

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES-
URI ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GIOVANA FELTES

**ESTUDO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO PARA
ISOTIOCIANATO DE BENZILA DAS SEMENTES DE MAMÃO (*Carica papaya*
Linn) DO GRUPO FORMOSA**

**ERECHIM, RS - BRASIL
MARÇO DE 2021**

GIOVANA FELTES

**ESTUDO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO PARA
ISOTIOCIANATO DE BENZILA DAS SEMENTES DE MAMÃO (*Carica papaya*
Linn) DO GRUPO FORMOSA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Natália Paroul
Prof^a. Dr^a. Clarice Steffens

**ERECHIM, RS – BRASIL
MARÇO DE 2021**

**ESTUDO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO PARA
ISOTIOCIANATO DE BENZILA DAS SEMENTES DE MAMÃO (*Carica papaya*
Linn) DO GRUPO FORMOSA**

Giovana Feltes

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof^a. Natália Paroul
Orientadora (URI-Erechim)

Prof^a. Clarice Steffens
Orientadora (URI-Erechim)

Prof^a. Geciane Toniazco Backes
(URI-Erechim)

Prof^o. Altemir Mossi
(UFFS-Erechim)

Erechim, Março de 2021.

F325e Feltes Giovana,

Estudo de diferentes técnicas de extração para isotiocianato de benzila das sementes de mamão (*Carica papaya* Linn) do grupo formosa / Giovana Feltes. - 2021.

60 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2021.

“Orientação: Prof^ª Dra Natália Paroul, Prof^ª Dra Clarice Steffens”

1 Mamão 2. Atividade antioxidante 3. Cinética de secagem 4. Atividade antifúngica I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento pessoal.

Agradeço a minha família que sempre me apoiaram em todas as decisões durante esse caminho.

Agradeço as minhas orientadoras Clarice e Natália pela orientação e paciência durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos professores Alexander Junges e Rogério Luis Cansian pelo auxílio e sugestões.

Agradeço a Bruna, Sandy e Rosi por todo auxílio, sugestões e dedicação ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de mestrado Bruno, Eloir e Patrícia por todo apoio, auxílio e por deixar meus dias mais divertidos.

Agradeço também a Patrícia e Rafaela por fazer os meus dias mais alegres e doce na “Sala do Mestrado”.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

RESUMO

O isotiocianato de benzila é um composto bioativo presente na semente de mamão. Em sua forma nativa é um líquido oleoso e hidrofóbico, possui cheiro pungente, baixa disponibilidade e degrada muito facilmente, além de ser fortemente volátil. O presente estudo teve como objetivo investigar diferentes técnicas de extração de isotiocianato de benzila, avaliar o efeito das temperaturas de secagem (45 e 55°C) sobre o composto e realizar modelagem matemática das sementes de mamão (*Carica papaya Linn*) do grupo Formosa. Foram avaliados quatro modelos matemáticos de cinética de secagem, Lewis, Henderson e Pabis, Page e Overhults, usando o coeficiente de determinação (R^2) e função objetiva (F_0), onde o melhor ajuste aos dados experimentais foi observado para o modelo de Overhults. Os extratos obtidos a partir da hidrodestilação, solvente hexano e CO₂ subcrítico foram avaliados quanto ao rendimento e quantificação de isotiocianato de benzila. O maior rendimento (34 %) foi obtido pela extração com solvente hexano nas sementes desidratadas a 45 °C. A maior concentração de isotiocianato de benzila (0,0781 g/100 g) foi encontrada nos extratos obtidos com CO₂ subcrítico. O extrato hexanoico obtido das sementes desidratadas a 55 °C foi o mais efetivo contra bactérias Gram-positivas. O padrão isotiocianato de benzila foi mais efetivo contra bactérias Gram-negativas, e apresentou menores concentrações inibitórias (0,625 mg/mL) em relação ao extrato hexanoico. O extrato hexanoico obtido das sementes em ambas as temperaturas de secagem não foram efetivos contra o fungo *Alternaria alternata*. Contudo o extrato hexanoico obtido das sementes secas a 45 °C apresentou atividade nas concentrações de 50 e 25 mg/mL contra *Aspergillus flavus*, e o extrato hexanoico obtido a partir de sementes desidratadas à 55 °C apresentou atividade nas concentrações de 50 e 25 mg/mL para *Penicillium crustosum*. A atividade antioxidante do extrato hexanoico apresentou diferença em relação a temperatura de secagem da semente. A extração com CO₂ subcrítico mostrou-se eficiente na obtenção de extrato com maior concentração de isotiocianato de benzila a partir de sementes desidratadas à 45 °C. Dessa forma foi possível verificar que o extrato hexanoico obtido por sementes de mamão desidratadas à 45 °C apresentou melhores resultados em relação as atividades biológicas.

