

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Mônica Cristine Pereira dos Santos

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL FUNCIONAL DE PRODUTO E
SUBPRODUTO DE FRUTAS E HORTALIÇAS**

Rio de Janeiro

2017

Mônica Cristine Pereira dos Santos

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL FUNCIONAL DE PRODUTO E
SUBPRODUTO DE FRUTAS E HORTALIÇAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientadora: Prof. Dr^a. Édira Castello Branco de Andrade Gonçalves

Rio de Janeiro

2017

Mônica Cristine Pereira dos Santos

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL FUNCIONAL DE PRODUTO E
SUBPRODUTO DE FRUTAS E HORTALIÇAS**

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Professora Dr^a. Édira Castello Branco de Andrade Gonçalves
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Professora Dr^a. Suellen Gomes Moreira
Instituto Federal do Rio de Janeiro – IFRJ

Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Agroindústria de
Alimentos

DEDICATÓRIA

*Ao casal Edgar e Helena Martins por cuidarem do meu coração
enquanto eu trilhava mais esse caminho.*

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Prof.^a Édira Gonçalves, por acreditar no impossível e me guiar nessa incrível jornada.

Ao Carlos Mega por trilhar esse caminho ao meu lado.

Ao amigo Joel Pimentel que nunca me negou ajuda nas incontáveis vezes que pedi.

À Mariana Pumar, pela parceria em inúmeras análises.

Às queridas Ticiane Farias e Verônica Mayrinck, pelas horas de conversa, caronas e por me lembrarem diariamente que no final as coisas terminam bem, seja como for.

Aos alunos das turmas bromatologia que, nesses dois anos, me ensinaram muito mais do que podem imaginar.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente transformaram esse período numa experiência de muito aprendizado científico e humano.

RESUMO

Compostos bioativos já foram largamente identificados e seu potencial evidenciado em diversas matrizes vegetais. Dentre os quais, compostos fenólicos e carotenoides têm grande destaque por serem amplamente distribuídos e abundantes no reino vegetal. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial funcional de um suplemento produzido a partir de frutas e hortaliças e do resíduo gerado após esse processamento, através da caracterização do perfil de compostos fenólicos e carotenoides. Foram avaliadas 30 condições de extração, com as variáveis tempo, temperatura e diferentes proporções de etanol:água. Os compostos fenólicos do resíduo foram tentativamente identificados por método espectrométrico e, o extrato com melhor perfil fenólico identificado, assim como o suplemento tiveram seus compostos quantificados por método cromatográfico, utilizando padrões analíticos. Além disso, o teor de fenólicos totais, e a atividade antioxidante *in vitro* do extrato hidroetanólico e do suplemento foram determinados. O perfil de carotenoides foi determinado também por método cromatográfico. Observou-se que a temperatura e o tempo de extração foram as variáveis que mais influenciaram no processo, sendo as condições com 50% e 75% de etanol, à 40°C por 24h as que extraíram o maior número de composto. Os flavonoides foram a principal classe de fenólicos encontrada, sendo a hesperidina e a narirutina os mais abundantes. Não foi observada diferença significativa entre a atividade antioxidante do suplemento e do seu subproduto, entretanto, o teor de fenólicos do subproduto identificado pelo método de Folin-Ciocalteu foi superior. O perfil de carotenoides também diferiu quantitativamente de forma significativa entre as duas amostras, sendo o resíduo maior fonte destes. Assim, foi possível concluir que a utilização integral das frutas e vegetais utilizados, permite não apenas um desenvolvimento sustentável de uma bebida, como também permite o aproveitamento do seu resíduo como potencial fonte de compostos funcionais que, por estarem presentes de forma simultânea e variada no produto podem atuar de forma sinérgica no organismo humano, atuando em diversas vias metabólicas.

PALAVRAS-CHAVE: CLAE-DAD; UPLC-MS; Extração; Fenólicos; Carotenoides

ABSTRACT

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A MIX FROM FRUITS AND VEGETABLES: PRODUCT AND BY-PRODUCT.

Bioactive compounds have been largely described along the past several years due to their potential health benefits. Among them, phenolic compounds and carotenoids are the most studied mostly because of their wide distribution in vegetables and different contributions to improve and prevent diseases. The objective of this study was to evaluate the functional potential of a supplement made from fruits and vegetables and the waste generated after this process, through the characterization of the profile of phenolics and carotenoids. 30 extraction conditions were evaluated, with time, temperature and ethanol percentage variables. The phenolic compounds extracted from the residue were tentatively identified by spectrometric method (UPLC-MS), and quantified using and HPLC-DAD method. Furthermore, the total phenolic contents and antioxidant activity in vitro of the hydroethanolic extract and the supplement were assessed by Folin-Ciocalteu, DPPH, and FRAP. The carotenoid profile was also determined by HPLC-DAD, in the both samples. Temperature and time of extraction were considered the most important variables, with an increased yield of extraction observed at 50% and 75% of ethanol, at 40°C for 24h. Flavonoids were a major class of phenolics found, being the most relatively abundant hesperidin and narirutin. No significant difference was observed between an antioxidant activity of the supplement and its by-product, however, the content of by-product phenotypes identified by the Folin-Ciocalteu method. The carotenoid profile can also be quantitated significantly between the two samples, with the residue being the source of the supplement. Thus, it was possible to conclude that an integral part of the fruits and vegetables used, is also not a sustainable product product (supplement), but can also be used in its residue as a potential source of functional products that, because they are present simultaneously and varied in the product can update synergistically in the human body, acting in various metabolic pathways.

KEYWORDS: HPLC-DAD; UPLC- MS; Extraction; Phenolic; Carotenoids

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo do processo de extração de carotenoides de suplemento e subproduto de frutas e hortaliças.....	33
Figura 2. Esquema representativo da etapa de saponificação do extrato de subproduto de frutas e hortaliças.....	34
Figura 3. Cromatograma de compostos fenólicos identificados por CLAE-DAD em suplemento de frutas e hortaliças em 260, 280 e 320 nm.....	42
Figura 4. Cromatograma de compostos fenólicos identificados por CLAE-DAD em resíduo de frutas e hortaliças a 260, 280 e 320 nm.....	43
Figura 5. Cromatogramas dos carotenoides identificados por CLAE-DAD em suplemento e subproduto de frutas e hortaliças com varredura de 350 a 550 nm.....	46
Figura 6. Gráficos de ACP dos extratos à 20°C (A) e 40°C (B) de extratos de subproduto de frutas e hortaliças.....	49
Figura 7. Flavonoides identificados em extratos de subproduto de frutas e hortaliças, obtidos à 20°C.....	64
Figura 8. Flavonoides identificados em subproduto de frutas e hortaliças, obtido à 40°C.....	65
Figura 9. Ácidos hidroxibenzoicos e derivados identificados em extrato de resíduo de frutas e hortaliças obtidos à 20°C e 40°C.....	66
Figura 10. Ácidos hidroxicinâmicos e derivados identificados em extrato de resíduo de frutas e hortaliças obtidos à 20°C e 40°C.....	67
Figura 11. Cumarina e outras substâncias fenólicas identificadas em extratos de resíduo de frutas e hortaliças à 20°C e 40°C.....	68
Figura 12. Abundância relativa de compostos fenólicos identificados em extratos hidroetanólicos à 20°C de subproduto de frutas e hortaliças.....	70
Figura 13. Abundância relativa de compostos fenólicos identificados em extratos hidroetanólicos à 40°C de subproduto de frutas e hortaliças.....	71
Figura 14. Gráficos de interações solvente x tempo x temperatura.....	72
Figura 15. Compostos fenólicos mais abundantes em subproduto de frutas e hortaliças.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de eluição utilizado para separação cromatográfica de compostos fenólicos por CLAE-DAD.....	31
Tabela 2. Curvas de calibração dos padrões de compostos fenólicos utilizados.....	32
Tabela 3. Gradiente de eluição para separação cromatográfica de carotenoides por CLAE-DAD.....	35
Tabela 4. Condições experimentais para extração de compostos fenólicos.....	37
Tabela 5. Gradiente de eluição utilizado para a separação cromatográfica de compostos fenólicos por UPLC-MS.....	38
Tabela 6. Carotenoides totais, luteína, α -caroteno, β -caroteno, 9-cis- β -caroteno, 13-cis- β -caroteno e licopeno identificados em suplemento e subproduto de frutas e hortaliças.	45
Tabela 7. Compostos fenólicos tentativamente identificados em resíduo de frutas e hortaliças por UPLC-MS.....	50
Tabela 8. Atividade antioxidante dos extratos de subproduto de frutas e hortaliças.....	75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Desperdício de alimentos e aproveitamento de resíduos	13
1.2. Compostos fenólicos.....	16
1.3. Carotenoides	18
1.4. Extração de compostos bioativos.....	20
1.5. Alimentos funcionais	24
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Amostras vegetais	26
3.1.1. Suplemento de frutas e vegetais.....	26
3.1.2. Subproduto de frutas e vegetais	27
3.2. Caracterização e quantificação dos compostos bioativos das amostras vegetais	27
3.2.1. Suplemento de frutas e vegetais.....	27
3.2.2. Subproduto de frutas e vegetais	28
3.2.3. Determinação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu	28
3.2.4. Determinação da capacidade antioxidante pela redução do radical DPPH	28
3.2.5. Determinação da capacidade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)	29
3.2.6. Identificação e quantificação de compostos fenólicos bioativos por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência com detector de Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD).....	30
3.2.7. Extração dos carotenoides	32
3.2.8. Saponificação dos extratos.....	33
3.2.9. Identificação e quantificação dos carotenoides por CLAE-DAD.....	34
3.2.10. Quantificação de carotenoides totais	35
3.3. Análise estatística	36

3.4.	Identificação de compostos fenólicos por UPLC - MS	37
3.4.1	Processamento dos dados.....	39
3.5.	Determinação da capacidade antioxidante pela redução do radical DPPH	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.	CONCLUSÃO	76
6.	REFERÊNCIAS	77
APÊNDICE A	102
APÊNDICE B	103
APÊNDICE C	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desperdício de alimentos e aproveitamento de resíduos

Por definição, chama-se de “alimento desperdiçado” toda a massa de alimento destinado ao consumo humano, que é perdido em qualquer etapa da cadeia de produção. Já os alimentos que são desperdiçados no final desta cadeia, são comumente designados “resíduos alimentares”, e sua geração está diretamente ligada ao comportamento dos consumidores, e a forma como os alimentos são preparados (PARFITT; BARTHEL; MACNAUGHTON, 2010).

Sabe-se que o desperdício de alimentos pode ocorrer em praticamente todas as etapas de produção devido a problemas no cultivo, colheita, embalagem, transporte, infra-estrutura, mercado/preço, processamento e forma de consumo. E, de modo geral, a quantidade de resíduo gerado antes do alimento chegar ao consumidor está diretamente relacionado à capacidade tecnológica disponível no país, para garantir uma produção, colheita, transporte, armazenamento e processamento eficientes, capazes de promover o melhor aproveitamento do que é produzido (FAO, 2015).

Nos últimos anos a quantidade de alimentos desperdiçados nos países desenvolvidos, mostrou-se maior que a quantidade gerada nos países em desenvolvimento, o que ficou claro no último relatório da Organização das Nações Unidas (ONU), segundo o qual estima-se que nos países da Europa e América do Norte entre 95 – 115 Kg/ano *per capita* de resíduo é gerado, contra 6 – 11 Kg/ano *per capita* nos países da África Subsaariana e sul e sudeste da Ásia (FAO, 2011). Tal fato, entretanto, tem relação direta com a forma de consumo e não com as características da cadeia produtiva dos dois grupos.

Em países em desenvolvimento como os países africanos, do sul e sudeste da Ásia e da América Latina, quase 50% da produção de frutas e hortaliças, entre 30 – 40% das raízes e tubérculos e entre 15 – 20% das produções de cereais são perdidos antes mesmo do alimento chegar ao consumidor, ou seja, por falhas que ocorrem no processamento (FAO, 2011).

Já nos países desenvolvidos, as maiores perdas acontecem depois que o alimento é comercializado, com 42% de resíduos sendo produzidos pelas famílias oriundo de consumo inadequado ou preparo ineficiente (FAO, 2011).

Esses dados mostram não só que os processos tecnológicos envolvidos na produção de alimentos nos países desenvolvidos é mais eficiente, mas também que a cultura de consumo e desperdício de alimentos é um problema social que contribui negativamente para o panorama mundial de insegurança alimentar onde estão inseridos mais de 790 milhões de pessoas (FAO, 2012, 2015).

Por este motivo, conhecer e intervir nos estágios onde há maior geração de resíduo é a melhor maneira de minimizar a sua produção e, promover uma cadeia de alimentos sustentável, principalmente naquelas onde há maior geração de resíduos. Nesse sentido destacam-se as cadeias de frutas, vegetais, raízes, tubérculos e cereais (MIRABELLA; CASTELLANI; SALA, 2014; FAO, 2011).

O processamento de frutas para obtenção de sucos, geleias e doces produz entre 30 e 40% de resíduos constituídos por casca, caroço, sementes e bagaço que são contabilizados como custo operacional, além de representar potenciais fontes de contaminação ambiental. Entretanto, grande parte destes resíduos apresenta em sua composição vitaminas, minerais, fibras e compostos com importantes ações na manutenção e proteção das funções fisiológicas do organismo humano (RABETAFIKA et al., 2014; HERRERO et al., 2015).

Na cadeia produtiva de raízes, tubérculos e cereais o maior problema é causado pela enorme produção desses gêneros que, por constituírem a base da alimentação de muitos povos, geram muitos resíduos e perdas alimentares (FAO, 2011).

Sabe-se que tais resíduos poderiam ser utilizados de diversas formas pela indústria de alimentos, farmacêutica, nutracêutica, têxtil e biotecnológica (MELO et al., 2008; HARBOURNE et al., 2013; PANDA et al., 2016), dependendo da composição do resíduo e da tecnologia disponível para explorar o potencial da matriz. Assim, a valorização dos resíduos e subprodutos da indústria de alimentos é um desafio mundial que reflete tanto a necessidade de melhor aproveitar o potencial nutricional destes produtos, quanto o desafio de reduzir o impacto ambiental e econômico que eles geram (GALANAKIS, 2012).

Somente a indústria de cítricos produz quantidades de resíduos que se utilizamos de forma otimizada, poderiam ser fontes de importantes compostos fenólicos que se concentram na casca (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Além destes, em cascas de vários outros vegetais, também foram encontradas quantidades importantes de compostos fenólicos, e, em alguns casos, quantidades maiores do que as encontradas nas partes comestíveis (WOLFE; WU; LIU, 2003; MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007a).

Essas descobertas reforçam a importância da recuperação ou obtenção de compostos com ação antioxidante, vitaminas, fibras, peptídeos e outras moléculas de substancial importância, a partir de resíduos agrícolas, o que promoveria uma ‘reciclagem’ dentro da cadeia de alimentos, permitindo a obtenção de compostos bioativos, de diferentes matrizes com baixo custo, o que por sua vez poderia favorecer a elaboração de ingredientes, suplementos alimentares ou alimentos funcionais (NAZIRI et al., 2014).

Nesse sentido diversos estudos têm sido desenvolvidos a fim de identificar e quantificar os compostos bioativos presentes em vegetais (DA SILVA et al., 2014; LÓPEZ-COBO et al., 2014; LI et al., 2016). Além disso, busca-se também estabelecer os métodos de extração necessários à obtenção destes compostos, e determinar as formas de conservação capazes de preservá-los (GALANAKIS, 2013; STRATI; OREOPOULOU, 2014).

Sabe-se que nas últimas duas décadas grande parte dos estudos voltados à identificação, quantificação e extração de compostos bioativos têm sido direcionados à resíduos vegetais, que, vêm sendo amplamente apontados como importantes fontes de compostos bioativos. Apesar disso, muitas desses produtos ainda não são explorados como fontes destes compostos, em grande parte devido à falta de tecnologia apropriada para a extração dos mesmos (WIJNGAARD et al., 2012), fato que têm levado a um aumento no número de pesquisas aplicando diferentes técnicas capazes de otimizar a extração de compostos bioativos de resíduos vegetais (MELO et al., 2015; RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2015).

Dentre os principais compostos bioativos estudados atualmente, os compostos fenólicos e os carotenoides se destacam por desempenharem um papel decisivo nas propriedades sensoriais de frutas e vegetais, tais como, amargura, adstringência, cor e

aroma (CHEYNIER, 2005; MORTENSEN, 2006). Além disso, diversos efeitos benéficos à saúde têm sido reportados em estudos epidemiológicos relacionando o consumo de alimentos fontes desses compostos com a redução no risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como câncer e doenças cardiovasculares (OMONI; ALUKO, 2005; SOOBRAATTEE et al., 2005).

1.2. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários de frutas, hortaliças e outros vegetais e, são importantes determinantes na qualidade sensorial e nutricional tanto dos produtos *in natura* quanto de produtos adicionados destes compostos (AYALA-ZAVALA et al., 2011). Este grupo de fitoquímicos que se encontra amplamente distribuído no reino vegetal, é de extrema importância fisiológica e morfológica para o desenvolvimento e manutenção dos vegetais ao longo do seu ciclo de vida (POPA et al., 2008).

Estes compostos possuem um anel aromático contendo uma ou mais hidroxilas e suas estruturas podem variar desde uma simples molécula até um complexo polímero de alta massa molecular (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). São classificados como fenólicos simples ou polifenóis com base na estrutura química de cada molécula (SOTO-VACA et al., 2012).

A enorme diversidade de compostos fenólicos considerados bioativos, ou seja, com atividade biológica, reflete também a variedade de nichos de atuação onde estes compostos podem ser inseridos.

No vegetal podem atuar como agentes atraentes para polinizadores, contribuem para a pigmentação das plantas, agem como antioxidantes e agentes protetores contra a luz UV, apresentam propriedades antimicrobianas a partir de compostos como fitoalexinas, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2006; POPA et al., 2008). De modo geral essas propriedades fazem com que esses compostos desempenhem um papel importante tanto no crescimento quanto na reprodução das plantas, proporcionando uma proteção eficiente contra patógenos e predadores.

No organismo humano diversos estudos já relacionaram o consumo de compostos fenólicos presentes em frutas, hortaliças, outros vegetais e produtos derivados com benefícios na prevenção e tratamento de distúrbios como aterosclerose, síndrome metabólica, diabetes e câncer (BODET et al., 2008; LUCAS; RUSSELL; KEAST, 2011; MOHAMED, 2014; ZHEN et al., 2016).

Apesar disso, a falta de estudos *in vivo* ainda levanta dúvidas sobre a real atividade e os mecanismos de ação desses compostos no organismo humano, especialmente associados à grande metabolização que os compostos bioativos, em geral, passam durante o processo digestivo, modificando a capacidade de redução dessas substâncias (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004).

Sabe-se que mesmo após o consumo elevado de flavonoides, os metabolitos resultantes encontrados no organismo, tendem a apresentar capacidade antioxidante reduzida (HALLIWELL; RAFTER; JENNER, 2005) e, a concentração de compostos fenólicos pode ser de 100 a 1000 vezes menor no corpo humano, raramente excedendo uma concentração plasmática acima de alguns nmol/L (DEL RIO et al., 2010).

Apesar de todas as evidências, conflitantes ou não, sabe-se que o consumo de alimentos de origem vegetal, especialmente as frutas (ricas em compostos fenólicos), são de fundamental importância para a manutenção da saúde humana, uma vez que os efeitos anti-inflamatório (TRIPOLI et al., 2007; MUELLER; HOBIGER; JUNGBAUER, 2010), anti-tumoral (KAUR; VERMA, 2015), dentre outros vêm sendo largamente descritos.

Dentre todas as classes de compostos fenólicos existentes, os flavonoides são os mais comumente encontrados, devido à sua ampla distribuição nos tecidos vegetais e, com os carotenoides e a clorofila, é responsável pela ampla variedade de cores encontradas nos vegetais. Nesta família estão incluídas as flavonas, flavonois, isoflavonois, antocianinas, antocianidinas, pro-antocinidinas e catequinas (RONG, 2010; FERREIRA; PINHO, 2012).

Estas moléculas são derivadas dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina e apresentam em sua estrutura química três anéis (ROUTRAY; ORSAT, 2012). As variações causadas por diferentes padrões de hidroxilação, alquilação, glicosilação e prenilação (adição de uma molécula hidrofóbica), alteram sua estrutura, dando origem a diferentes classes de flavonoides (ex. flavonois, flavonas, isoflavonois) (STALIKAS,

2007), dos quais as flavonas e os flavonóis são os mais amplamente distribuídos e estruturalmente diversificados (IGNAT; VOLF; POPA, 2011).

Um segundo grupo de compostos fenólicos também amplamente distribuídos e abundantes na natureza são os ácidos fenólicos. Estes podem ocorrer na forma de éster, glicosídeos ou amidas e raramente são encontrados em sua forma livre no vegetal (PEREIRA et al., 2009). E, assim como os flavonoides podem ser divididos em subclasses: os ácidos hidroxicinâmicos (ex. ferúlico, cafeico, *p*-cumárico) e os ácidos hidroxibenzoicos (ex. gálico, vanílico, siríngico) (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Enquanto a presença e a quantidade de compostos bioativos nas diferentes matrizes vegetais tem relação direta com a variedade, o grau de maturação (PALAFOX-CARLOS; YAHIA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2012), as condições de armazenamento e processamento (RINALDO; MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ; FILS-LYCAON, 2010), seu potencial efeito funcional no organismo humano é considerado um resultado da ação sinérgica entre diferentes nutrientes e não nutrientes presentes no alimento, tais como vitaminas, compostos fenólicos, carotenoides, minerais e fibras (AGUDO; JOINT, 2005; IBGE, 2010; HADAD; LEVY, 2012; LIU, 2013).

Atualmente, dentre os compostos de maior interesse destacam-se os carotenoides cujo papel protetor já foi largamente reportado (GARDNER et al., 2000; KRINSKY; JOHNSON, 2005; SHAH; PRASAD; KUMAR, 2016), e os compostos fenólicos, principalmente por sua capacidade antioxidante, com potencial atuação na prevenção de doenças crônico-inflamatórias (LUCAS; RUSSELL; KEAST, 2011).

1.3. Carotenoides

Carotenoides são tetraterpenos lipossolúveis que contém 40 carbonos em sua estrutura e duplas ligações conjugadas (BRITTON, 1995). São um importante grupo de micronutrientes, cuja aplicação funcional está relacionada ao seu potencial antioxidante e sua atividade de provitamina A (STAHL; SIES, 2003). Estes compostos também são importantes fontes naturais de corantes e pigmentos que variam de tons de amarelo ao

vermelho, dependendo do tipo predominante de carotenoide presente na matriz (MORTENSEN, 2006).

Apesar de serem encontrados majoritariamente em matrizes de origem vegetal, os carotenoides também podem ser encontrados em peixes, crustáceos, insetos e na plumagem de pássaros. Entretanto, animais não são capazes de sintetizar carotenoides, de modo que somente através da alimentação é possível obtê-los (OKADA; NUR-E-BORHAN; YAMAGUCHI, 1994; MATSUNO et al., 1999; RAO; RAO, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; M.; AMAYA-FARFAN, 2009)

Estima-se que entre 600 e 800 carotenoides naturais já tenham sido isolados e caracterizados (DUGO et al., 2008), dos quais aproximadamente 560 já tiveram sua estrutura química elucidada (SINGH; AHMAD; AHMAD, 2015) e, aproximadamente 50 destes foram caracterizados por apresentarem em sua estrutura química pelo menos um anel β -ionona não-substituído com no mínimo 11 duplas ligações, apresentando assim, atividade de provitamina A. Destes, apenas 14 já foram identificados no soro humano, entretanto, apenas 6 (β -caroteno, β -criptoxantina, α -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina) representam mais de 95% do total de carotenoides presentes no plasma humano (MAIANI et al., 2009) e 4 (β -caroteno, α -caroteno, licopeno e luteína) representam mais de 90% do total de carotenoides presentes na dieta humana (JASWIR et al., 2011; SINGH; AHMAD; AHMAD, 2015).

Os carotenoides podem ser classificados quanto à sua atividade biológica em provitamínicos (ex. β -caroteno e β -criptoxantina), sem atividade provitamínica (ex. Licopeno e luteína), e outros cuja relação com benefícios a saúde são menos estudados (ex. fitoeno e o fitoflueno) e que estão presentes em menor concentração nos alimentos por serem moléculas precursoras na biossíntese dos demais carotenoides (MORTENSEN, 2006). E, também podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em carotenos, constituídos por átomos de carbono e hidrogênio (ex. β -caroteno, α -caroteno e licopeno) e xantofilas, constituídas por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio (ex. luteína, zeaxantina e β -criptoxantina) (AIZAWA; INAKUMA, 2007).

Dentre os carotenoides identificados, o β -caroteno é o mais abundante e o que apresenta a maior atividade de provitamina A, por ter em sua estrutura química dois anéis β -ionona, resultando normalmente em duas moléculas de retinol (vitamina A) (LEUENBERGER; ENGELCH-JARRET; WOGGON, 2001). E, assim como nos

compostos fenólicos, a biossíntese de carotenoides e a variação das concentrações nos vegetais depende de fatores genéticos, ambientais, do grau de maturação, condições de colheita e pós-colheita, armazenamento e processamento (KIDMOSE et al., 2001; ALQUEZAR; RODRIGO; ZACARIAS, 2008; MAIANI et al., 2009).

A ação antioxidante dos carotenoides é uma característica particularmente importante do licopeno que é eficaz em inibir o potencial oxidativo de radicais livres (SHAMI; MOREIRA, 2004; HADAD; LEVY, 2012). Além deste, a luteína, zeaxantina e as xantofilas encontradas em milho e em folhas como o espinafre funcionam como antioxidantes protetores da região da mácula da retina humana, protegendo contra a formação de catarata, doenças coronarianas e acidente vascular encefálico (SNODDERLY, 1995; EVANS et al., 2013; LIU et al., 2014).

Outros benefícios conferidos pelo consumo de alimentos fontes de carotenoides, que podem estar relacionados ao seu potencial antioxidante, incluem o reforço da função do sistema imune, a proteção contra queimaduras solares e a inibição de certos tipos de câncer (KRINSKY; JOHNSON, 2005; RAO; RAO, 2007).

