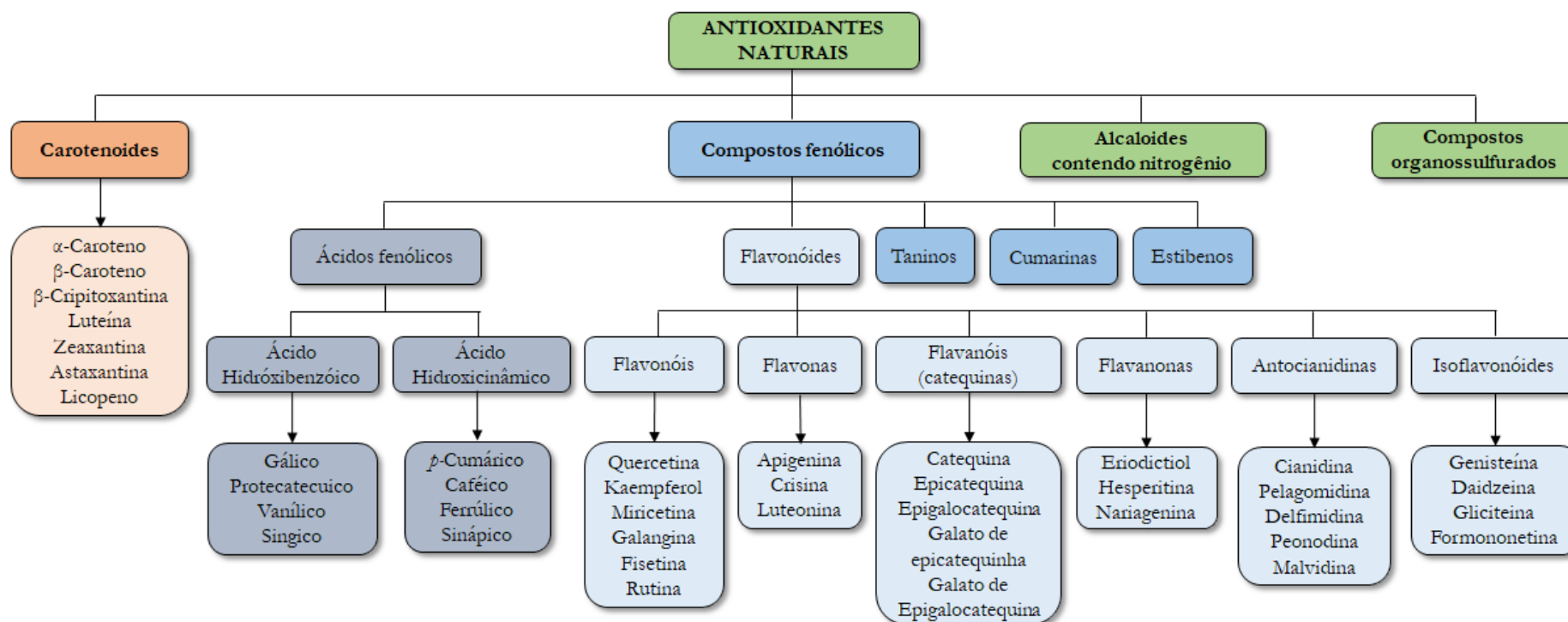


Figura 1. Fluxograma das classes dos antioxidantes naturais e os principais subgrupos de compostos com propriedades antioxidantes.

Fonte: Adaptado de Liu (2004), Rojas e Buitrago (2019), Vuolo et al. (2019).

Atualmente a literatura lista diversas fontes naturais emergentes de antioxidantes que podem ser usadas como aditivos alimentares. Os produtos cárneos processados são exemplos de alimentos que utilizam uma grande quantidade de aditivos alimentares, ligados principalmente à conservação, sendo a grande maioria sintético, como nitritos e nitratos. Decorrentes a isso, muitos estudos buscando novas fontes de antioxidantes naturais foram realizados. A Tabela 1 lista algumas fontes de antioxidantes naturais oriundas de frutos exóticos usadas para estes produtos com antioxidantes. É notável que as fontes vegetais e os subprodutos vegetais ou mesmo resíduos industriais são os mais estudados, onde é possível recuperar produtos com alto valor agregado em comparação aos que antes seriam descartados.

Tabela 1. Fontes emergentes de antioxidantes naturais usadas para produtos cárneos.

Fonte	Aplicação alimentar	Referência
Aspargos (<i>Asparagus racemosus</i>)	Utilização do aginato de cálcio extraídos de aspargos para o desenvolvimento de um novo filme comestível.	Nooret al., (2018)
Madeira de carvalho	Utilização de extratos pressurizados de madeira de carvalho como conservante natural de rissóis de porco em comparação com o uso de ascorbato de sódio como conservante sintético.	Soriano et al. (2018)
Extrato de orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	Substituição do eritorbato de sódio pelo extrato de orégano nas concentrações de em hambúrguer de cordeiro.	Fernandes et al. (2017)
Polissacarídeos isolados do subproduto casca externa de pistache (<i>Pistacia vera</i> L.)	Testar a adição de polissacarídeo extraídos da casca de pistache em formulações de carne moída e comparar com a adição de antioxidante sintético (hidroxitolueno butilado-BHT).	Hamed et al. (2020)
Águas residuais (AWW) da prensa a frio do abacate.	Comparação de formulações de linguiça de porco adicionadas do pó da água residual seco por pulverização a 160 ° C (AWW) com lotes acrescidos de eritorbato de sódio (E316).	Permal et al. (2020)
Erva Beldroega (<i>Succulentia, Portulaca oleracea</i> L.)	Testar adição do extrato da erva (POE) em amostra de carne de porco, e comparar a uma formulação sem conservante e outra com adição do antioxidante sintético BHA (hidroxil anisole butilado).	Fan et al. (2019)
Extratos de sálvia (<i>Salvia officinalis</i> L.)	Testar os benefícios da adição de extratos de sálvia, tanto etanólicos quando aquosos, além de óleo essencial de sálvia em amostra de carne de frango mecanicamente separadas.	Cegielka et al. (2019)
Inflorescência da banana	Extrato obtidos de folhas masculinas foi o selecionado para ser usado em formulações de embutidos.	Rodrigues et al. (2020a)
Resíduos da indústria de Romã	Investigado efeito da inclusão de subproduto de romã, como cascas, sementes e membranas, na dieta de cordeiro em relação a estabilidade oxidativa da carne.	Natalello et al. (2020)
Extrato de polifenóis de folhas de eucalipto (EPE)	Avaliar a atividade antioxidante da EPE <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> e avaliar seu efeito na qualidade da carne de frango.	Li et al. (2020)

As matrizes vegetais são fontes em destaque para obtenção de antioxidantes naturais. Mesmo não sendo uma fonte inovadora de fitoquímicos, um trabalho realizado com uvas verdes se mostrou interessante pois, além de usar um rejeito industrial, o método de extração utilizava o extrato diluído em água destilada, centrifugado e eluído por uma membrana de 0,45 µm para separação dos antioxidantes. Essa separação dos compostos resultou em uma fonte satisfatória para obtenção de polifenóis com boa ação antioxidante em matrizes alimentares proteicas (Bucalossi et al., 2020).

Outras matrizes inovadoras e abundante são as árvores, que podem ser grandes fontes de antioxidantes. A partir disto, foi extraído e caracterizado o extrato obtido da árvore oriental *Hovenia dulcis* Thunberg, demonstrando que esta possui altos níveis de catequinas ($157,18 \pm 34,34$ mg/100 g peso seco) e outros compostos fenólicos responsáveis pelas propriedades antioxidantes (De Biaggi et al., 2020). Outra árvore bastante estudada é a *Moringa oleifera* Lam., conhecida como árvore da vida, que apresenta uma grande gama de estudos sobre todas as partes que a constitui. As folhas possuem polifenóis (35,19 mg/g de folha seca), sendo os antioxidantes pertencentes ao grupo dos flavonóides, como kempferol, rutina e quercetina os compostos antioxidantes mais abundantes dessa matriz vegetal (Rocchetti et al., 2019).

A alta quantidade de compostos bioativos presentes nos coprodutos de frutas pode ser utilizada como aditivo alimentar natural, principalmente considerando que os resíduos agroindustriais são ricos em fitoquímicos. A cereja da cornalina (*Cornus mas* L.), muito utilizada como alimento na Europa, demonstrou ser uma fonte considerável de vitamina C (48-108 mg/100 g), ácido málico (104-375 mg/100 g) e polifenóis totais (158-591 mg EAG/100 g) (Martinović; Cavoski, 2020).

Nos últimos anos, os chamados frutos exóticos têm se destacado como fontes emergentes de moléculas antioxidantes. No Brasil, um exemplo importante é o camu-camu (*Myrciaria dúbia* -H.B.K.) Mcvaugh) uma fruta economicamente relevante para a região amazônica (Conceição et al., 2019). Foi verificado que a mesma apresenta alto conteúdo de ácido ascórbico ($1882 \pm 43,2$ mg/100 g de fruta), ainda mais expressivo do que os apresentados pela acerola e jabuticaba, conhecidas por serem excelentes fontes de vitamina C (Rodrigues et al., 2020b).

Ainda para camu-camu, ao investigar a semente deste fruto, que é comumente descartada pela indústria de processamento de polpas, verificou um teor de compostos fenólicos totais de 43,6 g de EAG/100 g de extrato, sendo os flavonóides (vescalagina, castalagina, eepicatequina) a classe de compostos bioativos predominante (Fidelis et al., 2020).

O polissacarídeo extraído do bagaço da fruta guavira (*Campomanesia adamantium*), considerado um resíduo agroindustrial, foi testado como agente antioxidante em farinha. A adição do bagaço na concentração de 50 µg/mL promoveu uma eliminação de 67,4% de radicais livres em um ensaio de capacidade antioxidante equivalente em trolox (Schneider et al., 2020). Outra baga exótica, a jabuticaba da espécie (*Plinia trunciflora* -O. Berg, Kausel) têm se destacado como fonte promissora de antocianinas bioativas. O fruto cultivado na Sicília, Itália, apresentou um conteúdo fenólico total de 1201,05 mg EAG/100 g de fruto, sendo as antocianinas os compostos majoritários. O teste de atividade antioxidante celular mostrou que o extrato hidroalcolico da casca de jabuticaba, apto para utilização em alimentos, impediu a peroxidação lipídica em células HepG2 com maior eficácia do que frutas mais conhecidas como romã, amora, framboesa e mirtilo (Mannino et al., 2020).

Mais recentemente, as flores comestíveis estão recebendo um interesse renovado como fontes de moléculas bioativas. Um trabalho bastante interessante demonstrou o poder antioxidante de diversas flores tipicamente brasileiras, como *Amaranthus hypochondriacus*, *Tropaeolum majus*, *Tropaeolum majus* e *Spilanthus oleracea* L, detectando em todas as amostras a presença dos ácidos fenólicos *p*-carmárico e ferúlico, além do flavonoide kaempferol (Barros et al., 2020).

As flores das espécies *Hibiscus rosa-sinensis* L. e o *Hibiscus syriacus* L., da família *Malvaceae*, além de muito usados na área ornamental e gastronômica, vêm ganhando espaço como flores comestíveis não convencionais, uma alternativa para alimentação natural. Decorrente a isso, muitos estudos são realizados com a intenção de identificar e extrair compostos antioxidantes dessa flor e, há o relato de muitos compostos pertencentes ao grupo dos flavonóides em quantidades consideráveis em suas flores (Rengarajan et al., 2020).

Fontes naturais para obtenção de agentes de corpo

Outros aditivos alimentares muito importantes são os responsáveis pelas características de textura e palato. Os atributos reológicos são um dos aspectos de qualidade mais relevantes nos produtos alimentícios, não apenas pela aparência física (e.g. criando textura desejada ou impedindo os fenômenos de separação de fases durante o armazenamento), mas também em termos de percepção sensorial, como a sensação na boca de um alimento, durante o seu consumo.

É notada uma diferenciação quando empregado o termo agente de corpo, onde quando usado, pode ser além de associado com mudança de textura do alimento, também com outras características, como por exemplo os polióis (monossacarídeos e dissacarídeos hidrogenados),

que são utilizados também como adoçantes por possuírem dulçor bastante variável e baixa caloria, ou mesmo as algas, que em adição proporcionam um enriquecimento de fibras alimentares para o produto adicionado (Bernaerts et al., 2019).

Os polissacarídeos são os agentes de corpo mais conhecidos. Um exemplo deste aditivo são os amidos, podendo ser usados como agente espessante, ligante, adoçante e emulsificante. No entanto, o uso do amido apresenta limitações de estabilidade estrutural sob condições extremas de pH e cisalhamento, podendo sob estas condições sofrer retrogradação. Assim, a mistura com hidrocolóides, como goma arábica, goma guar, goma xantana, goma de alfarroba, gelatina e pectina é uma das maneiras de manipular as propriedades do amido (Mahmood et al., 2017).

Uma fonte emergente de agente de corpo são as microalgas, que além de poderem ser usada como um texturizante, devido a sua grande quantidade de biopolímeros estruturais, podem ainda agregar valor nutricional ao alimento, como, por exemplo, vitaminas, minerais, proteínas com aminoácidos essenciais, ácidos graxos poliinsaturados, antioxidantes e fibras alimentares (Bernaerts et al., 2019).

As cianobactérias, como a spirulina, também conhecidas como algas verde-azuladas são uma das principais tendências da indústria de alimentos. Com aproximadamente 70% do seu peso seco composto por proteínas, essa microalga também é uma fonte rica de outros compostos de alto valor agregado, como clorofilas, carotenóides e ficobiliproteínas (Lafarga et al., 2020). Devido a sua disponibilidade de biopolímeros estruturais, a spirulina é usada como agente de corpo, além de promover a melhora nutricional dos alimentos em que ela é adicionada (Bernaerts et al., 2019; Lafarga et al., 2020).

Outra fonte bastante inovadora de biopolímeros estruturais são as flores. A calêndula (*Calendula officinalis*), conhecida como margarida, usada para retirada de óleo essencial e na indústria de pigmentos naturais, pode ser usada para retirada de polissacarídeos com propriedades viscoelásticas e com alta estabilidade térmica (Slavov et al., 2020).

A celulose bacteriana, considerada um polissacarídeo puro que pode ser obtido a partir da fermentação do vinagre, possui ótimas propriedades em comparação a celulose derivada de plantas, incluindo alta capacidade de retenção de água, alta área superficial, propriedades reológicas e biocompatibilidade (Lin et al., 2020).

Sendo assim, essa celulose pode ser usada como novas emulsões *Pickering* de grau alimentício (emulsões estabilizadas por um agente sólido que diminui a tensão superficial,

fazendo com que a emulsão seja mais estável), com grande potencial para fornecer substâncias bioativas lipofílicas para indústria de alimentos.

Cascas de árvores também podem ser fontes de gomas alimentícias usadas como estabilizantes, espessantes, emulsificantes e auxiliares de formulação. Árvores bastante encontradas no cerrado, como *Cochlospermum gossypium* e outras espécies de *Cochlospermum* pertencentes à família *Bixaceae*, produzem um polissacarídeo natural denominada kondagogu (KG) que não apresentam nenhuma toxicidade, podendo então ser usadas como aditivos alimentares (Puskuri et al., 2017).

Levando em conta a grande produção de resíduos ricos em nutrientes (atualmente a agricultura global produz por ano cinco bilhões de toneladas métricas de biomassa residual), os biopolímeros estruturais com perspectivas de aplicabilidade em matrizes alimentares podem ser obtidos da indústria de beneficiamento da fruta banana através, por exemplo, a extração de nanopolímeros da inflorescência da banana ou mesmo emulsificantes retirados dos rejeitos oriundos da indústria de beneficiamento da azeitona (indústria de azeite) (Alzate-Arbeláez et al., 2019; Bharathiraja et al., 2017; Koliastasi et al., 2020).

Fontes naturais para obtenção de aroma

O aroma pode ser caracterizado como uma percepção quimiossensorial captada por nossos receptores sensoriais. Os responsáveis por estas sensações, de dar ou reforçar o aroma, são um vasto grupo de substâncias ou mistura de substâncias orgânicas com propriedades aromáticas, das quais podemos citar os alcanos e alcenos de cadeia curta (com ou sem oxigênio, nitrogênio ou enxofre), álcoois, ésteres, cetonas e ácidos orgânicos. Estas substâncias voláteis são percebidas pelos receptores de odor do sistema olfativo. Dentre estes compostos químicos, tem-se grande destaque a classe dos terpenos, que são metabólitos secundários produtos do metabolismo que estão distribuídos de forma abundante pela natureza e são responsáveis por características odoríferas em plantas, frutas, fungos e animais (Castro-Muñoz, 2019). Vale ressaltar que estes compostos não estão associados a propriedades nutricionais dos alimentos, mas sim, a características sensoriais.

Buscando adequação ao mercado consumidor atual, que tem demonstrado um crescente interesse em produtos naturais, a indústria de alimentos teve de buscar meios para atender rapidamente a esta nova demanda, investindo em novas tecnologias, formulações, bem como na busca por ingredientes de origem natural como alternativa de substituição aos ingredientes sintéticos, dentre outras estratégias. Isto fez com que, nas últimas décadas, houvesse uma

escassez significativa de várias fontes naturais, a exemplo da baunilha e hortelã pimenta (Dunkel et al., 2014).

A substituição de aromatizante sintético pelos naturais na maioria dos casos se tornou um obstáculo. Houve a necessidade do desenvolvimento de técnicas “verdes” ou “mais ecológica” para biossíntese destas moléculas, bem como a descoberta de outras fontes naturais de aromas. É provável que a melhor opção para recuperação destes compostos, a partir de fontes naturais, seja a extração e purificação e atualmente para tal fim, várias técnicas já foram propostas. No entanto, a recuperação destes compostos não é uma tarefa fácil, visto que devido a sua instabilidade, durante as etapas de obtenção estes estão propensos a reações de hidrólise, oxidação e degradação térmica (Saifullah et al., 2019).

Buscando fornecer aromas de origem natural para suprir a demanda atual das indústrias de alimentos e cosméticos, pesquisadores trabalham para identificar, extrair e purificar aromas que possam ser destinados a estes fins. Inúmeros trabalhos com objetivo de identificar fontes de aromas em produtos naturais foram publicados nos últimos anos e na maioria, são investigados frutos exóticos inteiros ou em partes, produtos vegetais diversos, como a pimenta, e resíduos agroindustriais, ervas aromáticas, cogumelos, dentre outros (Tabela 2). No entanto, explorar as novas fontes, obter e utilizar estes aromas não se torna uma tarefa fácil devido à grande quantidade e variedade destes compostos químicos e da maneira individual de como eles são percebidos pelos nossos sentidos.

Quando se obtém um extrato, há uma enorme complexidade química nas frações voláteis e uma grande diferença nas concentrações dos compostos. Estima-se que há aproximadamente 10.000 voláteis diferentes em alimentos (Dunkel et al., 2014), no entanto, como saber quais voláteis são responsáveis pelas principais características de odor daquela determinada matriz? Podemos pensar que a concentração é diretamente proporcional às características de odor?

Para responder a estas perguntas, pesquisadores começaram a investigar a contribuição dos odores individuais para um determinado aroma alimentar e propuseram o conceito de valores de atividade de odor (OAV) pela primeira vez em 1957. O OAV é definido como a razão entre a concentração de um único composto e o limiar de odor desse composto. Acredita-se que os compostos com OAVs maiores contribuam mais para as propriedades gerais de odor de uma substância (Sun et al., 2020).

Os fatores extrínsecos e intrínsecos ao cultivo dos produtos também influenciam diretamente nas características de aroma. A exemplo, pesquisadores que pesquisaram a composição volátil de quatro ervas aromáticas (endro, salsa, coentro e hortelã) colhidas em datas

diferentes, demonstraram que há uma diferença na concentração de compostos voláteis quando colhidas em semanas diferentes e que para cada caso, deve-se conhecer o momento ideal da colheita para que a máxima concentração de voláteis possível possa ser obtida (El-Zaeddi et al., 2020).

A estabilidade do odor e sabor com um nível adequado de força também é uma grande preocupação dos processadores de alimentos. Isso ocorre por possuir uma forte relação com a qualidade e a aceitabilidade das matrizes alimentares. Como já abordado anteriormente, as moléculas responsáveis por conferir aroma são voláteis e muito sensíveis a condições como ar, calor, luz e umidade. Com o objetivo de reduzir o nível de degradação e preservar a originalidade do sabor e aroma, ingredientes voláteis pré-encapsulados podem ser usados em alimentos e bebidas e para isso, metodologias de micro e nano encapsulação são empregadas.

Tabela 2. Fontes emergentes de possíveis aromatizantes naturais, identificação dos compostos e descrição das características de odor.

Fonte	Principais compostos odoríferos identificados	Descrição das características	Referência
Pimenta Habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.) var. Mayapan	δ -cadineno, 2-metilpropanoato de 3-metil-butil e 3,3-dimetilciclo-hexanol.	Notas doces e frutadas.	Cuevas-Glory et al. (2020)
Pimenta Habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.) var. jaguar	2-metilpropanoato de 3-metilbutil e 2-metilbutanoato de 2-metilpropil, penitanoato de hexil e δ -cadineno.	Pungente intenso devido principalmente ao 3,3-dimetilciclohexanol.	Cuevas-Glory et al. (2020)
Aroeira (<i>Schinus molle</i> L.)	sabineno, 1-hexanol, óxido trans-linalol (furanoide), terpinen-4-ol, β -eudesmol.	Levemente pungente, frescor, amadeirado. Lembra uma pimenta preta mais sutil, sem o calor.	Giuffrida et al. (2020)
<i>Semnostachya menglaensis</i> Tsui (S. menglaensis)	1-Octen-3-ol, 2-Propionil-1-pirrolina, 2-Acetil-3,4,5,6-tetra-hidropiridina, 2-Propionil-3,4,5,6- tetra-hidropiridina, 2-Propionyl-1,4,5,6- tetra-hidropiridina e linalol.	Aroma que lembra arroz basmati, pão e pipoca.	He et al. (2020)
Semente de rambutan (<i>Nephelium lappaceum</i> L.)	ácido 3-metilbutanóico, dimetilsilanodiol, 2-furanmetanol, furfural, 5-metil-2-furancarboxaldeído, trimetilpirazina e tetrametilpirazina.	Aroma semelhante ao de cacau em pó. Aroma presente de caramelo, cozidos, amadeirados, amêndoas, nozes e café.	Jahurul et al. (2020)
Omija (<i>Schisandra chinensis</i> Baillon)	4-terpineol e α -terpineol.	Aroma picante e de madeira úmida.	Kim et al. (2020)
Cinza espinhosa alada (<i>Zanthoxylum armatum</i> DC)	-(+)-linalol, β -mirceno, citronelol, (+)-limoneno e geraniol.	Notas de especiarias amadeiradas, cítricas, doces e florais.	Liu et al. (2020)

Fontes naturais para obtenção de corantes

A cor é um dos atributos mais relevantes na hora de se escolher um alimento. A coloração, do ponto de vista sensorial, pode estimular a compra/consumo ou gerar uma redução ou aumento da aceitação deste produto pelo consumidor. Corantes são substâncias capazes de conferir cor onde forem adicionados. Os alimentos, de maneira geral, possuem suas próprias substâncias corantes que são responsáveis por atribuir colorações características. No entanto, fatores extrínsecos como luz, temperatura, oxigenação, dentre outros, podem alterar a estabilidade destes compostos durante processamento ou armazenamento causando alterações na coloração (Corrêa et al., 2019). Como estratégia a uma melhor aceitação sensorial de seus produtos, a indústria emprega corantes naturais ou artificiais na formulação de seus produtos.

Embora os pigmentos artificiais apresentem estabilidade superior, um portfólio variado de cores e sejam comercialmente atrativos, o fato de serem obtidos por síntese química e não serem encontrados na natureza, seu consumo pode conferir efeitos negativos a saúde humana como déficit de atenção, hiperatividade, irritabilidade, sono perturbado e agressividade em crianças, alergias e até respostas cancerígenas. Essas características, conferem uma não aceitação e redução de consumo (Albuquerque et al., 2020).

Deste modo, a substituição dos corantes artificiais por naturais se tornou um grande desafio para a indústria alimentícia. Os pigmentos naturais podem ser obtidos de tecidos vegetais, células animais, metabolismo microbiano ou fontes minerais. A busca por pigmentos oriundos destas fontes, a exemplo das antocianinas, carotenóides, betalainas, clorofilas, dentre outros, todas muito abundantes em matrizes vegetais, tiveram um número expressivo de pesquisas nos últimos 5 anos, demonstrando desta forma, o crescente interesse dos pesquisadores e indústria por novas fontes de pigmentos naturais (Corrêa et al., 2019). Observa-se que a maioria dos estudos se concentram em matrizes vegetais, como frutas, legumes, algas e resíduos agroindustriais. Podemos ver na Tabela 3 algumas das fontes de obtenção, a forma e os parâmetros de obtenção, bem como os compostos obtidos com a coloração características.

Tabela 3. Fontes emergentes para extração e recuperação de corantes.