Palavras-chave: cinética de secagem, rendimento, quantificação, atividade antioxidante, atividade antifúngica.

ABSTRACT

Benzyl isothiocyanate is a bioactive compound present in papaya seed. In its native form it is an oily and hydrophobic liquid, it has a pungent smell, low availability and it degrades very easily, in addition to being highly volatile. This study aimed to investigate different benzyl isothiocyanate extraction techniques, evaluate the effect of drying temperatures (45 and 55 ° C) on the compound and perform mathematical modeling of papaya (*Carica papaya* Linn) seeds from the Formosa group. Four mathematical models of drying kinetics were evaluated, Lewis, Henderson and Pabis, Page and Overhults, using the coefficient of determination (R^2) and objective function (F_o), where the best fit to the experimental data was observed for the Overhults model. The extracts obtained from hydrodistillation, hexane solvents and subcritical CO₂ were evaluated for the performance and quantification of benzyl isothiocyanate. The highest yield (34%) was obtained by extraction with hexane in the seeds dehydrated at 45 ° C. The highest concentration of benzyl isothiocyanate (0.0781 g / 100 g) was found in extracts obtained with subcritical CO₂. The hexanoic extract obtained from the seeds dehydrated at 55 ° C was the most effective against Gram-positive bacteria. The benzyl isothiocyanate pattern was more effective against Gram-negative bacteria, and showed lower inhibitory concentrations (0.625 mg / mL) compared to hexanoic extract. The hexanoic extract obtained from the seeds at both drying temperatures was not effective against the fungus *Alternaria alternata*. However, the hexanoic extract obtained from the dried seeds at 45 ° C showed activity in the concentrations of 50 and 25 mg / mL against *Aspergillus flavus*, and the hexanoic extract obtained from seeds dehydrated at 55 ° C showed activity in the concentrations of 50 and 25 mg / mL for *Penicillium crustosum*. The antioxidant activity of the hexanoic extract showed a difference in relation to the drying temperature of the seed. Extraction with subcritical CO₂ proved to be efficient in obtaining an extract with a higher concentration of benzyl isothiocyanate from seeds dehydrated at 45 ° C. Thus, it was possible to verify that the hexanoic extract obtained by papaya seeds dehydrated at 45 ° C presented better results in relation to biological activities.