Carotenoides são moléculas altamente suscetíveis à isomerizações ou degradações pela luz, oxigênio, presença de ácidos e metais pró-oxidantes o que torna tanto sua extração da matriz quanto sua conservação etapas que requerem cuidados importantes a fim de preservar estes compostos no produto final (MAIANI et al., 2009).

1.4. Extração de compostos bioativos

A extração de compostos fenólicos das matrizes onde se encontram, é diretamente afetada pela estrutura química e as propriedades físico-químicas dos mesmos. De tal modo, que condições de extração, como tempo, temperatura, homogeneização e o tipo de solvente utilizado influenciam nas características dos diferentes extratos obtidos, quantitativa e qualitativamente, permitindo maior ou menor arraste desses compostos da matriz para o solvente utilizado (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; FRANQUIN-TRINQUIER et al., 2014).

A solubilidade desses compostos, é outra característica particular desses fitoquímicos, que explica a inexistência de um procedimento de extração universal para

determinar tanto a atividade antioxidante *in vitro* quanto seu teor nos alimentos, o que reforça a necessidade de selecionar métodos de extração específicos para cada matriz (FRANKEL; MEYER, 2000; SANCHEZ-MORENO, 2002; CAETANO et al., 2011).

De acordo com Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2006) a polaridade dos diferentes solventes pode afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio que são aspectos determinantes nas análises de avaliação da capacidade antioxidante desses extratos, de modo que, podem atuar como interferentes dos métodos, superestimando ou subestimando o potencial *in vitro* dessas matrizes. Além disso, extratos majoritariamente aquosos podem conter compostos não-antioxidantes, como as proteínas que também interferem diretamente tanto na eficiência da extração dos compostos fenólicos quanto na determinação da sua atividade antioxidante.

Compostos fenólicos são conhecidos por formarem complexos com proteínas capazes de promover mudanças estruturais, funcionais e nutricionais. De modo que, os efeitos da temperatura, pH, o tipo e a concentração de proteína, o tipo e a estrutura do composto fenólico da matriz, e as interações proteína-fenólico sob variadas condições tem sido amplamente estudado na tentativa de elucidar o exato mecanismo capaz de explicar como e porque a presença dessas proteínas e essas interações com os compostos fenólicos interferem na atividade biológica desses compostos (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013).

Assim, extrações sólido-líquido com solventes como água, metanol, etanol, acetona, propanol, acetato de etila, dentre outros (BAYDAR; OZKAN; SAGDIC, 2004), em diferentes proporções têm sido comumente utilizadas para extrair compostos fenólicos de frutas, vegetais e dos resíduos destes, o que só é possível graças a enorme variedade de compostos que estes solventes podem arrastar da matriz sem causar modificações químicas capazes de interferir nas propriedades funcionais destes compostos (ZUO, 2002; CAETANO et al., 2011).

Extrações sólido-líquido podem ser definidas como um fenômeno de transporte de massa, onde os sólidos presentes na matriz (sólida) migram para o solvente, dependendo do gradiente de concentração, do coeficiente de difusão (CORRALES et al., 2009), da temperatura empregada, do tempo de contato, da relação líquido-sólido, do fluxo, do tamanho da partícula (IGNAT; VOLF; POPA, 2011; MOKRANI; MADANI, 2016) e da presença de interferentes (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Dentre os diferentes tipos de solventes, o metanol e o etanol são os mais comumente utilizados, assim como diferentes proporções de soluções aquosas destes solventes, com ou sem emprego de temperatura, agitação e com maior ou menor tempo de contato destes com as amostras (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; RASHED et al., 2014; MOKRANI; MADANI, 2016). Apesar disso, para aplicação em alimentos, o etanol é preferido uma vez que apresenta menor toxicidade, e geralmente, uma atividade antioxidante semelhante à observada quando outros solventes são empregados na extração (DORTA; LOBO; GONZALEZ, 2012; SANTOS; GONÇALVES, 2016)

Quando se considera os variados tipos de compostos fenólicos existentes, e sua diversidade química, naturalmente se conclui que os métodos de extração variam de acordo com a composição destes metabólitos nos vegetais, e os grupos majoritariamente presentes. Assim, sabe-se que para os ácidos fenólicos simples e os flavonoides que, geralmente estão presentes em forma solúvel (ex. ésteres livres e glicosídeos solúveis), o uso de um solvente orgânico aquoso é suficiente para promover sua extração (ESCARPA; GONZALEZ, 2001; ESCARPA; MORALES; GONZALEZ, 2002).

Entretanto, na natureza, muitos compostos fenólicos existem na forma de complexos insolúveis, que geralmente encontram-se ligados a polímeros de parede celular através de ligações éster e glicosídicas, e, são geralmente liberados da matriz por hidrólise básica, ácida ou ambas (VICHAPONG et al., 2010; ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

Em diversos estudos da atividade antioxidante *in vitro* desses complexos insolúveis, os fenólicos conjugados, demonstraram um potencial superior ao observado nos fenólicos simples e nos fenólicos conjugados solúveis (LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2006; CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2010). Apesar disso, diferentemente dos cereais que apresentam maior proporção de compostos na forma insolúvel, frutas e vegetais são ricos nas formas conjugadas solúveis enquanto as formas insolúveis representam em média 24% do teor total de compostos fenólicos (ADOM; LIU, 2002; SUN et al., 2002).

Com relação a extração dos carotenoides, esta é feita com solventes orgânicos que são em seguida removidos, restando apenas uma resina lipídica rica em pigmentos e outros materiais (ex. triglicerídeos). A remoção desses interferentes (ex. clorofila, triglicerídeos) é feita através de uma etapa de saponificação (MORTENSEN, 2006).

Devido à alta susceptibilidade desses compostos à fatores como temperatura, luz e oxigênio, a presença de antioxidante no meio permite sua preservação durante e depois do processo de extração (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

Além da extração com solvente, extrações com fluido supercrítico vêm sendo largamente aplicadas no isolamento de compostos fenólicos e carotenoides (HERRERO; CIFUENTES; IBAÑEZ, 2006; BLEVE et al., 2008; MASSIAS et al., 2015). Tais métodos vêm sendo utilizados com a finalidade de minimizar as inúmeras desvantagens dos métodos tradicionais (ex. baixa seletividade e rendimento, consomem muito tempo e são mais trabalhosos), além de não utilizarem as grandes quantidades de solventes, muitas vezes tóxicos, necessários nas extrações convencionais (HERRERO; CIFUENTES; IBAÑEZ, 2006; HERRERO et al., 2010).

Apesar da extração com fluidos supercríticos ser técnica e economicamente viável não apenas em escalas piloto mas também industrial, e de apresentar inúmeras vantagens quando comparada às técnicas convencionais, após mais de três décadas de desenvolvimentos o uso desta tecnologia em países em desenvolvimento ainda é mínimo e até 2011 essa tecnologia ainda não era utilizada, em escala industrial, nos países da América Latina (PRADO; PRADO; MEIRELES, 2011).

Grande parte do problema para a utilização desta tecnologia nesses países está na dificuldade de se estabelecer critérios cinéticos, que permitam prever o comportamento do processo na escala industrial, uma vez que os dados ainda são muito controversos, os resultados inconclusivos e as possibilidades mudam de acordo com o equipamento utilizado, o que torna a aplicação desta tecnologia em países em desenvolvimento uma experiência ainda economicamente inviável na maioria dos casos (FERNÁNDEZ-PONCE et al., 2016).

Além disso, enquanto muitos estudos afirmam que este processo de extração é extremamente eficiente em escala industrial (PRADO; PRADO; MEIRELES, 2011; VEGGI et al., 2014), há relatos na literatura de decaimento do rendimento à medida que a escala de operação aumenta (KOTNIK; SKERGET; KNEZ, 2007).

Assim, as técnicas de extração convencional com solventes para a obtenção de compostos bioativos, mesmo que impliquem na co-extração de substância indesejáveis (ex. açúcares, ácidos orgânicos, proteínas), quando associadas a um processo

subsequente de purificação (ex. extração em fase sólida) (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009) são ferramentas válidas, importantes e economicamente viáveis.

1.5. Alimentos funcionais

O conceito de alimentos funcionais foi proposto inicialmente no Japão, em meados da década de 1980. Nos anos 90, foi cunhada a designação, em inglês, FOSHU (Foods for Specified Health Use, alimentos para uso específico de saúde), referindo-se aos alimentos usados como parte de uma dieta normal que demonstram benefícios fisiológicos e/ou reduzem o risco de doenças crônicas, além de suas funções básicas nutricionais (SHIMIZU, 2012).

Um alimento pode ser considerado funcional se for comprovado que pode interferir benéficamente em uma ou mais funções alvo no corpo, além de ser nutricionalmente relevante para o bem-estar e a saúde e para a redução do risco de uma doença (FANG; BHANDARI, 2010; EVANS et al., 2013). São funcionais alimentos que combinam produtos comestíveis com moléculas biologicamente ativas (compostos bioativos), com a finalidade de corrigir distúrbios metabólicos (GONZÁLEZ-CASTEJÓN; RODRIGUEZ-CASADO, 2011; MILAGRO et al., 2013), resultando em benefícios a saúde (CATCHPOLE et al., 2015)

Impulsionados pelo aumento da consciência dos consumidores que desejavam melhorar a qualidade de suas vidas através de escolhas alimentares e incorporação de hábitos saudáveis, os alimentos funcionais ganharam grande destaque e desenvolvimento ao longo dos últimos anos (BREWER, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil de compostos fenólicos e carotenoides de suplemento e subproduto de frutas e hortaliças.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar e quantificar, com base em padrões analíticos, os compostos fenólicos de suplemento obtido a partir do processamento de frutas e hortaliças e de seu subproduto, por CLAE-DAD;
 - Avaliar o teor de fenólicos livres totais no suplemento e em extratos do subproduto;
 - Avaliar o potencial antioxidante do suplemento e em extratos do subproduto;
 - Identificar e quantificar por CLAE-DAD os carotenoides do suplemento e do subproduto;
 - Determinar o perfil de compostos fenólicos e a melhor condição de extração, considerando as variáveis tempo, temperatura e percentual de etanol por UPLC-MS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras vegetais

As seguintes frutas foram utilizadas: laranja (*Citrus sinensis*), maracujá (*Passiflora edulis*) e melancia (*Citrullus lanatus*). Os vegetais foram: alface (*Lactuca sativa*), abobrinha (*Cucúrbita pepo*), cenoura (*Daucus carota*), espinafre (*Spinacea oleracea*), menta (*Mentha* s.p.), inhame (*Colocasia esculenta*), pepino (*Cucumis sativus*) e rúcula (*Eruca sativa*).

Todas as espécies foram adquiridas em um supermercado localizado no Rio de Janeiro (Brasil), levadas ao laboratório e processadas de acordo com o método descrito por Martins, Chiapetta, Paula, & Gonçalves (2011) para obter um suco concentrado de frutas e vegetais.

O resíduo gerado deste processamento foi seco e armazenado conforme descrito por Ferreira e colaboradores (2015).

3.1.1. Suplemento de frutas e vegetais

Depois da etapa de pasteurização do suco concentrado, este foi filtrado seco em um spray dryer (GEA, AS0340D Niro Atomizer, Alemanha), com temperaturas de entrada e saída de 190°C e 90°C, respectivamente.

Maltodextrina na proporção 1:4 (m/m) foi utilizada como adjuvante para a encapsulação do produto. A concentração final de sólidos solúveis foi fixada em 32° Brix, e o rendimento da produção foi de 0,22 Kg.L⁻¹ de suplemento em pó.

Todo o suplemento foi armazenado em embalagens tipo PET, que foram seladas e mantidas em local seco e limpo até a data das análises.

3.1.2. Subproduto de frutas e vegetais

Após a obtenção do suco concentrado, o resíduo sólido gerado foi imediatamente seco em estufa ventilada Marconi modelo MA-035/5 à 65° C; após a secagem o material foi triturado em processador de alimentos modelo Walita, retornando à estufa por mais 60 minutos à 90°C. Por fim todo o lote foi homogeneizado para obtenção da farinha de frutas e hortaliças (FFH) e armazenado em sachês plásticos metalizados, à temperatura ambiente (20°C – 30°C) até a data das análises (FERREIRA et al., 2015).

Estudos anteriores avaliaram a estabilidade físico-química e microbiológica da bebida após um ano de armazenamento, e da FFH ao longo de um ano de armazenamento e as duas amostras se mostraram estáveis pelos respectivos períodos (FERREIRA et al., 2015). Além disso, a atividade antioxidante da FFH em extratos aquoso, metanólico, etanólico e metanol:etanol (diferentes proporções), bem como o teor de fenólicos totais também já foram previamente reportados (SANTOS; GONÇALVES, 2016).

3.2. Caracterização e quantificação dos compostos bioativos das amostras vegetais

3.2.1. Suplemento de frutas e vegetais

Foram pesados 2 g de amostra em tubo tipo Falcon (50 mL), adicionado com pipeta volumétrica 30 mL de água destilada, a mistura foi homogeneizada em vortex até completa dissolução da amostra e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 g por 15 min (Thermo Fisher Scientific, Mega Fuge 16R, EUA) e o sobrenadante foi transferido para frascos de vidro e cor âmbar, e, armazenado a -18°C até análise. Esta etapa foi realizada em triplicata.

3.2.2. Subproduto de frutas e vegetais

Foram pesados 2g de amostra em tubos tipo Falcon (50 mL), em seguida, foi adicionado com pipeta volumétrica em cada tubo, 30 ml de solução etanol: água (75:25; v/v). Em seguida as amostras foram deixadas em shaker por 24 horas, à 40°C. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 2000 g por 15 min e o sobrenadante foi recuperado e armazenado a -18°C até análise.

3.2.3. Determinação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, ORTHOFER E LAMUELA-RAVENTOS, 1999), com algumas modificações descritas por Santos e Gonçalves (2016).

Foram utilizadas as soluções de Folin Ciocalteu à 10%, Carbonato de sódio à 4% e solução padrão de ácido gálico 0,1g%, e a leitura foi feita em espectrofotômetro à 750 nm.

Os extratos foram avaliados em concentrações entre 3 mg.ml⁻¹ e 20 mg.mL⁻¹. O ponto de maior concentração da amostra (20 mg.mL⁻¹) foi realizado em triplicata. Foi feito também para cada amostra um branco de todos os reagentes, excluindo apenas a amostra.

Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por grama de amostra seca (mg EAG.g⁻¹) e uma triplicata do terceiro ponto (1,0 mL de extrato) de cada amostra foi realizada.

3.2.4. Determinação da capacidade antioxidante pela redução do radical DPPH

A atividade antioxidante pelo método de redução do radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas modificações descritas por (SANTOS, 2016).

Preparou-se uma solução de DPPH 0,06mM em metanol, e uma curva padrão de Trolox com 6 pontos em concentrações entre 0 e 2000 micromol de trolox, para leitura no espectrofotômetro a 517 nm:

As amostras e os brancos foram adicionados em concentrações entre 3 mg.mL⁻¹ e 20 mg.mL⁻¹, com repetição em triplicata do último ponto.

Os resultados foram expressos micromol de Trolox por grama (μmol.g⁻¹).

3.2.5. Determinação da capacidade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

Para a determinação da atividade antioxidante através da redução do ferro, foi utilizada a metodologia descrita por Benzie and Strain (1996) com algumas modificações descritas por Ferreira, Gonçalves e Ferreira (2015).

O reagente FRAP foi preparado no momento da análise contendo 25 ml de tampão acetato (0,3 M, pH 3,6), 2,5 ml de TPTZ (2,4,6-tripiridil – s – triazina) 10 mM em 40 mM HCl e 2,5ml de FeCl₃ (20 mM).

Para os ensaios foram preparados extratos em concentrações variando de 0,25 a 0,9 mg.ml⁻¹, e a curva de calibração foi preparada a partir de sulfato ferroso nas concentrações de 500, 750, 1000 e 1250 μM.

Alíquotas de 90 μL de cada diluição da solução padrão e da amostra foram adicionadas a 270 μL de água Milli-Q e 2,7 ml do reagente FRAP. Os tubos contendo as misturas foram homogeneizados em vórtex e incubados em banho-maria (ALB 250C, lab 1000, Brasil) a 37°C por 30 minutos.

As leituras foram realizadas a 595 nm, utilizando reagente FRAP como branco, e, os resultados foram expressos em mmol Fe²⁺ por grama de amostra seca (mmol Fe²⁺.g⁻¹).

3.2.6. Identificação e quantificação de compostos fenólicos bioativos por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência com detector de Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD)

As amostras atomizadas (10 mg) foram pesadas em tubos Eppendorf (1,5 mL) e dissolvidas em solução água:metanol (97:3; v/v). Em seguida foram homogeneizadas em vórtex (Warmnest, VX-28, Brazil) e filtradas em filtro de seringa 0,45µm PTFE (Millex, Millipore, Alemanha). Por fim os extratos foram transferidos para vials de cor âmbar (Allcrom, Brazil).

Para as análises dos extratos do resíduo 1,5 mL dos extratos foram transferidos para Eppendorf e concentrado à vácuo (Thermo Scientific, Speedvac, USA). O extrato concentrado foi recuperado em solução água: metanol (97:3; v/v) homogeneizado em vórtex e filtrado em filtro de seringa de 0,45µm PTFE (Millex; Millipore, Alemanha). As amostras foram armazenadas a $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até a data das análises.

As amostras e os padrões analíticos foram analisados em um Sistema CLAE (Perkin Elmer, Flexar, EUA) equipado com um degasificador, um forno de coluna e um detector de arranjo de fotodiodos (PDA; Perkin Elmer, Flexar, USA) ajustado para aquisição de dados a 260 nm, 280 nm e 320 nm.

As amostras foram injetadas automaticamente, e os compostos fenólicos foram eluidos de uma coluna de fase reversa C₁₈ (5µm x 150 mm x 4,6 mm; Kromasil; Akzobel, Suécia), acoplada a uma coluna de guarda (4 x 3,0 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA), a 40°C.

A fase móvel consistiu de uma solução água: ácido fórmico (97:3; v/v; A), metanol (B) e acetonitrila (C). A vazão foi fixada em 0,8 mL.min⁻¹ e o gradiente de eluição foi realizado conforme descrito por Gomes e Torres (2016) com algumas modificações (Tabela 1).

Tabela 1. Gradiente de eluição utilizado para separação cromatográfica de compostos fenólicos por CLAE-DAD.

Tempo (min)	Solvente (%)		
	A	B	C
0,1	85,0	14,5	0,5
7,1	55,0	43,5	1,5
14,1	5,0	93,0	2,0
20,1	1,0	97,0	2,0
23,1	15,0	83,0	2,0
23,2	85,0	14,5	0,5
33,2	85,0	14,5	0,5

A: 0.3% Ácido fórmico; B: Metanol; C: Acetonitrila.

O tempo total de corrida foi de 33,2 min e o volume de injeção estabelecido foi de 20 µL.

O monitoramento e aquisição dos dados foram realizados através do software Chromera Data System 2012 (Perkin Elmer, USA), e a identidade dos picos foi determinada por comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV-Vis, das amostras com padrões comerciais.

A quantificação dos compostos fenólicos por CLAE-DAD foi realizada através da obtenção de curvas de calibração de cinco pontos para cada padrão (Tabela 2). Para tal, soluções estoque (500 ppm) foram diluídas a concentrações de 1 a 10 ppm, e a concentração final de cada composto foi individualmente calculada utilizando a área do pico, e os resultados foram expressos em mg.Kg⁻¹.

Os limites de detecção (LOD) que é a menor concentração do analito na matriz que pode ser detectada pelo método utilizado, e o limite de quantificação (LOQ) que é a menor concentração que pode ser quantificada com precisão e exatidão foram calculados para cada composto com base nas curvas de calibração de 5 pontos e no modelo de regressão linear.

Tabela 2. Curvas de calibração dos padrões de compostos fenólicos utilizados (n=3).

Compostos fenólicos	R²	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Ácido 3,4-Di-hidroxi-fenilacético	0,9851	1,437	4,355
Catequina	0,9895	1,204	3,648
Ácido 4-Hidroxibenzoico	0,996	0,742	2,248
Epicatequina	0,9829	1,541	4,670
Ácido <i>Trans</i>-Cafeico	0,9932	1,530	4,635
Ácido Vanílico	0,9961	0,730	2,213
Ácido 2,4-Di-hidroxi-benzoico	0,9956	0,777	2,354
Vanilina	0,993	0,979	2,966
Ácido <i>p</i>-Cumárico	0,9942	0,891	2,700
Ácido Ferulico	0,9977	0,560	1,693
Ácido Sinapínico	0,9849	1,451	4,396
Rutina	0,9905	1,147	3,475
Miricetina	0,9981	0,514	1,558
Ácido 2-Hidroxibenzoico	0,9943	0,884	2,679

R² para curvas de regressão obtidas com 5 pontos de calibração.

3.2.7 Extração dos carotenoides

O processo de extração foi executado conforme descrito por Lima e colaboradores (2009). Assim, aproximadamente 10g das amostras (suplemento e subproduto) mais 3g de celite 545 foram pesados e macerados em gral e pistilo, para homogeneização com sucessivas adições de 25 mL de acetona. As amostras foram maceradas até que se obtivesse uma pasta.

A pasta obtida foi vertida em um funil de vidro siterizado acoplado em um Kitasato de 500 mL para promover uma filtração à vácuo. Este procedimento foi repetido três vezes, ou até que a amostra ficasse transparente.

Em seguida a amostra foi transferida quantitativamente para um funil de separação contendo éter de petróleo e lavado com água Mili-Q, promovendo a transferência dos carotenoides da acetona para o éter de petróleo.

Quando necessário, a amostra foi lavada com solução de NaCl 10%, para desfazer emulsões.

Por fim, o extrato foi transferido do funil de separação para um balão volumétrico de 25 mL utilizando um funil com lã de vidro e sulfato de sódio para

remover o excesso de água do extrato. Nesta etapa, tanto o funil de separação quanto o funil para a transferência para dentro do balão foram lavados com éter de petróleo.

O volume no balão volumétrico foi, então, completado com éter de petróleo. Uma alíquota foi retirada para a leitura em espectrofotômetro e outra (1 mL) foi seca em fluxo de nitrogênio e, reconstituída em 200 μ L de acetona para a identificação por CLAE-DAD.

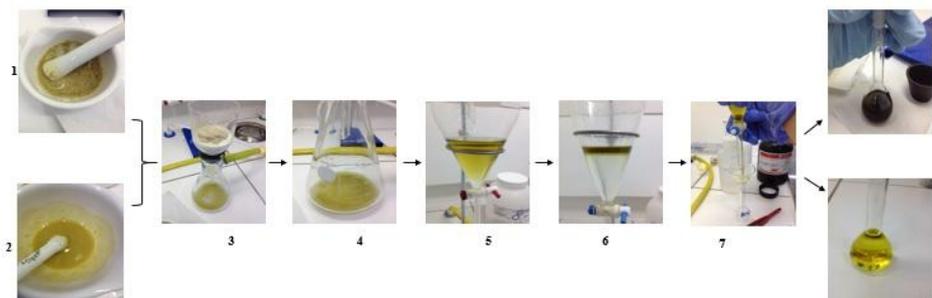


Figura 1. Esquema representativo do processo de extração de carotenoides de suplemento e subproduto de frutas e hortaliças.

(1 e 2) Maceração do resíduo e suplemento com acetona, respectivamente; (3) Filtração à vácuo; (4) Extrato filtrado; (5 e 6) Separação em funil; (7) Transferência do extrato para o balão volumétrico; (8) Extrato do resíduo; (9) Extrato do suplemento.

3.2.8 Saponificação dos extratos

Em um frasco âmbar foram adicionados 5 mL de solução metanólica de KOH 10% e 5 mL do extrato obtido anteriormente. Esta mistura foi acondicionada ao abrigo da luz por 16h. Em seguida, 5 mL de água Mili-Q foram adicionadas em bureta de 25 mL e o conteúdo do frasco (amostra saponificada) foi transferido quantitativamente para a bureta.

O conteúdo da bureta foi lavado com água Mili-Q até que toda a porção saponificada (aquosa) fosse removida. Por fim, o extrato foi retirado da bureta pela parte superior com auxílio de uma pipeta. Este procedimento foi realizado apenas para a amostra do subproduto.

Para as determinações de carotenoides por CLAE-DAD, 1 mL do extrato obtido foi seco em fluxo de nitrogênio e reconstituído em 200 μ L de acetona.

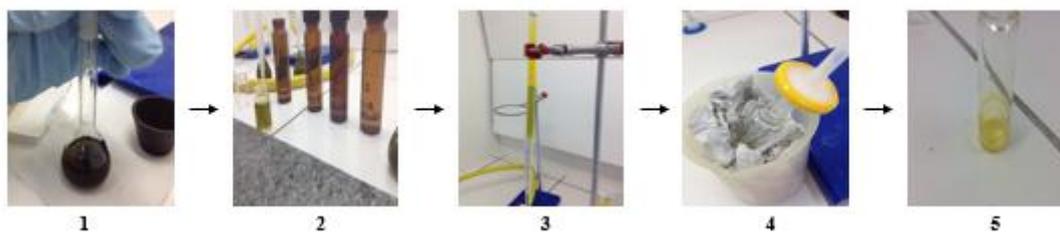


Figura 2. Esquema representativo da etapa de saponificação do extrato de subproduto de frutas e hortaliças.

(1) Extrato; (2) Extrato após 16 horas em solução metanólica de KOH 10 %; (3) Separação da fração saponificada; (4) Concentração da amostra com fluxo de nitrogênio; (5) Extrato concentrado.

3.2.9 Identificação e quantificação dos carotenoides por CLAE-DAD

Para a identificação e quantificação dos carotenoides por CLAE-DAD, os extratos reconstituídos em 200 μ L de acetona, foram injetados automaticamente em cromatógrafo líquido.

A separação foi realizada em coluna cromatográfica YMC® C₃₀ Carotenoid (250 x 4,6xmm; 3 μ m), a uma temperatura de 33 \pm 2°C, com eluição em modo gradiente de éter metil *terc*-butílico e metanol, conforme Tabela 3 (PACHECO, 2009). A detecção foi feita com detector de arranjo de fotodiodos (W2996 Waters®) com varredura de 350 a 550nm e quantificação em 450nm.