Fontes	Extração/purificação	Compostos e Coloração	Referências
Resíduos industriais de casca de tomate	Pré-tratamento com impulsos elétricos antes de uma extração sólido-líquido utilizando solvestes “verdes”.	Carotenóides com cor característica laranja, amarela e vermelha.	Pataro et al. (2020)
Tomates maduros não vendidos	Extração enzimática.	Carotenóides com cor característica laranja, amarela e vermelha.	Lombardelli et al. (2020)
Spirulina (<i>Arthrospira platensis</i>)	A ficocianina de <i>A. platensis</i> foi purificada (precipitação, centrifugação e diafiltração) e tratada termicamente em um processo contínuo e escalável.	Ficociana de coloração azul natural.	Böcker et al. (2020)
Alga marinha marrom (<i>Saccorhiza polyschides</i>)	A clorofila a foi encontrada como o pigmento predominante na biomassa, com um máximo extraído com 90% de acetona. Carotenóides e fucoxantina também podem ser extraídos com metanol.	Clorofila com coloração esverdeada, carotenoides e fucoxantina com coloração avermelhada.	Pardilhó et al. (2020)
Ahipa ou inhame andino (<i>Pachyrhizus ahipa</i>)	Extrato de antocianinas com potencial para pigmentação natural, no entanto, apresentando instabilidade dos pigmentos ao aumento do pH.	Antocianinas com coloração púrpura, lilás ou roxo.	Dini et al. (2020)
Amora (<i>Rubus ulmifolius</i> Schott)	Extração de antocianinas usando calor com etanol acidificado com ácido cítrico (pH 2,5) com condições otimizadas (20 min, 56,87 °C e etanol 46,07%). Aplicação dos pigmentos a rosquinhas que apresentaram coloração rosa/lilás estável após o cozimento.	Antocianinas com intensa vermelho-bordô.	Silva et al. (2019)
Arroz integral (<i>Oryza nivara</i>)	Extração por maceração utilizando metanol acidificado e concentração do extrato usando temperatura e vácuo.	Antocianinas com coloração lilás.	Anggraeni et al. (2019)
Cogumelos boletus (<i>Boletus edulis</i>)	Extrato pigmentado obtido por extração hidroalcolica em ultrassom. Pigmento estável em baixas temperaturas e pH na faixa (3-5), porém instável a luz.	Pigmento rosa.	Guo et al. (2020)
Casca de limão (<i>Citrus limonum</i>), cenoura (<i>Daucus carota</i>) e folhas de acelga (<i>Beta vulgaris</i>)	Extração e isolamento de carotenoides com melhor resultado para o solvente isopropanol a 60°C por 3h e separação com éter dietílico: metanol (2:1), respectivamente. O pigmento recuperado foi aplicado	Luteína com pigmentação alaranjada e amarela.	Al-Ali et al. (2020)

na fabricação de doces.

Dentre os principais corantes naturais, tem-se **as** antocianinas que, são flavonoides encontrados em abundância em matrizes vegetais. Sua estrutura química (diferenças no número de grupos hidroxila e metoxila presentes na estrutura) é um fator de diferenciação das várias antocianinas presentes na natureza e interferem diretamente na sua coloração e estabilidade. Quanto mais hidroxilada, tende-se a coloração azul e quanto mais metilada, tende-se a coloração vermelha e compostos mais estáveis. Existem mais de 600 tipos de antocianinas presentes na natureza, sendo as mais comuns cianidina, pelargonidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina. A estabilidade das antocianinas obtidas de fontes naturais é muito importante e um fator limitante para sua utilização na indústria de alimentos. A forma mais estável das antocianinas é em baixos valores de pH (1-2) com coloração vermelha. Conforme há elevação do pH do meio, a estabilidade é alterada e sua coloração muda (incolor 4-5, azul 6-6,5, amarelo pálido 7-9 e azul escura superior a 9). As antocianinas geralmente são estáveis a presença de luz, oxigênio e a altas temperaturas, no entanto, quando superior a 100 °C podem ocasionar sua degradação e limitar sua aplicação a alimentos que necessitem de tratamento térmico com temperaturas elevadas (Albuquerque et al., 2020; Conceição et al., 2019). As betalainas que, são pigmentos compostos por uma estrutura nuclear nitrogenada, formada a partir de ácido betalâmico. Atualmente, mais de 75 betalainas já foram descritas em tecidos vegetais. São solúveis em água, o que facilita sua aplicação na indústria de alimentos. São divididas em betacianina (responsáveis pela coloração vermelho-violeta) e betaxantina (responsáveis pela coloração amarela). Betalainas podem ser facilmente encontradas em beterraba, diversos frutos de cactos, pitaya, dentre outros. Em relação a sua estabilidade, são estáveis a uma faixa de pH 3-7, sendo as betaxantinas mais estáveis em pH neutro e as betacianinas em pH ácido. Abaixo desta faixa, há instabilidade e alteração da cor para azul-violeta, já acima, a mudança ocorre para marrom-amarelado. Também são instáveis a luz, oxigenação e presença metais e temperatura, por isso, indica-se adicioná-las aos alimentos após o tratamento térmico (Albuquerque et al., 2020; Corrêa et al., 2019). Os Carotenoides que, são pigmentos lipossolúveis que nos vegetais, são responsáveis por conferir coloração amarela, laranja ou vermelha. Mais de 1000 carotenóides já foram descritos, mas apenas 40-50 tipos são consumidos na dieta humana e os principais encontrados nos alimentos são: β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina e dentre algumas fontes, podemos citar: tomate, buriti, pitanga, tucum, pimenta, abóbora, uva, resíduos de manga e pêssgo, dentre outros. Quando comparados com outras classes de pigmentos, os carotenoides possuem maior estabilidade ao pH e suas alterações, no entanto, são altamente susceptíveis a alterações de cor devido a oxidação na presença de luz, oxigênio e

temperatura, limitando por este motivo, sua aplicação em alimentos (Albuquerque et al., 2020; Corrêa et al., 2019). As clorofilas, pigmento mais abundante do reino vegetal. São encontradas em cinco classes, diferenciando-se em suas estruturas químicas, e nomeadas de clorofila A-E, sendo a (azul esverdeada) e b (verde amarelada) as mais comuns em vegetais e frutas e geralmente são encontradas juntas na proporção 3:1. A principal fonte de obtenção são as folhas, no entanto, também ocorrem em frutos antes do processo de maturação. As algas também estão sendo exploradas como fonte. O pH ácido e a alta temperatura são fatores cruciais para a estabilidade das clorofilas, podendo ocorrer alteração da cor verde para o marrom (Albuquerque et al., 2020; Corrêa et al., 2019).

Até o momento, muitas pesquisas publicadas relacionam a obtenção de corantes naturais de alimentos. O processo comumente utilizado para obter corantes naturais consiste em várias etapas básicas: extração, filtração, concentração e secagem. Para extração, as formas mais utilizadas costumam empregar altas temperaturas e solventes tóxicos, no entanto, técnicas empregando ultrassom, pré-tratamentos solventes biosolventes estão sendo investigadas (Tabela 3). Para secagem, podemos citar duas técnicas importantes: atomização (*spray-drying*) e liofilização (*freeze-drying*).

Geralmente, a secagem por atomização tem o inconveniente de utilizar altas temperaturas, o que no caso de alguns tipos de pigmentos descritos anteriormente pode ser indesejável. Também, a utilização de alguns aditivos para estabilização no processo de secagem. Já a liofilização, é atrativa por produzir produtos de boa qualidade, inclusive sem a adição de estabilizadores de cor. No entanto, limitações estão associadas a essa técnica, incluindo os longos tempos de secagem e os altos custos operacionais.

Por esta razão, uma atenção crescente está sendo dedicada à técnica de secagem por congelamento por spray (*spray-freeze-drying*). Algumas tentativas foram feitas para usar essa técnica em materiais biológicos (e.g. proteína de soro de leite, albumina de ovo, café) e podem ser consideradas corantes naturais (Rózyło, 2020).

COMPOSTOS BIOATIVOS E A SUPLEMENTAÇÃO EM ALIMENTOS

Nas últimas décadas, ficou claro que os alimentos não são apenas ligados a uma fonte de energia e nutrição e isso resultou no aumento considerável da classe dos consumidores que buscam alimentos funcionais suplementados com compostos biologicamente ativos capazes de auxiliar na melhora imunológica do corpo humano. Além disso, o papel dos alimentos excede a

muitas outras funções que contribuem para a saúde e o bem-estar, como por exemplo, efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anticarcinogênicos. Esses compostos fitoterápicos são diferentes dos nutrientes, pois não são essenciais a estrutura dos alimentos e, atualmente, não existem valores de ingestão diária recomendados (Chugh; Kamal-Eldin, 2020; Ghosh et al., 2019).

A incorporação direta de compostos bioativos e nutracêuticos em produtos alimentícios deve ser muito bem estudada, já que, embora seja possível importar a ideia de ação desses compostos bioativos através das ciências farmacêuticas para a ciência dos alimentos, a questão da interação desse composto com a matriz alimentar é bastante singular para cada alimento (Mohammadian et al., 2020). Desta forma, adicionar um determinado composto ou extrato que tenha relato científico de determinada atividade biológica não necessariamente fará com o a ingestão do alimento proporcione tal benefício.

Para isso, os estudos relacionam desde a sua solubilidade, estabilidade dos compostos ativos durante a vida de prateleira do alimento, liberação sob digestão simulada, que depende de sua presença livre ou conjugada nas matrizes alimentares e, finalmente biodisponibilidade e bioeficácia *in vivo*, em animais e/ou diretamente em humanos, para evitar estudos com animais sempre que possível. Por fim, mas não menos importante, deve-se dar atenção as mudanças sensoriais relacionados à qualidade desse produto suplementado, como efeitos negativos na cor, textura, sabor e aparência (Bento-Silva et al., 2020; Mohammadian et al., 2020; Nowak et al., 2019).

Ainda, deve se considerar que as biomoléculas, antes da extração, estão dispersas em um meio complexo, podendo se comportar de forma sinérgica e, em muitos casos, estabilizadas pela própria mistura de elementos presentes em seu ambiente natural. No entanto, após a sua extração e isolamento, sua atividade fisiológica pode ser afetada, reduzida ou até mesmo completamente inativada. Para evitar isto, novas tecnologias podem ser propostas para reduzir ou até impedir a perda da funcionalidade desses compostos. Algumas técnicas, como a nanotecnologia podem ser usadas de forma promissora a fim de tornar os compostos bioativos mais estáveis, resolvendo suas restrições e aumentando sua aplicação industrial (Giaconia et al., 2020).

Efeitos biológicos

O conhecimento sobre o uso potencial de alimentos ou suplementos alimentares para o manejo das principais doenças é útil. Muitos candidatos a aditivos alimentares obtidos de fontes naturais e que possuem funções relacionadas às características sensoriais, como os corantes, aromatizantes e agentes de corpo, podem desempenhar outras funções importantes que os

configure como agentes nutracêuticos. Pesquisas, ao extrair e/ou purificar estes compostos, estudam também a sua biatividade *in vitro* e *in vivo*. A Tabela 4 demonstra os produtos naturais, a sua possível função e a atividade biológica encontrada.

Os compostos aromáticos, moléculas responsáveis pelo aroma de inúmeras substâncias, também apresentam propriedades terapêuticas. Componentes pungentes nas plantas ativam as membranas mucosas do trato respiratório aumentando a secreção e ajudam a combater microrganismos, bem como remover agentes indesejáveis. Muitos aromas também podem se comportar como expectorantes, descongestionantes, antitússicos, antimicrobianos e bons para doenças respiratórias. Compostos com mentol (em hortelã) e timol (encontrado em tomilho) são poderosos antimicrobianos, anti-inflamatórios e antioxidantes (Lim; Mohamed, 2016; Van Vuuren; de Rapper, 2020).

Além disso, a aromaterapia vem ganhando destaque no cenário dos aromas e óleos essenciais. Trata-se de uma técnica natural que consiste na inalação de óleos essenciais para causar o efeito terapêutico desejado. A técnica utiliza aromas e seus compostos liberados por óleos essenciais para tratamento de alguns sintomas como ansiedade, depressão, insônia, dentre outros, bem como, promoção de bem-estar e fortalecimento do sistema autoimune (Van Vuuren; de Rapper, 2020).

Os pigmentos de origem natural, além de suas propriedades corantes, também estão relacionados a benefícios terapêuticos. A exemplo, as antocianinas ganharam destaque por estarem relacionadas ao controle do diabetes, prevenção de doenças cardiovasculares e prevenção e tratamento de distúrbios neurológicos. Além disto, sabe-se que os carotenóides têm capacidade antioxidante e como precursores da vitamina A (Albuquerque et al., 2020).

Ainda, existem inúmeras evidências experimentais que descrevem o papel protetor dos ácidos fenólicos em doenças degenerativas e cardiovasculares, câncer, diabetes, inflamação, dentre outras. No entanto, a intensidade das atividades biológicas mostradas depende principalmente de sua biodisponibilidade, responsável pela proporção de sua absorção, digestão e metabolismo após a entrada no sistema de circulação. O ácido gálico é o ácido hidroxibenzóico mais estudado para absorção e metabolismo e confirma sua grande capacidade de absorção (Kumar; Goel, 2019).

Tabela 4. Fontes naturais, compostos individuais ou majoritários e seus benefícios fisiológicos reportados.

Fontes	Compostos	Efeito biológico	Referência
Louro (<i>Laurus nobilis</i> L.), corniso pagode (<i>Cornus alternifolia</i> L.), amoreira (<i>Morus atropurpurea</i> Roxb.), juçara (<i>Euterpe edulis</i> M.) e <i>Haskap berries</i> (<i>Lonicera caerulea</i> L.)	Cianidina 3-O-glucosídeo, a principal antocianina em várias frutas	Anti-obesidade, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais.	Albuquerque et al. (2020)
Pitaya (<i>Hylocereus polyrhizus</i>), <i>Opuntia engelmannii</i> Salm-Dyck ex Engelm, <i>Stenocereus stellatus</i> vermelho (Pfeiffer) Riccobono, <i>Stenocereus pruinosus</i> Laranja (Otto) Buxb., <i>Stenocereus pruinosus</i> vermelho (Otto) Buxb.	Fonte de betalaínas (com maior componente a indicaxantina)	Redução da peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas e atividade anti-inflamatória	
Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.), Manga (<i>Mangifera indica</i> L.), Mangostão (<i>Garcinia mangostana</i> L.), Mamão Papaya (<i>Papaya Carica</i> L.), Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	Licopeno	Prevenção do câncer de próstata, mas também mostrou efeitos promissores em outras linhas de células tumorais, doenças cardiovasculares e outros distúrbios causados por estresse oxidativo.	
Laranja (<i>Citrus nobilis</i> Lour), Pimenta (<i>Capsicum annuum</i> L cv Orlando), Jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.), Salak (<i>Salacca edulis</i>), Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i> L.), Uva (<i>Vitis vinifera</i> L.)	β -caroteno	Potencial para reduzir doenças cardiovasculares e exibir efeitos anticâncer.	
Pistache (<i>Pistacia vera</i> L.), casca de limão (<i>Citrus limonum</i>), cenoura (<i>Daucus carota</i>), Folhas de acelga (<i>Beta vulgaris</i>) Flores amarela e laranja de calêndula (<i>Tagetes erecta</i> L.)	Carotenoides como luteína e zeaxantina	Propriedades benéficas para problemas de visão, prevenindo a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e as cataratas.	Al-Ali et al. (2020; Albuquerque et al. (2020; Kurniawan et al. (2019)
Frutos e folhas do gênero Citrus (limão, toranja, lima, tangerina, dentre outras).	Limoneno	Efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antinociceptivos, anticâncer, antidiabéticos, anti-hiperalgésicos, antivirais e gastroprotetores, entre outros efeitos benéficos para a saúde.	Vieira et al. (2018)
Citrus, eucalipto (<i>Eucalyptus dives</i>), alecrim	D-limoneno, pineno e	Auxiliam na limpeza do o muco descongestivo dos	Lim;

<i>(Rosmarinus officinalis)</i> e Pinheiro <i>(Pinus sylvestris)</i>	eucaliptol	pulmões de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica.	Mohamed, (2016)
Funcho <i>(Foeniculum vulgare)</i> , Curcuma <i>(Curcuma domestica valetan)</i> , Sândalo <i>(Santalum álbum)</i> , <i>Cuscuta reflexa</i> , <i>Withania somnifera</i> , <i>Emblica officinalis</i> , manga <i>(Mangifera indica)</i> , cenoura <i>(Daucus carota)</i> , Melãozinho <i>(Momordica charantia)</i> , Manjerição <i>(Ocimum sanctum)</i> , <i>Psoralea corylifolia</i> , <i>Svertia chirayita</i> , erva moura <i>(Solanum nigrum)</i> , Alcaçuz <i>(Glycyrrhiza glabra)</i> , <i>Morua alba</i> , Chá-verde <i>(Camellia sinensis)</i>	Quercetina	Atividade antioxidante, antiviral, antimicrobiana, antiprotozoária, anticâncer, hepatoprotetoras e anti-hipertensivas e apresenta papel importante no tratamento da doença de Alzheimer.	El-Saber et al. (2020)
Algas verdes	Polissacarídeos de Enteromorpha (EPPs)	Imunomodulação, antibacterias, anti-hiperlipidemia, anti-tumoral, anti-câncer, anti-viral, propriedades anticoagulantes e regulam a microbiota intestinal.	Zhong et al. (2020)

METODOLOGIAS EMERGENTES PARA OBTENÇÃO E ESTABILIDADE DE ADITIVOS ALIMENTARES NATURAIS

Uma consideração bastante pertinente relacionada à extração de aditivos está na inovação, não só com as fontes emergentes, mas quanto às metodologias de execução dessa etapa. É sabido que muitos dos compostos investigados apresentam certa instabilidade térmica e rápida degradação quando expostos em demasia à luz, além de possuírem uma ampla variedade de grupos químicos constituintes (Sharma et al., 2019).

Decorrente a essa preocupação, surgiram as metodologias de extração chamadas de não convencionais, como ultrassom, ultraturrax, e micro-ondas que basicamente se diferenciam das convencionais, como maceração e agitação, por se preocuparem com o tempo de exposição ou a não exposição da amostra durante o processo a variáveis que influenciam na desestabilização, por controlarem minuciosamente o tempo do processo de extração, além do emprego de solventes que podem produzir extratos aptos a serem utilizados em alimentos, sem toxicidade.

Em relação ao emprego de solventes orgânicos nas extrações, houve uma crescente preocupação em substituí-los por solventes considerados ‘verdes’, ou seja, com menor ou nenhuma toxicidade comprovada, não agressividade ao meio ambiente, dentre outros fatores. Os mais comuns são a água, fluidos supercríticos, líquidos iônicos (LIs) e também solventes eutéticos profundos (SEP) (Shabani et al., 2020).

Os mais inovadores, como os LIs, surgem como uma alternativa limpa, para quase todos os solventes, podendo ser empregados na sua forma puros ou em conjunto com outro solvente. Basicamente os líquidos iônicos são compostos de um cátion de amônio e fosfônio que tem a capacidade de formar pares iônicos ou complexos com os íons metálicos em matriz aquosa, obtendo alta eficiência e propriedades físico-químicas únicas, como pressão de vapor desprezível, alta estabilidade térmica e não inflamabilidade (Guleria et al., 2020).

Já os solventes SEP, tem a capacidade de dissolver compostos orgânicos, possuem custo reduzido além de baixa toxicidade. Esse solvente baseia-se na mistura de um ou mais pares que englobam um aceitador e um doador de ligação de hidrogênio que, em proporções molares apropriados, geram fortes interações intermoleculares. Essa mistura proporciona propriedades físicas favoráveis que se parecem às dos líquidos iônicos, como baixo ponto de fusão, baixa volatilidade, alta viscosidade, alta tensão superficial e alta estabilidade térmica (Jiang et al., 2019; Lawal et al., 2019; Shabani et al., 2020).

Em relação a metodologias para obtenção de compostos, uma das técnicas modernas em alta está relacionada à extração pressurizada usando água quente com adição de dióxido de

carbono supercrítico ($\text{H}_2\text{O}+\text{CO}_2$ -SFE). Com essa técnica se resolvem os problemas relacionados à temperatura empregada, que são moderadas, e o único solvente usado, o dióxido de carbono, é totalmente separado após a descompressão, ao final da extração (Rodrigues et al., 2020c). Esta técnica, e também a metodologia de extração por ultrassom e micro-ondas, representam uma grande parte das pesquisas atuais relacionadas a obtenção de antioxidantes e pigmentos.

Para obtenção e purificação de aromas, cita-se a utilização de métodos como extração líquido-líquido/sólido-líquido, absorção, adsorção, destilação, evaporação e pervaporação. Todas estas técnicas precisam da disponibilidade dos compostos em sistemas aquosos ou em solventes para que seja possível o processo de separação. A pervaporação tem chamado atenção por ser um método de membrana que utiliza barreira seletiva utilizando ou não temperatura, com capacidade de separação de solutos específicos como compostos aromáticos. Até então, mais de 70 compostos específicos (incluindo ésteres, cetonas, aldeídos, álcoois, hidrocarbonetos) já foram separados e, assim, recuperados seletivamente de diferentes fontes usando a metodologia (Castro-Muñoz, 2019).

Quanto a estabilidade dos aditivos alimentares naturais, sejam na forma de compostos isolados ou extratos, frequentemente durante a extração ou imediatamente após ela, muitos compostos começam a se degradar. Essa degradação pode ser causada por exposição a altas temperaturas, enzimas, produtos químicos ou mesmo à passagem do tempo (Seibert et al., 2019).

Ainda, os aditivos naturais têm sua eficácia alterada por processos industriais como pasteurização, esterilização, branqueamento, evaporação, extrusão, secagem, torrefação, cozimento, fritura, micro-ondas, aplicação de luz infravermelha e armazenamento (mesmo quando congelados). Entretanto, estas perdas podem ser minimizadas pelo uso de embalagens adequadas, como vácuo com gases inertes eliminadores de oxigênio (Gheonea et al., 2021).

Também neste sentido, a estratégia do encapsulamento em suas várias formas provou ser uma solução, embora com resultados limitados e difíceis de implementar em uma ampla variedade de gêneros alimentícios. A micro e nano encapsulação, que são técnicas empregadas, tem como princípio a criação de uma membrana externa aos compostos de interesse com o intuito de protegê-los. A diferença entre as técnicas baseia-se no tamanho da partícula formada (1–1000 nm para nanoencapsulação e 1–1000 μm para microencapsulação).

Estes processos são eficazes visto que após encapsulados, os produtos finais podem ser um pó, uma pasta ou um líquido. Isso facilita a utilização pela indústria de alimentos por serem estáveis, fáceis de pesar, transportar e armazenar. Ainda, as capsulas preservam os compostos durante o processamento e armazenamento também ajudam a reter o sabor até o consumo

(Saifullah et al., 2019). Bioencapsulação, microencapsulação e nanoencapsulação foram todos usados e parecem promissores em termos do que é esperado do ponto de vista da conservação de alimentos (Carocho et al., 2018).

Outras soluções, como alterações de pH, redução de água, embalagens opacas, entre outras, estão sendo utilizadas para diminuir o impacto sobre os aditivos, tornando-os necessários em menor quantidade para realizar os mesmos efeitos (Sharma et al., 2019).

OS DESAFIOS PARA UTILIZAÇÃO DE NOVOS ADITIVOS DE ORIGEM NATURAL

Estudos de toxicidade

Como mencionado anteriormente, os aditivos alimentares são uma classe importante de ingredientes adicionados intencionalmente no processamento de alimentos, com a finalidade de conferir propriedades tecnológicas ao produto final (Carocho et al., 2018). Os estudos de toxicidade são fundamentais e necessários para garantir a segurança de um novo aditivo. Além disso, através destes estudos é possível estabelecer o nível máximo de aditivo que pode ser adicionado a diferentes produtos para garantir sua segurança ao consumidor (Jansen et al., 2020).

A toxicologia desempenha papel importante na utilização dos novos ingredientes de origem natural, visto que a informação toxicológica é o ponto central que determina o risco associado à substância química em questão. Consequentemente, a liberação destes compostos é realizada mediante a realização de estudos toxicológicos (Jansen et al., 2020).

Um estudo de toxicidade contempla o cumprimento de diretrizes e protocolos específicos estabelecidos por agências reguladoras nacionais e internacionais. É um processo minucioso, longo e complexo, que integra uma sequência de experimentos em laboratório. O *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), administrado pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e *World Health Organization* (WHO) é um grupo internacional responsável por avaliar a segurança dos aditivos alimentares.

A Comissão do *Codex Alimentarius*, também é um órgão conjunto da FAO/WHO, responsável por definir os níveis máximos de uso dos aditivos alimentares, baseados na ingestão diária aceitável (IDA), que é a quantidade de uma substância ingerida diariamente por um indivíduo que não induz risco considerável (Oga et al., 2014). A IDA é uma estimativa de responsabilidade do JECFA, que se aplica a nível mundial.

Os experimentos em laboratório constituem uma etapa fundamental do estudo toxicológico, sendo baseados em testes *in vitro* e *in vivo*. A seleção do método adequado depende da natureza da substância a ser testada. Outro ponto relevante é a seleção da dose a ser administrada nos testes. Estudos prévios sobre a substância em questão devem ser levados em consideração, bem como a exposição humana prevista, sua frequência e duração (WHO, 2009). Nenhum teste isolado pode fornecer uma prova completa da segurança dos novos aditivos, portanto, é recomendada a combinação de testes para garantir a segurança desses produtos (Olusegun; Olajire, 2015).

Dentre as organizações internacionais, a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) é reconhecida por fornecer guias para a condução de estudos toxicológicos (WHO, 2009).

No caso de substâncias alimentares, como os aditivos de origem natural, a grande maioria dos experimentos realizados é *in vivo*, isto é, utilizando animais como roedores (ratos e camundongos) ou não-roedores (cães). A substância a ser testada deve ser adicionada à dieta dos animais, atendendo aos requisitos nutricionais das espécies utilizadas no estudo. Geralmente a substância é administrada aos animais experimentais em três níveis de doses e o grupo controle: a) alta, com a intenção de produzir toxicidade; b) baixa, onde não se observa toxicidade; c) Intermediária, a fim de identificar os efeitos tóxicos mínimos; d) controle, que não recebe nenhuma dose da substância testada (WHO, 2009).

A seguir serão apresentados os principais testes toxicológicos realizados para um novo aditivo alimentar.

Genotoxicidade: O teste de toxicidade genética avalia os efeitos tóxicos no material genético da célula, sendo capaz de detectar destruição cromossômica e mutações genéticas ocasionadas pela substância investigada, podendo acarretar doenças hereditárias e câncer (Kumar et al., 2019; WHO, 2009). São conhecidos mais de 100 métodos de testes *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de identificar todos os aspectos da toxicidade genética. Em geral, os testes são divididos em dois grupos: testes de toxicidade genética e testes de mutagenicidade. Os testes de toxicidade genética avaliam os tipos de danos ao DNA e suas respostas celulares. Os testes de adulto de DNA, síntese não programada de DNA e ensaio cometa são realizados *in vitro* e *in vivo* (WHO, 2009). Os testes de mutagenicidade determinam os danos genéticos e cromossômicos. Dentre os testes para a mutação gênica destacam-se o ensaio microbiano *in vitro* de mutação direta à resistência a um antimetabólito específico utilizando as bactérias *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (OECD, 1997a). Também são realizados testes *in vitro* de aberração cromossômica e micronúcleo com

células de mamíferos e linfócitos humanos (OECD, 2010; OECD, 2016a). Finalmente, são avaliados os testes *in vivo*, por meio do ensaio de aberração cromossômica da medula óssea de mamíferos, ensaio do micronúcleo de eritrócitos de mamíferos e ensaio letal dominante para roedores (OECD, 2015; OECD, 2016b).