Keywords: drying kinetics, yield, quantification, anti-oxidant activity, antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do benzil glicosinolato.	16
Figura 2- Degradação do glicosinolato pela enzima mirosinase.	17
Figura 3- Esquema das etapas experimentais realizadas no estudo	27
Figura 4- Ilustração do estágio de maturação (a) e das sementes do mamão (b)	28
Figura 5- Sementes de mamão (a) desidratada e (b) moídas.	30
Figura 6- Aparelho tipo Soxhlet utilizado na extração com solvente.	31
Figura 7- Aparelho tipo Clevenger utilizado para extração por hidrodestilação.....	32
Figura 8- Unidade de extração subcrítica.....	32
Figura 9- Relação da taxa de umidade das sementes em relação ao tempo.....	37
Figura 10- Ajuste aos modelos matemáticos da cinética de secagem da semente de mamão para temperatura de 45 °C.	39
Figura 11- Ajuste aos modelos matemáticos da cinética de secagem da semente de mamão para temperatura de 55 °C.	39
Figura 12- Cromatograma padrão isotiocianato de benzila (C= 0,1 g/mL).	56
Figura 13- Cromatogramas dos extratos hexanoicos obtidos a partir de sementes desidratadas à 45 °C (a) e 55 °C (b).	57
Figura 14- Cromatogramas do extrato obtido por CO ₂ subcrítico a partir de sementes desidratadas à 45 °C (a) e 55 °C (b).	58
Figura 15- Cromatogramas obtidos por hidrodestilação a partir de sementes desidratadas à 45 °C (a) e 55 °C (b).	59
Figura 16- Curva de atividade antioxidante do extrato hexanoico obtido a partir de sementes desidratadas à 45 °C.	60
Figura 17- Curva de atividade antioxidante do extrato hexanoico obtido a partir de sementes desidratadas à 55 °C.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração de isotiocianato de benzila extraído por diferentes métodos de extração.....	22
Tabela 2- Modelos matemáticos utilizados.	29
Tabela 3- Parâmetros cinéticos para secagem das sementes de mamão e modelos utilizados.	38
Tabela 4- Rendimentos dos extratos das sementes de mamão desidratadas a 45 e 55 °C obtidos por fluido CO ₂ subcrítico, hidrodestilação e extração com hexano.	40
Tabela 5- Concentração do isotiocianato de benzila nos diferentes extratos das sementes de mamão desidratadas à 45 e 55 °C.....	42
Tabela 6- Concentração inibitória mínima do extrato hexanoico e do padrão isotiocianato de benzila.....	44
Tabela 7- Atividade antifúngica do extrato hexanoico obtido na secagem de 45 e 55 °C.	45
Tabela 8- Atividade antioxidante dos extratos hexanoicos expressos em IC ₅₀ (mg/mL) obtidos das sementes de mamão desidratadas à 45 e 55 °C.	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	Mamão Carica papaya Linn	14
3.2	Sementes de mamão do grupo Formosa	15
3.3	Isotiocianato de benzila	16
3.3.1	Métodos de extração	19
4	CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	26
5	MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1	Obtenção das sementes	27
5.2	Cinética de Secagem	28
5.3	Extração	30
5.3.1	<i>Extração com solvente</i>	30
5.3.2	<i>Hidrodestilação</i>	31
5.3.3	<i>Extração com CO₂ subcrítico</i>	32
5.4	Rendimento	33
5.5	Quantificação	33
5.6	Concentração Inibitória Mínima	34
5.7	Atividade Antifúngica	35
5.8	Atividade Antioxidante	35
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.1	Cinética de secagem	37
6.2	Rendimento	40
6.3	Quantificação	42
6.4	Concentração Inibitória Mínima	43
6.5	Atividade antifúngica	45
6.6	Atividade antioxidante	47
7	CONCLUSÃO	48
8	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

APÊNDICE A.....	56
APÊNDICE B.....	60

1 INTRODUÇÃO

O mamoeiro é uma das frutíferas mais comuns em quase todos os países da América tropical, popularmente conhecido como mamão, *Carica papaya Linn*, é cultivado em regiões tropicais, com destaques para a Ásia e Américas responsáveis por 57% e 32% da produção mundial, respectivamente (FAO, 2018). O Brasil é o segundo maior produtor mundial, a cultura do mamão está presente em todas as regiões, sendo mais evidenciadas no Nordeste e Sudeste (IBGE, 2018).

Os resíduos agroindustriais originados do processamento são de interesse econômico, apresentando em sua constituição substâncias importantes para as funções fisiológicas, dentre essas substâncias compostos antioxidantes, fenólicos, vitamina C e carotenoides são encontrados em maior concentração (NASCIMENTO FILHO e FRANCO, 2015); e interesse ambiental, pois segundo Garmus *et al.* (2009) o aproveitamento dos subprodutos é uma opção para reduzir o impacto que podem causar ao serem descartados no meio ambiente, além de diminuir os custos de produção e aumentar o aproveitamento do alimento.

No processamento ou até mesmo no consumo *in natura* do mamão os resíduos sólidos gerados consistem em cascas, extremidades e sementes, os quais são possíveis fontes de produtos de alto valor agregado. De acordo com Vilas Boas (2002), as cascas e sementes correspondem a 34% e as extremidades 12% do total de fruto, destes as sementes são responsáveis em média por 14% da massa do fruto, constituindo o material de descarte (JORGE e MALACRIDA, 2008), com grande potencial econômico e biotecnológico como fonte para extração de óleo (NASCIMENTO FILHO e FRANCO, 2015).

As sementes apresentam interesse econômico, por conter em sua composição substâncias com propriedades biológicas, compostos fitoquímicos como flavonoides, fenóis, saponinas, taninos, esteroides e terpenoides, além de uma quantidade considerável de glicosinolatos, precursores do isotiocianato de benzila.