A identificação foi realizada com base no tempo de retenção e espectro de absorção UV/Vis dos picos cromatográficos dos padrões externos injetados. E a quantificação foi feita com base na curva de calibração e nas áreas dos picos dos padrões injetados. Os resultados foram calculados em base seca e as injeções foram feitas em duplicata para cada amostra.

Tabela 3. Gradiente de eluição para separação cromatográfica de carotenoides por CLAE-DAD

Tempo (min)	Solvente (%)	
	A	B
Inicial	80,0	20,0
0,5	75,0	25,0
15,0	15,0	85,0
15,05	10,0	90,0
16,5	10,0	90,0
16,55	80,0	20,0
28,0	80,0	20,0

A: Metanol; B: Éter metil *terc*-butílico

Fonte: Pacheco, 2009, p.41.

3.2.10. Quantificação de carotenoides totais

A quantificação de carotenoides totais foi feita previamente à injeção das amostras no cromatógrafo por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm (UV-1800; SHIMADZU, Japão). Todas as leituras utilizadas nos cálculos apresentaram valores de absorvância entre 0,2 e 0,8.

Quando valores fora deste intervalo eram obtidos, as amostras eram concentradas ou diluídas apropriadamente.

A concentração de carotenoides totais foi calculada nas amostras de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Carotenoides totais } (\mu\text{g} \cdot 100^{-1}) = \left(\frac{\text{Abs} \times f_{\text{dil}} \times V \times 10000}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times m} \right) \times 100$$

Onde:

Abs = Absorvância

f_{dil} = Fator de diluição da amostra

V = volume total do extrato (mL)

m = Massa da amostra (g)

$A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$ (absortividade do β -caroteno em éter de petróleo).

3.3. Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade, análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando os softwares Excel e Action Stat.

3.4 Otimização da extração de compostos bioativos do subproduto de frutas e vegetais

3.4.1 Preparo da amostra

Para obtenção dos extratos foram pesados 2g de amostra em tubos tipo Falcon (50 mL), em seguida, foi adicionado com pipeta volumétrica em cada tubo, 30 ml de um dos solventes, deixadas em contato com o solvente por tempo específico, em shaker à 20°C ou 40°C. As condições de extração estão descritas na Tabela 4, onde foram consideradas as variáveis tempo, temperatura e proporção de etanol em água. A variável de resposta utilizada foi a abundância relativa máxima de fenólicos obtida na análise por UPLC-MS. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 2000 g por 15 min e o sobrenadante foi recuperado. As extrações foram feitas em triplicata e ao final todas as replicatas de uma mesma condição foram misturadas e armazenadas a -18°C até análise.

Tabela 4. Condições experimentais para extração de compostos fenólicos (n=3).

Experimento	Etanol:Água (v/v)	Temperatura (°C)	Tempo (h)
A1	0:100	20	1
B1	25:75	20	1
C1	50:50	20	1
D1	75:25	20	1
E1	100:0	20	1
F1	0:100	20	6
G1	25:75	20	6
H1	50:50	20	6
I1	75:25	20	6
J1	100:0	20	6
K1	0:100	20	24
L1	25:75	20	24
M2	50:50	20	24
N1	75:25	20	24
P1	100:0	20	24
A2	0:100	40	1
B2	25:75	40	1
C2	50:50	40	1
D2	75:25	40	1
E2	100:0	40	1
F2	0:100	40	6
G2	25:75	40	6
H2	50:50	40	6
I2	75:25	40	6
J2	100:0	40	6
K2	0:100	40	24
L2	25:75	40	24
M1	50:50	40	24
N2	75:25	40	24
P2	100:0	40	24

As extrações foram feitas em triplicata.

3.4. Identificação de compostos fenólicos por UPLC - MS

Para as análises de identificação por espectrometria de massas, 2 µL dos extratos e dos padrões foram injetados em triplicata no sistema UPLC - MS equipado com uma fonte de ionização por Eletro Spray (Xevo G2-S QToF, Waters Corporation, RU), operando em modo negativo ESI (-).

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna ACQUITY UPLC® HSS T3 C₁₈ (100 mm x 2,1 mm; 1,8 µm). A temperatura da coluna foi fixada em 30 ± 2°C. Durante cada corrida, a vazão foi de 0,6 mL.min⁻¹, com eluição em modo gradiente de solução aquosa de ácido fórmico 0,3 % (v/v; A) e, acetonitrila com ácido fórmico 0,3 % e formiato de amônio 5 mM (B), descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Gradiente de eluição utilizado para a separação cromatográfica de compostos fenólicos por UPLC-MS.

Tempo (min)	Solvente (%)	
	A	B
Inicial	97,0	3,0
11,8	50,0	50,0
12,38	15,0	85,0
13,53	15,0	85,0
14,11	97,0	3,0
16,99	97,0	3,0

A: 0.3% Ácido fórmico; B: Acetonitrila, ácido fórmico 0,3% e formiato de amônio 5 mM.

Os dados foram coletados considerando a razão m/z entre 50 e 1000 operando em modo negativo. A voltagem dos capilares foi fixada em 2,0 kV e a voltagem dos cones de gás foi fixada em 30 V. O fluxo do gás de dessolvatação (nitrogênio de alta pureza, N₂) foi fixado em 600 L.h⁻¹ e a fonte de aquecimento foi ajustada em 120°C.

Os dados foram adquiridos utilizando um modelo de aquisição multiplex MS/MS com alternância de energia (baixa e alta) em modo centroide.

Os experimentos MS/MS foram executados com energia de colisão entre 15 e 55 eV utilizando com gás de colisão Argônio ultrapuro (Ar). Os dados foram então coletados pelo MassLynx 4,1 (Waters Corporation, UK). Para garantir a acurácia e a reprodutibilidade, todas as determinações foram executadas junto com um padrão de massa calibrada leucina-encefalina (Waters Corporation, USA; m/z 554,2615) a uma concentração de 0,4 ng.L⁻¹ em acetonitrila:água (50:50,v/v), com ácido fórmico 0,1% (v/v), em um fluxo de 20 µL.min⁻¹.

O tempo de varredura para leucina-enkefalina foi definido em 0,3s, em intervalos de 15s e 3 escaneamentos com uma janela de massa de $\pm 0,3$ Da.

3.4.1 Processamento dos dados

Os dados brutos de todas as repetições resultantes da análise UPLC - MS foram processados pelo software QI Progenesis v. 2.1 (Nonlinear Dynamics, Waters Corporation, UK), com as seguintes condições: todas as corridas, limites automáticos, dados centroides, modo de ionização negativa e molécula deprotonada $[M - H]^-$.

A identificação de compostos fenólicos realizou-se pela busca de polifenóis com MetaScope, uma ferramenta de pesquisa totalmente integrada que permitiu o uso de banco de dados interno Polyphenols PubChem ID usando os seguintes parâmetros: íon precursor, erro de massa ≤ 5 ppm, fragmento (tolerância) ≤ 10 ppm, tempo de retenção dentro de 0,5 min e dentro do intervalo de 0,3 – 14,0 min de análise. Além disso, foram utilizados os parâmetros de 35 padrões fenólicos como o tempo de retenção, massa exata, erro em massa e o espectro de massa, além de outros acima mencionados foram comparados com os dados as amostras.

Os dados processados foram exportados para o programa EZinfo onde foi feita a Análise de Componentes Principais (ACP) para definir as similaridades e diferenças entre os extratos estudados.

3.5. Determinação da capacidade antioxidante pela redução do radical DPPH

Os extratos foram avaliados quanto a capacidade antioxidante pela redução do radical DPPH conforme descrito anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de fenólicos totais e o potencial antioxidante das amostras, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Fenólicos totais e atividade antioxidante de suplemento e subproduto de frutas e hortaliças (n=3).

Experimento	Fenólicos totais (mg.g ⁻¹)	Atividade antioxidante	
		DPPH (umol Trolox.g ⁻¹)	FRAP (umol sulfato ferroso.g ⁻¹)
Subproduto	3,02 ± 0,19 ^a	28,23 ± 0,01 ^b	30600,0 ± 937,2 ^a
Suplemento	1,85 ± 0,33 ^b	23,42 ± 0,004 ^b	27440,0 ± 359,3 ^b

Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,0,5$).

Quando comparados, o subproduto apresenta teor de fenólicos totais superior, entretanto a atividade antioxidante é menor.

Dados semelhantes já foram reportados na literatura demonstrando um potencial antioxidante tanto nas partes comestíveis quando nos subprodutos de frutas e hortaliças, variando consideravelmente tanto entre matrizes, quanto entre os métodos de extração utilizados (GARCÍA-SALAS et al., 2015). Além disso, diversos estudos apontam para uma maior eficiência na extração de compostos fenólicos quando solventes orgânicos são adicionados ao sistema de extração por solvente (TURKMEN; SARI; VELIOGLU, 2006; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Estes resultados também demonstram que o potencial antioxidante de um alimento não depende exclusivamente da concentração de fenólicos no meio, mas principalmente do potencial que cada molécula tem para agir como antioxidante, o que depende tanto da sua estrutura química quanto das interações moleculares que cada estrutura faz com outros constituintes do alimento, sejam eles macronutrientes (ex. carboidratos e proteínas) ou micronutrientes (ex. carotenoides e vitaminas)

(ALTUNKAYA et al., 2009; HIDALGO; SÁNCHEZ-MORENO; DE PASCUAL-TERESA, 2010; VILLENEUVE; MCCLEMENTS; DECKER, 2012).

A caracterização de compostos fenólicos no suplemento de frutas e hortaliças por CLAE-DAD, mostrou a presença de pelo menos 14 fenólicos, dentre os quais os mais abundantes foram os ácidos fenólicos, com concentrações variando entre 35,11 mg.Kg⁻¹ de ácido 2-hidroxibenzoico e 1342,74 mg.Kg⁻¹ do ácido *p*-cumárico. Além destes, outros 5 ácidos fenólicos, 4 flavonoides, 1 aldeído fenólico (vanilina) e 2 derivados fenólicos, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (metabólito derivado da quercetina) e o ácido sinapínico (derivado do ácido ferúlico) também foram identificados na Tabela 7 e Figuras 3 e 4.

Todos os compostos identificados e quantificados encontraram-se acima dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) estabelecidos.

Tabela 7. Compostos fenólicos identificados e quantificados por CLAE-DAD em suplemento e subproduto de resíduo de frutas e vegetais (n=3).

Compostos identificados	tR (min)	Concentração (mg.kg ⁻¹)	tR (min)	Concentração (mg.kg ⁻¹)
	Suplemento		Subproduto	
Ácido 3,4-Dihidroxi-fenilacetico	7,41**	227,26	NI ^a	-
Catequina	7,72**	353,80	NI ^a	-
Ácido 4-Hydroxibenzoico	9,07*	398,44	9,06*	858,02
Epicatequina	9,63**	210,81	9,60**	442,19
Ácido <i>Trans</i> -Cafeico	9,87***	266,27	NI ^a	-
Ácido Vanílico	10,06*	591,13	10,09*	606,76
Ácido 2,4-Di-hidroxi-benzoico	10,53*	561,15	NI ^a	-
Vanilina	11,3**	222,13	11,42**	-
Ácido <i>p</i> -Cumárico	12,02***	1342,74	12,05***	1348,57
Ácido Ferulico	12,28***	471,63	NI ^a	-
Ácido Sinapínico	12,38***	1183,85	NI ^a	-
Rutina	12,84*	330,07	12,83**	-
Miricetina	13,14***	79,35	13,16***	-
Ácido 2-Hidroxi-benzoico	14,96***	35,11	NI ^a	-

^aNão Identificado.

Medias obtidas de triplicatas de injeção.

*260 nm; **280 nm; ***320 nm.

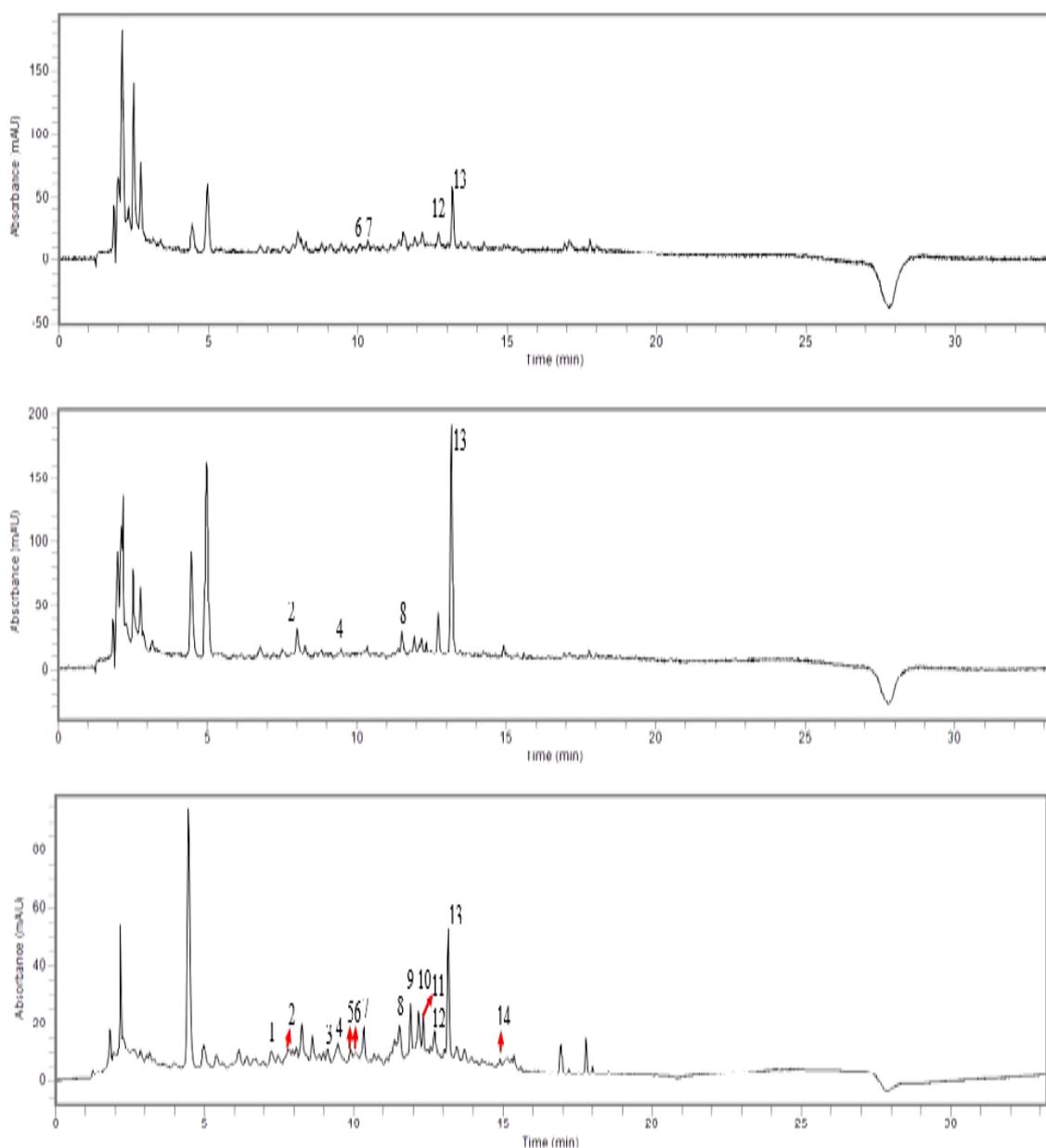


Figura 3. Cromatograma de compostos fenólicos identificados por CLAE-DAD em suplemento de frutas e hortaliças em 260, 280 e 320 nm (n=3).

Compostos identificados: **1:** Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético; **2:** Catequina; **3:** Ácido 4-Hidroxibenzoico; **4:** Epicatequina; **5:** Ácido *Trans*-Cafeico; **6:** Ácido Vanílico; **7:** Ácido 2,4-Dihidroxibenzoico; **8:** Vanilina; **9:** Ácido *p*-Cumárico; **10:** Ácido Ferulico; **11:** Ácido Sinapínico; **12:** Rutina; **13:** Miricetina; **14:** Ácido Salicílico.

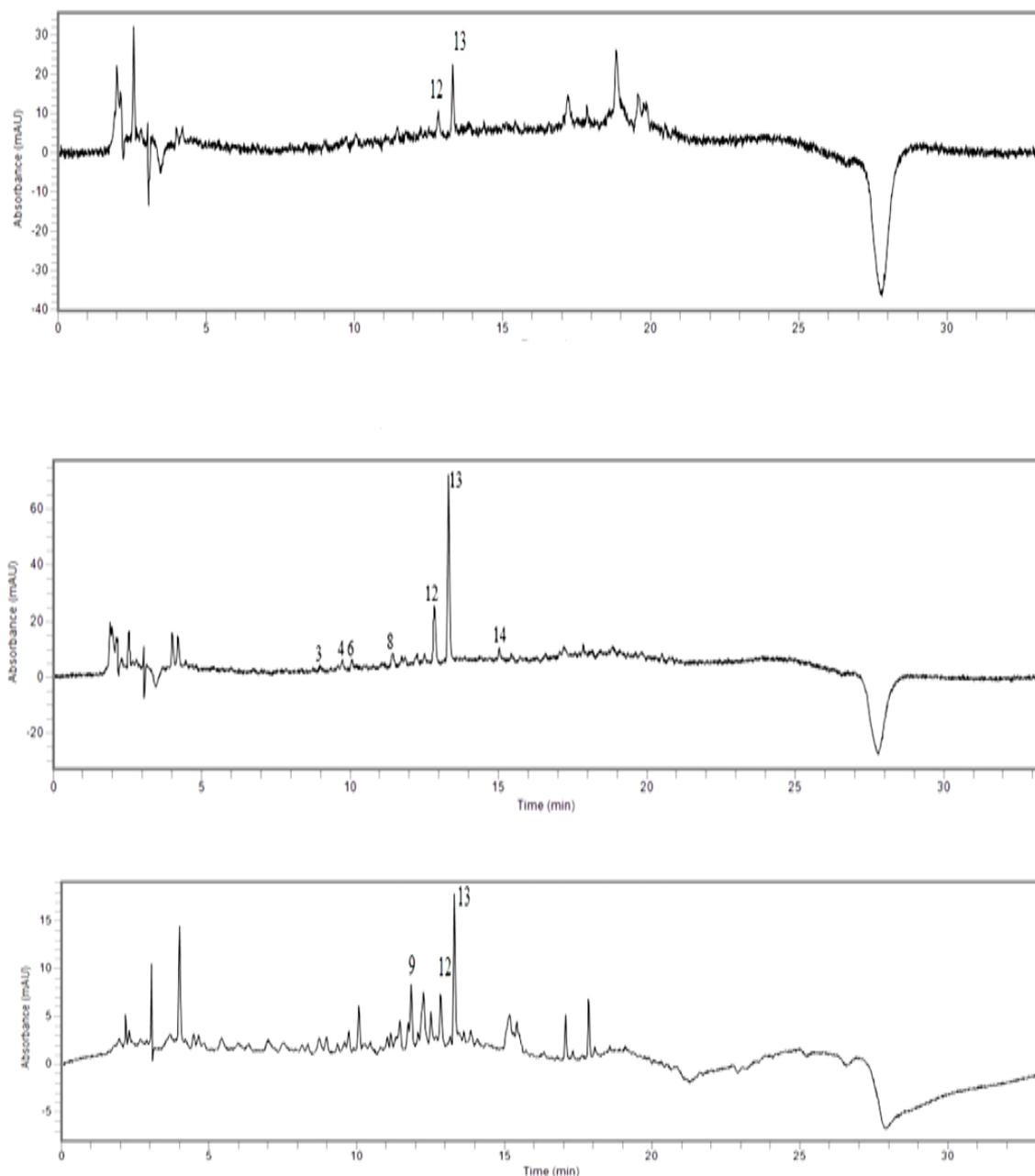


Figura 4. Cromatograma de compostos fenólicos identificados por CLAE-DAD em resíduo de frutas e hortaliças a 260, 280 e 320 nm (n=3).

Compostos identificados: 3: Ácido 4-Hidroxibenzoico; 4: Epicatequina; 6: Ácido Vanílico; 8: Vanilina; 9: Ácido *p*-Cumarico; 12: Rutina; 13: Miricetina.

Em sucos e bebidas de frutas, a concentração de ácidos fenólicos é geralmente maior que a de flavonoides (SHUI; LEONG, 2002; TEZCAN et al., 2009; RODRIGUES; BRAGAGNOLO, 2013) isso porque esses compostos tem uma estrutura

química relativamente mais simples que os flavonoides, são hidrofílicos, o que favorece a sua difusão em meio aquoso (JAKOBEK, 2015) e podem se ligar a frações de carboidratos o que também facilitaria seu arraste para a fração aquosa (HUTZLER1 et al., 1998; PEREIRA et al., 2009).

Dentre os flavonoides encontrados no suplemento apenas a rutina ($330,07 \text{ mg.Kg}^{-1}$) apresenta baixa solubilidade em água e, se encontra ligada a parede celular de vegetais folhosos (DE OLIVEIRA et al., 2013). Entretanto, o processamento dos alimentos ao promover a ruptura da parede celular dos vegetais, poderia contribuir para a sua liberação da matriz (JAKOBEK, 2015).

Ao observar o perfil cromatográfico do subproduto, foram identificados apenas 4 compostos, o ácido *p*-cumárico ($1348,57 \text{ mg.Kg}^{-1}$), o ácido 4-hidroxibenzóico ($858,02 \text{ mg.Kg}^{-1}$), o ácido vanílico ($606,76 \text{ mg.Kg}^{-1}$), além da epicatequina como único flavonoide ($442,19 \text{ mg.Kg}^{-1}$).

A complexidade do subproduto representa um obstáculo a mais nos processos de extração, purificação e consequente de identificação dos compostos o que pode ter contribuído para a presença de um menor número (quantitativa e qualitativamente) de compostos. Essa complexidade estrutural é um dos fatores capazes de comprometer a eficiência do processo de extração (SUN-WATERHOUSE et al., 2009; GODOY-CABALLERO; ACEDO-VALENZUELA; GALEANO-DÍAZ, 2012), já que a presença de proteínas, fibras e outros carboidratos podem dificultar a saída dos compostos fenólicos da estrutura vacuolar onde eles naturalmente se encontram (AGATI et al., 2012, 2013).

Dentre os carotenoides identificados (*Tabela 8 e Figura 5*), o β -caroteno mostrou-se predominante tanto no suplemento ($486 \pm 19,09 \text{ }\mu\text{g.100g}^{-1}$) quanto no subproduto ($1317 \pm 207 \text{ }\mu\text{g.100g}^{-1}$), seguido pelo α -caroteno, presente em uma concentração de $256,5 \pm 10,61 \text{ }\mu\text{g.100g}^{-1}$ no suplemento e de $493 \pm 74 \text{ }\mu\text{g.100g}^{-1}$ no subproduto.

A presença de outros carotenoides como licopeno, luteína e os isômeros 9 e 13-*cis* do β -caroteno nas duas amostras, é reflexo da variedade de vegetais utilizados na elaboração do produto, e consequentemente do resíduo, contribuindo para o elevado teor total de carotenoides que variou entre $1160,5 \pm 53,03 \text{ }\mu\text{g.100g}^{-1}$ e $2643 \pm 479 \text{ }\mu\text{g.100g}^{-1}$, para o suplemento e subproduto, respectivamente.

Como era esperado o teor de carotenoides no suplemento foi inferior ao encontrado em outras bebidas atomizadas, sucos e frutas *in natura* como mamão (4400 – 4600 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$), manga (1800 – 2500 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) (GANCEL et al., 2008) e cagaita (7700 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) (CARDOSO et al., 2011), que são reconhecidas fontes de carotenoides. Porém o subproduto apresentou um teor maior que o encontrado no suplemento e em outros subprodutos de frutas como atemóia (*Annona cherimola*) onde o teor de carotenoides encontrado foi de aproximadamente 190 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ em extrato saponificado (ALBUQUERQUE et al., 2014), abacaxi (156,10 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de β -caroteno), acerola (272,83 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de β -caroteno) e pitanga (1110,85 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de β -caroteno) (DA SILVA et al., 2014), mas inferior ao reportado para resíduo de maçã onde o teor de carotenoides totais encontrado foi de 5420 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (DE ABREU et al., 2013).

Tabela 6. Carotenoides totais, luteína, α -caroteno, β -caroteno, 9-cis- β -caroteno, 13-cis- β -caroteno e licopeno identificados em suplemento e subproduto de frutas e hortaliças (n=2).