Toxicidade na reprodução: É utilizado para determinar o efeito da substância estudada no sistema reprodutivo feminino e masculino, a capacidade reprodutiva da prole e o efeito cumulativo na reprodução das gerações. É recomendada a realização do estudo reprodutivo por no mínimo duas gerações. Os testes são realizados *in vivo*, com roedores (Kumar et al., 2019).

Farmacocinética e metabolismo: São parâmetros muito importantes, realizados com animais, roedores ou não-roedores. O protocolo do teste inclui amostragem de plasma, soro, urina, fezes, que fornecem dados sobre absorção, distribuição, metabolismo e excreção da substância avaliada (FDA, 2007a).

Toxicidade de doses repetidas: São realizados testes *in vivo* com roedores ou não-roedores, a curto prazo (*Short term*), entre 14 e 28 dias (OECD, 2008), ou a longo prazo (*Long term*), entre 90 dias e 1 ano (OECD, 1998), com o objetivo de determinar o perfil toxicológico da substância de estudo após a administração repetida. Após o período de administração da substância investigada, são efetuados exames oftalmológicos, hematológicos, microscópicos, histopatológicos e de urina, além de ensaios de neurotoxicidade e imunotoxicidade (FDA, 2003a). A partir desses dados é possível determinar o nível de ausência de efeito adverso observado, do inglês, *no observed adverse effect level* (NOAEL). Além disso, esses resultados são utilizados como base para testes posteriores de toxicidade subcrônica e crônica.

Toxicidade subcrônica e crônica: Os testes são semelhantes aos realizados na toxicidade de doses repetidas. A substância investigada é administrada de acordo com os testes conduzidos a curto e longo prazo, em doses graduais aos grupos de animais experimentais. São identificados os efeitos tóxicos, os órgãos alvo e a relação entre dose-resposta, bem como são obtidas informações sobre os efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, patológicas e histopatológicas, buscando a elucidação do modo de ação da substância estudada (OECD, 2018a; 2018b).

Neurotoxicidade: O estudo de neurotoxicidade avalia todo e qualquer efeito adverso na estrutura ou função do sistema nervoso central e/ou periférico após a exposição da substância investigada (OECD, 1997b). O teste pode ser agudo, subcrônico ou crônico e consiste em administrar aos animais experimentais três diferentes doses da substância, além do controle. Durante a realização do estudo, os animais são avaliados diariamente por meio de pesagem, testes

bioquímicos, oftalmológicos, hematológicos e histopatológicos. Ao final do estudo é realizada a neurohistopatologia detalhada, avaliando os efeitos neurocomportamentais e neuropatológicos, em termos de incidência e gravidade, além de qualquer outro efeito adverso observado (WHO, 2009).

Imunotoxicidade: Nesse ensaio são investigados os efeitos do novo aditivo ao sistema imunológico, que incluem imunossupressão, imunoestimulação, hipersensibilidade e autoimunidade (FDA, 2003b). A imunotoxicidade é um estudo complexo, uma vez que envolve uma série de eventos celulares. Sendo assim, exige uma interpretação cuidadosa dos resultados (WHO, 2009). Os experimentos são conduzidos com animais de laboratório, identificando agentes imunomoduladores supressores pelas seguintes avaliações: histopatologia de órgãos linfoides; fenotipagem linfocitária, verificando a celularidade dos tecidos linfoides e hematologia do sangue periférico; respostas imunes, determinando a função das células imunes; e resistência a doenças ou ao hospedeiro (WHO, 2009).

Carcinogenicidade: Por meio de testes laboratoriais *in vivo*, são identificados os riscos associados ao câncer, definindo as propriedades carcinogênicas da substância testada, o tempo de aparecimento dos sintomas e os órgãos acometidos (OECD, 2018c). Os experimentos costumam ser realizados durante toda a vida dos animais, comumente roedores, de ambos os sexos, em torno de 2 anos. No estudo de carcinogenicidade é recomendada a exposição *in-utero*, para avaliar o efeito da substância no útero e no feto (FDA, 2007b).

Estudos com seres humanos: Após o cumprimento dos protocolos laboratoriais *in vitro* e *in vivo*, e os resultados obtidos demonstrarem que a nova substância estudada seja segura, a próxima etapa é a realização de estudos com seres humanos. Os testes são realizados em todas as faixas etárias, desde crianças até idosos, de ambos os sexos e incluem exames bioquímicos, função de órgãos, reações enzimáticas e ensaios de absorção, metabolismo e excreção do novo aditivo alimentar. Além disso, são realizados estudos clínicos a longo prazo, com o intuito de identificar seus efeitos adversos (FDA, 1993).

Aprovação pelos órgãos regulamentadores

Anteriormente foi relatado a importância do estudo de toxicidade, os principais testes que são realizados para garantir a segurança de uma nova substância, e assim alcançar sucesso na aprovação e liberação do uso de novos aditivos alimentares. Sabe-se que é um processo longo e lento. Em geral, os experimentos demoram em torno de 14 a 28 dias nos ensaios em curto prazo,

90 dias nos subcrônicos, 1 ano nos crônicos e até 2 anos no estudo de carcinogenicidade (WHO, 2009).

A partir dos resultados obtidos nos estudos de toxicidade, são conhecidos os efeitos nocivos e adversos da substância avaliada, são estabelecidos os níveis de NOAEL e menor dose na qual são observados efeitos adversos, do inglês, *lowest observable adverse effect level* (LOAEL), e finalmente são definidos os parâmetros de IDA e dose de referência (RfD), que é o valor estimado de uma exposição diária a uma substância segura afim de não induzir efeitos adversos à saúde humana (Oga et al., 2014). Esta definição é responsabilidade dos órgãos regulamentadores, que aprovam os novos aditivos, liberam e fiscalizam seu uso. Além disso, esses órgãos são responsáveis por propor limite de uso para o aditivo alimentar.

A EFSA e a FDA são importantes órgãos governamentais que mundialmente legislam e supervisionam a aprovação e a regulamentação de novos aditivos alimentares. A EFSA é uma agência independente da União Europeia que divulga pareceres científicos sobre os riscos associados aos alimentos, contribuindo com a legislação e as políticas dos países europeus (EFSA, 2020). E a FDA fornece diretrizes gerais para estudos toxicológicos, e é responsável por regular, controlar e supervisionar diversas categorias de produtos, incluindo alimentos e bebidas (FDA, 2020).

No Brasil, a ANVISA é responsável por controlar e fiscalizar os aditivos alimentares. A ANVISA estabelece normas dos aditivos alimentares permitidos, para as diferentes categorias de alimentos, bem como determina os limites máximos. Essas definições são apoiadas em regulamentações de órgãos internacionais, como *Codex Alimentarius*, JECFA, FDA e EFSA (ANVISA, 2020).

CONCLUSÃO

Como observado nas últimas décadas, os hábitos relacionados ao consumo alimentar vêm sofrendo grandes mudanças por parte dos consumidores. Cada vez mais a conscientização do consumo de alimentos industrializados e sem adição de insumos naturais vem perdendo mercado.

Como essas novas perspectivas apresentadas, é possível concluir que a substituição dos aditivos sintéticos relacionados a estruturação dos alimentos é bastante possível, já que fontes de aditivos podem ser encontradas em abundância na natureza.

Deve ser evidenciado ainda, que as leis de regulamentação e liberação desses aditivos devem estar sempre em constante atualização para que assim os consumidores estejam seguros.

REFERÊNCIAS

- Al-Ali RM, Al-Hilifi SAH, Al-Mossawi AEBHJ (2020). Extraction of lutein from some plant source in different conditions and application in food system. *Plant Archives*, 20: 1679–1685.
- Albuquerque BR, Oliveira MBPP, Barros L, Ferreira ICFR. (2020). Could fruits be a reliable source of food colorants? Pros and cons of these natural additives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Alzate-Arbeláez AF, Dorta E, López-Alarcón C, Cortés FB, Rojano BA (2019). Immobilization of Andean berry (*Vaccinium meridionale*) polyphenols on nanocellulose isolated from banana residues: A natural food additive with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 294: 503–517.
- Anggraeni VJ, Ramdanawati L, Ayuantika W (2019). Optimization of Total Anthocyanin Extraction from Brown Rice (*Oryza nivara*). *Journal of Physics: Conference Series*, 1338: 012006.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2020). O que é aditivo alimentar? Para que serve?. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/>> Acessado em: 01 jun. 2020.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2020). Aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/aditivos-alimentares>> Acessado em: 04 ago. 2020.
- Barros RGC, Andrade JKS, Pereira UC, et al. Phytochemicals screening, antioxidant capacity and chemometric characterization of four edible flowers from Brazil. (2020). Phytochemicals screening, antioxidant capacity and chemometric characterization of four edible flowers from Brazil. *Food Research International*, 130: 108899.
- Bento-Silva A., Koistinen VM., Mena P, et al. (2020). Factors affecting intake, metabolism and health benefits of phenolic acids: do we understand individual variability? *European Journal of Nutrition*, 59(4): 1275–1293.
- Bernaerts TMM, Gheysen L, Foubert I, Hendrickx ME, Van Loey AM. (2019). The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnology Advances*, 37(8): 107419.
- Bharathiraja S, Suriya J, Krishnan M, Manivasagan P, Kim SK. (2017). Production of Enzymes From Agricultural Wastes and Their Potential Industrial Applications. 80(1): 125-148.
- Böcker L, Hostettler T, Diener M, et al. (2020). Time-temperature-resolved functional and structural changes of phycocyanin extracted from *Arthrospira platensis*/Spirulina. *Food Chemistry*, 316: 126374.

- Bucalossi G, Fia G, Dinnella C, et al. (2020). Functional and sensory properties of phenolic compounds from unripe grapes in vegetable food prototypes. *Food Chemistry*, 315: 126291.
- Carocho M, Barreiro MF, Morales P, Ferreira ICFR. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4): 377–399.
- Carocho M, Morales P, Ferreira ICFR. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 71: 107–120.
- Castro-Muñoz R. (2019). Pervaporation: The emerging technique for extracting aroma compounds from food systems. *Journal of Food Engineering*, 253: 27-39.
- Cegińska A, Hać-Szymańczuk E, Piwowarek K, Dasiewicz K, Słowiński M, Wrońska K. (2019). The use of bioactive properties of sage preparations to improve the storage stability of low-pressure mechanically separated meat from chickens. *Poultry Science*, 98(10): 5045–5053.
- Chugh B, Kamal-Eldin A. (2020). Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Current Opinion in Food Science*, 32: 76–82.
- Conceição N, Albuquerque BR, Pereira C, et al. (2019). By-Products of Camu-Camu [*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh] as Promising Sources of Bioactive High Added-Value Food Ingredients: Functionalization of Yogurts. *Molecules*, 25(70): 1-17.
- Corrêa RCG, Garcia JAA, Correa VG, Vieira TF, Bracht A, Peralta RM. (2019). Pigments and vitamins from plants as functional ingredients: Current trends and perspectives. *Advances in Food and Nutrition Research*, 90: 259–303.
- Cuevas-Glory L, Pino J, Lopez-Sauri D, Novelo-Torres B, Sauri-Duch E. (2020). Characterization of odor-contributing volatiles in two Habanero pepper varieties by gas chromatography–olfactometry. *Chemical Papers*, 74(7): 2239–2246.
- Da Silva LP, Pereira E, Prieto MA, et al. (2019). *Rubus ulmifolius* schott as a novel source of food colorant: extraction optimization of coloring pigments and incorporation in a bakery product. *Molecules*, 24(11): 2181.
- De Biaggi M, Donno D, Mellano MG, Gamba G, Riondato I, Rakotoniaina EN, Beccaro GL. (2020). Emerging species with nutraceutical properties: Bioactive compounds from *Hovenia dulcis* pseudofruits. *Food Chemistry*, 310: 125816.
- Dini C, Zaro MJ, Rolny N, Caputo M, Boido E, Dellacassa E, Viña SZ. (2020). Characterization and stability analysis of anthocyanins from *Pachyrhizus abipha* (Wedd) Parodi roots. *Food Bioscience*, 34: 100534.

- Dunkel A, Steinhaus M, Kotthoff M, Nowak B, Krautwurst D, Schieberle P, Hofmann T. (2014). Nature's chemical signatures in human olfaction: A foodborne perspective for future biotechnology. *Angewandte Chemie International Edition*. 53(28): 7124-43.
- EFSA - European Food Safety Authority. About EFSA (2020). Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa>> Acessado em: 04 ago. 2020.
- El-Saber BG, Beshbishy AM, Ikram M, et al. (2020). The pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: Quercetin. *Foods*. 9(3): 374.
- El-Zaeddi H, Calín-Sánchez Á, Noguera-Artiaga L, Martínez-Tomé J, Carbonell-Barrachina ÁA. (2020). Optimization of harvest date according to the volatile composition of Mediterranean aromatic herbs at different vegetative stages. *Scientia Horticulturae*, 267: 109336.
- Fan XJ, Liu SZ, Li HH, Li HH., He J, Feng JT, Zhang X, Yan H. (2019). Effects of *Portulaca oleracea* L. extract on lipid oxidation and color of pork meat during refrigerated storage. *Meat Science*, 147: 82–90.
- FDA - Food and Drug Administration. Redbook II: Chapter VI Human studies. Guidance Document, 1993. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM078753.pdf>>
- FDA - Food and Drug Administration. Redbook 2000: IV.C.3.a. Short-Term toxicity studies with rodents. Guidance Document, 2003a. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/redbook-2000-ivc3a-short-term-toxicity-studies-rodents#exp>>
- FDA - Food and Drug Administration. Redbook 2000: IV. C. 4. A subchronic toxicity studies with rodents toxicological principles for the safety assessment of food. Guidance Document, 2003b. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/IngredientsAdditivesGRASPackaging/ucm078345.htm>>
- FDA - Food and Drug Administration. Redbook 2000: Metabolism and pharmacokinetic studies. Guidance Document, 2007a. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM078741.pdf>>
- FDA - Food and Drug Administration. Redbook 2000: IV.C.8. In-Utero exposure phase for addition to carcinogenicity studies or chronic toxicity studies with rodents. Guidance Document, 2007b. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/redbook-2000-ivc8-utero-exposure-phase-addition->

carcinogenicity-studies-or-chronic-toxicity-studies>.

FDA - Food and Drug Administration. Food Ingredients & Packaging (2020). Disponível em:

<<https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging>> Acessado em: 04 ago. 2020.

Fernandes RPP, Trindade MA, Tonin FG, Pugine SMP, Lima CG, Lorenzo JM, de Melo MP.

(2017). Evaluation of oxidative stability of lamb burger with *Origanum vulgare* extract. *Food Chemistry*, 233: 101–109.

Fidelis M, de Oliveira SM, Sousa Santos J, et al. (2020). From byproduct to a functional

ingredient: Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seed extract as an antioxidant agent in a yogurt model. *Journal of Dairy Science*, 103(2): 1131–1140.

Gheonea (Dima) I, Aprodu I, Cîrciumaru A, Râpeanu G, Bahrim GE, Stănciuc N. (2021).

Microencapsulation of lycopene from tomatoes peels by complex coacervation and freeze-drying: Evidences on phytochemical profile, stability and food applications. *Journal of Food Engineering*, 288: 110166.

Ghosh T, Beniwal A, Semwal A, Navani NK. (2019). Mechanistic insights into probiotic

properties of lactic acid bacteria associated with ethnic fermented dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 10: 502.

Giaconia MA, Ramos S dos P, Pereira CF, Lemes AC, De Rosso VV, Braga ARC. (2020).

Overcoming restrictions of bioactive compounds biological effects in food using nanometer-sized structures. *Food Hydrocolloids*, 107, 105939.

Giuffrida D, Martínez N, Arrieta-Garay Y, Fariña L, Boido E, Dellacassa E. (2020). Valorisation

of *Schinus molle* fruit as a source of volatile compounds in foods as flavours and fragrances. *Food Research International*, 133: 109103.

Guleria A, Neogy S, Raorane BS, Adhikari S. (2020). Room temperature ionic liquid assisted

rapid synthesis of amorphous Se nanoparticles : Their prolonged stabilization and antioxidant studies. *Materials Chemistry and Physics*, 253: 123369.

Guo L, Kong D, Yao K, Li J, Li H, Lan N, Hua Y. (2020). Optimization and characterization of

pigment production from *Boletus edulis* Bull.: Fr. by ultrasonic-assisted extraction. *Journal of Food Processing and Preservation*. 44:e14534.

Halliwell B. (1990). How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radical Research*

Communications, 9(1): 1–32.

Hamed M, Bougatef H, Karoud W, Krichen F, Haddar A, Bougatef A, Sila A. (2020).

Polysaccharides extracted from pistachio external hull: Characterization, antioxidant activity and potential application on meat as preservative. *Industrial Crops and Products*, 148: 112315.

- He C, Li Z, Liu H, Zhang H, Wang L, Chen H. (2020). Characterization of the key aroma compounds in *Semnostachya menglaensis* Tsui by gas chromatography-olfactometry, odor activity values, aroma recombination, and omission analysis. *Food Research International*, 131: 108948.
- Jahurul MHA, Azzatul FS, Sharifudin MS, et al. (2020). Functional and nutritional properties of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) seed and its industrial application: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 99:367-374.
- Jansen T, Claassen L, van Kamp I, Timmermans DRM. (2020). ‘All chemical substances are harmful.’ public appraisal of uncertain risks of food additives and contaminants. *Food and Chemical Toxicology*, 136:110959.
- Jiang Z, Wang L, Gao Z, Zhuang B, Yin Q, Liu E. (2019). Green and efficient extraction of different types of bioactive alkaloids using deep eutectic solvents. *Microchemical Journal*, 145: 345-353.
- Júnior MM, de Oliveira TP, Gonçalves OH, et al. (2019). Substitution of synthetic antioxidant by curcumin microcrystals in mortadella formulations. *Food Chemistry*, 300: 125231.
- Kim MK, Jang H won, Lee K-G. (2020). Characterization of key aroma-active compounds isolated from omija fruit treated differently based on odor activity values and descriptive sensory analysis. *Foods*, 9(5):638.
- Koliastasi A, Kompothekra V, Giotis C, et al. (2020). Novel emulsifiers from olive mill compost. *Food Hydrocolloids*, 99: 105373.
- Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Reports*. 24:e00370.
- Kumar, Dourgesh., Singh, Vijay Pratap; Sharma, Shivesh; Kishore N (2019). *Food Safety and Human Health*. Elsevier. 385p.
- Kurniawan JM, Yusuf MM, Azmi SS, et al. (2019). Effect of drying treatments on the contents of lutein and zeaxanthin in orange- and yellow-cultivars of marigold flower and its application for lutein ester encapsulation. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 509: 012060.
- Lafarga T, Fernández-Sevilla JM, González-López C, Acién-Fernández FG. (2020). Spirulina for the food and functional food industries. *Food Research International*, 137: 109356.
- Lawal IA, Lawal MM, Azeez MA, Ndungu P. (2019). Theoretical and experimental adsorption studies of phenol and crystal violet dye on carbon nanotube functionalized with deep eutectic solvent. *Journal of Molecular Liquids*, 288: 110895.

- Li W, Zhang X, He Z, et al. (2020). In vitro and in vivo antioxidant activity of eucalyptus leaf polyphenols extract and its effect on chicken meat quality and cecum microbiota. *Food Research International*, 136: 109302.
- Lim SL, Mohamed S. (2016). Functional food and dietary supplements for lung health. *Trends in Food Science and Technology*, 57:74-82.
- Lin D, Liu Z, Shen R, Chen S, Yang X. (2020). Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158: 1007-1019.
- Liu RH. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12): 3479S-3485S.
- Liu Y, Li Q, Yang W, et al. (2020). Characterization of the potent odorants in *Zanthoxylum armatum* DC Prodr. pericarp oil by application of gas chromatography–mass spectrometry–olfactometry and odor activity value. *Food Chemistry*, 319: 126564.
- Lombardelli C, Liburdi K, Benucci I, Esti M. (2020). Tailored and synergistic enzyme-assisted extraction of carotenoid-containing chromoplasts from tomatoes. *Food and Bioprocess Processing*, 121: 43–53.
- Mahmood K, Kamilah H, Shang PL, Sulaiman S, Ariffin F, Alias AK. (2017). A review: Interaction of starch/non-starch hydrocolloid blending and the recent food applications. *Food Bioscience*, 19, 110–120.
- Mannino G, Perrone A, Campobenedetto C, Schittone A, Margherita Berteà C, Gentile C. (2020). Phytochemical profile and antioxidative properties of *Plinia trunciflora* fruits: A new source of nutraceuticals. *Food Chemistry*, 307: 125515.
- Martinović A, Cavoski I. (2020). The exploitation of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars and genotypes from Montenegro as a source of natural bioactive compounds. *Food Chemistry*, 318, 126549.
- Martins** FCOL, Sentanin MA, De Souza D. (2019). Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. *Food Chemistry*, 272: 732-750.
- Mohammadian M, Waly MI, Moghadam M, Emam-Djomeh Z, Salami M, Moosavi-Movahedi AA. (2020). Nanostructured food proteins as efficient systems for the encapsulation of bioactive compounds. *Food Science and Human Wellness*.
- Mohd Ali M, Hashim N, Aziz SA, Lasekan O. (2020). Exploring the chemical composition, emerging applications, potential uses, and health benefits of durian: A review. *Food Control*. 113:107189.
- Natalello A, Priolo A, Valenti B, et al. (2020). Dietary pomegranate by-product improves

- oxidative stability of lamb meat. *Meat Science*, 162:108037.
- Noor S, Bhat ZF, Kumar S, Mudiyansele RJ. (2018). Preservative effect of *Asparagus racemosus*: A novel additive for bioactive edible films for improved lipid oxidative stability and storage quality of meat products. *Meat Science*, 139: 207–212.
- Nowak E, Livney YD, Niu Z, Singh H. (2019). Delivery of bioactives in food for optimal efficacy: What inspirations and insights can be gained from pharmaceuticals? *Trends in Food Science and Technology*, 91: 557–573.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. *Test n° 471: bacterial reverse mutation test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 1997a.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. *Test n° 424: neurotoxicity study in rodents*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 1997b.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. *Test n° 409: Repeated dose 90-day oral toxicity study in non-rodents*. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 1998.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. *Test n° 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents*. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2008.
- OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development. *Proposal for updating guideline 473: in vitro mammalian chromosome aberration test*. OECD Publishing, Paris, 2010.
- OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development. *Test n° 478: rodent dominant lethal test*. OECD Publishing, Paris, 2015.
- OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development. *Test n° 487: in vitro mammalian cell micronucleus test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2016a.
- OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development. *Test n° 474: mammalian erythrocyte micronucleus test*. OECD Publishing, Paris, 2016b.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. *Test n° 408: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents*. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2018a.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. *Test n° 452: Chronic toxicity studies*. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris,

2018b.

- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. *Test nº 453: Combined chronic toxicity/carcinogenicity studies*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2018c.
- Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO (2014). *Fundamentos de Toxicologia*. 4. ed. Editora: Atheneu, São Paulo. 704p.
- Olusegun ET, Olajire AA. Toxicity of food colours and additives: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9(36): 900-914.
- Pardilhó SL, Machado S, F. Bessada SM, F. Almeida M, Oliveira MB, M. Dias J. Marine macroalgae waste from northern Portugal: A potential source of natural pigments? *Waste and Biomass Valorization*.
- Pataro G, Carullo D, Falcone M, Ferrari G. (2020). Recovery of lycopene from industrially derived tomato processing by-products by pulsed electric fields-assisted extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 63: 102369.
- Permal R, Leong Chang W, Seale B, Hamid N, Kam R. (2020). Converting industrial organic waste from the cold-pressed avocado oil production line into a potential food preservative. *Food Chemistry*, 306: 125635.
- Puskuri J, Katukam V, Sashidhar RB. (2017). Immunological evaluation of Gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A tree gum with potential applications in food and pharma industry. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 11: 48–52.
- Rengarajan S, Melanathuru V, Govindasamy C. (2020). Journal of King Saud University – Science Antioxidant activity of flavonoid compounds isolated from the petals of Hibiscus rosa sinensis. *Journal of King Saud University - Science*, 32(3): 2236–2242.
- Rocchetti G, Blasi F, Montesano D, et al. (2019). Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of Moringa oleifera leaves. *Food Research International*, 115, 319–327.
- Rodrigues AS, Kubota EH, da Silva CG, dos Santos Alves J, Hautrive TP, Rodrigues GS, Campagnol PCB (2020a). Banana inflorescences: A cheap raw material with great potential to be used as a natural antioxidant in meat products. *Meat Science*, 161: 1–5.
- Rodrigues J, Madson M, Freitas S, et al. (2020c). Obtaining extracts rich in antioxidant polysaccharides from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* using binary system with hot water and supercritical CO₂, *Food Chemistry*, 330: 127173.
- Rodrigues LM, Romanini EB, Silva E, Pilau EJ, da Costa SC, Madrona GS. Rodrigues, LM

- (2020b). Camu-camu bioactive compounds extraction by ecofriendly sequential processes (ultrasound assisted extraction and reverse osmosis). *Ultrasonics Sonochemistry*, 64: 105017.
- Rojas J, Buitrago A (2019). Antioxidant activity of phenolic compounds biosynthesized by plants and its relationship with prevention of neurodegenerative diseases. In: Campos MRS, *Bioactive Compounds: Health benefits and potential applications*. Elsevier Inc. 1: 3-31.
- Rózyło R. (2020). Recent trends in methods used to obtain natural food colorants by freeze-drying. *Trends in Food Science & Technology*, 102: 39–50.
- Saifullah M, Shishir MRI, Ferdowsi R, Tanver Rahman MR, Van Vuong Q. (2019). Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends in Food Science and Technology*, 86: 230-251.
- Schneider VS, Bark JM, Winnischofer SMB, Dos Santos EF, Iacomini M, Cordeiro LMC. (2020). Dietary fibres from guavira pomace, a co-product from fruit pulp industry: Characterization and cellular antioxidant activity. *Food Research International*, 132: 109065.
- Seibert JB, Bautista-Silva JP, Amparo TR, et al. (2019). Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. *Food Chemistry*, 287: 61-67.
- Shabani E, Zappi D, Berisha L, Dini D, Letizia M, Sadun C (2020). Talanta Deep eutectic solvents (DES) as green extraction media for antioxidants electrochemical quantification in extra-virgin olive oils. *Talanta*, 215: 120880.
- Shah MA, Bosco SJD, Mir SA. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, 98(1): 21-33.
- Sharma S, Cheng S, Bhattacharya B, Chakkaravarthi S. (2019). Efficacy of free and encapsulated natural antioxidants in oxidative stability of edible oil: Special emphasis on nanoemulsion-based encapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 91: 305-318.
- Slavov, A., Ognyanov, M., & Vasileva, I. (2020). Pectic polysaccharides extracted from pot marigold (*Calendula officinalis*) industrial waste. *Food Hydrocolloids*, 101: 105545.
- Soriano A, Alañón ME, Alarcón M, García-Ruiz A, Díaz-Maroto MC, Pérez-Coello MS. (2018). Oak wood extracts as natural antioxidants to increase shelf life of raw pork patties in modified atmosphere packaging. *Food Research International*, 111: 524-533.
- Sun L bin, Zhang Z yong, Xin G, et al. (2020). Advances in umami taste and aroma of edible mushrooms. *Trends in Food Science and Technology*, 96: 176-187.
- Van Vuuren S, de Rapper S. (2020). Odoriferous Therapy: Identifying the Antimicrobial Potential of Essential Oils against Pathogens of the Respiratory Tract. *Chemistry & Biodiversity*. 17,

e2000062.