O isotiocianato de benzila é um líquido oleoso, volátil, hidrofóbico, possui cheiro pungente e degrada muito facilmente (UPPAL *et al.*, 2020). Está presente tanto nas sementes como na polpa do fruto, mas a sua concentração varia durante amadurecimento. Quando o mamão está verde a concentração de isotiocianato de benzila é maior na polpa e menor nas sementes, a medida que ocorre a maturação a concentração diminui na polpa e aumenta nas sementes (NAKAMURA, MURATA e

NAKAMURA, 2019). Apresenta propriedades biológicas como atividade antimicrobiana (YANG *et al.*, 2020; PATEL *et al.*, 2020) e antifúngica (HE *et al.*, 2017; SALADINO, *et al.*, 2017), possui propriedade medicinal com destaque para atividade anticarcinogênica (KUANG e CHEN, 2004; ZHOU *et al.*, 2013; UPPAL *et al.*, 2020), além de possuir atividade anti-helmíntica (KERMANSYAI *et al.*, 2001).

A obtenção de extratos ricos em isotiocianato de benzila dependem das técnicas de extração utilizadas e dos solventes escolhidos que influenciam diretamente na qualidade e composição química do extrato.

As técnicas empregadas para a extração do isotiocianato de benzila variam desde a mais simples como a maceração até a extração com fluídos subcríticos e supercríticos. A extração com dióxido de carbono (CO₂) subcrítico é semelhante a extração supercrítica, a diferença está em suas condições que são abaixo da temperatura e pressão críticas do CO₂ (T= 31,1 °C e P= 73,76 bar).

Na literatura são encontrados estudos de técnicas de extração com sementes de mamão desde a extração com destilação até supercrítica, porém não há relato de estudos utilizando a técnica de extração subcrítica utilizando CO₂. Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral investigar diferentes técnicas de extração do isotiocianato de benzila e avaliar o efeito da temperatura de secagem das sementes de mamão sobre o composto.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Investigar diferentes técnicas de extração e avaliar o efeito da temperatura de secagem das sementes de mamão (*Carica papaya Linn*) do grupo Formosa sobre o isotiocianato de benzila.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a cinética de secagem e realizar modelagem matemática das sementes de mamão em diferentes temperaturas;
- Realizar a extração de isotiocianato de benzila usando as técnicas de extração contínua com hexano, hidrodestilação e extração subcrítica com CO₂ a partir de sementes desidratadas em diferentes temperaturas;
 - Avaliar o rendimento dos extratos obtidos nos diferentes métodos de extração;
 - Quantificar o isotiocianato de benzila nos extratos;
 - Avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica do padrão de isotiocianato de benzila e dos extratos hexanoicos obtidos a partir das sementes desidratadas a 45°C e 55°C.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre o estado da arte no que concerne à produção e comercialização do mamão, bem como reaproveitamento dos resíduos gerados durante o processamento do fruto focando nos princípios ativos presentes nas sementes. Também serão apresentadas as propriedades biológicas e medicinal do isotiocianato de benzila, assim como diferentes métodos de extração desse composto.

3.1 Mamão *Carica papaya* Linn

O mamoeiro é uma planta frutífera, tendo sua origem na América do Sul. Popularmente conhecido como mamão, *Carica papaya* Linn, é um fruto tropical podendo apresentar uma massa de 200 a 3000 g, e atingir até 50 cm de comprimento, de acordo com o tipo de flor, pode apresentar diferentes formatos, arredondado, oblongo, alongado, cilíndrico ou piriforme. A casca é fina e lisa, de coloração que varia do amarelo-clara a alaranjada, protegendo a polpa, com 2,5 a 5 cm de espessura, de coloração que pode variar de amarela a avermelhada, possuindo em seu interior grande quantidade de sementes. Suas características o tornam um alimento completo e saudável (ANWAR, RASUL e ASHWATH, 2018).

O fruto é cultivado em regiões tropicais, com destaques para a Ásia e Américas, responsáveis por 57 e 32% da produção mundial, respectivamente (FAO, 2018). O Brasil é o segundo maior produtor mundial, com 1 milhão de tonelada de produção do fruto, com destaques para as regiões Sudeste e Nordeste (IBGE, 2018).