	Suplemento ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$)	RE*	Subproduto ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$)	RE
Total	1160,5 \pm 53,03	-	2643 \pm 479	-
Luteína	20 \pm 0,0	-	169 \pm 125	-
α-caroteno	256,5 \pm 10,61	21,37 ¹	493 \pm 74	41,08 ¹
β-caroteno	486,5 \pm 19,09	81,08 ²	1317 \pm 207	219,5 ²
13-cis β-caroteno	21 \pm 2,82	-	44 \pm 3,5	-
9-cis β-caroteno	21 \pm 2,82	-	167 \pm 30	-
Licopeno	194 \pm 14,14		296 \pm 62	

Média \pm DP (n= 2). *Retinol equivalente

¹1RE = 12 μg de β -caroteno;

²1RE = 6 μg de β -caroteno

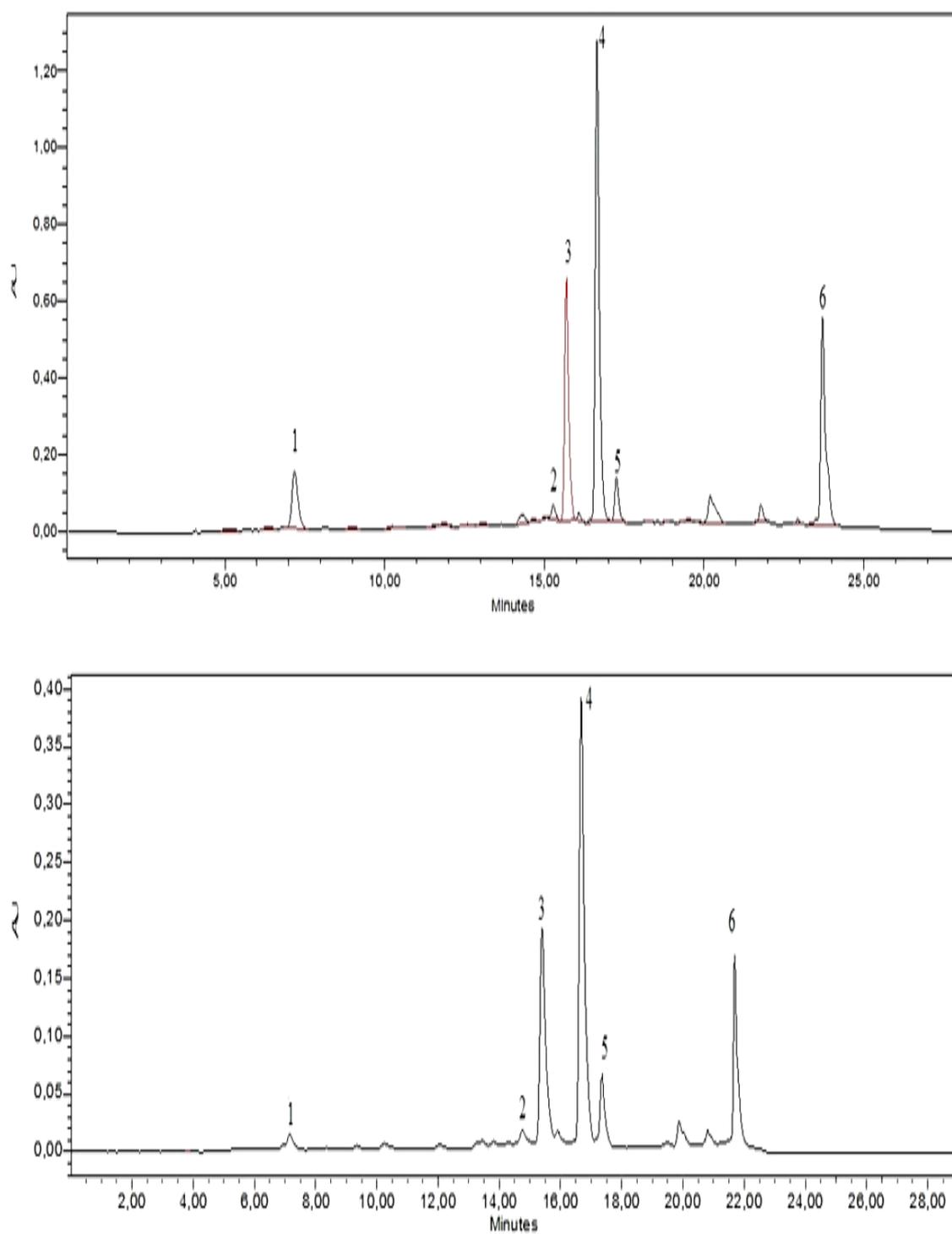


Figura 5. Cromatogramas dos carotenoides identificados por CLAE-DAD em suplemento e subproduto de frutas e hortaliças com varredura de 350 a 550 nm (n=2). Luteína (1), 13-*cis*- β -caroteno (2), α -caroteno (3), β -caroteno (4), 9-*cis*- β -caroteno (5) e licopeno (6).

Albuquerque e colaboradores (2014) também demonstraram que a etapa de saponificação, apesar de reduzir os interferentes da amostra, também provocou a perda de carotenoides em subproduto de atemóia, principalmente luteína e β -caroteno, que reduziram até 77% e 34,75%, respectivamente, após a saponificação, mas, permitiu a identificação e quantificação da β -criptoxantina. Segundo os mesmos autores, essa redução é ocasionada porque o hidróxido de potássio permite a formação de uma emulsão arrastando os carotenoides que serão perdidos durante a eliminação da fase aquosa (porção saponificada).

O teor de luteína observado no resíduo também foi elevado, comparando-se à um resíduo seco de milho, uma reconhecida fonte de luteína, onde foi observado um teor de 1990 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de luteína. Entretanto, quando comparados à cebola (8760 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) e brócolis (11330 $\text{mg}\cdot \text{kg}^{-1}$) os valores foram notavelmente inferiores (MAMATHA; ARUNKUMAR; BASKARAN, 2012).

Sabe-se que alguns isômeros *Cis*- β -caroteno apresentam menor atividade na varredura de espécies reativas de oxigênio e são degradados mais rapidamente que a forma *Trans*- β -caroteno (SCHIEBER; CARLE, 2005), entretanto, durante o processamento de frutas e vegetais (ex. aquecimento), a concentração da forma *Cis*-caroteno aumenta devido à isomerização da forma *Trans*-caroteno, que é forçada pelo processo, levando também a um decaimento na intensidade da cor do produto, podendo alterar de forma significativa suas características sensoriais.

Por outro lado, sabe-se que a presença de compostos fenólicos na amostra pode atuar de forma protetiva nesses carotenoides, preservando-os de danos oxidativos. O fato dos dados acerca da atividade biológica da forma *Cis*- β -caroteno ainda serem inconclusivos, reforça a importância da realização de testes *in vivo* que permitam elucidar as rotas metabólicas que esses isômero alcançam no organismo humano, além de avaliar o efeito sinérgico que as interações entre carotenoides, polifenóis e outras moléculas orgânicas podem ter tanto na absorção, quanto na atividade biológica desses compostos (HADAD; LEVY, 2012; GUPTA; SREELAKSHMI; SHARMA, 2015).

Devido ao perfil de carotenoides encontrado, principalmente no subproduto de frutas e hortaliças, e ao fato de que a metodologia empregada pode ter impactado significativamente nos teores reais de carotenoides totais do produto, subestimando-o, é possível caracterizar o subproduto de frutas e hortaliças como uma importante fonte de

compostos pró-vitamínicos, de baixo custo, uma vez que as concentrações observadas, mostram um potencial de conversão em vitamina A (retinol) superiores ao encontrado em frutas e vegetais reconhecidamente fontes de carotenoides como acerola (192 RE), manga (215 RE), melão (184 RE) e alface (208 RE) (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

Sabe-se que a extração de compostos bioativos de matrizes vegetais depende tanto da composição do alimento quanto do método selecionado e, de modo geral a variação nas condições de extração como tempo, temperatura e concentração de solvente orgânico, vão interferir tanto no tipo quanto na quantidade de compostos que serão extraídos.

Assim, para a avaliação do perfil de compostos fenólicos por UPLC-MS foram avaliadas 30 condições de extração onde, através da análise de componentes principais (ACP) foi possível observar que os extratos à 20°C e 40°C (*Figura 6*) apresentaram uma distribuição semelhante de compostos fenólicos principalmente em condições com a presença de ambos os solventes, etanol e água.

Quando etanol e água foram utilizados isoladamente, os extratos obtidos apresentaram perfis ligeiramente diferentes dos demais, especialmente quando houve aumento da temperatura para 40°C. Nestes extratos, o tempo de extração não foi tão significativo para o perfil dos compostos extraídos, quanto foi a variação no solvente.

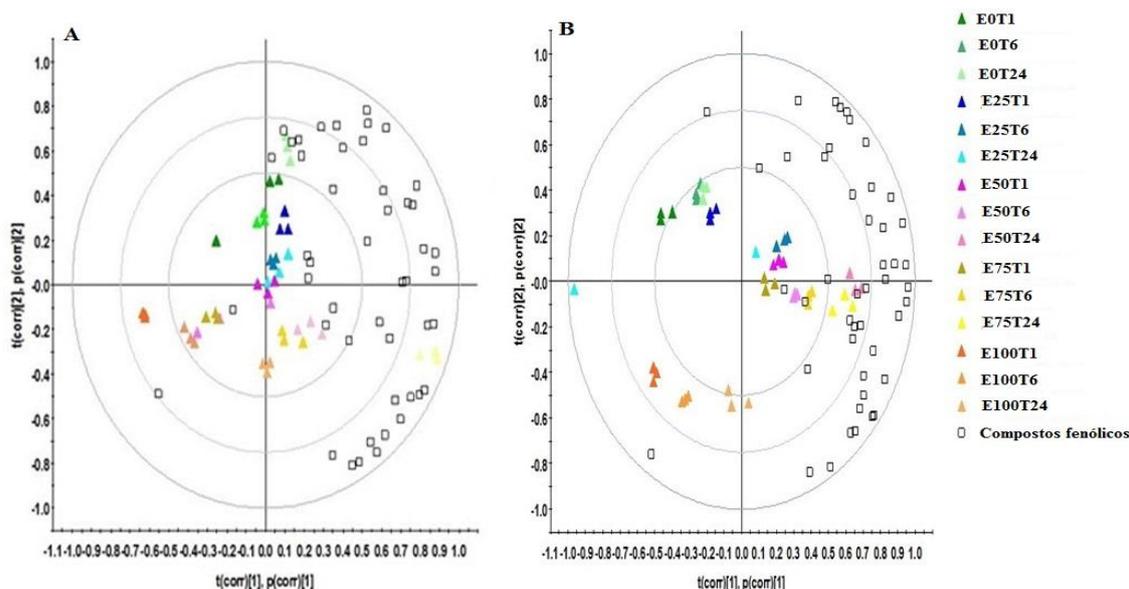


Figura 6. Gráficos de ACP dos extratos à 20°C (A) e 40°C (B) de extratos de subproduto de frutas e hortaliças.

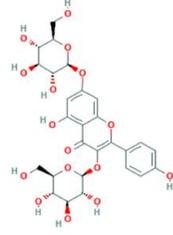
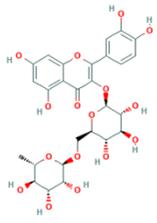
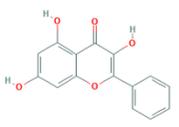
Nos extratos obtidos foram identificados 25 flavonoides, 12 ácidos fenólicos, 2 cumarinas e 3 outras substâncias fenólicas (2 ésteres e 1 aldeído), apresentados na Tabela 7. As identificações foram feitas com base em padrões analíticos (quando disponíveis) e utilizando informações de tempo de retenção, razão massa/carga (m/z), score de fragmentação, score (gerado pelo software utilizado) erro de massa e similaridade isotópica.

Os compostos propostos foram comparados às informações contidas na base de dados Phenol Explorer, com confirmação na base de dados da PubChem e Chem Spider.

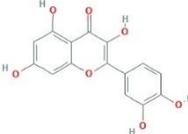
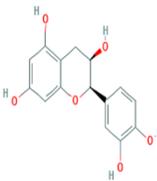
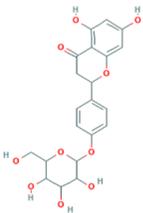
Além disso, os compostos identificados no subproduto também foram referenciados à estudos que já haviam identificado estes compostos em uma das espécies vegetais utilizadas para o preparo do suplemento.

O número total de compostos tentativamente identificados por UPLC-MS em cada extrato variou consideravelmente entre as diferentes temperaturas e tempos avaliados, tendo sido identificados até 41 e 42 compostos em 20°C e 40°C, respectivamente.

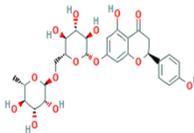
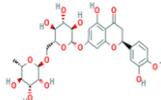
Tabela 7. Compostos fenólicos tentativamente identificados em resíduo de frutas e hortaliças por UPLC-MS.

Nº	Possível identificação	<i>m/z</i>	<i>tR</i> ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
Flavonol												
C1	Kaempferol-3,7-di- <i>p</i> -D-glicopiranosídeo	609,1444	3,48	C27H30O16	54,2	90,1	-2,80	84,25	52353		(PASINI et al., 2012)	Potencial anti-inflamatório (RAJENDRAN et al., 2014);
C2	Rutina*	609,1456	4,95	C27H30O16	55,3	96,6	-0,76	80,67	21816		(KHANAM et al., 2012)	Anti-inflamatório intestinal (MASCARAQUE et al., 2014); Antioxidante (LI et al., 2014b); Efeito anti-tumoral em hepatoma (CHEN et al., 2015)
C3	Galangina	269,0447	6,83	C15H10O5	36	0	-3,24	83,99	1098		(BERTIN et al., 2014)	Potencial agente quimio-preventivo (HEO; SOHN; AU, 2001)

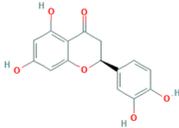
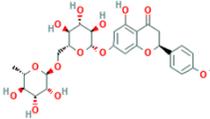
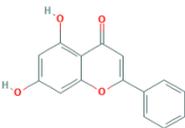
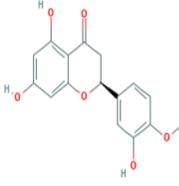
Continuação da Tabela 7.

Nº	Possível identificação	m/z	tR ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
C4	Quercetina	301,0346	7,01	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	57,5	95,3	-2,55	95,42	13101		(BELAJOVÁ; SUHAJ, 2004)	Potencial inibição do ciclo celular em células de câncer e efeito quimio-preventivo (MURAKAMI; ASHIDA; TERAQ, 2008; JEONG et al., 2009)
Flavanol												
C5	- (-) Epicatequina	289,0715	3,89	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	36,6	0,51	-1,04	83,75	653		(BIMAKR et al., 2011)	Potencial antioxidante (IACOPINI et al., 2008)
Flavanonas												
C6	Naringenina 4-O-glicosídeo	433,1144	4,02	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	55,1	96,7	0,85	80,07	3843		(ABAD-GARCÍA et al., 2012)	-

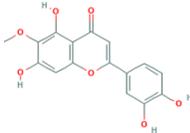
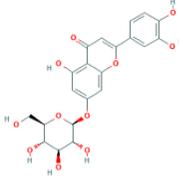
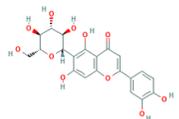
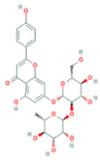
Continuação da Tabela 7.

Nº	Possível identificação	m/z	tR ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
C7	Narirutina	579,1715	5,46	C27H32O14	50,5	54,4	-0,79	98,89	1648619		(BRONNER; BEECHER, 1995)	Anti-inflamatório (FUNAGUCHI et al., 2007)
C8	Hesperidina	609,1806	5,85	C28H34O15	51,4	61,4	-3,14	99,45	4104348		(EL-SHAFAE; EL-DOMIATY, 2001)	Potencial antioxidante em terapêutica de estresse renal (BHARATHI; JAGADEESAN, 2014); Eficiência quimio-preventivo contra nefrotoxicidade medicamentosa induzida (SIDDIQI et al., 2015); Efeitos protetivos contra o estresse oxidativo e dislipidemia (PARI et al., 2015)

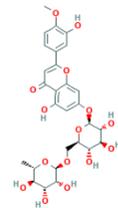
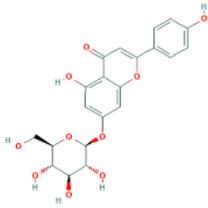
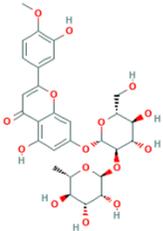
Continuação da Tabela 7.

Nº	Possível identificação	m/z	tR ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
C9	Eriodictiol	287,0557	7,22	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	37	0	-1,55	86,66	15550		(KHAN; ZILL-E-HUMA; DANGLES, 2014)	-
C10	Didymin	593,1864	7,25	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	49,8	55,8	-1,99	95,57	201015		(VANAMALA et al., 2006)	Potencial indutor de apoptose em células de câncer (HUNG et al., 2010)
C11	Chrysin	253,0504	7,92	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	50,6	66,8	-0,99	87,26	27613		(HOUGEE et al., 2005; ABAD-GARCÍA et al., 2012)	Potencial efeito quimio-preventivo (KASALA et al., 2015)
C12	Hesperetina	301,0706	8,11	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	35,7	0	-3,79	82,85	14423		(BILBAO et al., 2007)	Potencial efeito anticolesterolêmico (BORRADAILE; CARROLL; KUROWSKA, 1999; CHO et al., 2012)

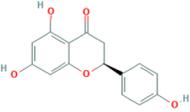
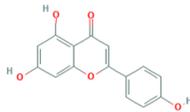
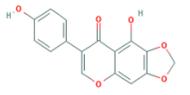
Continuação da Tabela 7.

Nº	Possível identificação	m/z	tR ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
C13	Nepetin	315,0500	8,83	C16H12O7	36,8	0	-3,21	87,93	7945		(IWASHINA; KAMENOSON O; UENO, 1999; JIN et al., 2008)	Potencial citotóxico (MILITÃO et al., 2004)
Flavonas												
C14	Cinarosideo/ Luteolina 7-O-glicosideo	447,0925	4,38	C21H20O11	57,7	96,8	-1,64	93,62	394543		(ABAD-GARCÍA et al., 2012)	Potencial antioxidante e citotóxico (SUN; MU, 2014)
C15	Luteolina 6-C-glicosideo	447,0923	4,52	C21H20O11	57,4	96,4	-2,29	93,27	82250		(ABAD-GARCÍA et al., 2012)	-
C16	Rhoifolin	577,1547	4,53	C27H30O14	56,1	95,3	-2,66	88,22	34517		(BARRECA et al., 2011)	Ação mimética à insulina (TZENG et al., 2011)

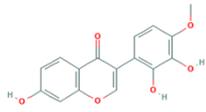
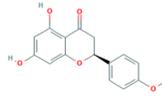
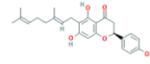
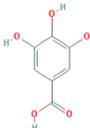
Continuação da Tabela 7.

Nº	Possível identificação	m/z	tR ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
C17	Diosmin	607,1647	5,68	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	55,4	98,5	-3,45	82,66	35997		(KANAZE et al., 2003)	Efeito anti hiperdislipidêmico em ratos (QUEENTHY; JOHN, 2013)
C18	Apigenina 6-C-glicosídeo	431,0975	5,69	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	55,6	92,3	-2,10	87,99	43617		(ABAD-GARCÍA et al., 2012)	-
C19	Neodiosmin	607,1646	5,82	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	47,5	54,7	-3,67	87,25	44348		(KANAZE et al., 2003)	-

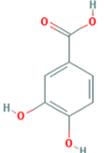
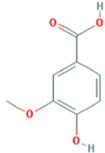
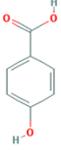
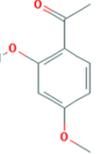
Continuação da Tabela 7.

Nº	Possível identificação	m/z	tR ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
C20	Naringenina	271,0604	8,33	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	49,5	53,8	-3,03	97,24	359901		(ABAD-GARCÍA et al., 2012)	Potencial ação hipocolesterol (BORRADAILE; CARROLL; KUROWSKA, 1999); aumento no consumo de glicose muscular (ZYGMUNT et al., 2010)
C21	Apigenina	269,0447	8,43	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	39,9	5,65	-3,15	97,45	221986		(ABAD-GARCÍA et al., 2012)	Potencial anti-inflamatório e anticarcinogênico (WANG et al., 2000; HOUGEE et al., 2005)
Isoflavonoides												
C22	Irilone	297,0404	5,63	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	36,5	0	-0,26	82,89	2928		(KLEJDUS; VITAMVÁSOV Á-ŠTÉRBOVÁ; KUBÁŇ, 2001)	Potencial efeito estrogênico (LUTTER et al., 2014)

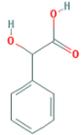
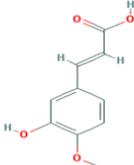
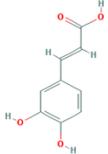
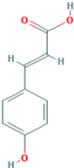
Continuação da Tabela 7.

Nº	Possível identificação	m/z	tR ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
C23	Koparin	299,0552	8,68	C16H12O6	57,6	97,2	-2,98	94,21	166428		(LIU et al., 2007)	-
Metabólitos flavonoide												
C24	Isosakuranetina	285,0763	11,00	C16H14O5	45,9	41,5	-2,07	90,30	56012		(KHAN; ZILL-E-HUMA; DANGLES, 2014)	-
C25	6-Geranylneringerina	407,1865	13,16	C25H28O5	38	9,04	0,33	81,61	158326		(INUÍ et al., 2012)	Ação terapêutica e preventiva no tratamento do câncer (VENTURELLI et al., 2015); e Alzheimer (CHO et al., 2012)
Ácidos hidroxibenzoicos												
C26	Ácido gálico*	169,0135	1,34	C7H6O5	51,8	72,3	-4,38	91,64	6398		(LONDOÑO-LONDOÑO et al., 2010)	Potencial anticarcinogênico (INOUE et al., 1995); potencial citotóxico (FORESTER et al., 2014)

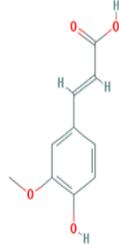
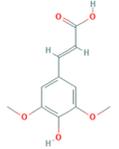
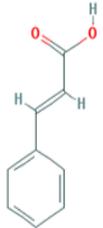
Continuação da Tabela 7.

Nº	Possível identificação	m/z	tR ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
C27	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico*	153,0186	2,14	C7H6O4	37,6	0	-4,56	93,26	36798		(MA et al., 2009)	Efeito protetivo contra radiação ultra violeta (CHA et al., 2014)
C28	Ácido vanílico	167,0344	2,28	C8H8O4	56,5	95,9	-3,72	90,85	1555		(KHANAM et al., 2012)	Ação nefroprotetiva (SINDHU; NISHANTHI; SHARMILA, 2015)
C29	Ácido 4-hidroxibenzoico*	137,0241	2,81	C7H6O3	51,3	59,5	-2,01	99,63	1501768		(FÚZFAI; MOLNÁR-PERL, 2007)	Efeito antiproliferativo e pró-apoptótico (SEIDEL et al., 2014)
C30	Paeonol	165,0551	4,43	C9H10O3	37,2	0	-3,96	90,47	12515		(JIN; FAN; AN, 2011)	Potencial uso em tratamento de doenças neurológicas (ZHOU et al., 2011; TAO et al., 2016)

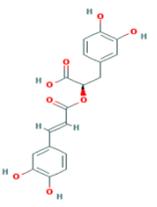
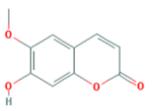
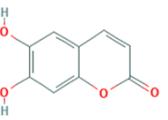
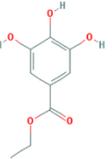
Continuação da Tabela 7.

Nº	Possível identificação	<i>m/z</i>	<i>tR</i> ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
Ácidos hidroxicinâmicos												
C31	Ácido mandélico	151,0394	2,48	C8H8O3	37,3	0	-4,42	91,44	19097		(NIEMAN et al., 2013)	-
C32	Ácido isoferúlico	193,0502	2,60	C10H10O4	37,3	0	-2,06	88,84	2007		(HE et al., 2011)	Potencial anti-inflamatório (DILSHARA et al., 2014)
C33	Ácido <i>Trans</i> -Cafeico*	179,0345	3,54	C9H8O4	58,3	95,8	-2,81	99,15	202025		(FALLICO et al., 2017)	Potencial antioxidante (GÜLÇIN, 2006)
C34	Ácido <i>p</i> -cumárico*	163,0395	4,50	C9H8O3	57,8	96,2	-3,71	97,11	133905		(VILLATORO-PULIDO et al., 2013)	Potencial anticarcinogênico, antioxidante, antimicrobiano (PEI et al., 2016)

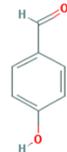
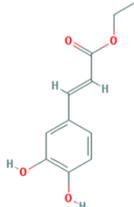
Continuação da Tabela 7.

Nº	Possível identificação	m/z	tR ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
C35	Ácido férulico*	193,0504	4,92	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	49,1	57,3	-1,35	89,85	35601		(VILLATORO-PULIDO et al., 2013)	Potencial anti-inflamatório (SERGENT et al., 2010)
C36	Ácido sinápico	223,0609	4,99	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	54,5	85,8	-1,15	88,32	20681		(ABAD-GARCÍA et al., 2012)	Efeito cardioprotetor (ROY; MAINZEN, 2013)
C37	Ácido cinâmico	147,0447	5,27	C ₉ H ₈ O ₂	37,4	0	-3,38	91,05	28038		(SWATSITANG et al., 2000)	-

Continuação da Tabela 7.

Nº	Possível identificação	m/z	tR ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
C38	Ácido rosmarínico	359,0771	6,10	C18H16O8	36	0	-0,42	80,69	4561		(TANG; KONCZAK; ZHAO, 2016)	Potencial anti-inflamatório (MUELLER; HOBIGER; JUNGBAUER, 2010)
Cumarinas												
C39	Escopoletina	191,0347	4,18	C10H8O4	37,4	0	-1,70	88,86	3194		(ABAD-GARCÍA et al., 2012)	Promove a supressão de citocinas pro-inflamatórias (MOON et al., 2007)
C40	Esculetina	177,0187	5,38	C9H6O4	37,9	0	-3,68	93,88	50614		(KOUPEI-ABYAZANI; CREASER; STEPHENSON, 1992)	Potencial efeito apoptótico em células cancerígenas (CHU et al., 2001)
Outras substâncias fenólicas												
C41	Éster etílico do ácido gálico	197,0449	1,44	C9H10O5	37,2	0	-3,08	89,58	2427		(KELEBEK; SELLI, 2011)	-

Continuação da Tabela 7.

Nº	Possível identificação	m/z	tR ¹	Fórmula	Score	SF ¹	EM ³	SI ⁴	Abundância Máxima	Estrutura	Referência	Potencial Atividade Biológica
C42	4-Hidroxi benzaldeído	121,0290	3,70	C7H6O2	38,7	0	-3,92	98,09	208834		(GOODNER; JELLA; ROUSEFF, 2000; YI et al., 2010)	-
C43	Éster etílico do ácido cafeico	207,0661	7,53	C11H12O4	38,7	0	-1,00	94,54	9711		(HE et al., 2011; FALLICO et al., 2017)	-

¹Tempo de retenção; ²Score de Fragmentação; ³Erro de Massa; ⁴Similaridade Isotópica; *Identificados com base nos padrões injetados;

**Referências das amostras vegetais onde os compostos já foram previamente identificados.

A maior presença de flavonoides era esperada, uma vez que eles são os mais abundantes fenólicos encontrados na natureza e, além disso, os principais constituintes de frutas e vegetais presentes na amostra (BILBAO et al., 2007; ABU-REIDAH et al., 2012).