- Vieira AJ, Beserra FP, Souza MC, Totti BM, Rozza AL (2018). Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chemico-Biological Interactions*, 283: 97-106.
- Vuolo MM, Lima VS, Maróstica Junior MR (2019). Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In: Campos MRS, *Bioactive Compounds: Health benefits and potential applications*. Elsevier Inc. 1: 33-50.
- WHO - World Health Organization. Hazard identification and characterization: toxicological and human studies. In: *Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. IPCS: International Programme on Chemical Safety*, 2009.
- Wu G, Chang C, Hong C, Zhang H, Huang J, Jin Q, Wang X (2019). Phenolic compounds as stabilizers of oils and antioxidative mechanisms under frying conditions: A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, 92: 33-45.
- Zhong R, Wan X, Wang D, et al. (2020) Polysaccharides from Marine Enteromorpha: Structure and function. *Trends in Food Science and Technology*. 99:11-20.
- Zeece, M. (2020). Food additives. In *Introduction to the Chemistry of Food* (pp. 251–311). Elsevier.

Optimization of the extraction of antioxidants from Moringa leaves: A comparative study between ultrasound- and ultra-homogenizer-assisted extractions

Juliana M. G. Pereira^{1,2}  | Franciele Leila G. Viell²  | Patricia C. de Lima²  |
Evandro Silva³  | Eduardo J. Pilau³  | Rúbia C. G. Corrêa⁴  | Evandro Bona²  |
Angélica M. S. Vieira¹ 

¹Postgraduate Program in Food Science, Department of Food Science, State University of Maringá (UEM), Maringá, Brazil

²Postgraduate Program of Food Technology (PPGTA), Federal University of Technology - Paraná (UTFPR), Curitiba, Brazil

³Department of Chemistry, State University of Maringá (UEM), Maringá, Brazil

⁴Program of Master in Science, Technology and Food Safety, Cesumar Institute of Science Technology and Innovation (ICETI), University Center of Maringá (UniCesumar), Maringá, Brazil

Correspondence

Evandro Bona, Postgraduate Program of Food Technology (PPGTA), Federal University of Technology - Paraná (UTFPR), Via Rosalina Maria da Silva, 1233, CEP 87301-899, Campo Mourao, Paraná, Brazil. Email: ebona@utfpr.edu.br

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Abstract

This work investigated the effect of the solvent composition and solid/solvent ratio on the extraction of antioxidants from *Moringa oleifera* Lam leaves using experimental design and compared the efficiency between the ultrasound- (UAE) and ultra-homogenizer (HAE)-assisted extractions. The phytochemical composition of the optimized extracts was investigated by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with a high-resolution mass spectrometer (UHPLC-QTOF-MS/MS). The experimental results adequately fitted to quadratic models as indicated by the coefficient of determination (0.71–0.97), low standard errors of estimate, and lack of fit >0.05. The optimum conditions of extraction for both methods were identified as 4:200 solid:solvent (m/v) and a 1:1 water:ethanol (v/v) ratio. Thirty compounds were identified by UHPLC-QTOF-MS/MS, among which quercetin, rutin, kaempferol, alkaloids, and lignins. Both techniques studied were efficient in extracting antioxidants from Moringa leaves. The HAE equipment has a longer extraction time but is more accessible than the UAE equipment.

Novelty Impact Statement: UAE and HAE parameters were optimized for the recovery of antioxidants from Moringa leaves. HAE and UAE allowed obtaining extracts rich in antioxidant compounds. Impacts of solvent composition and solid/solvent ratio were assessed using RSM, and the optimal conditions found were: 4g of sample for 200 ml of solvent with 1:1 water:ethanol ratio. Quercetin, rutin, kaempferol, alkaloids, and lignins were detected in Moringa extracts using UHPLC-QTOF-MS/MS.

1 | INTRODUCTION

As the demand for healthier foods increases, the use of synthetic antioxidants in the food industry has been the subject of questions regarding food safety due to toxicity issues. Several researches are focused on the search for natural compounds that exhibit this functional property and many plant matrices were studied as potential sources of antioxidants (Cañadas et al., 2021; Fombang et al., 2020; Kumar

et al., 2021; Santos et al., 2021). To obtain the antioxidants from plant matrices, the optimization of the extraction processes is an important challenge, including the choice of the extraction methodology (conventional and unconventional methods), the time and temperature of the process, sample/solvent ratio, the mixture of solvents, the solvent toxicity, and the preservation of the bioactive compounds during the process (Chen et al., 2018; Görgüç et al., 2020; Nishad et al., 2019). A wide range of solid-liquid extraction approaches has been used

for the extraction of bioactive phytochemicals from vegetal matrices. Conventional methods comprehend percolation, maceration, and Soxhlet extraction, among others. These traditional approaches are commonly time-consuming and demand a substantial amount of solvents (Heleno et al., 2016). Emerging methods, like ultrasound-assisted extraction (UAE), ultra-homogenizer-assisted extraction (HAE), microwave-assisted extraction (MAE), pressurized solvent extraction (PSE), and supercritical fluid extraction, are rapid and effective approaches that have been applied in the last couple of decades with the intent of extracting more efficiently a large variety of compounds (Belwal et al., 2018).

Moringa oleifera Lam (Moringa), universally referred to as “the tree of life” and “the miracle tree,” is a valuable multitasking crop grown worldwide (Gupta et al., 2018; Lin et al., 2018). Its flowers, leaves, pods, and seeds are palatable and extraordinarily rich in nutrients and bioactive phytochemicals (Liu et al., 2018; Ma et al., 2019). Moringa has been used for years in water treatment and agriculture, as water flocculant, biofuel, and fertilizer; likewise in livestock, as fodder, feed ingredient, and antibiotic (Brilhante et al., 2017; Raman et al., 2018). Moringa extracts were also applied for the innovation of functional food products and food packing, providing bioactive features or replacing synthetic additives in formulations (Looi et al., 2019; Oyeyinka & Oyeyinka, 2018; Saucedo-Pompa et al., 2018; Topuz & Uyar, 2020). In the past decade, several authors investigated the chemical composition of the Moringa tree, all the plant parts contain vitamins, carotenoids, polyphenols, phenolic acids (e.g., gallic, ellagic, chlorogenic, and ferulic acid), flavonoids (mostly quercetin, vanillin, and kaempferol), glucosinolates, alkaloids, in addition to isothiocyanates, tannins, saponins, and oxalates (Falowo et al., 2018; Gopalakrishnan et al., 2016; Ma et al., 2019). Furthermore, researches focusing on these metabolites have evidenced their biological properties as an antioxidant (Liu et al., 2018), anti-inflammatory (Lin et al., 2018), antidiabetic (Muhammad et al., 2016), antiproliferative (Tiloke et al., 2018), and antimicrobial (Gupta et al., 2018). Nevertheless, like in all plant matrices, the profile and amount of phytochemicals in Moringa greatly differ according to genetic and environmental conditions, harvest and processing, and extraction conditions (Gómez-Martínez et al., 2020).

To optimize an extraction, where multiple parameters should be considered (e.g., temperature, time, solvent/sample ratio, and matrix composition), the use of chemometric tools can lead to the identification of the ideal conditions for a multi-objective analysis that takes into account all variables of interest, thus minimizing the number of experiments (Pereira et al., 2018; Vieira et al., 2017). In this sense, a rotatable central composite design (RCCD) is useful to simultaneously analyze the relationship of independent variables that are relevant to the process concerning dependent variables or responses (Santos et al., 2018). Including the optimization of emerging extraction methods for the recovery of bioactive compounds from Moringa leaves (Rocchetti et al., 2019, 2020; Vázquez-León et al., 2019). However, to our best knowledge, an optimization study focused on the influence of the sample/solvent ratio and the mixture of solvents using experimental design has never been performed.

Furthermore, research employing only GRAS (Generally Recognized as Safe) solvents is still lacking.

Considering the above, we aimed to optimize the extraction process of bioactive compounds from Moringa leaves, evaluating the efficiency of ultrasound- (UAE) and ultra-homogenizer (HAE)-assisted extractions. To achieve this, the impacts of solvent composition and solid/solvent ratio were assessed using an RCCD. The responses optimized were extraction yield, total phenolic content (TPC), total flavonoid content, and antioxidant capacity. Afterward, the extracts obtained from Moringa leaves were analyzed using UHPLC-ESI-QTOF-MS.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Reagents

DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride), TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine), potassium persulfate, potassium phosphate buffer, gallic acid, and HPLC grade quercetin were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2 | Experimental design and optimization

An RCCD design was used to assess the effects of solvent composition (water/ethanol) and the solid/solvent ratio in the extraction of bioactive compounds applying HAE and UAE. The experimental matrix is displayed in Table 1 and the center point was performed in triplicate to measure the experimental error (pure error). To the experimental data, quadratic models (Equation 1) were adjusted to the dependent variables yield, TPC, total flavonoid content (TFC), and antioxidant capacity, assessed by DPPH and ABTS.

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_{11}X_1^2 + b_2X_2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (1)$$

In Equation (1), y represents the dependent variable, b_0 is the intersection, b_1 and b_2 are the linear coefficients, b_{11} and b_{22} are the quadratic coefficients, b_{12} is the binary interaction coefficient, X_1 represents solid/solvent ratio, and X_2 water/ethanol ratio. The significance of the individual effects was assessed by ANOVA (95%) to adjust the experimental models for all evaluated responses. Then, the overall fit of the model containing the significant coefficients was evaluated by the coefficient of determination (R^2), the adjusted coefficient of determination (R_{adj}^2), and ANOVA (95% with the decomposition of the residual sum of squares in pure error and lack of fit) (Santos et al., 2018). The adjusted models were used to obtain response surfaces and choose the best conditions to optimize the extraction. All statistical analyzes were performed using the software TIBCO Statistica™ (version 13; TIBCO Software Inc., 2017, <http://statistica.io>).

TABLE 1 Results obtained for rotatable central composite design with coded and real values (in parentheses), both for the solid/solvent ratio and for the water/ethanol ratio: yield of extraction, total phenolics, total flavonoids, and evaluation of the antioxidant capacity of the extracts

Experiment	X1 (g/ml)	X2 (ml/ml)	Yield (%)	TPC (g GAE.100 g ⁻¹ dry leaf)	TFC (g QE.100 g ⁻¹ dry leaf)	Antioxidant capacity (μmol Trolox. 100 g ⁻¹ dry leaf)	
						DPPH	ABTS
HAE							
UT1	-1 (6.4/200)	-1 (170.8/29.2)	27.17 ± 1.44	1.64 ± 0.02	1.47 ± 0.10	3,556.63 ± 15.25	17,130.90 ± 400.18
UT2	-1 (6.4/200)	1 (29.2/170.8)	24.59 ± 1.21	1.99 ± 0.01	1.34 ± 0.08	5,320.07 ± 123.83	12,589.10 ± 458.87
UT3	1 (17.6/200)	-1 (170.8/29.2)	18.48 ± 0.99	1.42 ± 0.01	0.91 ± 0.10	1,587.32 ± 40.83	9,381.93 ± 274.08
UT4	1 (17.6/200)	1 (29.2/170.8)	16.18 ± 1.79	1.40 ± 0.05	0.95 ± 0.02	2,794.29 ± 54.16	10,761.42 ± 352.67
UT5	-1.41421 (4/200)	0 (100/100)	31.47 ± 1.87	2.75 ± 0.09	1.64 ± 0.02	7,051.55 ± 245.73	15,362.22 ± 303.44
UT6	1.41421 (20/200)	0 (100/100)	20.42 ± 1.15	1.56 ± 0.02	1.07 ± 0.06	4,519.32 ± 135.47	15,534.54 ± 321.09
UT7	0 (12/200)	-1.41421 (200/0)	23.54 ± 1.17	1.57 ± 0.06	1.23 ± 0.13	1,907.67 ± 82.18	10,010.29 ± 287.23
UT8	0 (12/200)	1.41421 (0/200)	13.68 ± 0.50	1.06 ± 0.03	0.86 ± 0.12	3,238.72 ± 100.68	9,116.15 ± 312.65
UT9	0 (12/200)	0 (100/100)	25.73 ± 1.66	2.56 ± 0.08	2.52 ± 0.06	6,567.55 ± 101.14	15,087.55 ± 389.07
UT10	0 (12/200)	0 (100/100)	25.54 ± 1.45	2.06 ± 0.07	2.34 ± 0.03	6,397.49 ± 157.72	15,751.57 ± 324.59
UT11	0 (12/200)	0 (100/100)	24.72 ± 1.58	2.54 ± 0.12	2.44 ± 0.07	6,342.86 ± 135.31	13,148.17 ± 309.73
UAE							
US1	-1 (6.4/200)	-1 (170.8/29.2)	31.00 ± 1.76	2.07 ± 0.07	1.91 ± 0.16	2,565.83 ± 70.71	15,366.56 ± 523.19
US2	-1 (6.4/200)	1 (29.2/170.8)	24.37 ± 1.08	2.50 ± 0.02	1.85 ± 0.05	5,731.89 ± 220.60	13,785.53 ± 375.14
US3	1 (17.6/200)	-1 (170.8/29.2)	17.84 ± 0.96	1.31 ± 0.12	0.60 ± 0.03	1,830.08 ± 59.59	9,889.73 ± 207.25
US4	1 (17.6/200)	1 (29.2/170.8)	12.41 ± 0.88	1.06 ± 0.04	0.74 ± 0.08	1,966.74 ± 48.36	6,018.20 ± 187.39
US5	-1.41421 (4/200)	0 (100/100)	31.91 ± 1.98	2.66 ± 0.10	2.33 ± 0.04	6,586.23 ± 218.33	19,163.82 ± 493.61
US6	1.41421 (20/200)	0 (100/100)	20.04 ± 1.02	1.81 ± 0.03	1.60 ± 0.13	4,871.30 ± 245.53	13,620.92 ± 503.36
US7	0 (12/200)	-1.41421 (200/0)	22.18 ± 1.18	1.49 ± 0.03	0.58 ± 0.10	1,813.49 ± 12.26	7,868.10 ± 219.85
US8	0 (12/200)	1.41421 (0/200)	12.95 ± 0.76	1.16 ± 0.01	0.76 ± 0.01	5,709.79 ± 21.47	4,357.69 ± 275.18
US9	0 (12/200)	0 (100/100)	25.39 ± 1.53	2.54 ± 0.07	2.06 ± 0.03	6,999.35 ± 28.27	15,978.29 ± 471.49
US10	0 (12/200)	0 (100/100)	25.61 ± 1.67	2.56 ± 0.09	2.12 ± 0.08	5,606.00 ± 28.97	15,942.91 ± 429.66
US11	0 (12/200)	0 (100/100)	27.32 ± 1.56	2.41 ± 0.08	2.01 ± 0.10	5,823.63 ± 86.30	15,497.68 ± 391.49

Data are the mean ± standard deviation. X1, solid/solvent ratio (g/ml); X2, water/ethanol ratio (ml/ml). HAE, Ultra-homogenizer-assisted extraction. UAE, Ultra-sound-assisted extraction. UT, extracts obtained by the HAE equipment. US, extracts obtained by the UAE equipment. Yield (%): $\left(\frac{\text{ex(s)}}{\text{Al}}\right) 100$, where ex (s) corresponds to the mass of dry extract and Al to the mass of the initial dry leaf sample for each experiment, according to the experimental design. TFC, Total flavonoid content; TPC, Total phenolic content.

2.3 | Plant material

Fresh leaves of Moringa were provided by "Toka do Taka," a farm located in the city of Maringa, Northwest of the Parana State, Brazil (23° 24' 52" S and 51° 55' 10" W). Intact leaves were dried in an air circulation oven at 35°C, crushed, and sieved (300 µm sieve) to standardize the granulometry. Afterward, the obtained leaf flour was dissolved in the solvent or mixture of solvents, according to the experimental design (Table 1).

2.4 | Extraction procedures

The Homogenizer-Assisted Extraction (HAE) was conducted using an Ultra-Turrax (IKA-T25, Staufen) dispersing device at 12,000 rpm for 10 min. The Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) was carried out in an ultrasonicator with 120 W and 20 kHz (Fisher Scientific) for 5 min using the pulse mode, 30s on and 10s off. For both UAE and HAE, the sample was maintained at 30°C employing an ultra-thermostatic bath (Quimis - Q214 M, Diadema, SP, Brazil). The extracts were centrifuged (Centrifuge NT 825, New Technique, Piracicaba, Brazil) at 4,000 rpm (1,430 g) and 4°C for 15 min (Viell et al., 2020). Then, extracts were vacuum filtered repeatedly with filter paper (Quanty, 8 µm porosity, Adria laboratories- Londrina-PR) and vacuum pump (model 121- Prismatec), until the obtainment of translucent permeates. Subsequently, the extracts were kept in an air circulation oven for 36 hr for ethanol evaporation. Finally, the material was lyophilized (model L101-Liobras) for 5 days and all extracts were stored at -20°C until further analyses.

2.5 | Extraction yield

The yield was calculated based on the mass of the sample used in the extraction (Table 1) and the mass of the dry extract was obtained. The results were expressed as a percentage.

2.6 | Total phenolic content

TPC values were estimated by the Folin-Ciocalteu method with modifications (Singleton & Rossi, 1965). Briefly, 0.0081 g of the extract was diluted in 5 ml of water. Then, this solution was added to 2,370 µl of distilled water and 150 µl of the Folin-Ciocalteu reagent. After 5 min in a dark place, the mixture was neutralized with 450 µl of a 15% Na₂CO₃ solution and homogenized with the help of a vortex (VTX-2500-Biomixer). Two hours later, the absorbance was measured at 765 nm (USB4000-UV-VIS-ES spectrophotometer, Ocean Optics, Largo, FL, EUA). Gallic acid was used to construct the calibration curve ($y = 0.0012x - 0.0026$; $R^2 = 0.9991$) and the results were expressed in mg of gallic acid (GAE) per 100g of the sample (dry basis).

2.7 | Total flavonoid content

TFC values were assessed according to the protocol previously described by Alothman et al. (Alothman et al., 2009). For each extract, 0.0081 g was diluted in 5 ml of water, and to this solution, 1,000 µl of distilled water and 75 µl of 5% NaNO₂ were added. After 5 min, 150 µl of 10% AlCl₃ • 6H₂O were added. After 6 min, 500 µl of NaOH (1 mol/L) and 600 µl of distilled water were added, followed by the determination of absorbance at 510 nm (USB4000-UV-VIS-ES spectrophotometer, Ocean Optics). Quercetin was used to construct the calibration curve ($y = 0.0007x + 0.0398$; $R^2 = 0.9935$) and the results were expressed in mg of quercetin equivalents (QE) per 100g of sample (dry basis).

2.8 | Determination of in vitro antioxidant capacity

The DPPH radical scavenging capacity was estimated based on the protocol of Brand-Williams et al., (1995), with some modifications. For the assay, 0.0126 g of each dry extract was added to 5 ml of water, and these solutions were added to 3,900 µl of methanolic solution of DPPH radical at 60 µmol.L⁻¹. Simultaneously, negative control with 100 µl of extracting solution and 3,900 µl of DPPH was prepared. The mixtures were stored away from light for 30 min and the absorbance was determined at 517 nm using a spectrophotometer (USB4000-UV-VIS-ES, Ocean Optics). Results were compared with the Trolox calibration curve ($y = -0.0005x + 0.5663$; $R^2 = 0.9956$) and expressed in µmol Trolox per 100 g of sample (dry basis).

The ABTS was assessed according to the method proposed by Thaipong et al., (2006). First, a working solution was prepared by stirring two stock solutions (A and B), consisting of 7.4 mmol/L ABTS (A) and 2.6 mmol/L of potassium persulfate (B), in equal amounts. After reacting for 12 hr at room temperature in the dark, the solution was diluted by mixing 1 ml of ABTS solution with 60 ml of methanol to obtain an absorbance of 1.1 at 734 nm. For the assay, 0.0025 g of each dry extract was diluted in 5 ml of water, and this solution was mixed with 2,850 µl of ABTS solution. Afterward, the mixture was kept in the dark for 2 hr and then the absorbance of the samples was determined at 734 nm. Likewise, a negative control was prepared with 150 µl of extracting solution and 2,850 µl of ABTS solution. Results were compared with the Trolox calibration curve ($y = -0.0011x + 0.9493$; $R^2 = 0.9932$) and expressed in µmol Trolox per 100 g of the sample (dry basis).

2.9 | Identification of bioactive compounds by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS analysis

The extracts were resuspended in 500 µL of water/acetonitrile and then analyzed by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS. The UHPLC analysis (Shimadzu, Nexera X2, Japão) was performed using an Acquity UPLC HSS T3 C18 column (Waters, USA, 1.7 µm, 2.1 × 100 mm) at a flow

rate of 0.250 mL.min⁻¹. The elution gradient of solvents A (H₂O with 0.1% formic acid, v/v) and B (acetonitrile with 0.1% formic acid, v/v) was executed as follows: 5% B 0–1 min, 70% B 1–10 min, 98% B 12–20 min, and maintained at 5% B 20–25 min at 40°C, the final 5 min being used to reconstitute the column for the next analysis (Luiza et al., 2019).

High-resolution mass spectrometry (HRMS) was performed on a Q-TOF Geometry Impact II (Bruker Daltonics Corporation, Germany) equipped with an electrospray ionization source (ESI). The instrument was calibrated using a sodium formate solution (10 mmol.L⁻¹; isopropanol: water; 1:1; v/v) containing 50 µl of concentrated formic acid. The ionization source was operated in positive ionization mode and set to 4,500 V, with a potential end of the plate of -500 V. The drying gas parameters were adjusted to 8 L.min⁻¹ at 180°C with a nebulizing gas pressure of 4 bar. The data were obtained in the range of m/z 50 to 1,300 with an acquisition rate of 5 Hz. The five most intense ions were selected for automatic fragmentation (AutoMS/MS). Data were acquired using HyStar Application software version 3.2 and OTOF Control (Bruker Daltonics Corporation, Germany) (Silva et al., 2020).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Extraction yield

The extraction yield values varied between 13.68% ± 0.50 (UT8) and 31.47% ± 1.87 (UT5) for HAE, and between 12.41% ± 0.76 (US4) and 31.91% ± 1.98 (US5) for UAE (Table 1). The models were statistically

significant ($p < .05$) for both extraction methods, with the quadratic model showing an adjusted coefficient of determination (R^2_{adj}) of 0.9303 for HAE (Table 2), 0.9602 for the UAE (Table 3), and both models did not have lack of fit ($p > .05$). Furthermore, for UAE and HAE, the effect of the binary interaction between the solid/solvent ratio and water/ethanol ratio was not statistically significant ($p > .05$ for t test of the regression coefficient), so these coefficients were removed from the models.

The yield observed for both extraction methods can be explained by its capabilities in facilitating the interaction of the solvent with the particles of the solid matrix. The low extraction temperature and the reduced operating time also minimize the losses due to the degradation of compounds. It is important to highlight that the extraction yield for UAE was slightly superior, but the higher cost of the equipment is a drawback when compared with HAE (Vongsak et al., 2013).

The negative values for b_1 (Tables 2 and 3) and the response surfaces (Figures 1 and 2) indicate that the increase in the solid/solvent ratio decrease the yield. The experiments UT1, UT2, UT5, US1, US2, and US5 result in extracts with higher yields. This phenomenon occurs when the solvent reaches an equilibrium with the sample and it is not possible to extract more bioactive components (Santos et al., 2018). The negative values for b_2 (linear effect for water/ethanol ratio) in HAE (Table 2) and in UAE (Table 3) evidence that pure solvents decrease the extraction performance. The fact that the quadratic coefficient b_{22} was higher than b_2 , for both equipment, confirms that the solvent mixture water/ethanol (1:1) allowed the highest extraction yields (UT5 and US5).