No Brasil as cultivares mais exploradas para a comercialização são classificadas em dois grupos, conforme o tipo de fruto: Solo (ex.: *Sunrise Solo* e *Improved Sunrise Solo Line*) e Formosa (ex.: *Tainung*) (SEBRAE, 2016).

A variedade Solo, conhecida como mamão Havaí ou Papaya, tem formato de pera, com massa média de 500 g e polpa vermelha-alaranjada e cavidade interna estrelada. Sua produção começa entre oito e dez meses após o plantio, produzindo em média 40 t/ha/ano. Enquanto que a variedade Formosa apresenta um formato mais alongado ou arredondado, com massa média entre 800 e 1100 g e apresenta coloração da polpa laranja-avermelhada, com produção média de 60 t/ha/ano (SEBRAE, CEAGESP, 2020).

O fruto é consumido geralmente fresco, mas sua industrialização, através do aproveitamento integral do fruto, oferece uma ampla gama de produtos e subprodutos, que podem ser utilizados na indústria de alimentos, têxtil, farmacêutica e ração animal. É também importante fonte de papaína, enzima proteolítica de ação semelhante à da pepsina e tripsina encontrada em frutos imaturos, é utilizada em diversas indústrias, dentre elas a indústria farmacêutica, de alimentos, indústria têxtil e em cervejarias (HABTEMARIAM, 2019).

3.2 Sementes de mamão do grupo Formosa

Os resíduos agroindustriais como as sementes proveniente do fruto, tanto no consumo *in natura*, como da industrialização, podem apresentar interesse econômico, por conter em sua composição substâncias importantes para as funções fisiológicas, tais como compostos fenólicos, vitamina C e carotenoides (NASCIMENTO FILHO e FRANCO, 2015). Além disso há o interesse ambiental, pois segundo Garmus *et al.* (2009) o aproveitamento dos subprodutos é uma opção para reduzir o impacto que podem causar ao serem descartados no meio ambiente, além de diminuir os custos de produção e aumentar o aproveitamento do alimento.

As cascas e sementes correspondem a 34 % e as extremidades 12 % do total de fruto, destes as sementes são responsáveis em média por 14 % da massa do fruto, constituindo o material de descarte (JORGE e MALACRIDA, 2008), apesar de apresentar potencial econômico e biotecnológico como fonte para extração de óleo (NASCIMENTO FILHO e FRANCO, 2015).

As sementes de mamão são pequenas, redondas, rugosas e recobertas por uma camada mucilaginosa denominada exotesta, representando, em peso úmido, aproximadamente de 15 a 20 % do fruto (ANWAR, RASUL e ASHWATH, 2018). Em um fruto, de acordo com Melo (2010), do grupo “Formosa”, com peso de 1 a 2 Kg, possui cerca de 600 a 700 sementes, chegando a pesar 8 g ao todo *in natura*.

Análises realizadas nas sementes quanto às propriedades nutricionais e funcionais mostram a presença de compostos fitoquímicos com atividade antioxidante, dentre eles flavonoides, fenóis, saponinas, taninos, esteroides e terpenoides (GADZAMA *et al.*, 2016).

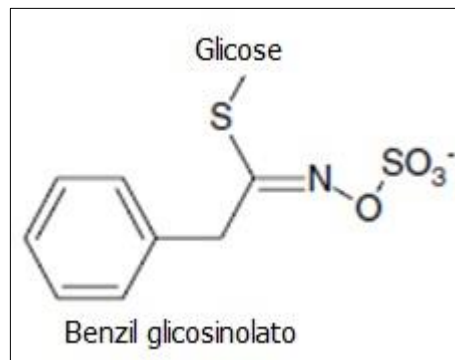
O óleo das sementes é rico em ácidos graxos moninsaturados, que contêm compostos funcionais (SAMARAM *et al.*, 2015). Os ácidos graxos mais abundantes

no óleo são palmítico, esteárico, oleico e linoleico, juntamente com tocoferóis e carotenoides (RODRIGUES *et al.*, 2019). Além disso possui o isotiocianato de benzila um composto com atividades biológicas bastante promissoras.