Foi possível perceber que as variáveis consideradas nas condições de extração não interferiram de forma significativa no perfil de fenólicos obtidos em cada extrato (*Figuras 7 a 11*). Apesar disso, alguns compostos como a apigenina e o ácido gálico, que foram detectados em praticamente todos os extratos à 20°C, com o aumento da temperatura só foram encontrados em 3 (apigenina) e 6 (ácido gálico) condições à 40°C, o que pode ter relação tanto com uma possível redução na capacidade destes compostos interagirem com o solvente, quanto com uma possível degradação acelerada pelo aumento da temperatura e do tempo de extração.

É importante lembrar que a maioria dos compostos fenólicos apresenta uma boa estabilidade à temperaturas superiores à 40°C, entretanto, a complexidade do subproduto de frutas e hortaliças não permite descartar a possibilidade da existência de moléculas pró-oxidantes no meio, inclusive dos próprios carotenoides que, quando em altas concentrações podem atuar promovendo o processo de oxidação (IWASAKI et al., 2011; AMORIM-CARRILHO et al., 2014).

Por outro lado, o ácido isoferúlico, o ácido rosmarínico, ácido vanílico, a galangina, a epicatequina, a naringenina-4'-O-glucosídeo, a escopoletina e o paeonol foram beneficiados pelo aumento da temperatura, sendo extraídos em maior número de condições e, no caso da galangina e da epicatequina sendo extraídos exclusivamente nesta temperatura. Tais variações podem ser explicadas por alterações na viscosidade dos solventes, uma vez que com o aumento da temperatura a energia cinética das moléculas aumenta, o que reduz o tempo médio que uma molécula leva para passar pela outra, mas reduz também as interações que essas moléculas fariam, o que dependendo das características da molécula do composto fenólico poderia causar uma menor interação e conseqüentemente uma menor extração. Por outro lado, o tempo de extração pareceu compensar em alguns casos o aumento da temperatura, permitindo que quantidades significativas fossem extraídas (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA, 2005; MOKRANI; MADANI, 2016).

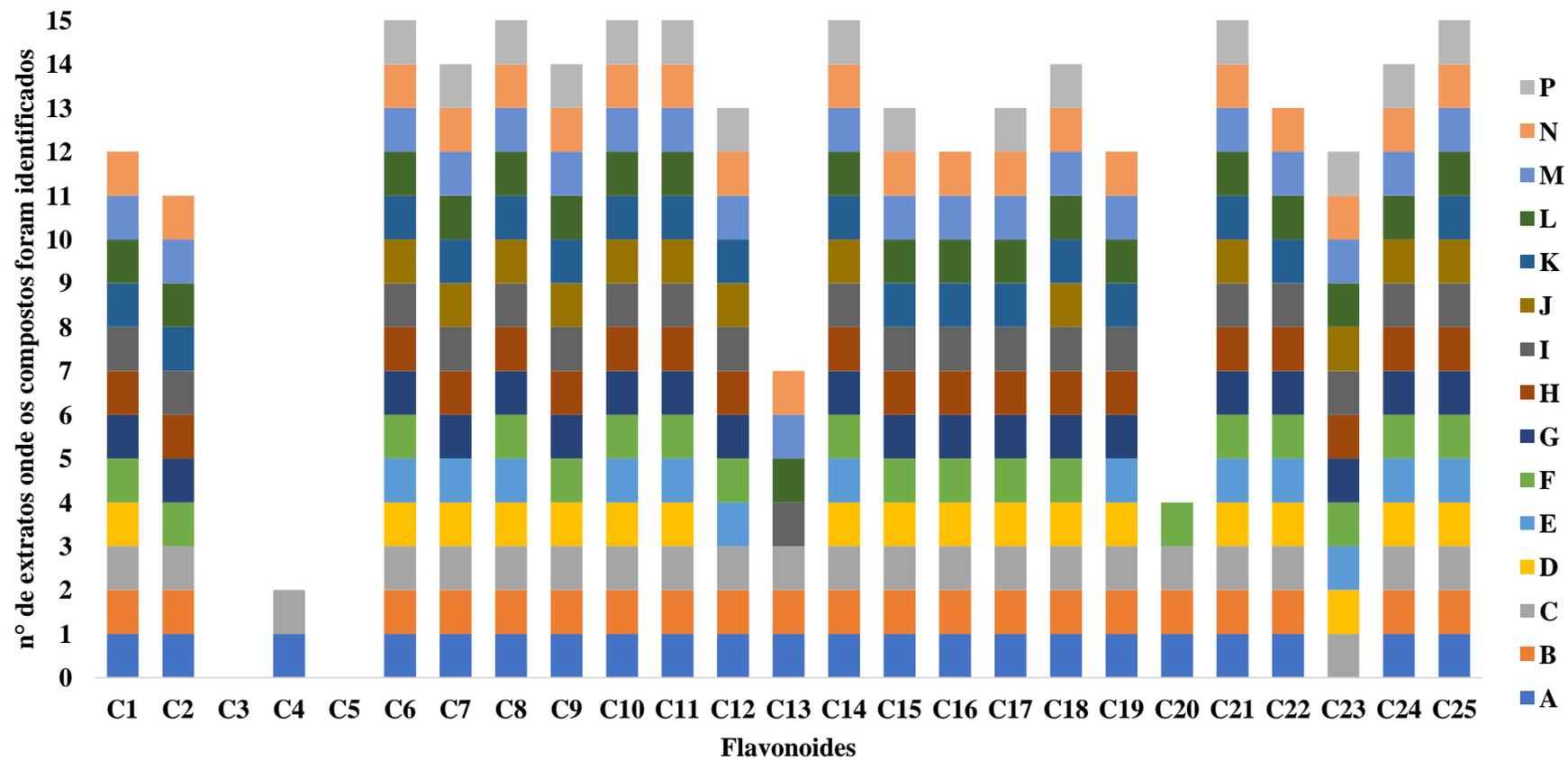


Figura 7. Flavonoides identificados em extratos de subproduto de frutas e hortaliças, obtidos à 20°C (n=3).

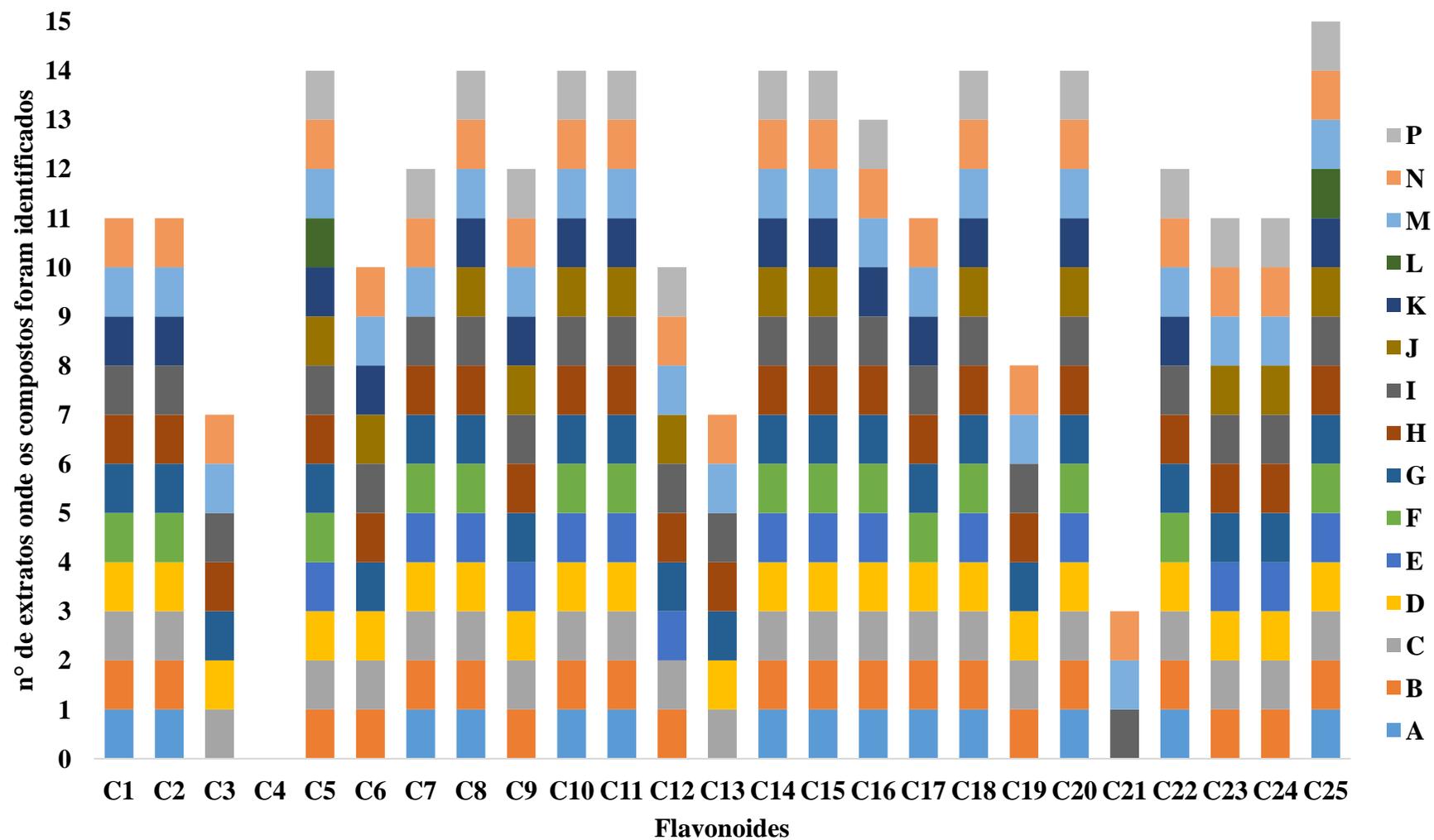


Figura 8. Flavonoides identificados em subproduto de frutas e hortaliças, obtidos à 40°C (n=3).

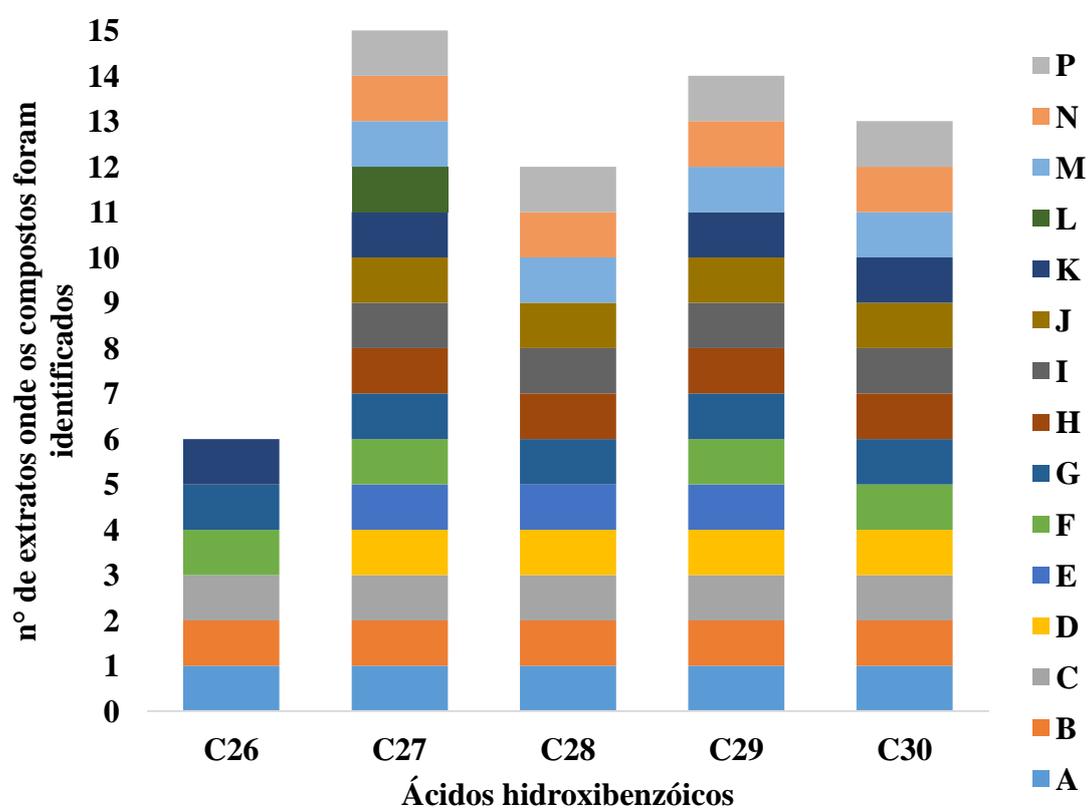
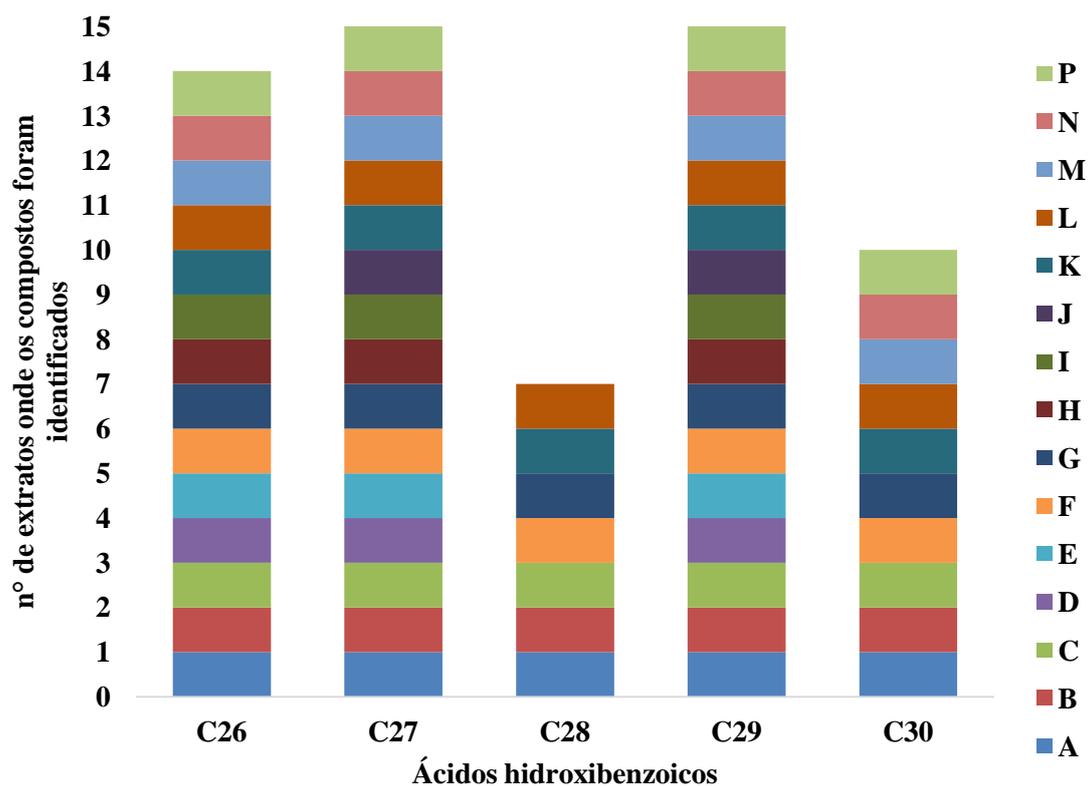


Figura 9. Ácidos hidroxibenzoicos e derivados identificados em extrato de resíduo de frutas e hortaliças obtidos à 20°C e 40°C (n=3).

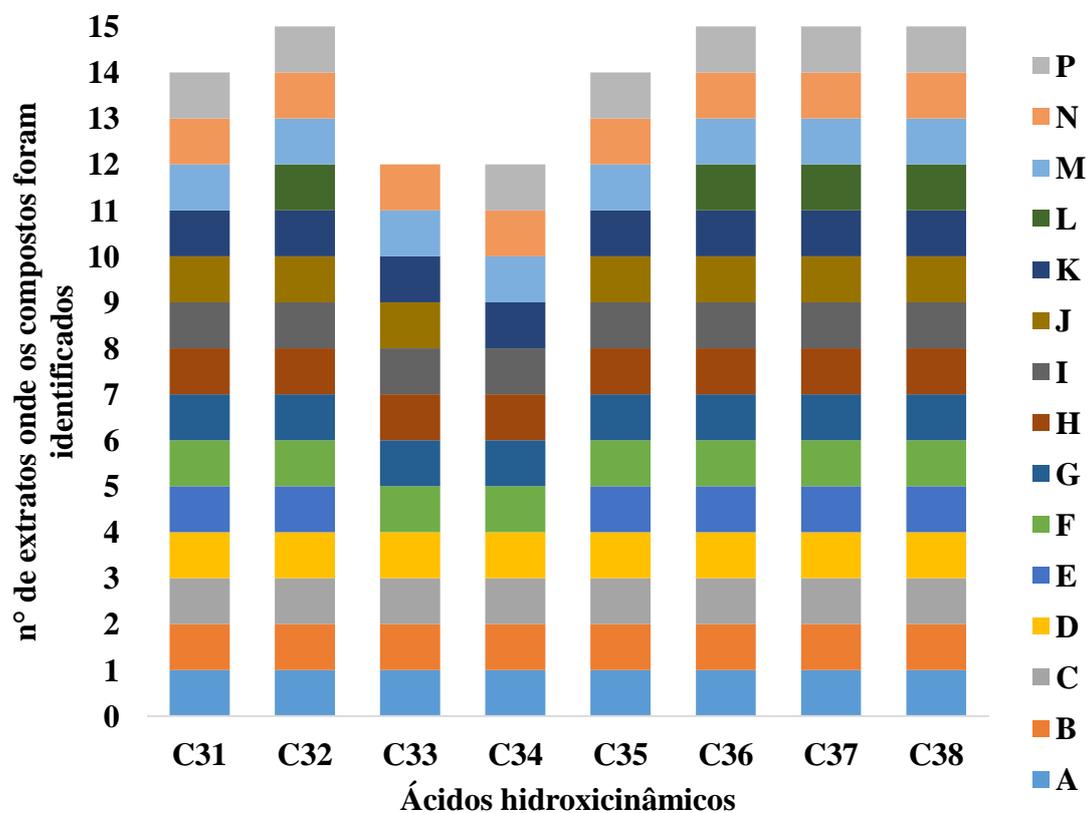
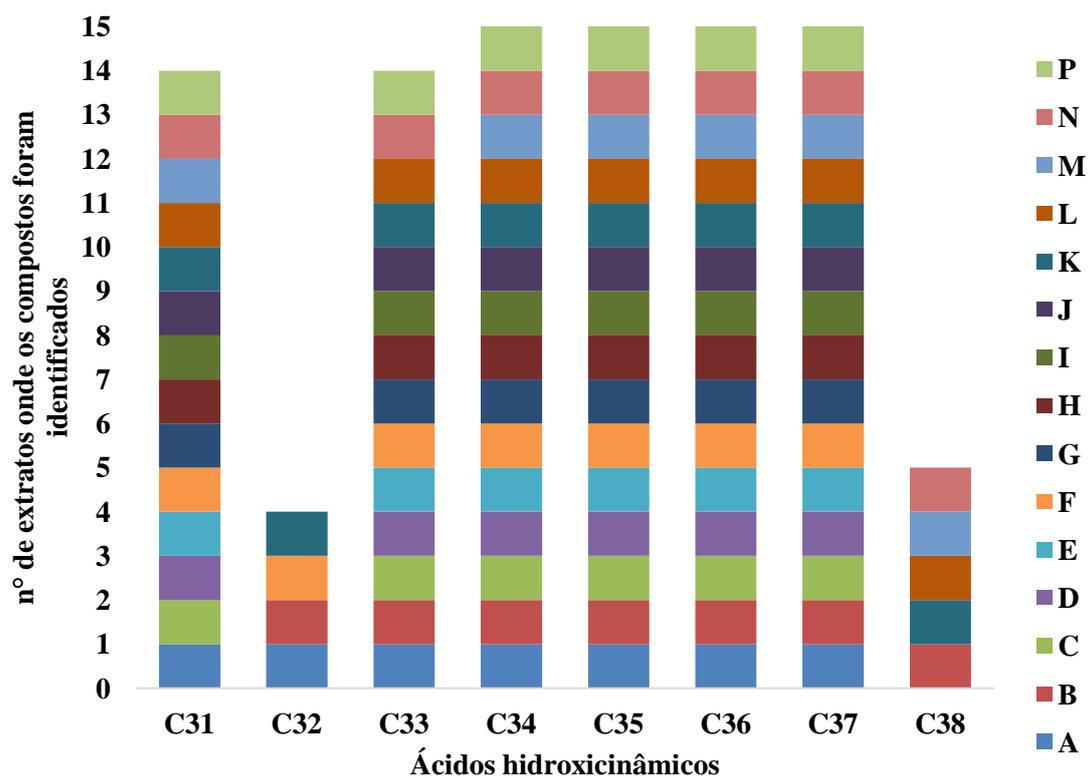


Figura 10. Ácidos hidroxicinâmicos e derivados identificados em extrato de resíduo de frutas e hortaliças obtidos à 20°C e 40°C (n=3).

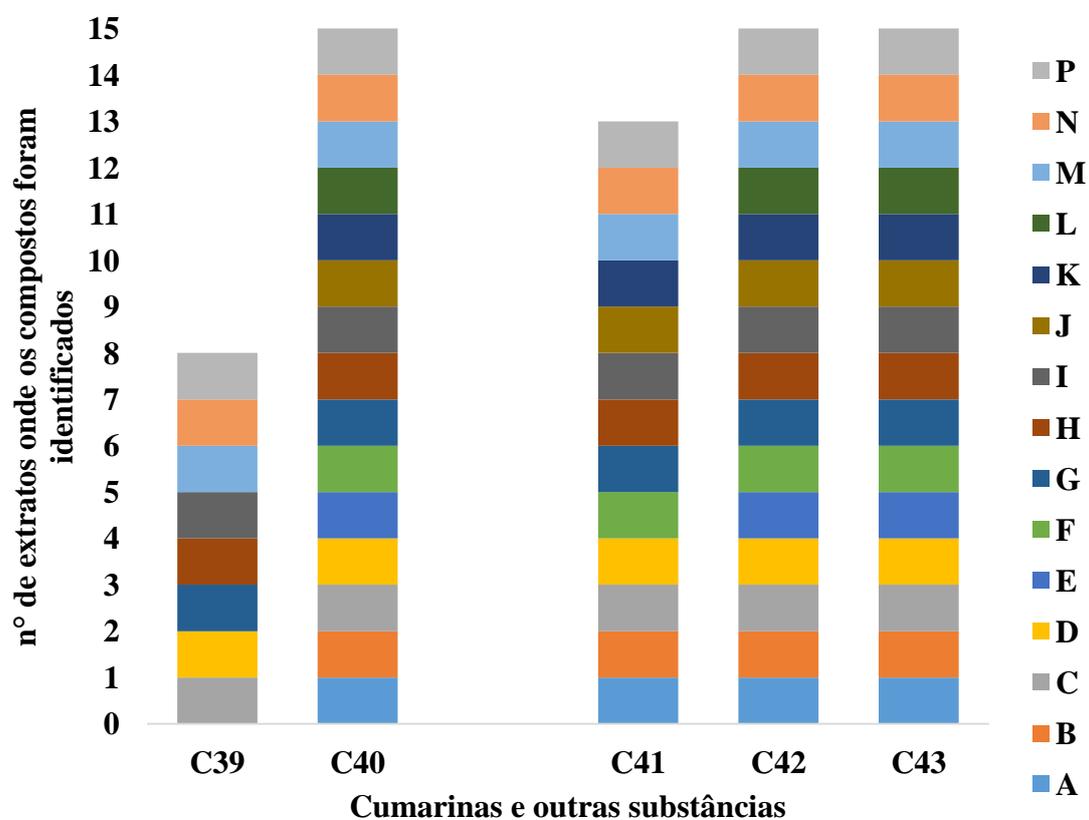
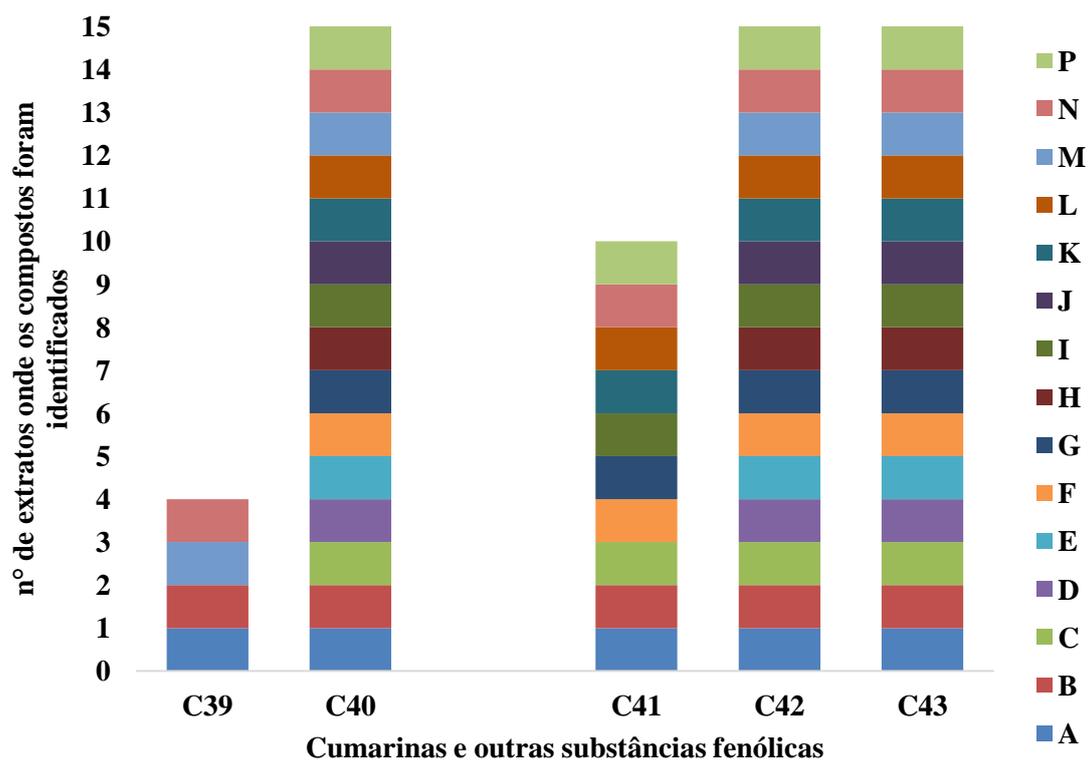


Figura 11. Cumarinas e outras substâncias fenólicas identificadas em extratos de resíduo de frutas e hortaliças à 20°C e 40°C (n=3).