TABLE 2 Statistically significant regression coefficients ($p < .05$) of the models adjusted for yield, TPC, and DPPH for the HAE extraction equipment

Model coefficients	Yield (%)	TPC ^f (g GAE.100 g ⁻¹)	Antioxidant capacity (µmol Trolox 100 g ⁻¹)
			DPPH
b_0	25.40	2.29	5,531.83
b_1	-4.09	-0.31	-1,009.53
b_{11}	-	-	-
b_2	-2.35	-0.05	606.60
b_{22}	-3.53	-0.55	-1,725.29
b_{12}	-	-	-
The overall quality of the fit			
R^{2a}	0.9535	0.7071	0.9081
$R^2_{adj}{}^b$	0.9303	0.5606	0.8621
p^c	2.16×10^{-4}	4.85×10^{-2}	1.64×10^{-3}
$p(FA)^d$	0.2788	0.9152	0.7780
SEP ^e	1.42	0.42	684.50

^a Coefficient of determination.

^b Adjusted coefficient of determination.

^c p -value for regression.

^d Lack of fit.

^e Standard error of prediction.

^f Total phenolic content.

TABLE 3 Statistically significant regression coefficients ($p < .05$) of the adjusted models for extraction yield, TPC, TFC, DPPH, and ABTS for the UAE extraction equipment

Model parameters	Yield (%)	TPC ^f (g GAE.100 g ⁻¹)	TFC ^g (g QE.100 g ⁻¹)	Antioxidant capacity (μmol Trolox 100 g ⁻¹)	
				DPPH	ABTS
b_0	25.96	2.35	1.91	5,666.69	17,249.77
b_1	-5.24	-0.43	-0.43	-865.77	-2,635.25
b_{11}	—	—	—	—	—
b_2	-3.13	-0.04	-0.04	194.76	-1,302
b_{22}	-4.31	-0.54	-0.63	-2,371.02	-5707.13
b_{12}	—	—	—	—	—
The overall quality of the fit					
R^{2a}	0.9721	0.8906	0.9224	0.8213	0.8292
R_{adj}^{2b}	0.9602	0.8437	0.8891	0.7446	0.7560
p^c	8.34×10^{-6}	9.66×10^{-4}	2.94×10^{-4}	5.22×10^{-3}	4.47×10^{-3}
$p(FA)^d$	0.4075	0.0581	0.4510	0.5438	0.9905
SEP ^e	1.30	0.24	0.22	1,129.82	2,821.27

^a Coefficient of determination.^b Adjusted coefficient of determination.^c p -value for regression.^d Lack of fit.^e Standard error of prediction.^f Total phenolic content.

3.2 | Total phenolic content

TPC values ranged from 1.06 ± 0.07 (UT8) to 2.75 ± 0.09 gGAE/100 g Moringa (UT5) for HAE and from 1.06 ± 0.04 (US4) to 2.66 ± 0.10 g GAE/100 g Moringa (US5) for UAE. Such slightly higher efficiency of the HAE approach was observed because the equipment applies a high shear rate in a few seconds that allows the rupture of plant cell structures, promoting the release of metabolites like phenolic compounds (Santos et al., 2018).

The regression models were statistically significant coefficients ($p < .05$) for both extraction equipment, as shown in Tables 2 (HAE) and 3 (UAE). The model obtained for HAE, despite being significant ($p = 4.85 \times 10^{-2}$) and presenting no lack of fit ($p_{(FA)} = 0.9152$), did not present a good predictive capacity as the adjusted R^2 was far from 1 ($R_{adj}^2 = 0.5606$). Moreover, the UAE model had no lack of fit and an R_{adj}^2 value of 0.8437, thus a good predictive capacity.

For HAE and UAE, the recovery of TPC was dependent on the solid/solvent ratio and the solvent mixture used. When high values of solid/solvent ratio were used and when pure solvents were applied, a reduction in the extraction efficiency was observed. Likewise the yield, TPC values were higher for the mixture of water and ethanol solvents 1:1 (quadratic coefficient b_{22} is greater than linear coefficient b_2) and also for the extractions with lower sample mass (negative b_1), as shown in Table 2 and Figure 1 for HAE and Table 3 and Figure 2 for UAE. These results are in agreement with previous works (Alves et al., 2016; Desta et al., 2016; Xie et al., 2018), reinforcing that solvents with intermediate polarities, such as the water-ethanol mixture 1:1, are more suitable for the extraction of phenolic

compounds from plant matrices. According to Dent et al., (2013), ethanol hydroalcoholic mixtures are the most suitable solvent systems for the extraction of polyphenols due to the different polarities of the bioactive constituents and their acceptability as a food-grade solvent.

TPC values similar to those observed for UAE (Table 1) were reported by Rodríguez-Pérez et al., (2015), which found 2.4 g GAE/100 g of Moringa leaves in their first extraction. Rocchetti et al., (2019) verified that the water-ethanol mixture (1:1) was more efficient than the methanol and water-methanol mixture (1:1) in extracting polyphenols from Moringa leaves via UAE and HAE, with TPC values of 1.448 g/100 g of dry leaf and 1.875 g/100g dry leaf, respectively. When the water-methanol solution (1:1) was used in the extraction via an ultrasonic bath, the results were less expressive (0.097 g GAE.100 g⁻¹ dry leaf) (Rocchetti et al., 2019).

3.3 | Total flavonoid content

The TFC values for HAE ranged from 0.86 ± 0.12 (UT8) to 2.52 ± 0.06 (UT9) g of QE/100g of Moringa leaf; however, it was not possible to obtain a valid model, since the quadratic mathematical model was not statistically significant. Moreover, for UAE the flavonoid contents ranged from 0.58 ± 0.10 (US7) to 2.33 ± 0.04 (US5) g of QE/100g of Moringa leaf; the model was statistically significant and there was no lack of fit, with an R_{adj}^2 of 0.8891.

Superior TFC values were obtained for the extraction with the HAE equipment when comparing with UAE. For both extraction

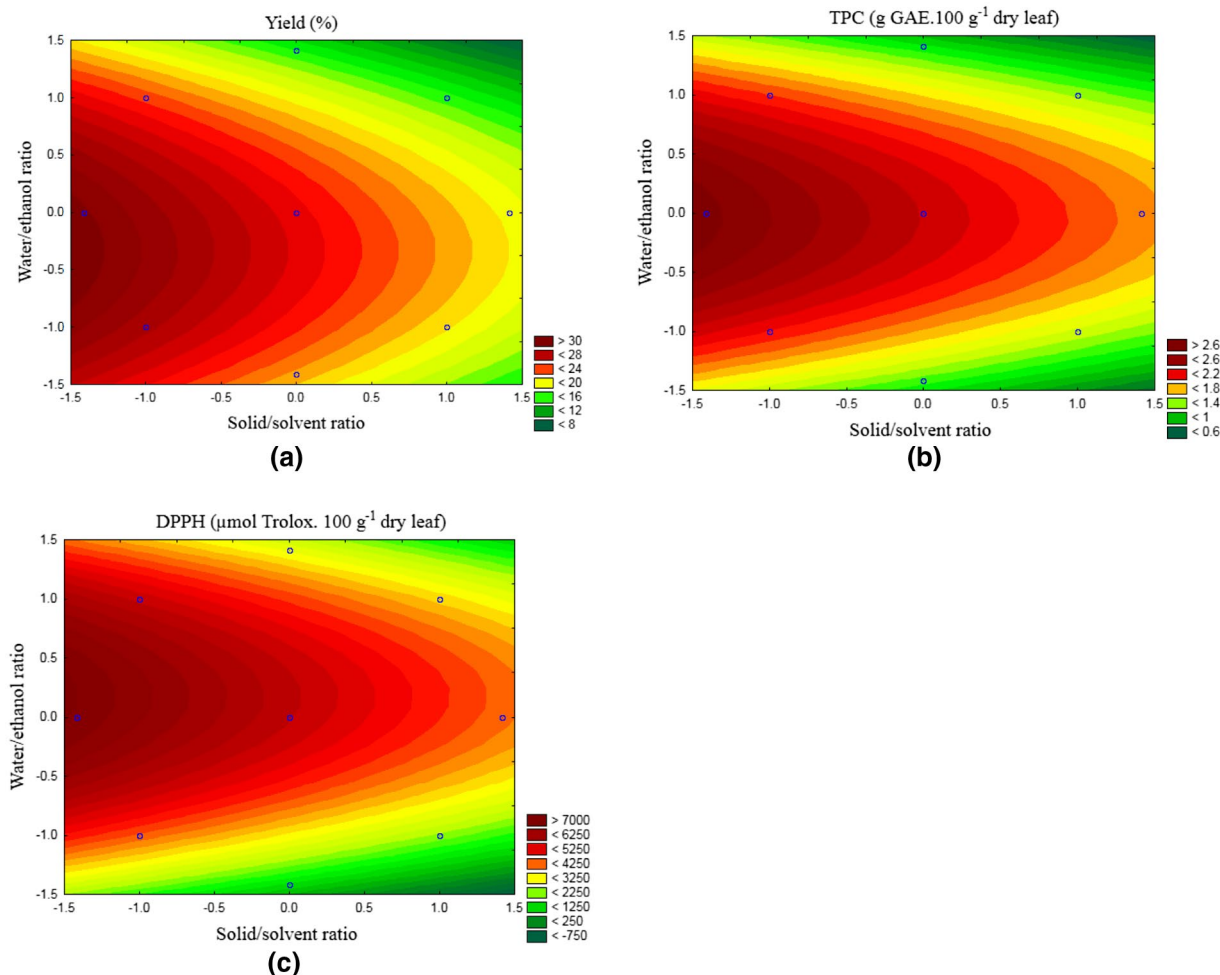


FIGURE 1 Response surfaces (contour plots) for extraction yield (a), TPC (b), and DPPH (c) as a function of water/ethanol proportions and solid/solvent ratio for HAE extraction

approaches, no proportional increase in the TFC values was observed when the sample mass was increased. This can be confirmed by the values displayed in Table 1 for HAE (this equipment did not present a significant model) and by the negative value of b_1 for the UAE (Table 3). TFC yields were improved when a mixture of solvents 1:1 ethanol-water was applied to both types of equipment. This is evidenced by the TFC values of UT extracts in Table 1 for the HAE equipment and the quadratic coefficient (b_{22}) is greater than the linear one (b_2) for UAE (Table 3). Furthermore, experiments 7 to 11 (Table 1), which were conducted with the same mass of the sample, confirms this fact. Assays 9 to 11 (a mixture of solvents) allowed higher TFC values than the single-solvent experiments (7 to 8). These results agree with several authors (Alves et al., 2016; Meneses et al., 2013; Viell et al., 2020), which have demonstrated that the extraction of antioxidant molecules is improved when used a mixture of solvents. Braham et al., (2019) found lower TFC values (0.472g QE.100 g⁻¹ dry leaf) for extractions via mechanical agitation using the same solid/solvent and water/ethanol ratio of UT5 and US5. Such comparison reinforce the superiority of the emerging extraction methods in relation to the traditional techniques.

3.4 | In vitro antioxidant assays

Two classic chemical methods were employed to assess the antioxidant potential of the Moringa extracts. The application of more than one method for evaluating the antioxidant capacity of plant matrices is essential, because phytochemicals act by different mechanisms, each possessing its specific target within the reaction matrix (Corrêa et al., 2017; Garcia et al., 2019). The antioxidant capacity values estimated by the DPPH method varied between $1,587.32 \pm 40.83$ (UT3) and $7,051.55 \pm 245.73$ μmol of Trolox/100 g of Moringa leaf (UT5) for HAE and between $1,813.49 \pm 12.26$ (US7) and $6,999.35 \pm 28.27$ μmol of Trolox/100 g of Moringa leaf (US9) for UAE.

For both types of equipment were obtained statistically significant quadratic models with no lack of fit (Tables 2 and 3). The negative coefficients for solid/solvent ratio (b_1) indicated that the increase in the Moringa leaf mass in the extraction did not improve the antioxidant activity values assessed via DPPH assay. The quadratic coefficients for water/ethanol ratio (b_{22}) were higher than the linear coefficients (b_2) for HAE and UAE. Confirming that the 1:1 solvent mixture had a higher efficiency in extracting compounds with antioxidant potential. However, it is important to highlight that the

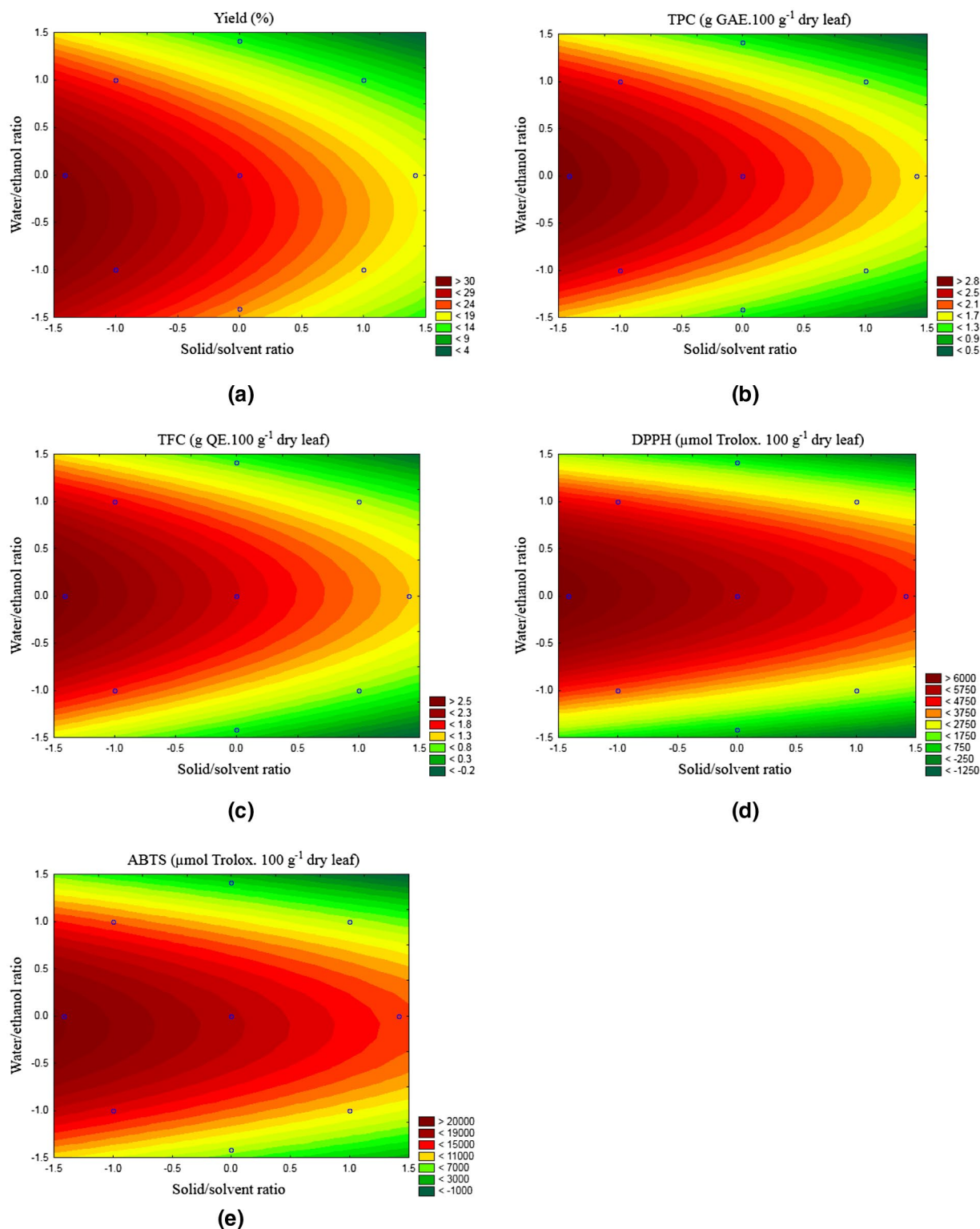


FIGURE 2 Response surfaces for extraction yield (a), TPC (b), TFC (c), DPPH (d), and ABTS (e) as a function of water/ethanol proportions and solid/solvent ratio for UAE extraction

DPPH antioxidant activity values produced positive values for the linear coefficients of the water/ethanol ratio, which indicates that the increase in ethanol increased the antioxidant capacity. This fact could be associated with the DPPH method which estimates the antioxidant action of fat-soluble compounds that have an affinity

for organic solvents such as ethanol (Sucupira et al., 2014). Braham et al., (2019) reported a lower DPPH antioxidant capacity value (56 μmol Trolox 100 g⁻¹ of *Moringa* dry leaf) when investigating the extraction with a 1:1 ethanol–water solution using maceration with magnetic stirring.

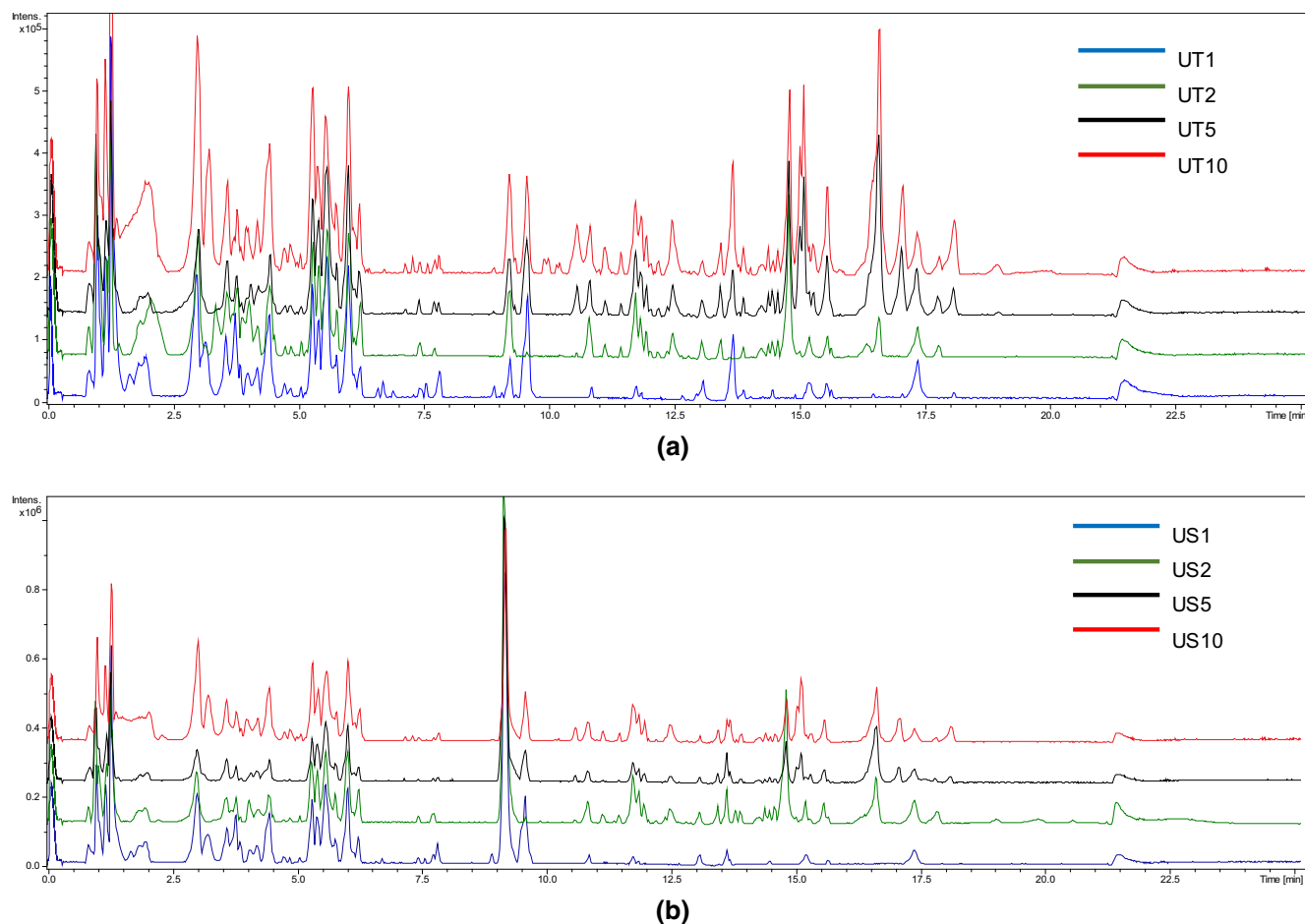


FIGURE 3 Overlap of base peak chromatograms (BPC) analysis of extracts obtained by HAE (a) and UAE (b). The visual inspection of chromatograms shows peak populations of similarity, in the 1–7.5 min retention time, region where the compounds of interest were detected

Regarding the ABTS assay results, it was not possible to obtain a statistically significant quadratic model to described data from the HAE. The antioxidant capacity values for HAE ranged from $9,116.15 \pm 312.65$ (UT8) to $15,751.57 \pm 324.59$ (UT10) μmol of Trolox/100 g Moringa leaf. For UAE ranged from $4,357.68 \pm 275.18$ (US8) to $19,163.82 \pm 493.61$ (US5) μmol of Trolox/100 g Moringa leaf (Table 1). Although UAE presented an R^2_{adj} of 0.7560 (Table 3), the model was statistically significant and showed no lack of fit. The regression model for ABTS showed an inverse relationship between the amount of Moringa leaf and the concentration of antioxidants. Again, the optimized extraction occurs when the concentration of solvents was applied in an equal proportion to water/ethanol. Vázquez-León et al., (2019) found ABTS activity values between 9,828.0 and 11,674.0 mg TE/100g db, when investigating Moringa leaf extracts obtained via counter-current multistage extraction with a mixture of ethanol/water 80:20 (w/w).

3.5 | Identification of bioactive compounds via UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS analysis

In vitro methods should be employed only as preliminary research, and mandatorily proceeded by high-resolution chromatographic

approaches to find the phytochemical profile (Granato et al., 2018). The extracts UT1, UT2, UT5, UT10, and US1, US2, US5 were the ones that displayed the best results regarding the extraction yield and antioxidant activity. For this reason, they were selected for the phytochemical characterization via UHPLC-ESI(+)-Q-TOF-MS/MS.

The analysis of mass spectrum (MS) chromatograms showed great similarity between the bioactive compound profiles of all assessed extracts (Supplementary Material, Figure 3, and Table 4). The identification was achieved by the interpretation of MS and fragmentation spectra (MS/MS) in comparison with public library spectra, such as GNPS (Wang et al., 2016), KEGG (Ogata et al., 1999), CHEBI (Degtyarenko et al., 2007), and PubChem (Kim et al., 2016). All identified compounds were confirmed by the MS/MS spectra and by calculating the mass error that presented a range of 0.1 to 6.0 ppm (Table 4). Up to 30 components were detected in the Moringa extracts, corresponding to, polyphenol, alkaloid, and lignin compounds.

Compounds 1, 2, 3, 4, and 5, with $[M + H]^+ m/z$ 149.0593, $[M + H]^+ m/z$ 165.0541, $[M + H]^+ m/z$ 193.0337, $[M + H]^+ m/z$ 369.1166 and $[M + H]^+ m/z$ 355.1008, were tentatively identified as cinnamic acid, coumaric acid, citric acid, 3-O-feruloylquinic acid, and chlorogenic acid, respectively (Table 4). Gallic and chlorogenic

TABLE 4 Bioactive compounds identified by UHPLC-ESI (+)-MS/MS in selected extracts

ID	Putative identification of compounds	Molecular Formula	[M + H] ⁺ measured ^a	[M + H] ⁺ theoretical	Fragments (MS/MS)	Error mass (ppm)
1	Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	149.0593	149.0597	89.0594 (100) 103.0539 (51.4) 149.0590 (24.9)	-2.7
2	Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	165.0541	165.0546	120.0805 (100)	-3.2
3	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	193.0337	193.0343	139.0023 (100) 129.0178 (67.6) 111.0075 (48.0)	-3.0
4	3-O-Feruloylquinic acid	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	369.1166	369.1180	177.0542 (100)	-3.8
5	Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1008	355.1024	163.0382 (100)	-4.4
6	Trigonelline	C ₇ H ₇ NO ₂	138.0548	138.0549	138.0548 (100)	-0.7
7	Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166.0856	166.0863	120.0805 (100)	-3.9
8	Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205.0964	205.0972	146.0594 (100) 188.0702 (65.6) 144.0880 (21.5)	-3.7
9	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.0551	287.0550	287.0551 (100) 226.0533 (28.9)	0.3
10	Kampeferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.0547	287.0550	287.0547 (100)	-1.0
11	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.0497	303.0499	303.0497 (100)	-0.8
12	Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	317.0656	317.0656	317.0356 (100) 138.0915 (30.2)	0.1
13	Vitexin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.1121	433.1129	313.0701 (100) 283.0597 (49.2) 337.0699 (41.7)	-1.8
14	Quercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.1066	449.1078	287.0548 (100)	-2.8
15	Isoquercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1017	465.1027	303.0496 (100)	-2.2
16	Isorhamnetin 3-O-glucoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	479.1177	479.1184	317.0654 (100)	-1.5
17	Quercetin 3-(2"-acetylrrhamnoside)	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	491.1166	491.1184	287.0545 (100)	-3.7
18	Quercetin-3-O-glucose-6"-acetate	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	507.1119	507.1133	303.0497 (100) 187.0599 (15.9)	-2.8
19	Kaempferol 3-(2"-O.4"-diacetylrrhamnoside)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	517.1332	517.1341	387.0550 (100) 213.0759 (32.7)	-1.6
20	Luteolin 7-O-(6"-malonylglucoside)	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₄	535.1073	535.1082	287.0551 (100)	-1.7
21	Quercetin 3-O-malonylglucoside	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	551.1015	551.1031	303.0495 (100) 127.0392 (15.3)	-3.0
22	Isorhamnetin 3-(6"-malonylglucoside)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₅	565.1159	565.1188	317.0649 (100) 127.0388 (16.0)	-5.1
23	Apigenin 7-glucuronide-4'-rhamnoside	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₅	593.1479	593.1501	287.0548 (100) 127.0391 (22.3) 145.0477 (16.9)	-3.7
24	Saponarin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.1637	595.1657	313.0698 (100) 415.1010 (96.1) 367.0805 (53.6) 379.0803 (31.0)	-3.4
25	6-Hydroxyluteolin 7-[4"-(3-hydroxy-3-methylglutaryl) glucoside]	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₆	609.1431	609.1450	303.0494 (100) 127.0338 (17.9) 145.0497 (15.1)	-3.1
26	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.1570	611.1607	303.0494 (100) 127.0338 (17.9) 145.0497 (15.1)	-6.0
27	Luteolin 3'-methyl ether 7-glucuronide-4'-rhamnoside	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₆	623.1579	623.1607	317.0648 (100) 127.0393 (20.7) 145.0496 (15.1)	-4.4
28	Quercetin 3-O-sophoroside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	627.1518	627.1556	303.0486 (100) 465.0995 (16.5) 304.0518 (15.6)	-6.0
29	Quercetin 3-(6"-malonylglucoside)-7-glucoside	C ₃₀ H ₃₂ O ₂₀	713.1531	713.1560	465.1001 (100) 303.0492 (90.1) 127.0385 (19.8)	-4.0
30	Isolariciresinol 9'-O-b-D-glucoside	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	523.2172	523.2174	219.1014 (100)	-0.4

^aProtonated molecular mass.

acids are reported to be the predominant phenolic acids in Moringa leaves (Rocchetti et al., 2020). Phenolic acids are secondary aromatic metabolites of plants, accounting for roughly one-third of the total phenolic compounds of plant matrices (Xiao & Kai, 2012; Yuan et al., 2019). They display great antioxidant, antimutagenic, and anti-inflammatory actions in vitro and in vivo, in addition to immunological protection against various human cancers (Heleno et al., 2015). Furthermore, this key class of dietary polyphenols was proven to shield against the development and evolution in pathological conditions that arise from oxidative stress. Hence, a diet rich in phenolic acids has been associated with a reduction in the incidence of cardiovascular and neurodegenerative diseases (Yuan et al., 2019).