3.3 Isotiocianato de benzila

Dos componentes presentes na semente de mamão, destaca-se o glicosídeo isotiocianato de benzila pertencente ao grupo dos glicosinolatos. Segundo Fahey *et al.* (2001) os glicosinolatos é um dos maiores grupos de metabólitos especiais que contém glicose e enxofre formando um tioglicosídeo ligado a uma cadeia lateral (Grupo R) derivada de um aminoácido, e é classificado de acordo com o aminoácido precursor do seu grupo R e pelos tipos de modificações sofridas por esse grupo, como é mostrado na Figura 1.

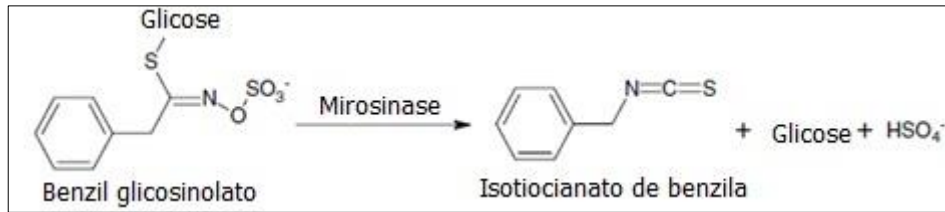
Figura 1- Estrutura do benzil glicosinolato.



Fonte: Lee, Lee e Su (2011).

Os isotiocianatos são obtidos a partir da conversão dos glicosinolatos pela ação da enzima hidrolítica mirosinase, presente no próprio vegetal, a qual cliva a glicose na ligação com o átomo de enxofre, resultando na aglicona, isso ocorre quando os tecidos da planta são lesionados e as células vegetais rompidas, por exemplo, pela ação de fungos ou injúrias. A aglicona resultante, é instável e reorganiza-se, com a perda do sulfato, dando origem a novos produtos voláteis pungentes, quimicamente reativos e com diversas atividades biológicas, entre os quais os isotiocianatos, nitrilas, tiocianatos, dentre outros (Figura 2). As proporções desses produtos podem variar, dependendo do tipo de glicosinolato, da espécie da planta e das condições de hidrólise (temperatura e pH) (CLARKE, 2010).

Figura 2- Degradação do glicosinolato pela enzima mirosinase.



Fonte: Lee, Lee e Su (2011).

O isotiocianato de benzila é um composto bioativo que existe predominantemente em plantas pertencentes as famílias Brassicaceae (*Lepidium sativum* L.), Caricaceae (*Carica papaya* L.), Capparaceae (*Capparis flexuosa*), Tropaeolaceae (*Tropaeolum mnajus* L.). Em sua forma nativa é um líquido oleoso e hidrofóbico, possui cheiro pungente, baixa disponibilidade e degrada muito facilmente, além de ser fortemente volátil (UPPAL *et al.*, 2020).

Sua concentração difere conforme o amadurecimento, no mamão, por exemplo, quando verde é maior na casca e polpa e menor nas sementes, a medida que ocorre a maturação o inverso acontece, a casca e polpa passam a diminuir a concentração enquanto que a semente aumenta (NAKAMURA, MURATA e NAKAMURA, 2019).

O isotiocianato de benzila vem se destacando devido as suas propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana (YANG *et al.*, 2020; PATEL *et al.*, 2020), antifúngica (HE *et al.*, 2017; SALADINO, *et al.*, 2017), anti-helmíntica (KERMANSAL *et al.*, 2001) e propriedades medicinais, com destaque para a atividade anticancerígena (KUANG e CHEN, 2004; ZHOU *et al.*, 2013; UPPAL *et al.*, 2020).

Yang *et al.* (2020) investigaram os efeitos inibitórios do isotiocianato de benzila e isotiocianato de fenetila contra *Escherichia coli*, produtora da toxina de Shiga, e *E. coli* enterotoxigênica. O efeito antibacteriano foi melhor quando utilizado o isotiocianato de benzila, a concentração inibitória mínima foi de 60 e 160 $\mu\text{mol/L}$ para *E. coli* e *E. coli* enterotoxigênica, respectivamente, enquanto a concentração de isotiocianato de fenetila foi de 400 $\mu\text{mol/L}$ para ambas as cepas.

Patel *et al.* (2020) investigaram, pelo ensaio de difusão em disco, o efeito antimicrobiano de sete compostos de hidrólises de glicosinolato contra *Salmonella* e *E. coli* O157:H7. Dentre esses compostos testados, o isotiocianato de benzila exerceu maior atividade antimicrobiana, a concentração inibitória mínima de 200 $\mu\text{g/mL}$ para ambas cepas utilizadas.