Nos extratos a 40°C observou-se principalmente um aumento na abundância relativa de fenólicos extraídos, de modo que a melhor condição, dentre as avaliadas, foi em solvente com etanol:água (50:50 v/v), e tempo de extração de 24h (M2), onde se obteve o maior número de compostos e a maior quantidade de flavonoides, diferindo da condição N2 por 1 composto, o ácido isofelúrico, entretanto, a condição N2 com etanol:água (75:25 v/v) e tempo de extração de 24h apresentou uma maior abundância relativa de hesperidina e de ácidos fenólicos.

A hesperidina foi o principal flavonoide encontrado nos extratos e suas funções biológicas como antioxidante, anti-inflamatório, imunomodulador, anticarcinogênico e antimicrobiano já foram descritas, (BHARATHI; JAGADEESAN, 2014; LI et al., 2014a; HAGHMORAD et al., 2016) assim como de sua aglicona (hesperitina) que também apresenta efeitos na prevenção de perda óssea (FURTADO; NUNES; RIBEIRO, 2012), e potencial ação antiproliferativa em células de câncer de mama e que também foi encontrada em todos os extratos porém, em menor quantidade.

A Hesperidina também foi o principal flavonoide encontrado na polpa de diferentes espécies de laranjas, seguida pela narirutina em estudo conduzido por Goulas e Manganaris (2012), o que demonstra que a laranja (*Citrus sinensis*) contribuiu de forma significativa para o perfil fenólico do subproduto de frutas e hortaliças. Além disso, em cascas de frutas cítricas (grapefruit) de diferentes cultivares, esses autores também identificaram que o teor de naringerina nas cascas foi 1,96 a 2,91 vezes maior que nas partes comestíveis.

Sabe-se que a solubilidade da hesperidina aumenta em solventes hidroalcoólicos com maior percentual alcoólico, e com adição de temperatura, o que favorece a sua extração (GARG et al., 2001), fato que foi observado nas amostras analisadas, onde há uma aumento significativo nos teores de hesperidina em concentração de até 75% etanol.

Chen e colaboradores (2012) identificaram aumento de 3,2% no rendimento de flavonoides obtidos após extração de subproduto de laranja (cascas), em meio alcoólico quando comparados à outros meios menos polares.

Assim como observado para os flavonoides, nas condições à 40°C os extratos com maior percentual de etanol, tempo 24h foram os que permitiram maior extração de ácidos fenólicos. Neste caso, entretanto, o tempo pareceu mais relevante para o processo de extração, uma vez que não foi observada diferença estatística significativa entre a

abundância relativa encontrada nos extratos à 20 e 40°C, para os ácidos fenólicos mais abundantes (*Figura 12 e 13*).

Nos extratos à 20°C, observou-se que as condições C1 (etanol:água 50:50; v/v) e N1 (75:25, v/v), por 1h e 24h, respectivamente, foram as que apresentaram a maior abundância relativa de flavonoides. Enquanto as condições de extração por 24h M2 (50:50 v/v), N2 (75:25; v/v) e P2 (100:0; v/v) também apresentaram a maior abundância relativa de ácidos fenólicos.

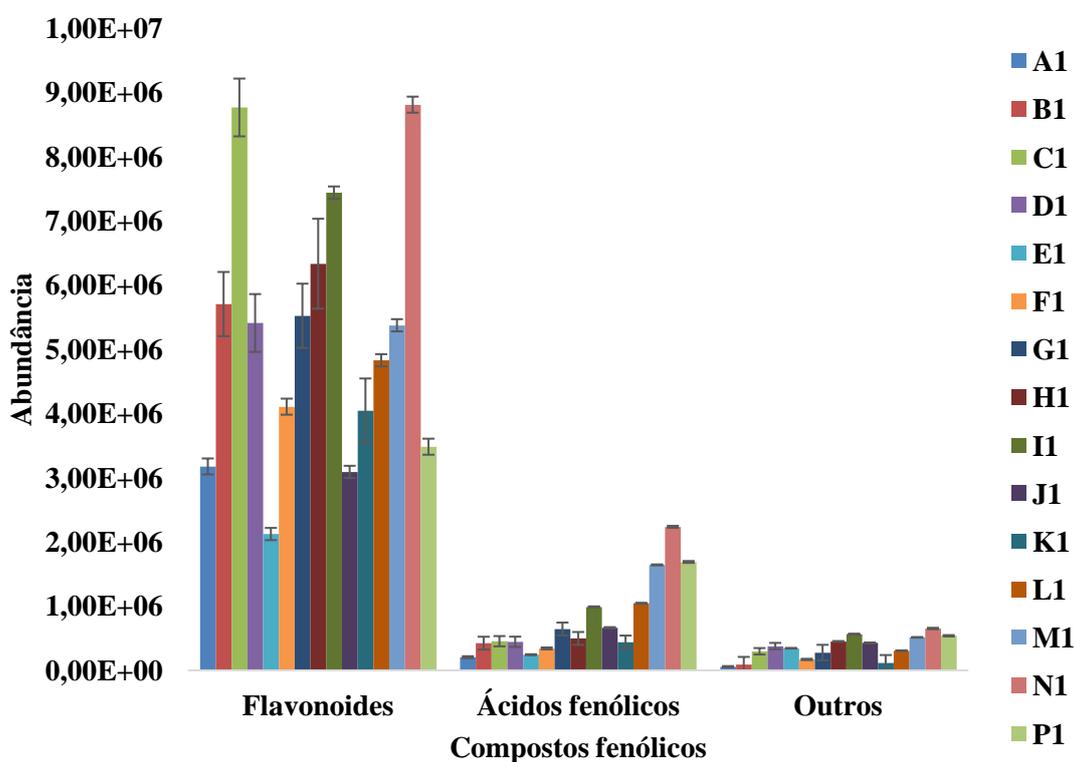


Figura 12. Abundância relativa de compostos fenólicos identificados em extratos hidroetanólicos à 20°C de subproduto de frutas e hortaliças.

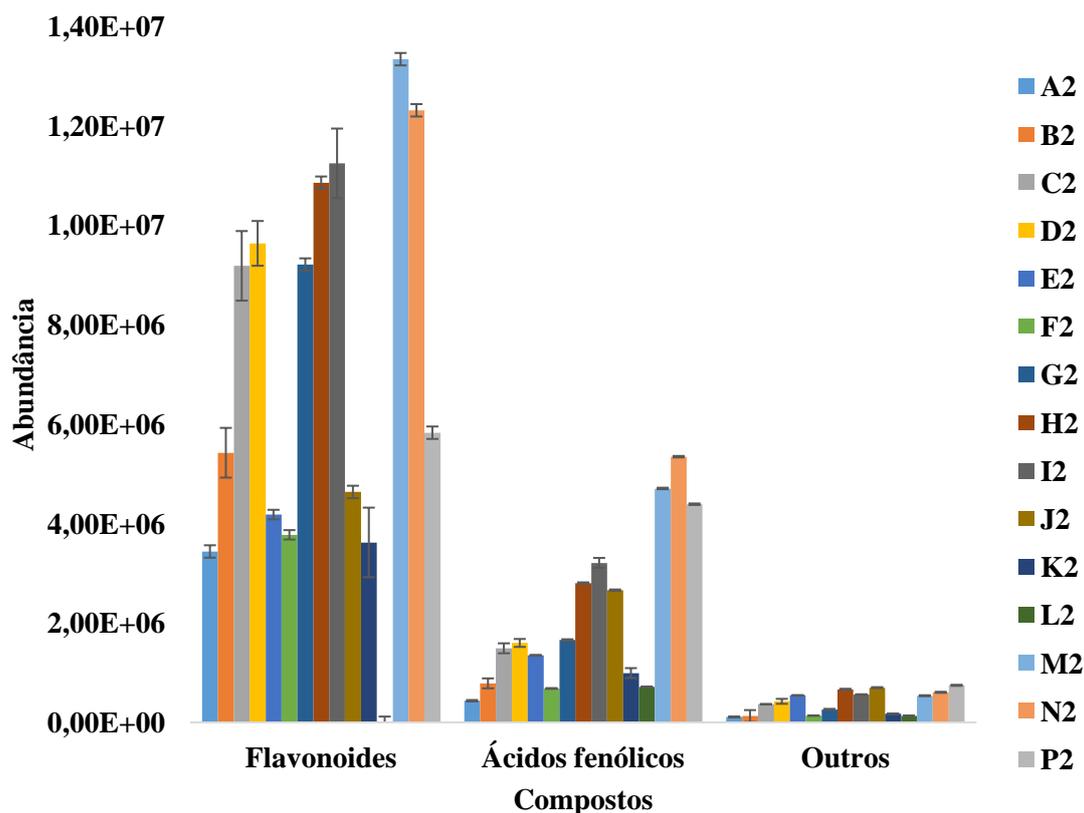


Figura 13. Abundância relativa de compostos fenólicos identificados em extratos hidroetanólicos à 40°C de subproduto de frutas e hortaliças.

Neste estudo foi possível observar também que quando correlacionadas a abundância relativa com o tempo de extração, as condições de extração por 1h com 0, 25 e 50% de etanol, diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação aos extratos obtidos após 6h e 24h, mas não apresentaram diferença dos extratos obtidos após 6h nas maiores concentrações de etanol (*Figura 14*).

Já em relação a temperatura, em todas as variações nas proporções de solventes utilizados, exceto na proporção com 50% de etanol, houve diferença significativa na abundância relativa dos compostos.

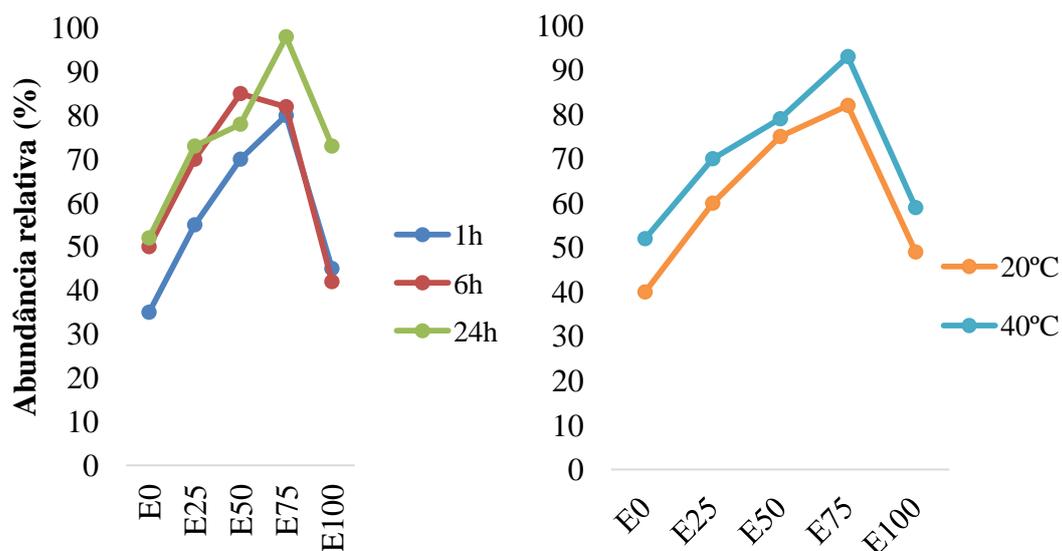


Figura 14. Gráficos de interações solvente x tempo x temperatura.

Sabe-se que mais de 60 tipos de flavonoides já foram identificados em frutas cítricas, dentre os quais as flavanonas, flavonas e flavonols se destacam tanto pela variedade quanto pela quantidade, conforme revisão de Calabró e colaboradores (2004). Destes, 22 foram encontrados nos extratos avaliados neste estudo.

Dentre os compostos mais abundantes encontrados no subproduto de frutas e hortaliças, além da hesperidina, destacam-se a narirutina, a naringenina e o ácido 4-hidroxibenzóico (*Figura 15*). Notavelmente, compostos presentes abundantemente tanto em produtos quanto em cascas de frutas cítricas (BILBAO et al., 2007; HAMDAN et al., 2011; LI et al., 2012).

Dos compostos majoritários identificados, apenas a hesperidina apresenta baixa solubilidade em meio aquoso. Os demais flavonoides e o ácido benzoico apresentam característica polar pela presença de hidroxilas que são capazes de interagir diretamente com a fração aquosa dos extratores, bem como com outros flavonoides o que facilitaria sua extração em meio aquoso.

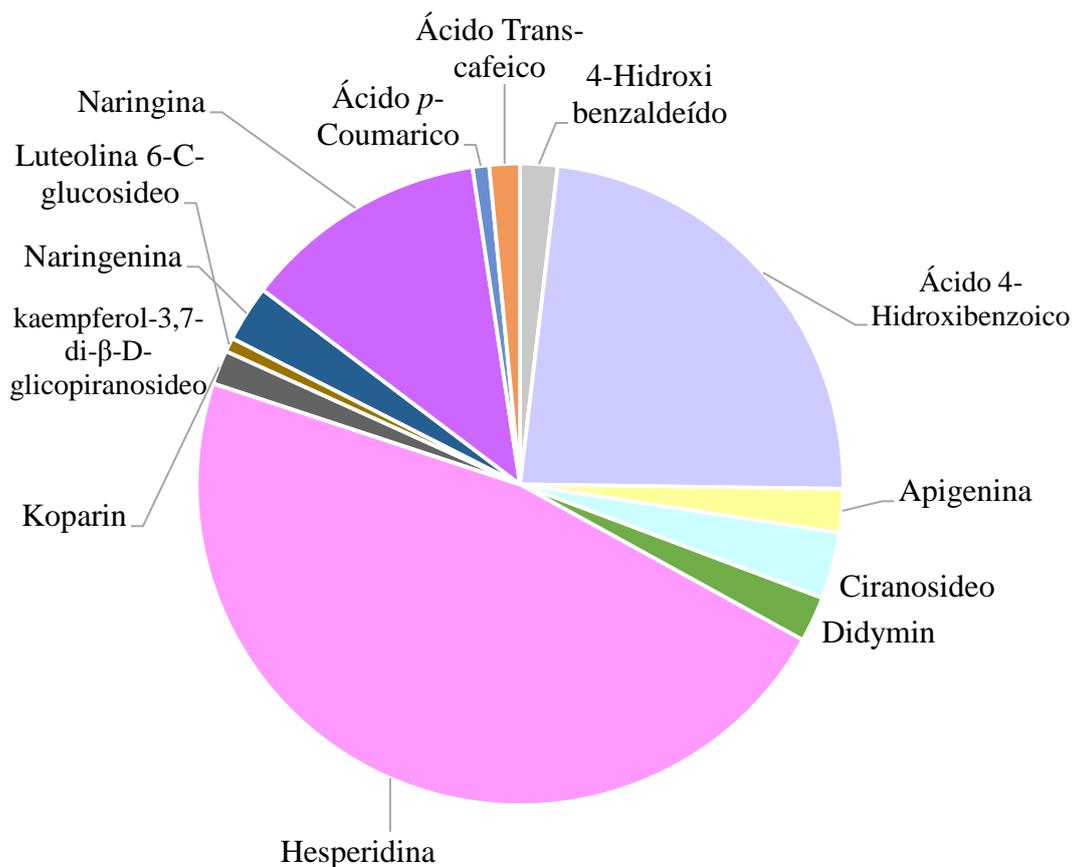


Figura 15. Compostos fenólicos mais abundantes em subproduto de frutas e hortaliças, condição N2.

Dentre os ácidos fenólicos os ácidos ferúlico e *p*-cumárico estão amplamente distribuídos entre os diferentes tipos de vegetais. Isso porque estes ácidos, compõe a maioria das paredes celulares, podendo estar ligado à polissacarídeos o que contribui para a estabilidade térmica e a textura dos vegetais, uma vez que desempenham um papel importante tanto na adesão célula-célula, como servem de base para a formação de lignina, importante componente da parede celular (NACZK; SHAHIDI, 2006).

O ácido *p*-cumarico tem sido descrito como um importante ácido fenólico dietético altamente biodisponível, cujas ações benéficas ao organismo são potencialmente facilitadas devido, principalmente, à sua fácil absorção em todas as seções do trato gastrointestinal, demonstrada em ensaios *in vivo* com ratos (ZHAO; MOGHADASIAN, 2010).

Os ácidos ferulico e *Trans*-cafeico apresentam menor biodisponibilidade quando comparados ao ácido *p*-cumárico, mas ainda é considerado um importante ácido fenólico que contribui tanto para a capacidade antioxidante de frutas e vegetais, como para um potencial efeito benéfico no organismos humano (PEI et al., 2016).

Outros compostos fenólicos encontrados foram 4-hidroxibenzaldeído e as cumarinas Escopoletina e Esculetina.

Diferentemente do observado em todas as outras condições, o extrato aquoso (A1) extraiu uma grande quantidade do composto, tentativamente identificado 6-geranilnaringenina, uma forma derivada de flavonoide encontrada em alguns vegetais, com potencial ação antioxidante, citotóxica e antimicrobiana, mas ainda pouco estudada. Atualmente estas formas têm sido estudadas, por possuírem potencial efeito terapêutico no tratamento de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (CHO et al., 2012, 2013).

A escopoletina, uma hidroxycumarina encontrada em frutos cítricos, assim como outros compostos fenólicos já foi apontada como um potente inibidor de citocinas pró-inflamatórias, além de possuir efeitos antifúngico e ação na tireoide (ABAD-GARCÍA et al., 2012; BERTIN et al., 2014).

Da mesma forma que a cumarina anteriormente citada, a esculetina, outra hidroxycumarina, também apresenta ação antitumoral e anti-inflamatória (WANG et al., 2002) e, encontra-se em pequenas concentrações nos vegetais, podendo ser formada espontaneamente a partir da isomerização do ácido *Trans*-cafeico, por ação fotoquímica (NEICHI; KOSHIHARA; MUROTA, 1983).

Nesse sentido, a composição tanto do suplemento quanto do subproduto deste processamento garante a presença de inúmeros compostos bioativos em concentrações e diversidade que não são normalmente encontradas na natureza (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008), o que pode ter um efeito potencializador das propriedades funcionais *in vivo* destes compostos.

É importante ressaltar que apesar dos resultados de identificação, quantificação e atividade antioxidante, os testes *in vitro* não refletem o real potencial biológico de amostras vegetais (KAMILOGLU et al., 2014), especialmente de uma amostra complexa como a que foi analisada neste trabalho, uma vez que os compostos aqui identificados e quantificados nunca foram testados conjuntamente em modelo vivo.

Ao avaliarmos o potencial antioxidante dos extratos, foi possível observar que o aumento da temperatura promoveu uma maior resposta antioxidante dos extratos frente ao radical DPPH, o que era esperado uma vez que o aumento da temperatura favorece a remoção dos compostos fenólicos da matriz, e estes são reconhecidamente importantes compostos antioxidantes (BREWER, 2011). Além disso, a atividade antioxidante de resíduos de frutas e hortaliças já foram largamente reportados na literatura corroborando os dados encontrados neste estudo (OKONOJI et al., 2007).

As variáveis tempo e proporção de etanol também contribuíram significativamente para um aumento do potencial antioxidante dos extratos, sendo os extratos com etanol:água (75:25 e 100:0; v/v), obtidos após 24h os que apresentaram maior capacidade antioxidante em todas as condições, sendo os maiores valores observados para os extratos N2 com $28,23 \pm 0,009$ ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$) e P2 com $28,45 \pm 0,005$ ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$). Já os menores valores foram observados à 20°C com 1 hora de agitação, no extrato A1 (etanol:água, 0:100; v/v) com atividades de $15,33 \pm 0,005$ ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$).

Tabela 8. Atividade antioxidante dos extratos de subproduto de frutas e hortaliças (n=3).

Temperatura: 20 °C		
1h	6h	24h
DPPH ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$)	DPPH ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$)	DPPH ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$)
A1 $15,33 \pm 0,005^{\text{dB}}$	F1 $17,23 \pm 0,007^{\text{cA}}$	K1 $17,78 \pm 0,003^{\text{cA}}$
B1 $15,72 \pm 0,003^{\text{cC}}$	G1 $17,39 \pm 0,007^{\text{cB}}$	L1 $17,9 \pm 0,002^{\text{cA}}$
C1 $14,88 \pm 0,001^{\text{cB}}$	H1 $18,02 \pm 0,004^{\text{bcA}}$	M1 $18,36 \pm 0,003^{\text{bA}}$
D1 $18,01 \pm 0,012^{\text{aC}}$	I1 $18,50 \pm 0,008^{\text{bB}}$	N1 $19,22 \pm 0,005^{\text{bA}}$
E1 $16,57 \pm 0,009^{\text{bB}}$	J1 $18,89 \pm 0,002^{\text{aAB}}$	P1 $19,74 \pm 0,005^{\text{aA}}$
Temperatura: 40 °C		
1h	6h	24h
DPPH ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$)	DPPH ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$)	DPPH ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$)
A2 $20,27 \pm 0,005^{\text{cC}}$	F2 $23,93 \pm 0,006^{\text{cA}}$	K2 $22,75 \pm 0,004^{\text{dB}}$
B2 $21,90 \pm 0,006^{\text{bC}}$	G2 $24,72 \pm 0,007^{\text{bB}}$	L2 $26,09 \pm 0,004^{\text{cA}}$
C2 $21,71 \pm 0,001^{\text{bC}}$	H2 $24,66 \pm 0,001^{\text{bcB}}$	M2 $27,85 \pm 0,002^{\text{bA}}$
D2 $23,74 \pm 0,009^{\text{aC}}$	I2 $24,72 \pm 0,001^{\text{bB}}$	N2 $28,23 \pm 0,009^{\text{abA}}$
E2 $24,04 \pm 0,002^{\text{aC}}$	J2 $26,14 \pm 0,004^{\text{aB}}$	P2 $28,45 \pm 0,005^{\text{aA}}$

Media \pm DP (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna e letras maiúsculas na mesma

linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$) dentro de uma mesma temperatura.

5. CONCLUSÃO

O suplemento de frutas e hortaliças, assim como seu subproduto apresentam uma ampla variedade de fitoquímicos (compostos fenólicos e carotenoides), em quantidades relevantes indicam o potencial dos dois produtos tanto para o consumo no caso do suplemento, quanto para a obtenção de compostos bioativos visando o aproveitamento integral dos alimentos, no caso do subproduto. Ressaltando que ambos, devido ao seu perfil de bioativos apresentam um grande potencial como alimento e ingrediente funcional.

A expressiva quantidade de flavonoides, em especial da hesperidina, indica que estes compostos são estáveis ao tratamento térmico ao qual o subproduto é submetido. Além disso, fornece um substancial aporte de compostos antioxidantes que auxiliam na preservação dos carotenoides, compostos reconhecidamente importantes para a saúde humana.

Apesar dos inúmeros relatos de atividades biológicas *in vitro* de diferentes compostos fenólicos, sua atividade *in vivo* nem sempre é alcançada, o que reforça a necessidade de extrapolar os estudos *in vitro* a fim de efetivamente serem estabelecidas as vias e as respostas metabólicas que estes compostos podem ter no organismo humano.

Além disso, é importante determinar as atividades funcionais utilizando matrizes complexas, tanto de macro e micronutrientes como de não nutrientes (ex. fitoquímicos), uma vez que sua ação sinérgica pode tanto potencializar quanto inibir efeitos assumidamente benéficos destes compostos.

Diferentemente do que se sabe sobre os carotenoides, os compostos fenólicos, devido à sua vasta diversidade e ampla distribuição ainda representam um importante campo de estudos, uma vez que pouco se sabe sobre seu metabolismo, absorção e vias de ação.

Assim, foi possível concluir que tanto o suplemento quanto o subproduto obtido deste ou daquele processamento apresentam um perfil de bioativos que desperta o interesse para o conhecimento de suas atividades e potenciais biológicos *in vivo*, que exigirão estudos futuros.

6. REFERÊNCIAS

ABAD-GARCÍA, B.; GARMÓN-LOBATO, S.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, v. 99, p. 213–224, 2012.

ABU-REIDAH, I. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; QUIRANTES-PINÉ, R.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. HPLC-ESI-Q-TOF-MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 108–117, 2012.

ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, 2014.

ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6182–6187, 2002.

AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67–76, 2012.

AGATI, G.; BRUNETTI, C.; DI FERDINANDO, M.; FERRINI, F.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 35–45, 2013.

AGUDO, A.; JOINT, F. Measuring intake of fruit and vegetables. **World Health Organization**, 2005.

AIZAWA, K.; INAKUMA, T. Quantitation of Carotenoids in Commonly consumed Vegetables in Japan. **Food Science and Technology Research**, v. 13, n. 3, p. 247–252, 2007.

Disponível

em:

<<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/fstr/13.247?from=CrossRef>>.

ALBUQUERQUE, T. G.; SANTOS, F.; SANCHES-SILVA, A.; BEATRIZ OLIVEIRA, M.; BENTO, A. C.; COSTA, H. S. Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. **Food Chemistry**, v. 193, p. 187–195, 2014.

ALQUEZAR, B.; RODRIGO, M. J.; ZACARIAS, L. Regulation of carotenoid

biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1997–2007, 2008.

ALTUNKAYA, A.; BECKER, E. M.; GÖKMEN, V.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 163–168, 2009.

AMORIM-CARRILHO, K. T.; CEPEDA, a.; FENTE, C.; REGAL, P. Review of methods for analysis of carotenoids. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49–73, 2014.

AYALA-ZAVALA, J. F.; VEGA-VEGA, V.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; PALAFOX-CARLOS, H.; VILLA-RODRIGUEZ, J. a.; SIDDIQUI, M. W.; DÁVILA-AVIÑA, J. E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. a. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1866–1874, ago. 2011.