Compound 6 ($[M + H]^+ m/z$ 138.0548) was tentatively identified as trigonelline, a strongly polar hydrophilic alkaloid found in several legume seeds that are reported to have promising anti-diabetic properties. Trigonelline works by improving the insulin signaling pathway and the activities of enzymes linked to glucose metabolism, besides mitigating oxidative stress in type 2 diabetes (Amaro et al., 2014; Farag et al., 2015).

Phenolic compounds 9–29 were tentatively identified in the extracts using previous works (Coppin et al., 2013; Luiza et al., 2019; Rocchetti et al., 2019; Rodríguez-Pérez et al., 2015). The major flavonoids reported in Moringa leaves are myricetin, quercetin, and kaempferol derivatives (Coppin et al., 2013; Rodríguez-Pérez et al., 2015). Quercetin (11, $[M + H]^+ m/z$ 303.0497) and its derivatives possess a very stable chemical structure in aqueous solutions and can thus be absorbed in vivo, a fact that arouses interest in its use for a variety of additives (Mishurov et al., 2016; Yang et al., 2020). Likewise, the flavonoid kaempferol (10, $[M + H]^+ m/z$ 287.0547) present great antifungal power and potential to be applied as a food preserver, in addition to its largely reported antioxidant capacity (del Valle et al., 2016; Jin, 2019). Phenolic components can act as pro-oxidants under some conditions, they can accelerate the lipid oxidation processes and catalyze the production of oxygen radicals. Rutin (26, $[M + H]^+ m/z$ 611.1570), a flavonoid tentatively identified in our extracts, does not show such pro-oxidant potential. Considered a bioactive compound superior to others, rutin exerts several health-promoting effects related to its ability to eliminate radicals, such as hydroxyl, superoxide, and peroxy radicals (Hooresfand et al., 2015; Prince & Kamalakkannan, 2006).

Compound 30 with $[M + H]^+ m/z$ 523.2172 was tentatively identified as 9'-O-b-D-glucoside isolariciresinol, belonging to the lignan class. These molecules have confirmed their anticancer, insecticidal, estrogenic, antiviral, anti-hypersensitive, and antioxidant properties (Zálešák et al., 2019). Moreover, two essential amino acids were also tentatively identified as phenylalanine (7, $[M + H]^+ m/z$ 166.0856) and tryptophan (8, $[M + H]^+ m/z$ 205.0964). Both compounds have already been reported in Moringa leaves (Luiza et al., 2019).

The phytochemical profile herein reported (Table 4) agreed with previous works (Gómez-Martínez et al., 2020; Luiza et al., 2019; Rocchetti et al., 2019, 2020) confirming the potential of distinct extraction techniques (traditional vs. emerging technologies) to recover

bioactive compounds from Moringa leaves. It is worth mention that we had some difficulty comparing our results with the available data in the literature. The majority of research performed on Moringa leaves employed exclusively in vitro spectrophotometric assays (e.g., Folin–Ciocalteu) to evaluate the TPC. Several authors have verified discrepancies in terms of nutrients and phenolic compounds in Moringa leaves grown in distinct countries (Brilhante et al., 2017; Gómez-Martínez et al., 2020; Rocchetti et al., 2020; Vázquez-León et al., 2019), confirming that not only the extraction approach but also the genetic and edafoclimatic conditions greatly impact the extracts' composition. For instance, Gómez-Martínez et al., (2020) investigated the phenolic profile by HPLC/MS of extracts from leaves and petioles of Moringa in three different locations of Spain. They verified that apigenin 6,8-di-C-glucoside, apigenin arabinoside-glucoside, and apigenin 6-C-glucoside were the most frequent biomolecules in samples, followed by cyanidin 3,5-O-diglucoside, peonidin 3-O-(6"-acetyl-glucoside), and quercetin 3-O-glucoside. However, the authors observed significant differences among the phytochemical compounds of the assessed extracts. Recently, Rocchetti et al., (2020) studied the polyphenolic profile of Moringa leaves from Italy by an untargeted metabolomic approach based on UHPLC-QTOF-mass spectrometry from HAE extractions with three solvent systems (methanol, methanol-water 50:50 v/v, and ethyl acetate). The authors verified abundant contents of dihydromyricetin 3-O-rhamnoside, quercetin 3-O-rhamnoside, glycosidic forms of kaempferol, gallic acid 4-O-glucoside, besides isomeric forms of caffeoylquinic acid.

4 | CONCLUSION

The obtained results showed that HAE and UAE are suitable for obtaining antioxidant extracts from Moringa leaves. HAE has an extraction time (10 min) longer than UAE (5 min), but the HAE equipment is more accessible than the UAE equipment. The yield presents a negative correlation with the mass of Moringa leaves used in the extraction. The increase in the mass difficulty the effective contact of the solvent with the sample and consequently decrease the extraction of the antioxidant compounds. Chemical analyzes and the response surface methodology demonstrated that the optimal extract was obtained with a mixture of 1:1 ethanol:water. The phytochemical profile identified using the UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS approach confirms that the antioxidant activity verified in the Moringa extracts was related to their composition which contains several antioxidant compounds. Thirty compounds were identified by UHPLC-QTOF-MS/MS, among which quercetin, rutin, kaempferol, alkaloids, and lignins.

ETHICAL GUIDELINES

Ethical approval was not required for this research.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Financing Code 001) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financing this research. They are also grateful to the Complex of Research Support Centers (COMCAP) of the State University of Maringá (UEM) and CAMulti-CM (UTFPR) for the technical support. R.C.G. Corrêa is a research grant recipient of the Cesumar Institute of Science Technology and Innovation (ICETI).

CONFLICTS OF INTEREST

We have no conflicts of interest to disclose.

AUTHOR CONTRIBUTION

Juliana Mendes Garcia Pereira: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing-original draft. **Franciele Leila Giopato Viell:** Methodology; Writing-original draft. **Patrícia Casarin Lima:** Data curation; Investigation; Methodology; Writing-original draft. **Evandro Silva:** Data curation; Investigation; Methodology; Writing-original draft. **Eduardo Pilau:** Data curation; Investigation; Methodology; Resources; Writing-original draft. **Rúbia Carvalho Gomes Corrêa:** Data curation; Formal analysis; Validation; Writing-review & editing. **Evandro Bona:** Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Project administration; Software; Supervision; Validation; Writing-review & editing. **Angélica Marquetotti Salcedo Vieira:** Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Resources; Supervision; Validation; Writing-review & editing.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data supporting the conclusions of this study are available through the corresponding author, upon reasonable request.

ORCID

Juliana M. G. Pereira  <https://orcid.org/0000-0001-5795-7071>
Franciele Leila G. Viell  <https://orcid.org/0000-0002-9947-5545>
Patrícia C. de Lima  <https://orcid.org/0000-0002-8628-7086>
Evandro Silva  <https://orcid.org/0000-0002-8557-4171>
Eduardo J. Pilau  <https://orcid.org/0000-0002-9175-3520>
Rúbia C. G. Corrêa  <https://orcid.org/0000-0003-0269-4344>
Evandro Bona  <https://orcid.org/0000-0001-8557-7527>
Angélica M. S. Vieira  <https://orcid.org/0000-0001-7467-3767>

REFERENCES

- Alothman, M., Bhat, R., & Karim, A. A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115(3), 785–788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.005>
- Alves, G. H., Ferreira, C. D., Vivian, P. G., Monks, J. L. F., Elias, M. C., Vanier, N. L., & De Oliveira, M. (2016). The revisited levels of free and bound phenolics in rice: Effects of the extraction procedure. *Food Chemistry*, 208, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.107>
- Amaro, C., González-Cortazar, M., Herrera-Ruiz, M., Román-Ramos, R., Aguilar-Santamaría, L., Tortoriello, J., & Jiménez-Ferrer, E. (2014). Hypoglycemic and hypotensive activity of a root extract of *Smilax aristolochiifolia*, Standardized on N-trans-Feruloyl-Tyramine. *Molecules*, 19(8), 11366–11384. <https://doi.org/10.3390/molecules190811366>
- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H. P., Orhan, I. E., Patra, J. K., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., & Atanasov, A. G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82–102. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.018>
- Braham, F., Carvalho, D. O., Almeida, C. M. R., Zaidi, F., Magalhães, J. M. C. S., Guido, L. F., & Gonçalves, M. P. (2019). Online HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from *Moringa oleifera* leaves. *South African Journal of Botany*, 129, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.001>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brilhante, R. S. N., Sales, J. A., Pereira, V. S., Castelo-Branco, D. D. S. C. M., de Aguiar Cordeiro, R., de Souza Sampaio, C. M., Paiva, M. D. A. N., Dossantos, J. B. F., Sidrim, J. J. C., & Rocha, M. F. G. (2017). Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(7), 621–630. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.002>
- Cañadas, R., González-Miquel, M., González, E. J., Díaz, I., & Rodríguez, M. (2021). Hydrophobic eutectic solvents for extraction of natural phenolic antioxidants from winery wastewater. *Separation and Purification Technology*, 254, 117590–<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117590>
- Chen, L., Yang, M., Mou, H., & Kong, Q. (2018). Ultrasound-assisted extraction and characterization of anthocyanins from purple corn bran. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13377>
- Coppin, J. P., Xu, Y., Chen, H., Pan, M.-H., Ho, C.-T., Juliani, R., Simon, J. E., & Wu, Q. (2013). Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1892–1899. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.010>
- Corrêa, R. C. G., Haminiuk, C. W. I., Barros, L., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Kato, C. G., Correa, V. G., Peralta, R. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Journal of Functional Foods*, 36, 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.030>
- Degtyarenko, K., de Matos, P., Ennis, M., Hastings, J., Zbinden, M., McNaught, A., Alcantara, R., Darsow, M., Guedj, M., & Ashburner, M. (2007). ChEBI: A database and ontology for chemical entities of biological interest. *Nucleic Acids Research*, 36(Database), D344–D350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm791>
- del Valle, P., García-Armesto, M. R., de Arriaga, D., González-Donquiles, C., Rodríguez-Fernández, P., & Rúa, J. (2016). Antimicrobial activity of kaempferol and resveratrol in binary combinations with parabens or propyl gallate against *Enterococcus faecalis*. *Food Control*, 61, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.001>
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brčić, M., Bosiljkov, T., & Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 84–91.
- Desta, K. T., Kim, G. S., Kim, Y. H., Lee, W. S., Lee, S. J., Jin, J. S., Abd El-Aty, A. M., Shin, H. C., Shim, J. H., & Shin, S. C. (2016). The polyphenolic

- profiles and antioxidant effects of *Agastache rugosa* Kuntze (Banga) flower, leaf, stem and root. *Biomedical Chromatography*, 30(2), 225–231. <https://doi.org/10.1002/bmc.3539>
- Falowo, A. B., Mukumbo, F. E., Idamokoro, E. M., Lorenzo, J. M., Afolayan, A. J., & Muchenje, V. (2018). Multi-functional application of Moringa oleifera Lam. in nutrition and animal food products: A review. *Food Research International*, 106, 317–334. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.079>
- Farag, M. A., Porzel, A., & Wessjohann, L. A. (2015). Unraveling the active hypoglycemic agent trigonelline in *Balanites aegyptiaca* date fruit using metabolite fingerprinting by NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 115, 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.08.003>
- Fombang, E. N., Nobossé, P., Mbofung, C. M. F., & Singh, D. (2020). Optimising extraction of antioxidants from roasted Moringa oleifera Lam. leaves using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(6), 1–13. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14482>
- Garcia, J. A. A., Corrêa, R. C. G., Barros, L., Pereira, C., Abreu, R. M. V., Alves, M. J., Calhêla, R. C., Bracht, A., Peralta, R. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Phytochemical profile and biological activities of “Oraprobis” leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. *Food Chemistry*, 294(May), 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.074>
- Gómez-Martínez, M., Ascacio-Valdés, J. A., Flores-Gallegos, A. C., González-Domínguez, J., Gómez-Martínez, S., Aguilar, C. N., Morlett-Chávez, J. A., & Rodríguez-Herrera, R. (2020). Location and tissue effects on phytochemical composition and in vitro antioxidant activity of Moringa oleifera. *Industrial Crops and Products*, 151(April), 112439. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112439>
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*, 5(2), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.04.001>
- Görgüç, A., Özer, P., & Yılmaz, F. M. (2020). Microwave-assisted enzymatic extraction of plant protein with antioxidant compounds from the food waste sesame bran: Comparative optimization study and identification of metabolomics using LC/Q-TOF/MS. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14304>
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., Miyashita, K., Camp, J. V., Alasalvar, C., Ismail, A. B., Elmore, S., Birch, G. G., Charalampopoulos, D., Astley, S. B., Pegg, R., Zhou, P., & Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry*, 264(March), 471–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.012>
- Gupta, S., Jain, R., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2018). Nutritional and medicinal applications of Moringa oleifera Lam.—Review of current status and future possibilities. *Journal of Herbal Medicine*, 11, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.07.003>
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
- Heleno, S. A., Prieto, M. A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of ergosterol from *Agaricus bisporus* L. by-products using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 100, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.006>
- Hooresfand, Z., Ghanbarzadeh, S., & Hamishehkar, H. (2015). Preparation and characterization of rutin-loaded nanophytosomes. *Tabriz University of Medical Sciences*, 21(Suppl 1), 145–151. <https://doi.org/10.15171/PS.2015.29>
- Jin, Y. (2019). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(19), 126589. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.07.048>
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B. A., Wang, J., Yu, B. O., Zhang, J., & Bryant, S. H. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202–D1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.jultsonch.2020.105325>
- Lin, M., Zhang, J., & Chen, X. (2018). Bioactive flavonoids in Moringa oleifera and their health-promoting properties. *Journal of Functional Foods*, 47(June), 469–479. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.011>
- Liu, Y., Wang, X., Wei, X., Gao, Z., & Han, J. (2018). Values, properties and utility of different parts of Moringa oleifera: An overview. *Chinese Herbal Medicines*, 10(4), 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2018.09.002>
- Looi, Y. F., Ong, S. P., Julkifly, A., & Alias, M. S. (2019). Effects of pretreatment and spray drying on the physicochemical properties and probiotics viability of Moringa (Moringa oleifera Lam) leaf juice powder. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(4), e13915. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13915>
- Ma, Z. F., Ahmad, J., Zhang, H., Khan, I., & Muhammad, S. (2019). Evaluation of phytochemical and medicinal properties of Moringa (Moringa oleifera) as a potential functional food. *South African Journal of Botany*, 129, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.12.002>
- Meneses, N. G. T., Martins, S., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, 108, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.015>
- Mishurov, D. A., Voronkin, A. A., & Roshal, A. D. (2016). Synthesis, molecular structure and optical properties of glycidyl derivatives of quercetin. *Structural Chemistry*, 27(1), 285–294. <https://doi.org/10.1007/s11224-015-0694-5>
- Muhammad, H. I., Asmawi, M. Z., & Khan, N. A. K. (2016). A review on promising phytochemical, nutritional and glycemic control studies on Moringa oleifera Lam. in tropical and sub-tropical regions. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(10), 896–902. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.08.006>
- Nishad, J., Saha, S., & Kaur, C. (2019). Enzyme- and ultrasound-assisted extractions of polyphenols from Citrus sinensis (cv. Malta) peel: A comparative study. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(8), 1–13. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14046>
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., & Kanehisa, M. (1999). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 29–34. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.29>
- Oldoni, T. L. C., Merlin, N., Karling, M., Carpes, S. T., Alencar, S. M. D., Morales, R. G. F., Silva, E. A. D., & Pilau, E. J. (2019). Bioguided extraction of phenolic compounds and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of extracts of Moringa oleifera leaves collected in Brazil. *Food Research International*, 125, 108647. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108647>
- Oyeyinka, A. T., & Oyeyinka, S. A. (2018). Moringa oleifera as a food fortificant: Recent trends and prospects. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(2), 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.02.002>
- Pereira, J. M. G., Sanchez, J. L., de Lima, P. C., Possebon, G., Tanamati, A., Tanamati, A. A. C., & Bona, E. (2018). Industrial hydrogenation process monitoring using ultra-compact near-infrared spectrometer and chemometrics. *Food Analytical Methods*, 11(1), 188–200. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0989-9>
- Prince, P. S. M., & Kamalakkannan, N. (2006). Rutin Improves Glucose Homeostasis In Streptozotocin Diabetic Tissues By Altering

- Glycolytic And Gluconeogenic Enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 20(2), 96–102. <https://doi.org/10.1002/jbt>
- Raman, J. K., Alves, C. M., & Gnansounou, E. (2018). A review on moringa tree and vetiver grass – Potential biorefinery feedstocks. *Bioresource Technology*, 249, 1044–1051. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.094>
- Rocchetti, G., Blasi, F., Montesano, D., Ghisoni, S., Marcotullio, M. C., Sabatini, S., Lucini, L. (2019). Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of Moringa oleifera leaves. *Food Research International*, 115(August 2018), 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.046>
- Rocchetti, G., Pagnossa, J. P., Blasi, F., Cossignani, L., Hilsdorf Piccoli, R., Zengin, G., Lucini, L. (2020). Phenolic profiling and in vitro bioactivity of Moringa oleifera leaves as affected by different extraction solvents. *Food Research International*, 127, 108712. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108712>
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from Moringa oleifera Lam leaves. *Industrial Crops and Products*, 66, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.002>
- Santos, C. H. K., Baqueta, M. R., Coqueiro, A., Dias, M. I., Barros, L., Barreiro, M. F., Ferreira, I. C. F. R., Gonçalves, O. H., Bona, E., da Silva, M. V., & Leimann, F. V. (2018). Systematic study on the extraction of antioxidants from pinhão (araucaria angustifolia (bertol.) Kuntze) coat. *Food Chemistry*, 261(February), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.057>
- Santos, P. H., Kammers, J. C., Silva, A. P., Oliveira, J. V., & Hense, H. (2021). Antioxidant and antibacterial compounds from feijoa leaf extracts obtained by pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Food Chemistry*, 344, 128620. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128620>
- Saucedo-Pompa, S., Torres-Castillo, J. A., Castro-López, C., Rojas, R., Sánchez-Alejo, E. J., Ngangyo-Heya, M., & Martínez-Ávila, G. (2018). Moringa plants: Bioactive compounds and promising applications in food products. *Food Research International*, 111, 438–450. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.062>
- Silva, E., da Graça, J. P., Porto, C., Martin do Prado, R., Hoffmann-Campo, C. B., Meyer, M. C., de Oliveira Nunes, E., & Pilau, E. J. (2020). Unraveling Asian Soybean Rust metabolomics using mass spectrometry and Molecular Networking approach. *Scientific Reports*, 10(1), 138. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56782-4>
- Singleton, V. L., & Rossai, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Sucupira, N. R., Da Silva, A. B., Pereira, G., & Da Costa, J. N. (2014). Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas E Da Saúde*, 14(4), 263–269.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Tiloke, C., Anand, K., Gengan, R. M., & Chuturgoon, A. A. (2018). Moringa oleifera and their phytonanoparticles: Potential antiproliferative agents against cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108(April), 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.060>
- Topuz, F., & Uyar, T. (2020). Antioxidant, antibacterial and antifungal electrospun nanofibers for food packaging applications. *Food Research International*, 130, 108927–<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108927>
- Vázquez-León, L. A., Olguín-Rojas, J. A., Páramo-Calderón, D. E., Palma, M., Barbero, G. F., Robles-Olvera, V. J., García-Alvarado, M. A., & Rodríguez-Jimenes, G. C. (2019). Modeling of counter-current multistage extraction of Moringa oleifera leaves using a mechanistic model. *Food and Bioproducts Processing*, 115, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.04.003>
- Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J. A. P., Ferreira, O., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Optimization and comparison of maceration and microwave extraction systems for the production of phenolic compounds from Juglans regia L. for the valorization of walnut leaves. *Industrial Crops and Products*, 107(June), 341–352. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.012>
- Viell, F. L. G., Madeira, T. B., Nixdorf, S. L., Gomes, S. T. M., Bona, E., & Matsushita, M. (2020). Comparison between ultra-homogenisation and ultrasound for extraction of phenolic compounds from teff (Eragrostis tef (Zucc.)). *International Journal of Food Science & Technology*, 55(7), 2700–2709. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14523>
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchoe, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.021>
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapono, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., ... Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Xiao, J., & Kai, G. (2012). A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: Characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(1), 85–101. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499017>
- Xie, P., Huang, L., Zhang, C., Ding, S., Deng, Y., & Wang, X. (2018). Industrial Crops & Products Skin-care effects of dandelion leaf extract and stem extract: Antioxidant properties, tyrosinase inhibitory and molecular docking simulations. *Industrial Crops & Products*, 111(September), 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.017>
- Yang, J. X., Maria, T. C., Zhou, B., Xiao, F. L., Wang, M., Mao, Y. J., & Li, Y. (2020). Quercetin improves immune function in Arbor Acre broilers through activation of NF-κB signaling pathway. *Poultry Science*, 99(2), 906–913. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.021>
- Yuan, S., Zhang, Y., Liu, J., Zhao, Y. U., Tan, L., Liu, J., Wang, Q., & Zhang, H. (2019). Structure-affinity relationship of the binding of phenolic acids and their derivatives to bovine serum albumin. *Food Chemistry*, 278, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.060>
- Zálešák, F., Bon, D. J. Y. D., & Pospíšil, J. (2019). Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. *Pharmacological Research*, 146, 104284–<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104284>

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Pereira JMG, Viell FLG, de Lima PC, et al. Optimization of the extraction of antioxidants from Moringa leaves: A comparative study between ultrasound- and ultra-homogenizer-assisted extractions. *J Food Process Preserv*. 2021;00:e15512. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15512>

Otimização do processo de extração de compostos antioxidantes da fruta exótica Canistel-Pouteria campechiana (Kunth) Baehni.

Juliana Mendes Garcia Pereira^{1,2}; Anielle de Oliveira,²; Lycio Shinji Watanabe³ Suzana Lucy Nixdorf³; Evandro Bona^{2*}; Angélica Marquetotti Salcedo Vieira ¹

¹Postgraduate Program in Food Science, Department of Food Science, State University of Maringá (UEM), PR, Brazil

²Postgraduate Program of Food Technology (PPGTA), Federal University of Technology - Paraná (UTFPR), PR, Brazil

³Development of Instrumentation and Analytical Automation Laboratory, Department of Chemistry, State University of Londrina (UEL), Londrina, Brazil

*Corresponding author: Federal University of Technology - Paraná (UTFPR), Department of Food – Paraná, CEP 87301-899, Campo Mourão, Paraná, Brazil. Tel. +55 44 3518 1477. E-mail: ebona@utfpr.edu.br

Resumo: A fruta Canistel-*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni, nativa da América Central e México e ainda pouco conhecida no Brasil, apresenta uma polpa amarelo-alaranjada, rica em carotenoides, que tem despertado interesse como potencial de vitamina A. O objetivo desse trabalho foi analisar a composição físico-química, o perfil de compostos bioativos, o potencial antioxidante, além de identificar e quantificar alguns compostos bioativos presentes na polpa da fruta *Canistel*. O efeito da composição do solvente (razão água:etanol:acetona) na extração realizada por meio do equipamento ultrassom (UAE), foi determinada pelo planejamento simplex-centróide. As respostas analisadas foram conteúdo de fenólicos totais (TPC), conteúdo de flavonoides totais (TFC), carotenoides, capacidade antioxidante, avaliada por DPPH e ABTS, poder antioxidante redutor férrico (FRAP) e capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC). A quantificação e a identificação dos compostos extraídos foi realizada por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance Acoplada a um Espectrômetro de Massas de Alta Resolução (UHPLC-ESI-QTOF-MS). Foi possível comprovar a grande capacidade antioxidante dos extratos obtidos da polpa da fruta canistel, e de acordo com a otimização, os melhores resultados foram obtidos no ensaio 3, que continha solvente com proporção 0:0:1 água:etanol:acetona (v/v), com exceção da análise de ORAC, que encontrou melhores valores para o experimento 6 (0:0,5:0,5) água:etanol:acetona (v/v)), sempre lembrando que o mínimo de 30% de água foi fixado para todas as análises.

Palavras-chave Canistel-*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni; extração; planejamento experimental; Ultrassom; antioxidantes; UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

Introdução

Considerada uma planta medicinal, a Canistel-*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni é uma árvore frutífera tropical nativa da região da América Central, pertencente à família Sapotaceae. Com dimensões que variam entre 7 e 12 centímetros de comprimento e de 5 a 7.5 centímetros de diâmetro, a fruta canistel apresenta uma polpa amarela e consistente (77.11% do peso total do fruto), semelhante a de uma manga, uma casca fina, podendo ainda variar entre uma a quatro sementes duras [1].

A produção anual de uma árvore pode chegar a até 136.250 kg, onde o peso de cada fruto é de cerca de 175 g. A fruta verde apresenta casca verde e grossa, com presença de látex além de uma polpa, com um sabor amargo e azedo. Já as frutas maturadas tem casca de

46 coloração bem amarelada e textura macia, enquanto sua polpa possui poucas fibras, textura
47 cremosa e sabor adocicado [2,3].

48 As formas de consumo dessa fruta são diversos, podendo ser *in natura* ou assada, além
49 de utilizada na confecção de cremes, sorvetes, milkshakes, geleias e marmeladas. Os
50 benefícios da ingestão das frutas das espécies *Pouteria* se dá pela grande quantidade de
51 antioxidantes biologicamente ativos, como compostos fenólicos e carotenoides, além de ser rica
52 em carboidratos, vitamina C, vitamina B e minerais, como cálcio, fósforo e ferro [4,5].

53 Um considerável aumento pode ser notado no consumo de frutas tropicais devido à sua
54 popularidade como fontes de compostos bioativos. Os compostos fenólicos encontrados nas
55 frutas possuem alta atividade antioxidante, que está associada à proteção do sistema
56 imunológico contra o estresse oxidativo. As fontes emergentes desses compostos podem ser as
57 espécies frutíferas exóticas e nativas amplamente produzidas em países tropicais, o que acarreta
58 o aumento no interesse da indústria de alimentos por essas frutas [6–8].

59 O interesse advindo dessa necessidade de fontes emergentes, ou seja, de fontes ainda
60 não exploradas ou completamente conhecidas, de antioxidante desencadeia a necessidade de se
61 desenvolver estudos exploratórios sobre quantidade e formas de extração desses bioativos, além
62 de como eles se comportam no organismo quando consumidos. Ferramentas estatísticas que
63 otimizam a obtenção dos antioxidantes podem ser aliadas no desenvolvimento destes estudos
64 [9].

65 Uma consideração bastante pertinente relacionada à extração de aditivos está na
66 inovação, não só com as fontes emergentes, mas quanto às metodologias de execução dessa
67 etapa. É sabido que muitos dos compostos investigados apresentam certa instabilidade térmica
68 e rápida degradação quando expostos em demasia à luz, além de possuírem uma ampla
69 variedade de grupos químicos constituintes [10].

70 Em relação ao emprego de solventes orgânicos agressivos nas extrações, como hexano
71 e metanol, houve uma crescente preocupação em substituí-los por solventes com menor ou
72 nenhuma toxicidade comprovada, não agressividade ao meio ambiente, dentre outros fatores.
73 Boas alternativas são o emprego de solventes mais brandos mais ainda sim com polaridades
74 diferentes, como água, etanol ou mesmo acetona [11].

75 Para tanto, essa fruta pode ser considerada uma alternativa para o mercado de frutas
76 exóticas que possuam interesses nutricionais. Porém, existem poucos estudos na literatura
77 sobre sua composição química, capazes de auxiliar a sua aplicação na indústria de alimentos.
78 Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo analisar a composição físico-química, o

79 perfil de compostos bioativos, o potencial antioxidante, além de identificar e quantificar alguns
80 compostos bioativos presentes na polpa da fruta *Canistel-Pouteria campechiana* (Kunth)
81 Baehni.

82

83

84 **Materiais e métodos/**

86 **Reagentes**

87 Os reagentes DPPH (hidrato de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil), Trolox (ácido 6-hidroxi-
88 2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), ABTS (2,2'-azino-bis-(Ácido 3-etilbenzotiazolina-6-
89 sulfônico), AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)) TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil)-
90 s-triazina), persulfato de potássio, tampão fosfato de potássio, ácido gálico e quercetina grau
91 HPLC foram adquiridos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

93 **Caracterização inicial - Composição centesimal**

94 Foram analisadas em duplicata, amostras da polpa da fruta, obtida de uma plantação
95 localizada na cidade de Santa Celeste-SP, segundo as metodologias padrões do Instituto Adolfo
96 Lutz Métodos físico-químicos para análise de alimentos, Ed.IV, 2008. Para o valor de pH foi
97 usado o método 017/IV. Para quantificação da umidade e voláteis foi usado o método 012/IV.
98 Para acidez total, o método 016/IV. Para proteína, o método 036/IV. Para lipídios ou extrato
99 etéreo (Extração direta) o método 032/IV. Resíduo por incineração (cinzas) o método 018/IV.
100 Por fim, para análise do valor de Carboidratos Totais foi utilizado a metodologia padrão RDC
101 429 [12].

103 **Planejamento Experimental e Otimização**

104 Para investigar o efeito da composição do solvente (água:etanol:acetona) na extração
105 dos compostos bioativos da polpa da fruta *Canistel-Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni foi
106 utilizado um planejamento simplex-centróide usando o equipamento UAE. A Tabela 1 mostra
107 a concentração (valores codificados e reais) de cada componente nas diferentes misturas. Duas
108 repetições da mistura ternária foram realizadas. Para o design simplex-centróide, é possível
109 ajustar um modelo cúbico especial mostrado na Eq. (1), em que y são as variáveis dependentes,
110 conteúdo de fenólicos totais (TPC), conteúdo de flavonoides totais (TFC), carotenoides,
111 capacidade antioxidante avaliada por DPPH e ABTS, poder antioxidante redutor férrico
112 (FRAP) e capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC); b é o coeficiente de
113 regressão para cada componente, e decorrente da necessidade de inclusão da restrição de
114 mistura na fórmula, em que a quantidade mínima de água adotada foi de 30% e X_1 , X_2 e X_3
115 representam os pseudo componentes da água, etanol e acetona, respectivamente.

$$y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 \quad (1)$$

Para as variáveis dependentes (Y) os modelos linear, quadrático e cubico foram testados e os mais adequados, ou seja, com um nível de confiança de 95% ($P < 0,05$), foram adotados e usados para obter superfícies de resposta para que se pudesse encontrar a extração mais eficiente realizada em função da mistura de solventes. A otimização foi realizada usando o *software* MATLAB versão R2008b (The MathWorks Inc., Natick, EUA)

Extração

Para realização da extração, foram pesados 2 gramas da polpa da fruta e diluído em 40 ml de solvente segundo o planejamento experimental. Em seguida foi-se utilizado o equipamento ultrasonicador (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) com pulsos de 120 W, 20 kHz e 30 s (on) $\times$ 10 s (off) por 5 minutos equipado com um banho de água acoplado a um controlador de temperatura (mantido a 30 °C). Os extratos foram filtrados duas vezes seguidas com a ajuda de um Kitassato e funil de buchner, em papel filtro (faixa azul, *Quanti*) com porosidade de 8µm e uma bomba vácuo (Prismatec, 121, Brasil).

Fenólicos totais (TPC)

O TPC foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações [13]. Resumidamente, 30 µL de extrato foi adicionada a 2370 µL de água destilada e 150 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após permanecer 5 min em local escuro, a mistura foi neutralizada com 450 µL de uma solução de Na_2CO_3 a 15% e homogeneizada com a ajuda de um vortex (VTX-2500-Biomixer). Duas horas depois, mediu-se a absorbância a 765 nm (espectrofotômetro USB4000-UV-VIS-ES, Ocean Optics),

Conteúdo de flavonoides totais (TFC)

O TFC foi quantificado seguindo o ensaio descrito por Alothman e colaboradores [14], no qual 250 µL de amostra foi adicionados a 1000 µL de água destilada e 75 µL de NaNO_2 a 5%. Após descanso de 5 minutos, foi adicionados 150 µL de 10% de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, aguardando-se mais 6 minutos. Adicionaram-se 500 µL de NaOH (1 mol.L⁻¹) e 600 µL de água destilada, seguindo para a determinação da absorbância a 510 nm em espectrofotômetro (USB4000-UV-VIS-ES, Ocean Optics). A quercetina foi usada para estabelecer a curva padrão

($y = 0.0007x + 0.0398$; $R^2 = 0.9935$) e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de quercetina (QUE) por 100 g da amostra.

Determinação dos carotenóides

Para a determinação dos carotenoides utilizou-se a metodologia de [15], com modificações. Para tanto, utilizou-se de 5 ml do extrato em tubo falcon com tampa e acrescentou-se 10 mL da solução composta por: 5 mL de hexano e 5 mL de acetona e agitou-se em agitador de tubos (Phoenix, modelo AP 59, Brasil) com potência de 130 W por cerca de 1 minuto. Após, a mistura foi centrifugada por 10 minutos, sendo possível verificar a separação de 3 fases distintas. Com o auxílio de uma pipeta foi retirado o sobrenadante e transferido na cubeta de quartzo para retirar uma leitura. A absorbância do extrato foi medida em espectrofotômetro UV-vis (Femto, Brasil) no comprimento de onda de 450 nm. O teor de carotenoides (mg betacaroteno por 100g de polpa) foi calculado de acordo com a Equação 2 [16]

$$\text{Teor de Carotenóides (mg betacaroteno } 100 \text{ g}^{-1}) = \frac{AxVx1.000.000}{A_{1CM}^{1\%} \times Mx 100} \quad (2)$$

Em que: A = é a medida da absorbância no comprimento de onda para o betacaroteno (450 nm); V é o volume final da solução; $A_{1CM}^{1\%}$ é o coeficiente de absorvidade molar de um pigmento em um determinado solvente (2550 para betacaroteno); M é a massa da amostra em gramas tomada para a análise.

Capacidade antioxidante

Determinação da capacidade de eliminação radical DPPH

O ensaio DPPH foi baseado no método de Brand-Williams e colaboradores com modificação [17], onde 100 µL de extrato foram adicionadas a 3900 µL de solução metanólica de radical DPPH a 60 µmol.L⁻¹. Um controle negativo foi elaborado com 100 µL de solução extratora e 3900 µL de DPPH foi preparado.

As misturas foram armazenadas longe da luz por 30 min e a absorbância foi determinada a 517 nm usando um espectrofotômetro (USB4000-UV-VIS-ES, Ocean Optics). Os resultados foram comparados com a curva de calibração Trolox ($y = -0.0005x + 0.5663$; $R^2 = 0.9956$).

Determinação da capacidade de eliminação radical ABTS

A capacidade antioxidante do ABTS foi avaliada, conforme detalhado por Thaipong et. al [18]. Uma solução de trabalho foi preparada agitando duas soluções estoque (A e B), consistindo em 7.4 mmol L^{-1} ABTS (A) e 2.6 mmol L^{-1} de persulfato de potássio (B), em quantidades iguais. Depois de reagir por 12 h em temperatura ambiente no escuro, a solução foi diluída misturando 1 mL de solução ABTS com 60 mL de metanol para obter uma leitura espectrofotométrica de absorbância de 1.1 no comprimento de onda de 734 nm.

Na análise, 150 μL de extrato foram adicionados a 2850 μL de solução ABTS. A solução foi mantida no escuro por 2 h e em seguida a absorbância das amostras foi determinada a 734 nm. Foi preparado um controle negativo contendo 150 μL de solução extratora e 2850 μL de solução ABTS, comparando-se os resultados com a curva de calibração Trolox ($y = -0.0011x + 0.9493$; $R^2 = 0.9932$) e expresso em μmol Trolox por 100 g da amostra (base seca).

Poder antioxidante redutor férrico (FRAP)

O ensaio foi realizado conforme descrito por [19]. Para preparar a solução FRAP, 25 mL de tampão de acetato (300 mmol.L^{-1}) pH 3.6 foram misturados com 2.5 mL de uma solução de TPTZ (2,4,6- tripyridyl-s-triazine) (10 mmol.L^{-1}) e 2.5 mL de cloreto férrico (20 mmol.L^{-1}). Para análise, foram usados 900 μL da solução FRAP juntamente com 90 μL de água destilada e 30 μL de amostra. Após 30 min de reação a 37°C no escuro, a absorbância foi determinada a 595 nm usando um espectrofotômetro (USB4000-UV-VIS-ES, Ocean Optics). Os resultados foram expressos em mmol de Trolox por 100 g de amostra.

Capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC)

A análise de ORAC foi realizado conforme descrito por [20], com adaptações. Em uma placa de 96 poços adicionou-se 25 μL de amostra ou tampão fosfato de potássio (para o branco) e 150 μL de fluoresceína. A placa foi pré-incubada em um fluorímetro a 37°C por 15 minutos sob agitação. Em seguida, foi adicionado 25 μL de AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano). Em seguida, foi realizada as leituras a cada 2 minutos por 70 minutos a 37°C nos comprimentos de onda de 485 nm e 520 nm. Os resultados foram expressos em μmol Trolox por 100 g da amostra (base seca).

Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) analysis

Chromatographic analysis was performed using a Waters Acquity UPLC system (Milford, MA, USA) coupled to a Waters Acquity tandem quadrupole (TQD) mass spectrometer. Chromatographic separation was achieved on a Waters Acquity UPLC BEH C18 column (50 mm $\times$ 2.1 mm; 1.7 μ m) by elution of the sample (10 μ L injection volume) with ultra-pure water (A) and methanol (B), both acidified with 0.1% of formic acid, at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹.

The method followed a linear gradient, with the initial A:B ratio of 95:5, increasing the concentration of B linearly up to 95% in 15.4 min. This ratio was maintained up to 18.4 min, returning to the initial proportion of the phases up to 20.0 min. The MS/MS operating parameters were 120 °C source temperature, 550 °C desolvation gas temperature and 3.5 kV capillary voltage, and the extraction cone voltage was optimised for each compound. The ionisation source was set in the negative ion mode. The cone gas and desolvation gas (both nitrogen) flow rates were set at 20 and 900 L h⁻¹, respectively. Quantification of the phenolic compounds was performed using the standard addition method at seven concentration levels between 1.0 and 500.0 μ g L⁻¹. The correlation coefficients (R^2) of the calibration curves exceeded 0.995.

Statistical analysis

Data were analysed using Statistica 13 (TIBCO Software Inc., 2017, <http://statistica.io>).

Resultados e Discussão

Caracterização inicial - Composição centesimal

A polpa da fruta Canistel - Pouteria (Kunth) Baehni apresentou, em média, um pH de 6.51; O teor de umidade e voláteis foi de 58.25 g.100g⁻¹ de polpa; Acidez total de 2.67 g.100g⁻¹ de polpa; Proteína foi 1.05 g.100g⁻¹ de polpa; Lipídios ou extrato etéreo (Extração direta) foi de 0.78 g.100g⁻¹ de polpa. Resíduo por incineração (cinzas) foi de 0.93 g.100g⁻¹ de polpa. Por fim, o valor de Carboidratos Totais foram de 39.00 g.100g⁻¹ de polpa. Uma revisão bibliográfica realizada sobre a Canistel, reuniu valores muito semelhantes como teores de carboidratos totais e cinzas de 36.69 e 0.90 g.100g⁻¹ de polpa [5]. MA Jinshuang *et al* [21] caracterizou a polpa e semente da fruta Canistel, encontrando valores de lipídios e proteínas de 0.71 e 1.04 g.100 g⁻¹, respectivamente, muito próximos do presente estudo.

Conteúdo de fenólicos totais

Os valores obtidos para TPC variaram de 1.28g (US1) a 5.34 g (US3) g GA.100 g⁻¹ de polpa (US5) conforme valores apresentados na Tabela 2

Os modelos de regressão ajustados, apresentados na Tabela 3, permitiram obter superfícies de resposta para o conteúdo fenólico total em função da mistura de solventes (Fig.1 (a)). Os coeficientes foram estatisticamente significativos ($P < 0.05$) e com boa capacidade (R^2 adj de 0.9976). Além disso a estimativa de erro padrão foi muito baixa quando comparado aos valores obtidos experimentalmente (0.0602 g GAE.100 g⁻¹ de polpa), não havendo falta de ajuste no modelo ($p > 0.05$). Esses dados demonstram que os valores obtidos no modelo cúbico especial representam muito bem os valores experimentais.

Foi possível observar que a recuperação de TPC foi dependente da razão de solventes utilizada, em que quanto maior a quantidade de acetona, maior foi a extração de fenólicos. A porcentagem de água foi fixada em 30% para todas as extrações, onde mesmo os termos lineares são compostos de 2 solventes.

O trabalho realizado por K.W. Kong *et al.* [22], com a mesma matriz vegetal e solvente etanol 70% obteve valores de TPC de 2.26 g GAE.100 g⁻¹ de polpa, bastante semelhante ao presente trabalho que encontrou, com o mesmo solvente, 2.71 g GAE.100 g⁻¹ de polpa. Esses resultados corroboram com a afirmação que a extração de antioxidante da polpa da fruta Canistel é favorecida quando utilizado acetona 70% já que com o emprego da acetona a extração foi superior (5.34 g GAE.100 g⁻¹ de polpa).

Um trabalho realizado com resíduo de frutas exóticas, em que por meio do equipamento ultrassom foram realizadas extrações e analisada a quantidade de antioxidantes, encontrou valores de 0.54 g GAE, 3.33 g GAE, 1.44 g GAE, 0.94 g GAE, 4.28 g GAE, 0.22 g GAE, 2.15 g GAE por 100g de resíduo de caja-umbu (*Spondias* spp.), canafístula (*Cassia fistula*), caju (*Anacardium occidentale*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), manguba (*Pachira aquatica*), graviola (*Annona muricata*), e morango (*Fragaria* × *annanassa*), respectivamente. Essa comparação demonstra que a fruta canistel pode ser divulgada como grande fonte de fitoquímicos complementares a alimentação [23].

M. Angonese e colaboradores [24] obtiveram valores de TPC semelhantes ao analisarem Pitaya (*Hylocereus undatus* e *Hylocereus polyrhizus*) em extrato aquoso. Afirmando que solventes com maiores polaridades beneficiam a extração e disponibilidade de TPC.

Estudos realizados em frutas exóticas *Eugenia calycina* Cambess (pitanga-do-cerrado), *Eugenia stipitata* e *Eugenia pyriformis* (uvaia), onde os fenólicos totais foram quantificados em extratos hidroetanólicos demonstraram valores de 0,46, 0,91 e 4,9 GAE g.100 g⁻¹ de polpa seca, respectivamente, mostrando a superioridade do perfil de antioxidantes presente na fruta Canistel [25–27].

A partir dos coeficientes lineares, binários e ternários que compõem as equações apresentadas na Tabela 3 e das superfícies de resposta observadas na Figura 1c, foi possível observar que o solvente que favorece a extração de TPC é a acetona, já que o valor linear de b_3 foi maior quando comparado aos outros dados. Além disso, mesmo sendo sinérgico os valores das interações binárias, são menores que o valor linear da acetona. Por fim, o valor negativo de b_{123} demonstra que quando usado os três solventes em conjunto, a extração dos Fenólicos Totais é prejudicada.

A primeira justificativa que se poderia aplicar a esses resultados seria a diferença de polaridade entre os solventes. Para isso o índice de polaridade de Snyder (P'), que se baseia nas medições de solubilidade em dioxano, nitrometano e etanol [28], foi calculado afim de mensurar as diferenças de polaridade de cada mistura extratora. Para os solventes usados neste trabalho, o P' da mistura pode ser calculado por $P = 10.22x_1 + 4.3x_2 + 5.1x_3$. Os valores encontrados variaram entre 10.4 e 6.13, vale ressaltar que a única solução com polaridade 10.4 foi a primeira, que era composta somente por água, enquanto que as demais ficaram entre 8.55 e 6.13, ou seja, não houve diferença relevante de polaridade nas misturas de extração.

Considerando que o efeito sonoquímico do ultrassom em um líquido é atribuído ao fenômeno de cavitação acústica, que diminui com o aumento da viscosidade já que quanto maior a viscosidade da amostra, maior também será a resistência da mesma ao movimento do dispositivo ultrassônico. Um solvente com baixa pressão de vapor favorece um processo de extração, pois o colapso da bolha de cavitação é mais intenso quando comparado a um solvente com alta pressão de vapor [29]. A viscosidade de etanol é 1.074 mPa s (25 °C) e da acetona é 0.327 mPa s (25 °C), dessa forma, uma maior proporção da acetona tende a diminuir o limiar de cavitação em UAE aumentando assim o rendimento de extração como visto na tabela 2.

Resultado semelhante foi encontrando em um estudo de otimização de compostos fenólicos em teff (*Eragrostis tef* (Zucc.)), onde quanto menor a viscosidade da amostra extratora melhor os índices de recuperação de compostos antioxidantes [30].

Flavonoides totais (TFC)

No presente estudo, as concentrações de flavonoides nos extratos obtidos variaram de 0.98 (US1) a 3.76 (US3) g de QUE.100g⁻¹ de polpa, sendo o modelo estatisticamente significativo com boa capacidade preditiva (R²adj de 0.9980), com um baixo erro padrão e sem falta de ajuste (tabela 2 e 3).

É possível observar que o maior percentual de acetona na mistura extratora favorece a extração de flavonoides totais (valor de b₃ é positivo e maior que os outros lineares e os binários) assim como a interação ternária dos solventes é antagônica a extração dos mesmos, devido seu valor de b₁₂₃ negativo (Tabela 3 e Figura 1b).

Um trabalho feito com a folha de Moringa (*Moringa oleífera Lam*), conhecida por ser uma ótima fonte de antioxidantes, realizado no mesmo equipamento e parâmetros de extração, apresentou valores que variaram entre 0,58 a 2,33 g de QUE.100 g⁻¹ de folha de moringa para flavonoides totais, o que demonstra que a polpa da fruta canistel pode ser considerada uma boa fonte de fitoquímicos [31].

Um trabalho que compara frutas exóticas cultivada na Argélia encontrou valores de fenólicos totais de 1,44 g de QUE; 1,29 g de QUE; 0,73 g de QUE e 0,14 g de QUE por 100g para *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* e *Opuntia*, respectivamente, mostrando que a extração de flavonoides com o uso de acetona da polpa da fruta Canistel tem maior rendimento dessa classe de antioxidante [32].

Carotenóides

Os conteúdos de carotenoides totais variaram entre 8.63 (US1) a 22.63 (US3) de mg de betacoteno.100g⁻¹ de polpa, apresentando um modelo estatisticamente significativo, condizente com a realidade (R²adj de 0.9997), pequeno erro padrão de análise e sem falta de ajuste (tabela 2 e 3).

Mais uma vez, conforme a Tabela 3 e a superfície de resposta da figura 1c a quantidade majoritária da acetona favorece a extração dos carotenóides. O único valor antagônico a extração é a interação ternária dos solventes.

Um trabalho realizado por M.S. De Lanerolle *et al.* [33] demonstrou que o conteúdo de carotenoides totais, extraídos com acetona da polpa da fruta canistel foi alto e variou de 1.9 a 23.5 mg.100g⁻¹ de peso seco. Assim, o presente estudo, que encontrou valores entre 8.63 e 22.62 mg betacoteno.100g⁻¹ de polpa, corrobora os resultados obtidos por outros autores, confirmando que a fruta é rica em carotenoides totais e pode ser utilizada como fonte dos mesmos.

O total de carotenóides contidos na amostra examinada é comparável aos relatórios publicados na literatura, como 17.2 mg, 17.0 mg, 15.01 mg, para 100g de Buriti, Marinana e Pupunha respectivamente [34–36]. Como a fruta canistel possui uma considerável quantidade de flavonóides, seu consumo, juntamente com outras frutas exóticas, ajudaria a suprir a quantidade de antioxidantes ideal à nossa dieta diária.

Capacidade antioxidante determinada por:

Determinação da capacidade de eliminação radical DPPH

Os valores de DPPH variaram 179.73 (US1) a 782.91 (US3) μmol de TE.100 g^{-1} de polpa (US9), resultando em um modelo cúbico especial estatisticamente significativo com um R^2_{adj} de 0.9985 e com baixa estimativa de erro padrão. Como todos os coeficientes de regressão foram importantes e permanecem no modelo, não houve grau de liberdade para que fosse calculado a falta de ajuste (Tabelas 2 e 3).

Quando observado o modelo obtido, é possível afirmar que a acetona isoladamente favorece mais uma vez a extração de antioxidantes, enquanto que a interação ternária prejudica a extração dos mesmos (Tabela 3 e Figura 1d).

Uma extração realizada com teff (*Eragrostis tef*(Zucc.)) no mesmo equipamento e com os mesmos parâmetros obteve valor de DPPH de 753.75 μmol de trolox.100 g^{-1} de Teff, demonstrando que as matrizes são análogas entre si quando comparados os valores de DPPH [30].

Determinação da capacidade de eliminação radical ABTS

Em relação ao ABTS os valores variaram entre 305.43 (US4) a 606.54 (US3) μmol de TE.100 g^{-1} de polpa (Tabela 2), com um modelo estatisticamente significativo, com boa capacidade preditiva (R^2_{adj} de 0.9999), com baixa estimativa de erro padrão e como todos os coeficientes de regressão foram importantes, não foi calculado a falta de ajuste (tabela 3).

Observando a tabela 3 e a figura 1e, conclui-se que a acetona favorece a obtenção dos antioxidantes e que antagônico a essa extração, a interação binária da água e do etanol, água e acetona e a ternária dos solventes (b_{12} , b_{13} e b_{123} , respectivamente) resultaram em valores negativos no modelo.

O trabalho realizado por Lucas González *et al* [37] avaliou a biodisponibilidade de antioxidantes na farinha de caqui e encontrou valores de 0.2 g TE.100 g^{-1} farinha) para ABTS, desmontando assim que o consumo de frutas *in natura* são fontes muito melhores de fitoquímicos.

Poder antioxidante redutor férrico (FRAP)

Os valores de FRAP obtidos nas análises variaram de 156.87 (US1) a 713.82 (US3) μmol de TE.100 g^{-1} de polpa (Tabela 2), onde foi possível obter um modelo especial cubico estatisticamente significativo e com um R^2_{adj} de 0.9994, demonstrando boa capacidade preditiva. Além disso, o erro padrão em relação aos resultados, foi baixo e mais uma vez, como todos os coeficientes de regressão foram mantidos, não houve grau de liberdade para que a falta de ajuste fosse calculada (tabela 3).

O modelo e a superfície de resposta obtidos para o FRAP (Tabela 3 e Figura 1f, respectivamente) demonstram que quando analisados os índices lineares, a quantidade de acetona influencia positivamente na extração, enquanto os valores binários e ternários, também foram sinérgicos aos resultados de extração.