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

BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; CARISTI, C.; LEUZZI, U.; GATTUSO, G. Distribution of C- and O-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl)glycosyl flavanones and furocoumarins in *Citrus aurantium* L. juice. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 576–582, 2011.

BAYDAR, N. G.; OZKAN, G.; SAGDIC, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Chemistry**, v. 15, p. 335–339, 2004.

BELAJOVÁ, E.; SUHAJ, M. Determination of phenolic constituents in citrus juices: Method of high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 339–343, 2004.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BERTIN, R. L.; GONZAGA, L. V.; BORGES, G. da S. C.; AZEVEDO, M. S.; MALTEZ, H. F.; HELLER, M.; MICKE, G. A.; TAVARES, L. B. B.; FETT, R. Nutrient composition and, identification/quantification of major phenolic compounds in *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) using HPLC-ESI-MS/MS. **Food Research**

International, v. 55, p. 404–411, 2014.

BHARATHI, E.; JAGADEESAN, G. Antioxidant potential of hesperidin and ellagic acid on renal toxicity induced by mercuric chloride in rats. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 131–136, 2014.

BILBAO, M. de L. M.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; JÁUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1742–1747, 2007.

BIMAKR, M.; RAHMAN, R. A.; TAIP, F. S.; GANJLOO, A.; SALLEH, L. M.; SELAMAT, J.; HAMID, A.; ZAIDUL, I. S. M. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 1, p. 67–72, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2010.03.002>>.

BLEVE, M.; CIURLIA, L.; ERROI, E.; LIONETTO, G.; LONGOC, L.; RESCIOA, L.; AL., E. An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. **Separation and Purification Technology**, v. 64, p. 192–197, 2008.

BODET, C.; LA, V. D.; EPIFANO, F.; GRENIER, D. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. **Journal of Periodontal Research**, v. 43, n. 4, p. 400–407, 2008.

BORRADAILE, N. M.; CARROLL, K. K.; KUROWSKA, E. M. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. **Lipids**, v. 34, n. 6, p. 591–598, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, jan. 1995.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011.

BRITTON, G. SERIAL Structure function. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1551–1558, 1995.

BRONNER, W. E.; BEECHER, G. R. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. **Journal of Chromatography A**, v. 705, n. 2, p. 247–256, 1995.

CAETANO, A. C. D. S.; ARAÚJO, C. R. De; LIMA, V. L. A. G. De; MACIEL, M. I. S.; MELO, E. D. A. Evaluation of antioxidant activity of agro-industrial waste of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) fruit extracts. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 769–775, 2011.

CALABRÒ, M. L.; GALTIERI, V.; CUTRONEO, P.; TOMMASINI, S.; FICARRA, P.; FICARRA, R. Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in Citrus bergamia juice. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 2, p. 349–363, 2004.

CARDOSO, L. de M.; MARTINO, H. S. D.; MOREIRA, A. V. B.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2151–2154, ago. 2011.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; DE LOURDES PACHECO-HERNÁNDEZ, M.; ELENA, M.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, J. A.; RODRÍGUEZ GALÁN-VIDAL, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859–871, 2009.

CATCHPOLE, O.; MITCHELL, K.; BLOOR, S.; DAVIS, P.; SUDDER, A. Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. **Fitoterapia**, v. 106, p. 167–174, 2015.

CHA, J. W.; PIAO, M. J.; KIM, K. C.; ZHENG, J.; YAO, C. W.; HYUN, C. L.; KANG, H. K.; YOO, E. S.; KOH, Y. S.; LEE, N. H.; KO, M. H.; HYUN, J. W. Protective effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid isolated from *Cladophora wrightiana* Harvey against ultraviolet b radiation-induced cell damage in human HaCaT keratinocytes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2582–2592, 2014.

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6706–6714, 2010.

CHEN, W.; LIU, Y.; LI, M.; MAO, J.; ZHANG, L.; HUANG, R.; JIN, X.; YE, L. Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2 / M cell cycle arrest. **Journal of Pharmacological Science**, v. 127, n. 3, p. 332–338, 2015.

CHEN, Z. T.; CHU, H. L.; CHYAU, C. C.; CHU, C. C.; DUH, P. Der. Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2119–2127, 2012.

CHEYNIER, V. Polyphenols in food are more complex than often thought. v. 81, p. 223–229, 2005.

CHO, J. K.; CURTIS-LONG, M. J.; LEE, K. H.; KIM, D. W.; RYU, H. W.; YUK, H. J.; PARK, K. H. Geranylated flavonoids displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the fruits of *Paulownia tomentosa*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 3051–3057, 2013.

CHO, J. K.; RYU, Y. B.; CURTIS-LONG, M. J.; RYU, H. W.; YUK, H. J.; KIM, D. W.; KIM, H. J.; LEE, W. S.; PARK, K. H. Cholinestrace inhibitory effects of geranylated flavonoids from *Paulownia tomentosa* fruits. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 2595–2602, 2012.

CHU, C. Y.; TSAI, Y. Y.; WANG, C. J.; LIN, W. L.; TSENG, T. H. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. **European journal of pharmacology**, v. 416, n. 1–2, p. 25–32, 2001.

CORRALES, M.; FERNÁNDEZ GARCÍA, A.; BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 415–421., 2009.

DA SILVA, L. M. R.; DE FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; DE FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398–404, 2014.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D. PLE in the analysis of plant compounds: Part I. The application of PLE for HPLC analysis of caffeine in green tea leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 5, p. 1155–1159, 2005.

DE ABREU, F. P.; DORNIER, M.; DIONISIO, A. P.; CARAIL, M.; CARISVEYRAT, C.; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 25–31, 2013.

DE OLIVEIRA, D. M.; SIQUEIRA, E. P.; NUNES, Y. R. F.; COTA, B. B. Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 4, p. 614–620, 2013.

DEL RIO, D.; COSTA, L. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Polyphenols and health: What compounds are involved? **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–6, 2010.

DILSHARA, M. G.; LEE, K. T.; JAYASOORIYA, R. G. P. T.; KANG, C. H.; PARK, S. R.; CHOI, Y. H.; CHOI, I. W.; HYUN, J. W.; CHANG, W. Y.; KIM, Y. S.; LEE, H. J.; KIM, G. Y. Downregulation of NO and PGE2 in LPS-stimulated BV2 microglial cells by trans-isoferulic acid via suppression of PI3K/Akt-dependent NF- κ B and activation of Nrf2-mediated HO-1. **International Immunopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 203–211, 2014.

DORTA, E.; LOBO, M. G.; GONZALEZ, M. Reutilization of mango byproducts: Study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. 80–88, 2012.

DUGO, P.; HERRERO, M.; GIUFFRIDA, D.; RAGONESE, C.; DUGO, C.; MONDELLO, L. Analysis of native carotenoid composition in orange juice using C30 columns in tandem. **J Sep Sci.**, v. 31, p. 2151–60, 2008.

EL-SHAFAE, A. M.; EL-DOMIATY, M. M. Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 4, p. 539–545, 2001.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 427, n. 1, p. 119–127, 2001.

ESCARPA, A.; MORALES, M. D.; GONZALEZ, M. C. Analytical performance of commercially available and unavailable phenolic compounds using real samples by high-performance liquid chromatography-diode array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 460, p. 61–72, 2002.

EVANS, M.; BECK, M.; ELLIOTT, J.; ETHEVE, S.; ROBERTS, R.; SCHALCH, W. Effects of formulation on the bioavailability of lutein and zeaxanthin: A randomized, double-blind, cross-over, comparative, single-dose study in healthy subjects. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 1381–1391, 2013.

FALLICO, B.; BALLISTRERI, G.; ARENA, E.; BRIGHINA, S.; RAPISARDA, P. Bioactive compounds in blood oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): Level and intake. **Food Chemistry**, v. 215, p. 67–75, 2017.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.

FAO, F. and A. O. of the U. N. **Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention.** [s.l: s.n.].

FAO, F. and A. O. of the U. N. **The State of Food Insecurity in the World.** [s.l: s.n.].

FAO, F. and A. O. of the U. N. OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2015-2024. 2015.

FEDYK, E. R.; PHIPPS, R. P. Reactive oxygen species and not lipoxygenase products are required for mouse B-lymphocyte activation and differentiation. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 16, n. 7, p. 533–546, 1994.

FERNÁNDEZ-PONCE, M. T.; PARJIKOLAEI, B. R.; LARI, H. N.; CASAS, L.; MANTELL, C.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. J. Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from mango leaves using different green techniques: Kinetic and scale up study. **Chemical Engineering Journal**, v. 299, p. 420–430, 2016.

FERREIRA, M. S. L.; SANTOS, M. C. P.; MORO, T. M. a.; BASTO, G. J.; ANDRADE, R. M. S.; GONÇALVES, É. C. B. a. Formulation and characterization of functional foods based on fruit and vegetable residue flour. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 822–830, 20 jun. 2015.

FERREIRA, O. .; PINHO, S. P. Solubility of flavonoids in pure solvents. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 6586–6590, 2012.

FERREIRA, R. L.; GONÇALVES, É. C. B. de A.; FERREIRA, M. S. L. **Avaliação dos processos de secagem e extração de compostos antioxidantes em farinha de residuo de frutas e hortaliças.** 2015. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

FORESTER, S. C.; CHOY, Y. Y.; WATERHOUSE, A. L.; OTEIZA, P. I. The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals. **Molecular Carcinogenesis**, v. 53, n. 6, p. 432–439, 2014.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 13, p. 1925–1941, out. 2000.

FRANQUIN-TRINQUIER, S.; MAURY, C.; BARON, A.; LE MEURLAY, D.; MEHINAGIC, E. Optimization of the extraction of apple monomeric phenolics based on response surface methodology: Comparison of pressurized liquid-solid extraction and manual-liquid extraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, n. 1, p. 56–67, 2014.

FUNAGUCHI, N.; OHNO, Y.; LA, B. L. B.; ASAI, T.; YUHGETSU, H.; SAWADA,

M.; TAKEMURA, G.; MINATOGUCHI, S.; FUJIWARA, T.; FUJIWARA, H. Narirutin inhibits airway inflammation in an allergic mouse model. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 766–770, 2007.

FURTADO, A. F. M.; NUNES, M. A. P.; RIBEIRO, M. H. L. Hesperidinase encapsulation towards hesperitin production targeting improved bioavailability. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, n. 11, p. 595–603, 2012.

FÜZFAI, Z.; MOLNÁR-PERL, I. Gas chromatographic-mass spectrometric fragmentation study of flavonoids as their trimethylsilyl derivatives: Analysis of flavonoids, sugars, carboxylic and amino acids in model systems and in citrus fruits. **Journal of Chromatography A**, v. 1149, n. 1, p. 88–101, 2007.

GALANAKIS, C. M. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 68–87, 2012.

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

GANCEL, A. L.; ALTER, P.; DHUIQUE-MAYER, C.; RUALES NAJERA, J.; VAILLANT, F. Identifying carotenoids and phenolic compounds in Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam. var. Puyo hybrid), a biodiverse andean fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11890–11899, 2008.

GARCÍA-SALAS, P.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Identification and quantification of phenolic and other polar compounds in the edible part of *Annona cherimola* and its by-products by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. **Food Research International**, v. 78, n. 2015, p. 246–257, 2015.

GARDNER, P. T.; WHITE, T. A. C.; MCPHAIL, D. B.; DUTHIE, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 471–474, 2000.

GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L. J. D.; SINGLA, A. K. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 8, p. 655–669, 2001.

GODOY-CABALLERO, M. P.; ACEDO-VALENZUELA, M. I.; GALEANO-DÍAZ, T. Simple quantification of phenolic compounds present in the minor fraction of virgin

olive oil by LC-DAD-FLD. **Talanta**, v. 101, p. 479–487, 2012.

GOMES, S.; TORRES, A. G. Optimized extraction of polyphenolic antioxidant compounds from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) cake and evaluation of the polyphenol profile by HPLC. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 8, p. 2805–2814, 2016.

GONZÁLEZ-CASTEJÓN, M.; RODRIGUEZ-CASADO, A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 5, p. 438–455, 2011.

GOODNER, K. L.; JELLA, P.; ROUSEFF, R. L. Determination of Vanillin in Orange, Grapefruit, Tangerine, Lemon, and Lime Juices Using GC–Olfactometry and GC–MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2882–2886, 2000.

GOULAS, V.; MANGANARIS, G. A. Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 39–47, 2012.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n. 2–3, p. 213–220, 2006.

GUPTA, P.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. **Plant methods**, v. 11, p. 5, 2015.

HADAD, N.; LEVY, R. The synergistic anti-inflammatory effects of lycopene, lutein, beta-carotene, and carnosic acid combinations via redox-based inhibition of NF-kB signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 7, p. 1381–1391, 2012.

HAGHMORAD, D.; MAHMOUDI, M. B.; SALEHIPOUR, Z.; JALAYER, Z.; ABBAS MOMTAZI BOROJENI, A.; RASTIN, M.; KOKHAEI, P.; MAHMOUDI, M. Hesperidin ameliorates immunological outcome and reduces neuroinflammation in the mouse model of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, 2016.

HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 268–276, 2005.

HAMDAN, D.; EL-READI, M. Z.; TAHRANI, A.; HERRMANN, F.; KAUFMANN, D.; FARRAG, N.; EL-SHAZLY, A.; WINK, M. Chemical composition and biological activity of Citrus jambhiri Lush. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 394–403, 2011.

HARBOURNE, N.; MARETE, E.; JACQUIER, J. C.; O'RIORDAN, D. Stability of phytochemicals as sources of anti-inflammatory nutraceuticals in beverages - A review. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 480–486, 2013.

HE, D.; SHAN, Y.; WU, Y.; LIU, G.; CHEN, B.; YAO, S. Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 880–885, 2011.

HEO, M. Y.; SOHN, S. J.; AU, W. W. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 488, n. 2, p. 135–150, 2001.

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

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2495–2511, 2010.

HERRERO, M.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. del P.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 26–38, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.018>>.

HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; DE PASCUAL-TERESA, S. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 691–696, 2010.

HOUGEE, S.; SANDERS, A.; FABER, J.; GRAUS, Y. M. F.; VAN DEN BERG, W. B.; GARSSSEN, J.; SMIT, H. F.; HOIJER, M. A. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 241–248, 2005.

HUANG, X. X.; BAI, M.; ZHOU, L.; LOU, L. L.; LIU, Q. B.; ZHANG, Y.; LI, L. Z.; SONG, S. J. Food Byproducts as a New and Cheap Source of Bioactive Compounds: Lignans with Antioxidant and Anti-inflammatory Properties from *Crataegus pinnatifida* Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 32, p. 7252–7260, 2015.

HUNG, J. Y.; HSU, Y. L.; KO, Y. C.; TSAI, Y. M.; YANG, C. J.; HUANG, M. S.; KUO, P. L. Didymin, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. **Lung Cancer**, v. 68, n. 3, p. 366–374, 2010.

HUTZLER¹, P.; FISCHBACH², R.; HELLER³, W.; JUNGBLUT³, T. P.; REUBER⁴, S.; SCHMITZ⁴, R.; VEIT⁵, M.; WEISSENBÖ, G.; SCHNITZLER², J. R.-P. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 323, p. 953–965, 1998.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 8, p. 589–598, 2008.

IBGE. **Pesquisas de orçamentos familiares 2008-2009**. [s.l: s.n.]v. 1

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821–1835, jun. 2011.

INOUE, M.; SUZUKI, R.; SAKAGUCHI, N.; LI, Z.; TAKEDA, T.; OGIHARA, Y.; JIANG, B. Y.; CHEN, Y. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 18, n. 11, p. 1526–1530, 1995.

INUI, S.; SHIMAMURA, Y.; MASUDA, S.; SHIRAFUJI, K.; MOLI, R. T.; KUMAZAWA, S. A new prenylflavonoid isolated from propolis collected in the Solomon Islands. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 76, n. 5, p. 1038–1040, 2012.

IWASAKI, Y.; HIRASAWA, T.; MARUYAMA, Y.; ISHII, Y.; ITO, R.; SAITO, K.; UMEMURA, T.; NISHIKAWA, A.; NAKAZAWA, H. Effect of interaction between phenolic compounds and copper ion on antioxidant and pro-oxidant activities. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1320–1327, 2011.

IWASHINA, T.; KAMENOSONO, K.; UENO, T. Hispidulin and nepetin 4'-glucosides from *Cirsium oligophyllum*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1109–1111, 1999.

JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, v. 175, p. 556–567, 2015.

JASWIR, I.; NOVIENDRI, D.; RENO, F. H.; OCTAVIANTI, F. Carotenoids: sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. **J. Med. Plants Res.**, v. 5, p. 7119–7131, 2011.

JEONG, J. H.; AN, J.; KWON, Y.; RHEE, J. G.; LEE, Y. J. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. **Journal of cellular biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 73–82, 2009.

JIN, R.; FAN, L.; AN, X. Microwave assisted ionic liquid pretreatment of medicinal plants for fast solvent extraction of active ingredients. **Separation and Purification Technology**, v. 83, n. 1, p. 45–49, 2011.

JIN, X. feng; LU, Y. hua; WEI, D. zhi; WANG, Z. tao. Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Salvia plebeia* R.Br. by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 1, p. 100–104, 2008.

KAMILOGLU, S.; PASLI, A. A.; OZCELIK, B.; CAPANOGLU, E. Evaluating the invitro bioaccessibility of phenolics and antioxidant activity during consumption of dried fruits with nuts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 284–289, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.040>>.

KANAZE, F. I.; GABRIELI, C.; KOKKALOU, E.; GEORGARAKIS, M.; NIOPAS, I. Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 2, p. 243–249, 2003.

KASALA, E. R.; BODDULURU, L. N.; MADANA, R. M.; ATHIRA, K. V.; GOGOI, R.; BARUA, C. C. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: Mechanistic perspectives. **Toxicology Letters**, v. 233, n. 2, p. 214–225, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.01.008>>.

KAUR, G.; VERMA, N. Nature curing cancer - Review on structural modification studies with natural active compounds having anti-tumor efficiency. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 64–78, 2015.

KELEBEK, H.; SELLI, S. Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dortyol (*Citrus sinensis* L. Osbeck) orange juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 10, p. 1855–1862, 2011.

KHAN, M. K.; ZILL-E-HUMA; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 85–104, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.004>>.

KHANAM, U. K. S.; OBA, S.; YANASE, E.; MURAKAMI, Y. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 979–987, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.07.006>>.

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

KIDMOSE, U.; KNUTHSEN, P.; EDELENBOS, M.; JUSTESEN, U.; HEGELUND, E. Carotenoids and flavonoids in organically grown spinach (*Spinacia oleracea* L) genotypes after deep frozen storage. **Journal of Science food and agriculture**, v. 81, p. 918–923., 2001.

KIM, E. K.; KWON, K. B.; SHIN, B. C.; SEO, E. A.; LEE, Y. R.; KIM, J. S.; PARK, J. W.; PARK, B. H.; RYU, D. G. Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor κ B and caspase-3. **Life Sciences**, v. 77, n. 7, p. 824–836, 2005.

KIM, H. J.; JANG, S. II; KIM, Y. J.; CHUNG, H. T.; YUN, Y. G.; KANG, T. H.; JEONG, O. S.; KIM, Y. C. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE2 from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3–4, p. 261–266, 2004.

KLEJDUS, B.; VITAMVÁSOVÁ-ŠTĚRBOVÁ, D.; KUBÁŇ, V. Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 450, n. 1–2, p. 81–97, 2001.

KOTNIK, M. P.; SKERGET; KNEZ, Z. Supercritical fluid extraction heads: comparison with conventional extraction, kinetics and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 192–198., 2007.

KOUPAI-ABYAZANI, M. R.; CREASER, C. S.; STEPHENSON, G. R. Separation and Identification of flavone, flavonol, isoflavone and flavanone aglycones by capillary column gas chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 3, p. 80–84, 1992.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 6, p. 459–516, 2005.

LEUENBERGER, M. G.; ENGELCH-JARRET, C.; WOGGON, W. D. The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of β -carotene to retinal. **Angew Chem-Int**, v. 40, p. 2614–2617, 2001.

- LI, F.; ZHANG, X.; ZHENG, S.; LU, K.; ZHAO, G.; MING, J. The composition, antioxidant and antiproliferative capacities of phenolic compounds extracted from tartary buckwheat bran [*Fagopyrum tartaricum* (L.) Gaerth]. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 145–155, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S175646461600030X>>.
- LI, G.; CHEN, M.-J.; WANG, C.; NIE, H.; HUANG, W.-J.; YUAN, T.-D.; SUN, T.; SHU, K.-G.; WANG, C.-F.; GONG, Q.; TANG, S.-Q. Protective effects of hesperidin on concanavalin A-induced hepatic injury in mice. **International immunopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 406–11, 2014a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867793>>.
- LI, Q.; QIU, Y.; MAO, M.; LV, J.; ZHANG, L.; LI, S.; LI, X.; ZHENG, X. Antioxidant mechanism of rutin on hypoxia-induced pulmonary arterial cell proliferation. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 19036–19049, 2014b.
- LI, W.; WANG, Z.; WANG, Y. P.; JIANG, C.; LIU, Q.; SUN, Y. S.; ZHENG, Y. N. Pressurised liquid extraction combining LC-DAD-ESI/MS analysis as an alternative method to extract three major flavones in *Citrus reticulata* “Chachi” (*Guangchenpi*). **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1044–1049, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.129>>.
- LIU, M.; LI, Y.; CHOU, G.; CHENG, X.; ZHANG, M.; WANG, Z. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae Miltiorrhizae*. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1–2, p. 51–55, 2007.
- LIU, R. H. Dietary bioactive compounds and their health implications. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 1, p. 18–25, 2013.
- LIU, R.; WANG, T.; ZHANG, B.; QIN, L.; WU, C.; LI, Q.; MA, L. Lutein and Zeaxanthin Supplementation and Association With Visual Function in Age-Related Macular Degeneration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 56, n. 1, p. 252–258, 2014. Disponível em: <<http://www.iovs.org/cgi/doi/10.1167/iovs.14-15553>>.
- LIYANA-PATHIRANA, C. M.; SHAHIDI, F. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1256–1264, 2006.
- LONDOÑO-LONDOÑO, J.; LIMA, V. R. de; LARA, O.; GIL, A.; PASA, T. B. C.; ARANGO, G. J.; PINEDA, J. R. R. Clean recovery of antioxidant flavonoids from

citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 81–87, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.075>>.

LÓPEZ-COBO, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; CERRETANI, L.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Distribution of phenolic compounds and other polar compounds in the tuber of *Solanum tuberosum* L. by HPLC-DAD-q-TOF and study of their antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 36, n. 1–2, p. 1–11, 2014.

LUCAS, L.; RUSSELL, A.; KEAST, R. Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 8, p. 754–768, 2011.

LUTTER, S.; SCHMALBACH, K.; ESCH, H. L.; LEHMANN, L. The isoflavone irilone contributes to the estrogenic potential of dietary supplements containing red clover. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 2, p. 309–321, 2014.

MA, Y. Q.; CHEN, J. C.; LIU, D. H.; YE, X. Q. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 1, p. 57–62, 2009.

MAIANI, G.; CASTÓN, M. J. P.; CATASTA, G.; TOTI, E.; CAMBRODÓN, I. G.; BYSTED, A.; GRANADO-LORENCIO, F.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; KNUTHSEN, P.; VALOTI, M.; BOHM, V.; MAYER-MIEBACH, E.; BEHSNILIAN, D.; SCHLEMMER, U. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. SUPPL. 2, p. 194–218, 2009.

MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 2, p. 125–132, 2007a.

MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. **Bioresource technology**, v. 98, n. 15, p. 2963–7, 1 nov. 2007b. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/6687984_Recovery_of_antioxidant_phenolics_from_white_vinification_solid_by-products_employing_waterethanol_mixtures._Bioresour_Technol>. Acesso em: 25 set. 2015.

MAMATHA, B. S.; ARUNKUMAR, R.; BASKARAN, V. Effect of Processing on Major Carotenoid Levels in Corn (*Zea mays*) and Selected Vegetables: Bioavailability of Lutein and Zeaxanthin from Processed Corn in Mice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 4, p. 1355–1363, 2012.

MARTINS, R. C.; CHIAPETTA, S. C.; PAULA, F. D. De; GONÇALVES, É. C. B. a. Avaliação da vida de prateleira de bebida isotônica elaborada com suco concentrado de frutas e hortaliças congeladas por 30 dias. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 44, p. 623–629, 2011.

MASCARAQUE, C.; ARANDA, C.; OCÓN, B.; MONTE, M. J.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARÍN, J. J. G.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Rutin has intestinal antiinflammatory effects in the CD4⁺ CD62L⁺ T cell transfer model of colitis. **Pharmacological Research**, v. 90, p. 48–57, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2014.09.005>>.

MASSIAS, A.; BOISARD, S.; BACCAUNAUD, M.; LEAL CALDERON, F.; SUBRA-PATERNAULT, P. Recovery of phenolics from apple peels using CO₂ + ethanol extraction: Kinetics and antioxidant activity of extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, p. 172–182, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.007>>.

MATSUNO, T.; OHKUBO, M.; TORIIMINAMI, Y.; TSUSHIMA, M.; SAKAGUCHI, S.; MINAMI, T.; MAOKA, T. Carotenoids in food chain between freshwater fish and aquatic insects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 124, n. 3, p. 341–345, 1999.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. J. Determination of free and total phenolic acids in plant derived foods by HPLC and diode array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3660–3667, 2002.

MELO, E. de A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G. de; NASCIMENTO, R. J. do. **Capacidade antioxidante de frutas** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2008. .

MELO, P. S.; MASSARIOLI, A. P.; DENNY, C.; DOS SANTOS, L. F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G. E.; VIEIRA, T. M. F. D. S.; ROSALEN, P. L.; DE ALENCAR, S. M. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160–169, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.087>>.

MILAGRO, F. I.; MANSEGO, M. L.; DE MIGUEL, C.; MARTÍNEZ, J. A. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: Progresses and perspectives. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 4, p. 782–812, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.06.010>>.

MILITÃO, G. C. G.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic activity of nepetin, a flavonoid from *Eupatorium ballotaefolium* HBK. **Pharmazie**, v. 59, n. 12, p. 965–966, 2004.

MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 28–41, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652613007440>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

MOHAMED, S. Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. **Trends in Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 114–128, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2013.11.001>>.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology**, v. 162, p. 68–76, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.043>>.

MOON, P. D.; LEE, B. H.; JEONG, H. J.; AN, H. J.; PARK, S. J.; KIM, H. R.; KO, S. G.; UM, J. Y.; HONG, S. H.; KIM, H. M. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the I κ B/NF- κ B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. **European Journal of Pharmacology**, v. 555, n. 2–3, p. 218–225, 2007.

MORTENSEN, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. **Pure and Applied Chemistry**, 2006. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/pac.2006.78.issue-8/pac200678081477/pac200678081477.xml>>. Acesso em: 30 maio. 2016.

MUELLER, M.; HOBIGER, S.; JUNGBAUER, A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 987–996, 2010.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.041>>.

MURAKAMI, A.; ASHIDA, H.; TERAOKA, J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 315–325, 2008.

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

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1523–1542, 2006.

NAZIRI, E.; NENADIS, N.; MANTZOURIDOU, F. T.; TSIMIDOU, M. Z. Valorization of the major agrifood industrial by-products and waste from Central Macedonia (Greece) for the recovery of compounds for food applications. **Food Research International**, v. 65, n. PC, p. 350–358, 2014.

NEICHI, T.; KOSHIHARA, Y.; MUROTA, S. T. v. 153, p. 130–132, 1983.

NIEMAN, D. C.; GILLITT, N. D.; KNAB, A. M.; SHANELY, R. A.; PAPPAN, K. L.; JIN, F.; LILA, M. A. Influence of a Polyphenol-Enriched Protein Powder on Exercise-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Athletes: A Randomized Trial Using a Metabolomics Approach. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

OKADA, S.; NUR-E-BORHAN, S. A.; YAMAGUCHI, K. Carotenoid Composition in the Exoskeleton of Commercial Black Tiger Prawns Shigeru Katsumi Yamaguchi Laboratory of Marine Biochemistry , Faculty of Agriculture , The University of Tokyo , Yayoi , Bunkyo , Tokyo 113 , Japan (Received Carotenoid content an. **Fisheries Science**, v. 60, n. 2, p. 213–215, 1994.

OKONOGLI, S.; DUANGRAT, C.; ANUCHPREEDA, S.; TACHAKITTIRUNGROD, S.; CHOWWANAPONPOHN, S. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 839–846, 2007.

OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 8, p. 344–350, 2005.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 954–970, 2013.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>>.

PALAFIX-CARLOS, H.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera*

indica, cv. Ataulfo) fruit by HPLC-DAD-MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 105–111, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.103>>.

PANDA, S. K.; MISHRA, S. S.; KAYITESI, E.; RAY, R. C. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: *Biotechnology and scopes*. v. 146, p. 161–172, 2016.

PARFITT, J.; BARTHEL, M.; MACNAUGHTON, S. Food waste within food supply chains : quantification and potential for change to 2050. p. 3065–3081, 2010.

PARI, L.; KARTHIKEYAN, A.; KARTHIKA, P.; RATHINAM, A. Protective effects of hesperidin on oxidative stress, dyslipidaemia and histological changes in iron-induced hepatic and renal toxicity in rats. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 46–55, 2015.

PASINI, F.; VERARDO, V.; CABONI, M. F.; D'ANTUONO, L. F. Determination of glucosinolates and phenolic compounds in rocket salad by HPLC-DAD-MS: Evaluation of *Eruca sativa* Mill. and *Diplotaxis tenuifolia* L. genetic resources. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 1025–1033, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.021>>.

PEI, K.; OU, J.; HUANG, J.; OU, S. *p* -Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 2952–2962, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.7578>>.

PEREIRA, D. M. .; VALENTÃO, P. .; PEREIRA, J. A. .; ANDRADE, P. B. Phenolics: From chemistry to biology. **Molecules**, p. 2202–2211., 2009.

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

POPA, V. I.; DUMITRU, M.; VOLF, I.; ANGHEL, N. Lignin and polyphenols as allelochemicals. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 2, p. 144–149, 2008.

PRADO, J. M.; PRADO, G. H. C.; MEIRELES, M. A. A. Scale-up study of supercritical fluid extraction process for clove and sugarcane residue. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 3, p. 231–237, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2010.10.036>>.

QUEENTHY, S. S.; JOHN, B. Diosmin exhibits anti-hyperlipidemic effects in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. **European Journal of Pharmacology**,

- v. 718, n. 1–3, p. 213–218, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.08.031>>.
- RABETAFIKA, H. N.; BCHIR, B.; BLECKER, C.; RICHEL, A. Fractionation of apple by-products as source of new ingredients: Current situation and perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 99–114, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.004>>.
- RAJENDRAN, P.; RENGARAJAN, T.; NANDAKUMAR, N.; PALANISWAMI, R.; NISHIGAKI, Y.; NISHIGAKI, I. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 103–112, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.011>>.
- RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p. 207–216, 2007.
- RASHED, K.; CIRIC, A.; GLAMOCLIIJA, J.; SOKOVIC, M. Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 210–215, 2014.
- RINALDO, D.; MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D.; FILS-LYCAON, B. Advances on polyphenols and their metabolism in sub-tropical and tropical fruits. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 12, p. 599–606, 2010.
- RODRIGUES, N. P.; BRAGAGNOLO, N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC-DAD-MSn. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 32, n. 2, p. 105–115, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2013.09.002>>.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; M., K.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenóides. tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2009.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenóides**. [s.l.: s.n.]
- RODRÍGUEZ-PÉREZ, C.; QUIRANTES-PINÉ, R.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 246–254, 2015.
- RONG, T. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols, Review. **Nutrients**, v. 2, p. 1231–1246, 2010.

ROUTRAY, W. .; ORSAT, V. Review: Microwave-assisted extraction of flavonoids. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 409–424, 2012.

ROY, S. J.; MAINZEN, P. S. Protective effects of sinapic acid on cardiac hypertrophy , dyslipidaemia and altered electrocardiogram in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1–3, p. 213–218, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.012>>.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121–137, 1 jun. 2002.

SANTOS, M. C. P.; GONÇALVES, É. C. B. A. Effect of different extracting solvents on antioxidant activity and phenolic compounds of a fruit and vegetable residue flour. **Scientia Agropecuaria**, v. 7, n. 1, p. 7–14, 2016.

SANTOS, M. C. P. dos. **Avaliação da capacidade antioxidante de resíduo de frutas e hortaliças**. 2014. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2014.

SCHIEBER, A.; CARLE, R. Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 9, p. 416–422, 2005.

SEIDEL, C.; SCHNEKENBURGER, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Antiproliferative and proapoptotic activities of 4-hydroxybenzoic acid-based inhibitors of histone deacetylases. **Cancer Letters**, v. 343, n. 1, p. 134–146, 2014.

SERGENT, T.; PIRONT, N.; MEURICE, J.; TOUSSAINT, O.; SCHNEIDER, Y. J. Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 3, p. 659–667, 2010.

SHAH, T. R.; PRASAD, K.; KUMAR, P. Maize — A potential source of human nutrition and health : A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 54, n. 1, p. 1–9, 2016.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. a M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutricao**, v. 17, n. 2, p. 227–236, 2004.

SHIMIZU, M. Functional food in Japan: Current status and future of gut-modulating food. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, n. SUPPL.1, p. 213–216, 2012.

SHUI, G.; LEONG, L. P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 977, n. 1, p. 89–96, 2002.

SIDDIQI, A.; HASAN, S. K.; NAFEES, S.; RASHID, S.; SAIDULLAH, B.; SULTANA, S. Chemopreventive efficacy of hesperidin against chemically induced nephrotoxicity and renal carcinogenesis via amelioration of oxidative stress and modulation of multiple molecular pathways. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 99, n. 3, p. 641–653, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.11.012>>.

SINDHU, G.; NISHANTHI, E.; SHARMILA, R. Nephroprotective effect of vanillic acid against cisplatin induced nephrotoxicity in wistar rats: A biochemical and molecular study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 392–404, 2015.

SINGH, A.; AHMAD, S.; AHMAD, A. Green extraction methods and environmental applications of carotenoids-a review. **RSC Adv.**, v. 5, n. 77, p. 62358–62393, 2015.

SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, 1999.

SNODDERLY, D. M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1448S–1461S, 1995.

SOOBRAATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1–2, p. 200–213, 2005.

SOTO-VACA, A. .; LOSSO, J. N. .; XU, Z. .; FINLEY, J. W. Review: Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 6658–6677, 2012.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular aspects of medicine**, 2003.

STALIKAS, C. D. Review: Extraction, Separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268–3295, 2007.

STRATI, I. F.; OREOPOULOU, V. Recovery of carotenoids from tomato processing by-products - A review. **Food Research International**, v. 65, n. PC, p. 311–321, 2014.

SUN-WATERHOUSE, D.; WEN, I.; WIBISONO, R.; MELTON, L. D.; WADHWA, S. Evaluation of the extraction efficiency for polyphenol extracts from by-products of

green kiwifruit juicing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 12, p. 2644–2652, 2009.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X. Z.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of vegetables. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 1, p. 6910–6916, 2002.

SUN, Y.; MU, C. Luteolin and luteolin-7- O -glucoside strengthen antioxidative potential through the modulation of Nrf2 / MAPK mediated HO-1 signaling cascade in RAW 264 . 7 cells. **FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY**, v. 65, p. 70–75, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.017>>.

SWATSITANG, P.; TUCKER, G.; ROBARDS, K.; JARDINE, D. Isolation and identification of phenolic compounds in *Citrus sinensis*. **Analytica Chimica Acta**, v. 417, n. 2, p. 231–240, 2000.

TANG, K. S. C.; KONCZAK, I.; ZHAO, J. Identification and quantification of phenolics in Australian native mint (*Mentha australis* R. Br.). **Food Chemistry**, v. 192, p. 698–705, 2016.

TAO, W.; WANG, H.; SU, Q.; CHEN, Y.; XUE, W.; XIA, B.; DUAN, J.; CHEN, G. Paeonol attenuates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Psychiatry Research**, v. 238, p. 116–121, 2016.

TEZCAN, F.; GULTEKIN-OZGUVEN, M.; DIKEN, T.; OZÇELIK, B.; ERIM, F. B. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 873–877, 2009.

TRIPOLI, E.; GUARDIA, M. La; GIAMMANCO, S.; MAJO, D. Di; GIAMMANCO, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 466–479, 2007.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 835–841, jan. 2006.

TZENG, Y. M.; RAO, Y. K.; LEE, M. J.; CHEN, K.; LEE, Y. C.; WU, W. S. Insulin-mimetic action of rhoifolin and cosmosiin isolated from citrus grandis (L.) osbeck leaves: Enhanced adiponectin secretion and insulin receptor phosphorylation in 3T3-L1 cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

VANAMALA, J.; REDDIVARI, L.; YOO, K. S.; PIKE, L. M.; PATIL, B. S. Variation

in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 2–3, p. 157–166, 2006.

VEGGI, P. C.; PRADO, J. M.; BATAGLION, G. A.; EBERLIN, M. N.; MEIRELES, M. A. A. Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 89, p. 68–77, 2014.

VENTURELLI, S.; BURKARD, M.; BIENDL, M.; LAUER, U. M.; FRANK, J.; BUSCH, C. Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. **Nutrition**, v. 32, n. 11–12, p. 1171–1178, 2015.

VICHAPONG, J.; SOOKSERM, M.; SRIJESDARUK, V.; SWATSITANG, P.; SRIJARANAI, S. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1325–1330, 2010.

VILLATORO-PULIDO, M.; PRIEGO-CAPOTE, F.; ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; SAHA, S.; PHILO, M.; OBREGÓN-CANO, S.; DE HARO-BAILÓN, A.; FONT, R.; DEL RÍO-CELESTINO, M. An approach to the phytochemical profiling of rocket [*Eruca sativa* (Mill.) Thell]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3809–3819, 2013.

VILLENEUVE, P.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Interactions between α - Tocopherol and Rosmarinic Acid and Its Alkyl Esters in Emulsions: Synergistic, Additive, or Antagonistic Effect? 2012.

WANG, C.-J.; HSIEH, Y.-J.; CHU, C.-Y.; LIN, Y.-L.; TSENG, T.-H. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. **Cancer Letters**, v. 183, n. 2, p. 163–168, 2002.

WANG, W.; HEIDEMAN, L.; CHUNG, C. S.; PELLING, J. C.; KOEHLER, K. J.; BIRT, D. F. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. **Molecular carcinogenesis**, v. 28, n. March, p. 102–110, 2000.

WIJNGAARD, H.; HOSSAIN, M. B.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 505–513, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.027>>.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, p. 838–849., 2004.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 3, p. 609–14, 29 jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12537430>>. Acesso em: 3 set. 2015.

YI, W.; CAO, R.; PENG, W.; WEN, H.; YAN, Q.; ZHOU, B.; MA, L.; SONG, H. Synthesis and biological evaluation of novel 4-hydroxybenzaldehyde derivatives as tyrosinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 639–646, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.11.007>>.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Bioavailability of hydroxycinnamates: A brief review of in vivo and in vitro studies. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 133–145, 2010.

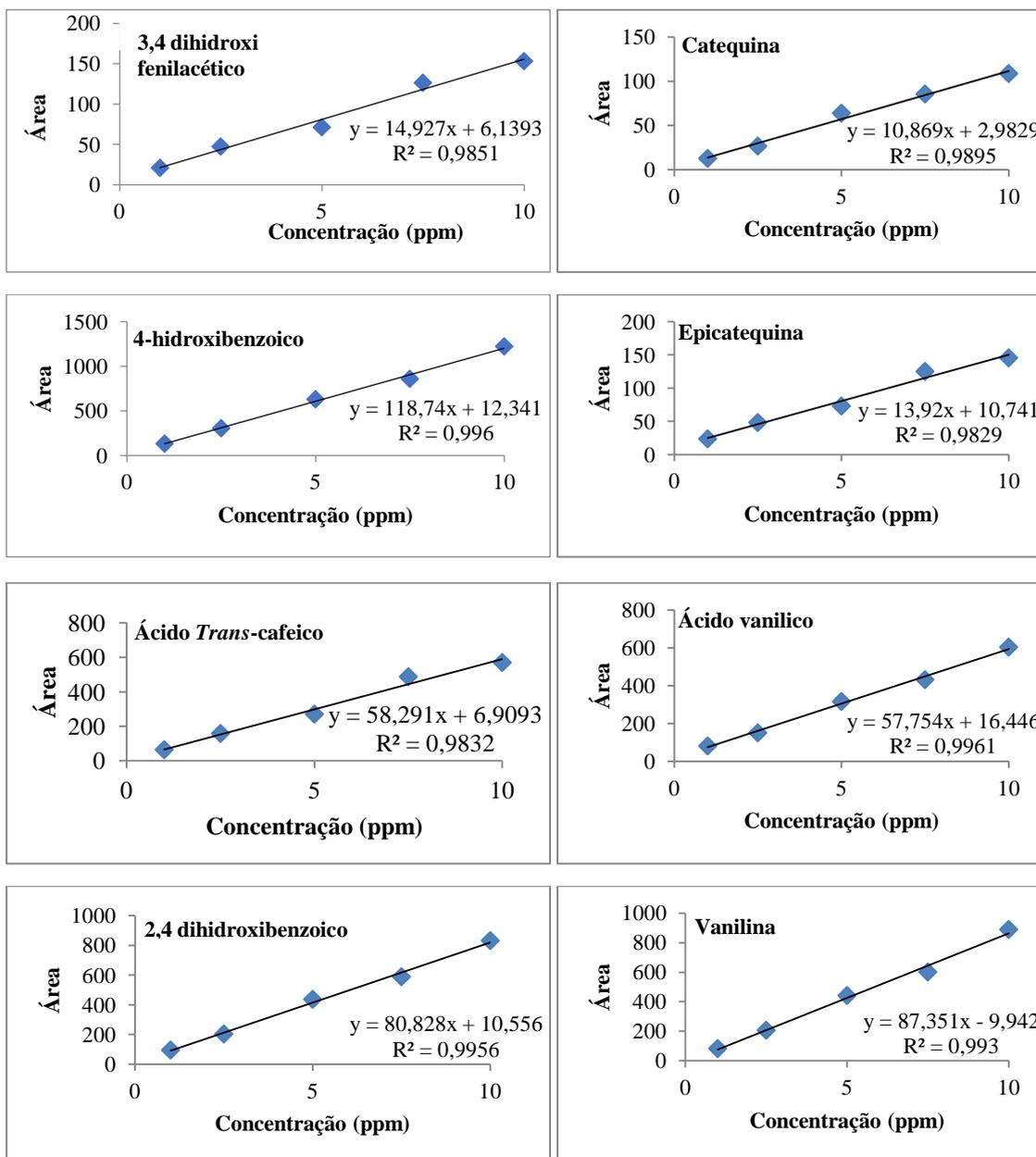
ZHEN, J.; VILLANI, T. S.; GUO, Y.; QI, Y.; CHIN, K.; PAN, M. H.; HO, C. T.; SIMON, J. E.; WU, Q. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of Hibiscus sabdariffa leaves. **Food Chemistry**, v. 190, p. 673–680, 2016.

ZHOU, J.; ZHOU, L.; HOU, D.; TANG, J.; SUN, J.; BONDY, S. C. Paeonol increases levels of cortical cytochrome oxidase and vascular actin and improves behavior in a rat model of Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 1388, p. 141–147, 2011.

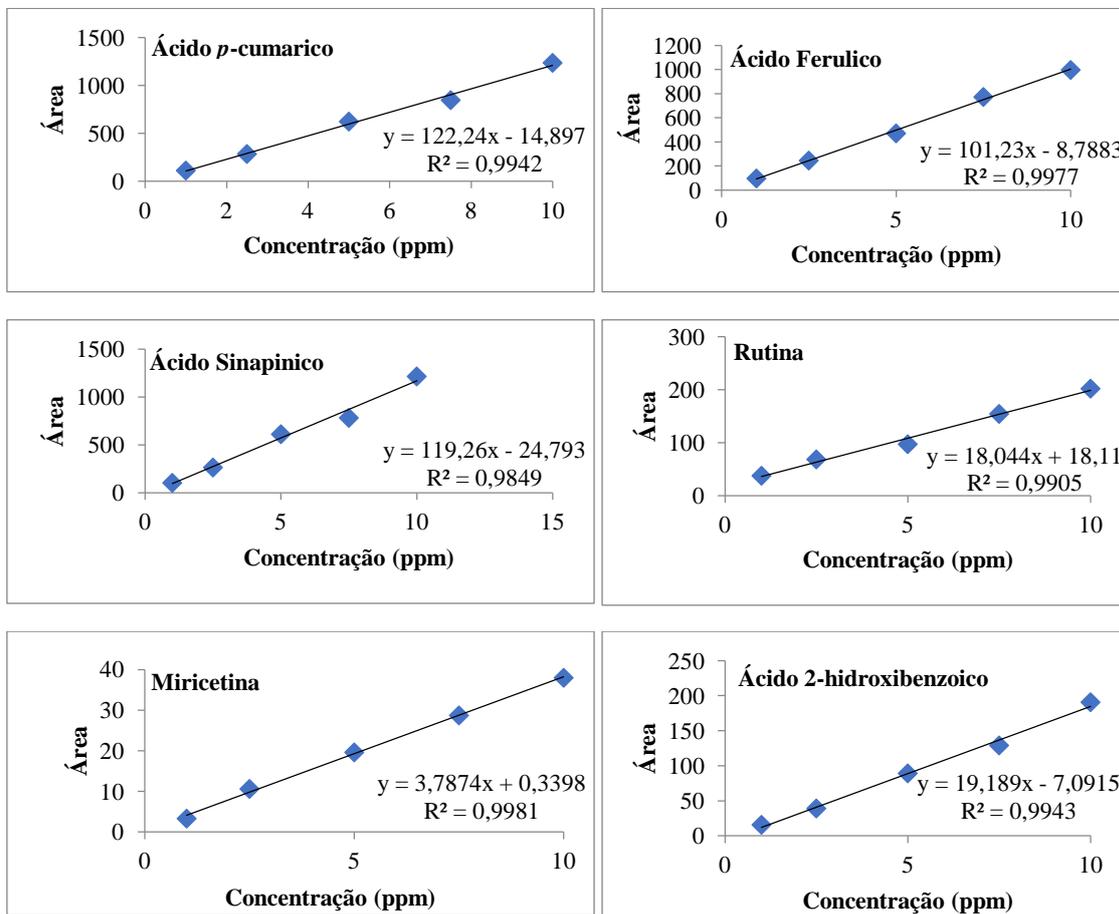
ZUO, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. **Talanta**, v. 57, n. 2, p. 307–316, 16 maio 2002.

ZYGMUNT, K.; FAUBERT, B.; MACNEIL, J.; TSIANI, E. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 2, p. 178–183, 2010.

APÊNDICE A - Gráficos da Curva de regressão linear dos padrões: ácido 3,4 - dihidroxi-fenilacético, catequina, ácido 4-hidroxibenzoico, epicatequina, ácido Trans-cafeico, ácido vanílico, ácido 2,4 dihidroxibenzoico e vanilina.



APÊNDICE B - Gráficos da Curva de regressão linear dos padrões: ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinapínico, rutina, miricetina e ácido 2-hidroxibenzoico



Effects of a Fruit and Vegetable Sports Drink on Hydration and Oxidative Stress Recovery of Brazilian Professional Athletes

Mônica Cristine Pereira dos Santos¹, Noemi Alves de Souza², Thaisa Souza Nunes² and Edra Castello Branco de Andrade Gonçalves^{1*}

¹Food and Nutrition Master's Program, Federal University of the State of Rio de Janeiro, CEP, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Nutrition School, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Corresponding author: Edra Castello Branco de Andrade Gonçalves, Food and Nutrition Master's Program, Federal University of the State of Rio de Janeiro, CEP, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Tel: 55 (21) 2542-7418; E-mail: edracb@analisadnutricao@unirio.br

Received date: 19 Sep 2016; Accepted date: 09 Nov 2016; Published date: 15 Nov 2016.

Citation: dos Santos MCP, de Souza NA, Nunes TS, Gonçalves ECBA (2016) Effects of a Fruit and Vegetable Sports Drink on Hydration and Oxidative Stress Recovery of Brazilian Professional Athletes. *Nutr Food Technol Open Access* 2(5): doi:10.15665/2470-6086.134

Copyright: © 2016 dos Santos MCP, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

This pilot project aimed to investigate the hydration and recovery from oxidative stress in athletes from different sports, after hydration with water or with a natural sports drink made of fruit and vegetables, in addition to the supplementation effects caused by this drink, using the Electro Sensor Complex. The consumption of the natural sports drink provided all the athletes with better hydration levels when compared to hydration with water. In athletes practitioners, body mass loss (BML) was significantly lower after the consumption of the natural sports drink, ranging from -1.1 ± 0.4 (%) after supplementation and -1.77 ± 0.5 (%), without supplementation. The effects on the recovery from oxidative stress showed a significant difference in interstitial free-radical levels and cortisol for athletes practitioners as a result of the consumption of the natural sports drink. The consumption of the natural sports drink resulted in better responses regarding hydration and oxidative stress recovery of the athletes when compared to water intake.

Keywords: Bioactive compounds; Dehydration; Supplement; Oxidative Stress

Introduction

A healthy hydration status for athletes is the condition of healthy individuals who maintain their water balance at a relatively consistent level across exercise sessions, while a dehydration state, caused by a decrease of a 1% to 2% of body weight may cause poor performance and represents a risk to health. However, long before a risk to one's health is posed, dehydration can impair athletic performance [1,2].

Research examining the efficacy of sports beverages indicates that their intake results in better fluid balance restoration, following exercise in comparison to water [3]. For this reason, various products have been developed to, purportedly, enhance athletic performance to a greater extent than water alone [4-6].

Another recurring concern among athletes is the increased production of reactive oxygen species (ROS) induced by exercise [7], which can have adverse effects on performance and muscle recovery.

It is well known that excessive physical activity produces excess levels of ROS, especially in professional athletes after aerobic or anaerobic strenuous exercise, increasing oxidative stress biomarkers in blood and tissues [7-9]. Additionally, sex, age, and food intake directly affect ROS production and the balance between ROS and the antioxidant system capacity to preserve or restore homeostasis [10-13].

To ultra-endurance athletes, oxidative damage may persist for 1-month post-exercise, depending on the biomarker assessed. For those, it has been reported that reduced glutathione (GSH) levels remain depleted in blood after 28 days post-race [14]. Furthermore, the increase in the levels of inflammatory cytokines (IL-6), lactate production, associated with a decrease of both antioxidant capacity and renal function has also been observed [8].

The Electro Sensor Complex (ESC) has been used over the past decade as a method to assess, through sensors placed on the skin, biochemical data and body composition measures, providing physiological data. It is a fast (less than 5 minutes), cost-effective and non-invasive method widely used in medical practice around the world. It is a method approved by the Food and Drug Administration (FDA-US) and the National Health Surveillance Agency (Anvisa-Brazil) [15-17].

The consumption of sports drinks has become widespread both for recreational and professional athletes because of their proposed energetic effects, and their ability to replenish electrolytes and prevent dehydration [18]. In this context, a natural sports drink may be an effective way to promote adequate water intake, electrolyte replacement and the additional benefit of providing dietary antioxidants whose positive effect on physical activity after recovery is still unclear and divides opinions in literature [19,20].

Thus, the objective of this pilot study was to evaluate the effect of a natural sports drink, made from whole fruit and vegetables (edible and non-edible parts), on hydration and oxidative stress markers, using a non-invasive method of detection in Brazilian (a)–jitsu and athletics sportsmen.

Materials and Methods

Beverage preparation

The following species of fruits were used: Sweet orange (*Citrus sinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and tamarind (*Tamarix lanata*). The following species of vegetables were used: lettuce (*Lactuca sativa*), coriander (*Coriandrum sativum*), carrot (*Daucus carota*), spinach (*Spinacia oleracea*), mint (*Mentha sp.*), taro (*Colocasia esculenta*), cucumber (*Cucumis sativus*) and radish (*Raphanus sativus*) [4].

Copyright: © 2016 dos Santos MCP, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.