Um estudo feito com o resíduo da fruta graviola, que apresentou maior bioacessibilidade de fenólicos e atividade antioxidante em um extrato obtido por meio de um equipamento ultrassônico, demonstrou capacidade antioxidante pelo método de FRAP de 317 μmol de TE.100 g^{-1} de resíduo, corroborando com a afirmação que a fruta canistel possui grande poder antioxidante [23].

Capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC)

Este é um método que avalia a capacidade de compostos fenólicos e não fenólicos de eliminar radicais livres, um importante mecanismo de atividade antioxidante [38].

Os resultados obtidos variaram entre 151.07 (US1) a 471.12 (US6) μmol de TE.100 g^{-1} de polpa (Tabela 2). Os modelos de regressão ajustados apresentados na tabela 3, exibiram coeficientes estatisticamente significativos e boa capacidade de ajuste (R^2_{adj} de 0,9984). Além disso, a estimativa de erro padrão foi muito baixa quando comparado aos valores obtidos experimentalmente, não havendo falta de ajuste no modelo.

A interação foi dependente da razão de solventes utilizados, em que quanto maior a quantidade de acetona, maior foi a extração dos antioxidantes, e que mais uma vez a interação ternária dos solventes foi antagônica a extração.

As características hidrofílicas ou hidrofóbicas dos solventes ou mistura de solventes utilizados na extração podem influenciar os resultados da análise de antioxidante pelo método de ORAC [38]. Xianli Wu e colaboradores [39] ao avaliarem a capacidade antioxidante de diferentes frutas pelo método de ORAC perceberam que ao utilizar solventes hidrofílicos foi

408 observada uma maior atividade quando comparado com a extração por solventes lipofílicos,
409 como observado neste estudo.

410

411

412 **Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS)**
413 **analysis**

414

415 **Conclusão**

416 Os resultados do presente estudo mostraram a grande capacidade antioxidante dos
417 extratos obtidos da polpa da fruta canistel. As análises químicas em conjunto com modelagem
418 matemática provaram que o uso da acetona em maior quantidade permitiu maior eficiência de
419 extração de antioxidantes em comparação com solventes puros ou misturas em proporções
420 iguais (foi fixado um mínimo de 30% de água para todos os experimentos, com o intuito de
421 melhorar a solubilidade da fruta nos solventes), com exceção da análise de ORAC, que
422 encontrou uma maior extração para misturas. O extrato ideal foi obtido com uma mistura de
423 solvente 0.3:0: 0.7 água:etanol:acetona, com exceção do Orac que teve uma pequena melhora
424 para 0.3:0,35: 0.35 água:etanol:acetona.
425

Agradecimentos

Os autores agradecem ao The authors thank the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES, Financing Code 001), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) pelo apoio financeiro, Complex of Research Support Centers (COMCAP) of the State University of Maringa (UEM) e CAMulti-CM pelo apoio técnico.

Conflitos de interesse

Não há conflitos de interesse a declarar.

Disponibilidade de dados

Os dados que sustentam as conclusões deste estudo estão disponíveis no autor correspondente, mediante solicitação razoável.

Diretrizes Éticas

A aprovação ética não foi necessária para esta pesquisa.

Referências

- [1] S.B. Aseervatham G., V. Manthra, C. Ireem, S. Thilagameena, S. Akshaya, A. Clara Mary, S. Giriprashanthini, T. Sivasudha, Free radical scavenging potential and antihaemolytic activity of methanolic extract of *Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni. and *Tricosanthes tricuspidata* Linn, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 18 (2019) 101031. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101031>.
- [2] N.S.B.M. Atapattu, K.G.S. Sanjeevani, D. Senaratna, Effects of dietary canistel (*Pouteria campechiana*) fruit meal on growth performance and carcass parameters of broiler chicken, *Trop. Agric. Res. Ext.* 16 (2015) 34. <https://doi.org/10.4038/tare.v16i2.5272>.
- [3] M.E. Aly, D.E.T. Nebal, F.M. Sherifa, M.A. Rabab, A.W.E.A. Sally, Chemical composition and biological activities of *Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni, *J. Med. Plants Res.* 10 (2016) 209–215. <https://doi.org/10.5897/JMPR2015.6031>.
- [4] J. Ma, H. Yang, M.J. Basile, E.J. Kennelly, Analysis of Polyphenolic Antioxidants from the Fruits of Three *Pouteria* Species by Selected Ion Monitoring Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 5873–5878. <https://doi.org/10.1021/jf049950k>.
- [5] F. Awang-Kanak, M.F. Abu Bakar, Canistel— *Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni, in: *Exot. Fruits*, Elsevier, 2018: pp. 107–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00015-0>.
- [6] A. Mery, D. Oliveira, L.N. Malunga, C.A. Perussello, T. Beta, R. Hoffmann, South African Journal of Botany Phenolic acids from fruits of *Physalis angulata* L . in two stages of maturation, 131 (2020) 448–453. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.029>.
- [7] A. Gómez-Maqueo, E. Bandino, J.I. Hormaza, M.P. Cano, Characterization and the impact of in vitro simulated digestion on the stability and bioaccessibility of carotenoids and their esters in two *Pouteria lucuma* varieties, *Food Chem.* 316 (2020) 126369. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126369>.
- [8] L.M. Rodrigues, E.B. Romanini, E. Silva, E.J. Pilau, S.C. da Costa, G.S. Madrona, Camu-camu bioactive compounds extraction by ecofriendly sequential processes (ultrasound assisted extraction and reverse osmosis), *Ultrason. Sonochem.* 64 (2020) 105017. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105017>.
- [9] D. Pinto, C. Delerue-Matos, F. Rodrigues, Bioactivity, phytochemical profile and pro-healthy properties of *Actinidia arguta*: A review, *Food Res. Int.* 136 (2020) 109449.

- 475 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109449>.
- 476 [10] S. Sharma, S.F. Cheng, B. Bhattacharya, S. Chakkaravarthi, Efficacy of free and
477 encapsulated natural antioxidants in oxidative stability of edible oil: Special emphasis
478 on nanoemulsion-based encapsulation, *Trends Food Sci. Technol.* 91 (2019) 305–318.
479 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.030>.
- 480 [11] E. Shabani, D. Zappi, L. Berisha, D. Dini, M.L. Antonelli, C. Sadun, Deep eutectic
481 solvents (DES) as green extraction media for antioxidants electrochemical quantification
482 in extra-virgin olive oils, *Talanta*. 215 (2020) 120880.
483 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120880>.
- 484 [12] AOAC International, *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, 21st
485 ed., Rockville, 2019.
- 486 [13] Singleton V L & Rossi J A Jr, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-
487 phosphotungstic acid reagents, (1985) 1980.
- 488 [14] M. Alothman, R. Bhat, A.A. Karim, Antioxidant capacity and phenolic content of
489 selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents, *Food Chem.* 115
490 (2009) 785–788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.005>.
- 491 [15] H.S. Lee, W.S. Castle, Seasonal Changes of Carotenoid Pigments and Color in Hamlin,
492 Earlygold, and Budd Blood Orange Juices, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 877–882.
493 <https://doi.org/10.1021/jf000654r>.
- 494 [16] P. McPhie, Origin of the alkaline inactivation of pepsinogen, *Biochemistry*. 14 (1975)
495 5253–5256. <https://doi.org/10.1021/bi00695a003>.
- 496 [17] C. Brand-Williams, W; Cuvelier, M. E.; Berset, Use of a Free Radical Method to
497 Evaluate Antioxidant Activity W, *LWT - Food Sci. Technol.* 28 (1994) 25–30.
498 <https://doi.org/10.3906/sag-1411-35>.
- 499 [18] K. Thaipong, U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos, D. Hawkins Byrne,
500 Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant
501 activity from guava fruit extracts, *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 669–675.
- 502 [19] R. Pulido, L. Bravo, F. Saura-Calixto, Antioxidant activity of dietary polyphenols as
503 determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, *J. Agric. Food Chem.*
504 48 (2000) 3396–3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>.
- 505 [20] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. Flanagan, E.K. Deemer, R.L. Prior, D. Huang, Novel
506 Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the
507 Probe, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2772–2777. <https://doi.org/10.1021/jf011480w>.

- 508 [21] J. Ma, M. Sheng, L. Wang, H. Liu, Analysis and Evaluation of Nutritional Components
509 of *Pouteria campechiana* Seeds, *Chinese J. Trop. Crop.* 40 (2019) 368–372.
- 510 [22] K.W. Kong, H.E. Khoo, N.K. Prasad, L.Y. Chew, I. Amin, Total phenolics and
511 antioxidant activities of *pouteria campechiana* fruit parts, *Sains Malaysiana.* 42 (2013)
512 123–127.
- 513 [23] R. Gleyse, C. Barros, U.C. Pereira, J. Karla, S. Andrade, C.S. De Oliveira, S.V.
514 Vasconcelos, N. Narain, In vitro gastrointestinal digestion and probiotics fermentation
515 impact on bioaccessibility of phenolics compounds and antioxidant capacity of some
516 native and exotic fruit residues with potential antidiabetic effects, *Food Res. Int.* 136
517 (2020) 109614. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109614>.
- 518 [24] M. Angonese, G.E. Motta, N. Silva de Farias, L. Molognoni, H. Daguer, P. Brugnerotto,
519 A.C. de Oliveira Costa, C.M. Olivera Müller, Organic dragon fruits (*Hylocereus undatus*
520 and *Hylocereus polyrhizus*) grown at the same edaphoclimatic conditions: Comparison
521 of phenolic and organic acids profiles and antioxidant activities, *LWT.* 149 (2021)
522 111924. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111924>.
- 523 [25] D. de P. Farias, F.F. de Araújo, I.A. Neri-Numa, F.L. Dias-Audibert, J. Delafiori, R.R.
524 Catharino, G.M. Pastore, Distribution of nutrients and functional potential in fractions
525 of *Eugenia pyrifomis*: An underutilized native Brazilian fruit, *Food Res. Int.* 137 (2020)
526 109522. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109522>.
- 527 [26] F.F. de Araújo, D. de Paulo Farias, I.A. Neri-Numa, F.L. Dias-Audibert, J. Delafiori,
528 F.G. de Souza, R.R. Catharino, C.K. do Sacramento, G.M. Pastore, Chemical
529 characterization of *Eugenia stipitata*: A native fruit from the Amazon rich in nutrients
530 and source of bioactive compounds, *Food Res. Int.* 139 (2021).
531 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109904>.
- 532 [27] N.M. Peixoto Araujo, E.K. Silva, H.S. Arruda, D. Rodrigues de Moraes, M. Angela A.
533 Meireles, G.A. Pereira, G.M. Pastore, Recovering phenolic compounds from *Eugenia*
534 *calycina* Cambess employing high-intensity ultrasound treatments: A comparison among
535 its leaves, fruit pulp, and seed as promising sources of bioactive compounds, *Sep. Purif.*
536 *Technol.* 272 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118920>.
- 537 [28] L.R. Snyder, P.W. Carr, S.C. Rutan, Solvatochromically based solvent-selectivity
538 triangle, *J. Chromatogr. A.* 656 (1993) 537–547. [https://doi.org/10.1016/0021-](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80818-S)
539 [9673\(93\)80818-S](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80818-S).
- 540 [29] F. Chemat, N. Rombaut, A.-G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.-S. Fabiano-Tixier, M.

- Abert-Vian, Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrason. Sonochem.* 34 (2017) 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>.
- [30] F.L.G. Viell, T.B. Madeira, S.L. Nixdorf, S.T.M. Gomes, E. Bona, M. Matsushita, Comparison between ultra-homogenisation and ultrasound for extraction of phenolic compounds from teff (*Eragrostis tef* (Zucc .)), *Int. J. Food Sci. Technol.* 55 (2020) 2700–2709. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14523>.
- [31] J.M.G. Pereira, F.L.G. Viell, P.C. Lima, E. Silva, E.J. Pilau, R.C.G. Corrêa, E. Bona, A.M.S. Vieira, Optimization of the extraction of antioxidants from Moringa leaves: A comparative study between ultrasound- and ultra-homogenizer-assisted extractions, *J. Food Process. Preserv.* 45 (2021). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15512>.
- [32] N. Zeghad, E. Ahmed, A. Belkhir, Y. Vander Heyden, K. Demeyer, Antioxidant activity of *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* and *Opuntia ficus indica* fruits cultivated in Algeria, *Heliyon.* 5 (2019) e01575. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01575>.
- [33] M.S. De Lanerolle, A.B. Priyadarshani, D. Sumithraarachchi, E. Jansz, The carotenoids of *Pouteria campechiana* (Sinhala: Ratalawulu), *J. Natl. Sci. Found. Sri Lanka.* 36 (2008) 95. <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v36i1.136>.
- [34] J.L. Serra, A.M. da C. Rodrigues, R.A. de Freitas, A.J. de A. Meirelles, S.H. Darnet, L.H.M. da Silva, Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: Fatty acids, methyl tocopherols, total carotenoids and chemical composition, *Food Res. Int.* 116 (2019) 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.028>.
- [35] P.C. Anunciação, D. Giuffrida, D.C. Murador, G.X. de Paula Filho, G. Dugo, H.M. Pinheiro-Sant’Ana, Identification and quantification of the native carotenoid composition in fruits from the Brazilian Amazon by HPLC–DAD–APCI/MS, *J. Food Compos. Anal.* 83 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103296>.
- [36] L.M. de Souza Mesquita, B.V. Neves, L.P. Pisani, V.V. de Rosso, Mayonnaise as a model food for improving the bioaccessibility of carotenoids from *Bactris gasipaes* fruits, *LWT.* 122 (2020) 109022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109022>.
- [37] R. Lucas-gonzález, M. Viuda-martos, J.A.P. Álvarez, J. Fernández-lópez, Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (*Diospyros kaki*) co-products during in vitro gastrointestinal digestion, *Food Chem.* 256 (2018) 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.128>.

- 574 [38] H. Speisky, C. López-Alarcón, M. Gómez, J. Fuentes, C. Sandoval-Acuña, First web-
575 based database on total phenolics and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of
576 fruits produced and consumed within the south andes region of South America, *J. Agric.*
577 *Food Chem.* 60 (2012) 8851–8859. <https://doi.org/10.1021/jf205167k>.
- 578 [39] X. Wu, G.R. Beecher, J.M. Holden, D.B. Haytowitz, S.E. Gebhardt, R.L. Prior,
579 Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States,
580 *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4026–4037. <https://doi.org/10.1021/jf049696w>.
581

582 **Tabela 1.** Planejamento simplex-centróide com os valores codificados e reais (entre parêntesis),
583 para a razão água/etanol/acetona.

Run number	Mixture variables					
	Pseudo componentes (%)			Componentes reais (%)		
	<i>X</i> ₁	<i>X</i> ₂	<i>X</i> ₃	Water	Ethanol	Acetona
1	1.00	0.00	0.00	1	0	0
2	0.00	1.00	0.00	0,3	0.7	0
3	0.00	0.00	1.00	0.3	0	0.7
4	0.50	0.50	0.00	0.65	0.35	0
5	0.50	0.00	0.50	0.65	0	0.35
6	0.00	0.50	0.50	0.3	0.35	0.35
7a	0.33	0.33	0.33	0.53	0.23	0.23
7b	0.33	0.33	0.33	0.53	0.23	0.23
7c	0.33	0.33	0.33	0.53	0.23	0.23

584 **Restrição de mínimo $X_1 \geq 30\%$**
585 **Os pseudos componentes correspondem as seguintes equações:**
586 $X_1=\frac{\textit{Água}-0.3}{0.7}; X_2=\frac{\textit{Etanol}}{0.7}; X_3=\frac{\textit{Acetona}}{0.7}$

587

588 **Tabela 2.** Resultados experimentais correspondentes aos compostos fenólicos e flavonoides e avaliação quanto sua capacidade antioxidante.

Experimento	TPC ^a (g GAE.100 g ⁻¹ de polpa)	TFC ^b (g QUE.100 g ⁻¹ de polpa)	Carotenóides (mg betacoteno.100g ⁻¹ de polpa)	Capacidade antioxidante (μmol Trolox. 100 g ⁻¹ de polpa)			
				DPPH	ABTS	FRAP	ORAC
				UAE ^c			
US1	1.28 ± 0.21	0.98 ± 0.04	8.63 ± 0.16	179.73 ± 3.57	280.07 ± 7.80	156.87 ± 10.00	151.07 ± 8.98
US2	2.71 ± 0.05	1.43 ± 0.06	9.51 ± 0.74	408.71 ± 12.33	384.28 ± 6.06	213.41 ± 9.71	190.09 ± 6.67
US3	5.34 ± 0.19	3.76 ± 0.02	22.62 ± 0.32	782.91 ± 8.95	606.54 ± 7.21	713.82 ± 9.96	422.90 ± 7.33
US4	2.10 ± 0.22	1.28 ± 0.01	8.92 ± 0.24	363.67 ± 6.39	305.43 ± 5.38	223.72 ± 9.79	163.17 ± 6.24
US5	3.86 ± 0.12	2.43 ± 0.08	19.58 ± 0.15	534.92 ± 6.35	411.57 ± 4.15	467.97 ± 10.11	401.24 ± 5.67
US6	4.68 ± 0.25	3.25 ± 0.03	17.53 ± 0.03	646.63 ± 10.88	543.45 ± 6.84	581.47 ± 7.98	471.12 ± 4.14
US7a	3.28 ± 0.07	2.20 ± 0.06	11.88 ± 0.11	500.84 ± 11.11	399.25 ± 7.21	479.46 ± 6.98	337.90 ± 7.53
US7b	3.32 ± 0.02	2.15 ± 0.04	11.99 ± 0.13	513.62 ± 15.05	398.79 ± 6.72	482.81 ± 8.81	335.70 ± 6.98
US7c	3.36 ± 0.02	2.18 ± 0.09	11.97 ± 0.20	504.00 ± 16.15	396.99 ± 4.65	488.70 ± 7.90	330.27 ± 7.65

589 *Dados são a média ± desvio padrão

590 ^aFenólicos Totais591 ^bFlavonoides Totais592 ^cExtração assistida por Ultrassom

Tabela 3. Coeficientes de regressão estatisticamente significativos ($p < 0,05$) dos modelos ajustados para TPC, TFC, carotenóides, DPPH, ABTS, FRAP, ORAC para o equipamento de extração UAE.

Variáveis dependentes	Model ^g	P	R ² _{adjusted}	RMSE ^h	p Lack of fit
TPC ^a	$Y = 1.31x_1 + 2.74x_2 + 5.34x_3 + 2.13x_1x_3 + 2.55x_2x_3 - 9.04x_1x_2x_3$	8.90×10^{-5}	0.9976	0.0602	0.1399
TFC ^b	$Y = 1.02x_1 + 1.46x_2 + 3.78x_3 + 2.52x_2x_3 - 4.99x_1x_2x_3$	3.00×10^{-6}	0.9980	0.0401	0.1845
Carotenóides	$Y = 8.58x_1 + 9.46x_2 + 22.62x_3 + 15.94x_1x_3 + 5.97x_2x_3 - 109.15x_1x_2x_3$	4.00×10^{-6}	0.9997	0.0857	0.1667
DPPH ^c	$Y = 179.73x_1 + 408.71x_2 + 782.91x_3 + 277.79x_1x_2 + 214.39x_1x_3 + 203.29x_2x_3 - 762.36x_1x_2x_3$	1.15×10^{-3}	0.9985	6.6560	
ABTS ^d	$Y = 280.07x_1 + 384.28x_2 + 606.54x_3 - 106.97x_1x_2 - 126.93x_1x_3 + 192.16x_2x_3 - 557.54x_1x_2x_3$	1.01×10^{-4}	0.9999	1.1992	
FRAP ^e	$Y = 156.87x_1 + 213.41x_2 + 713.82x_3 + 154.30x_1x_2 + 130.51x_1x_3 + 471.39x_2x_3 + 1033.27x_1x_2x_3$	4.74×10^{-4}	0.9994	4.6790	
ORAC ^f	$Y = 148.60x_1 + 187.62x_2 + 422.90x_3 + 461.95x_1x_3 + 663.44x_2x_3 - 1173.48x_1x_2x_3$	5.10×10^{-5}	0.9984	4.7408	0.2632

^aFenólicos totais

^bFlavonóides totais

^cDeterminação da capacidade de eliminação radical DPPH

^dDeterminação da capacidade de eliminação radical ABTS

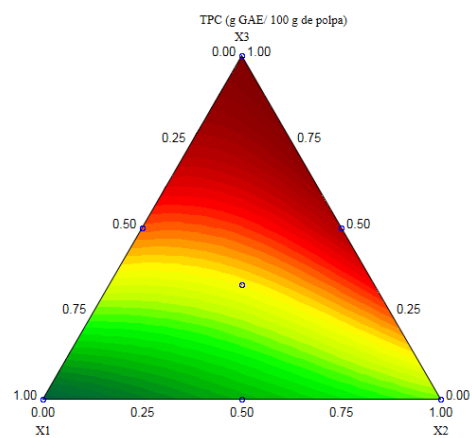
^ePoder antioxidante redutor férrico

^fCapacidade de absorção do radical de oxigênio

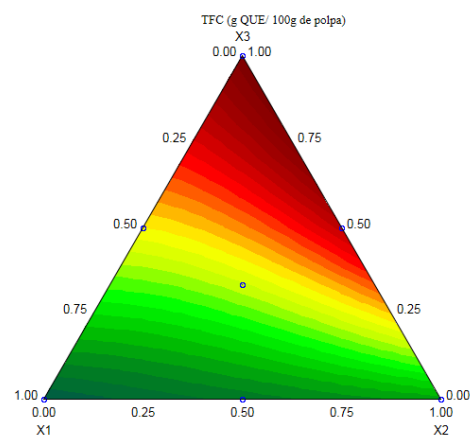
^gY representa os valores de cada variável dependente, x_1 represents water, x_2 represents ethanol, x_3 represents acetona

^hRoot mean square error

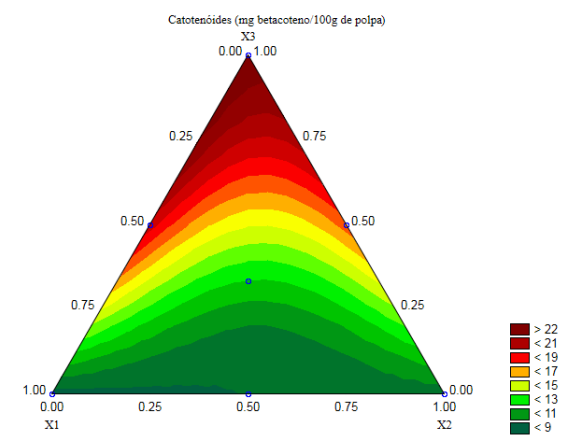
597



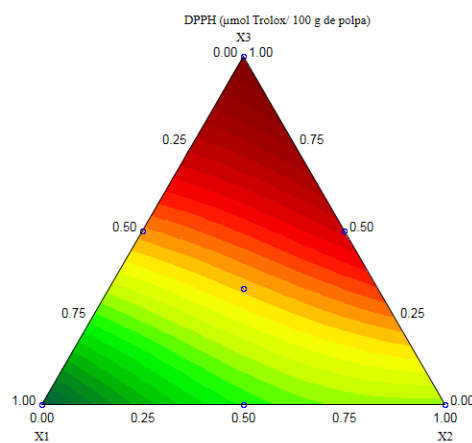
(a)



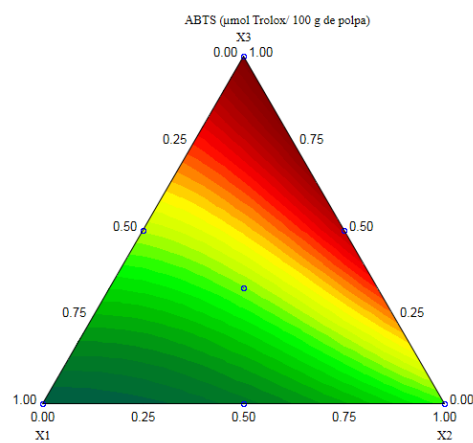
(b)



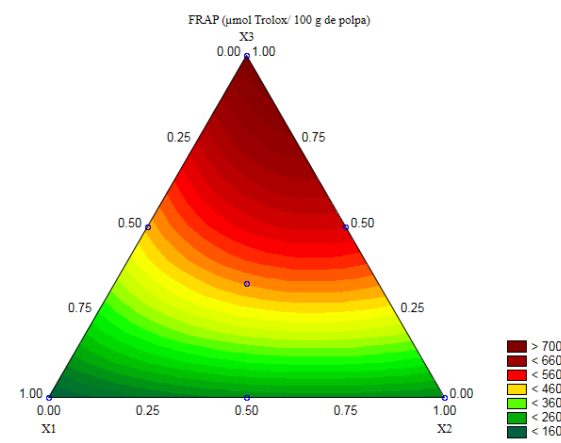
(c)



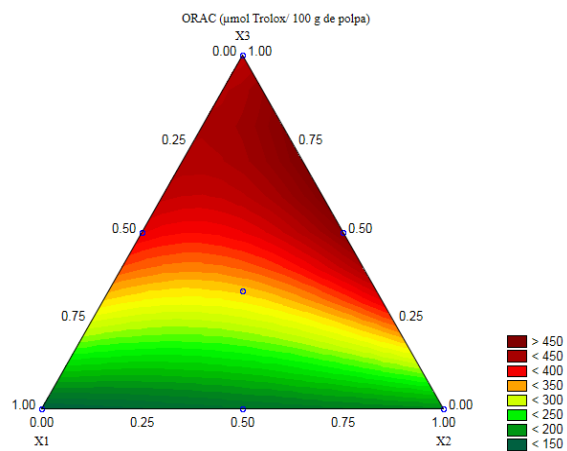
(d)



(e)



(f)



(g)

598 **Figura 1.** Superfícies de resposta para (a) TPC (b) TFC (c) Carotenóides (d) DPPH (e) ABTS, (f) FRAP (g) ORAC em função das proporções dos pseudo
 599 componentes X_1 X_2 X_3 da água, etanol e acetona, respectivamente.

600