He *et al.* (2017) analisaram a composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de semente de mamão extraído por hidrodestilação. Três compostos foram identificados, sendo o isotiocianato de benzila em maior concentração (99,36%), seguido pelo benzaldeído (0,33%) e benzil nitrila (0,31%). O óleo essencial mostrou-se efetivo para todas as cepas testadas de *Candida*, incluindo *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, com concentração fungicida mínima variando de 16 a 64 µg/mL.

Saladino *et al.* (2017) estudaram a melhoria do *shelf life* do pão de forma utilizando os isotiocianatos de alila, benzila e fenila contra *Aspergillus parasiticus*. Dois tratamentos antimicrobianos foram analisados, um com liberação rápida e outro com liberação controlada dos voláteis. Fatias de pão de forma foram inoculadas com *Aspergillus parasiticus*, e dispostas em embalagens plásticas juntamente com filtros de papel embebidos com diferentes concentrações dos isotiocianatos de 0,5, 1 e 5 µL/L. A concentração fungicida mínima foi de 50 mg/mL para os isotiocianatos de alila e fenila, e 20 mg/mL para o isotiocianato de benzila. Ambos tratamentos tiveram redução na produção de aflatoxinas em todas as concentrações avaliadas, aumentando o *shelf life* das fatias de pão de forma, contudo os isotiocianatos de benzila e fenila obtiveram melhores resultados quando utilizaram as concentrações de 1 e 5 µL/L.

Kermanshai *et al.* (2001) avaliaram a atividade anti-helmíntica de extratos aquosos e óleos de semente de mamão, com solvente pentano em extrator Soxhlet, utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Todos os extratos foram tóxicos para *C. elegans*. Exposições para períodos superiores a 12 h foram letais para todos os nematoides, independente da fonte do isotiocianato de benzila.

Os isotiocianatos são capazes de atuar em todos os estágios da carcinogênese e modular vários parâmetros, desde a transformação da droga bem como a inflamação. Kuang e Chen (2004) estudaram os efeitos de derivados de glucosinolatos, dentre eles o isotiocianato de benzila, sobre células de carcinoma pulmonar (A549), e obtiveram como resultado a inibição do crescimento dessas células de uma forma dependente da concentração. Zhou *et al.* (2013) investigaram os efeitos do isotiocianato de benzila na parada do ciclo celular e apoptose em linhas de células de leucemia primárias e xenoenxerto. O aumento gradual da apoptose celular foi observado dependendo da concentração do isotiocianato de benzila, assim

nas concentrações de 4 e 8 μM o tempo de exposição até a apoptose foi de 12 h e 3 h, respectivamente.

Liu *et al.* (2015) avaliaram a inibição de células de câncer de mama com o uso de diferentes concentrações de isotiocianato de benzila. O estudo revelou que a concentração de 5 μM teve efeito inibitório na proliferação e invasão celular e metástase. Zhu *et al.* (2017) exploraram os efeitos do isotiocianato de benzila no crescimento, migração e invasão de células de carcinoma hepatocelular. Os resultados desse estudo mostraram que concentrações de 40 e 80 $\mu\text{mol/L}$ de isotiocianato de benzila foram suficientes para inibir o crescimento e promover apoptose de células de carcinoma hepatocelular em 48 h, além de possuir efeito inibidor na migração e invasão dessas células. Uppal *et al.* (2020) investigaram a citotoxicidade da nanoemulsão do isotiocianato de benzila, e observaram o efeito citotóxico contra células de câncer de mama.

O isotiocianato de benzila apresenta várias propriedades farmacológicas, embora sua dose considerada segura tenha sido registrada até 12 μM , relatórios indicam toxicidade em níveis acima de 200 mg/Kg em estudos realizados com ratos (Sundaram *et al.*, 2021).

Desse modo, diferentes métodos de extração de isotiocianato de benzila devem ser investigados para conseguir extratos com alto teor desse princípio ativo.

3.3.1 Métodos de extração

A operação unitária de extração tem por objetivo a separação de substâncias a partir de diversas matrizes, sejam líquidas ou sólidas, através de processos químicos, físicos ou mecânicos (EGGERS e JAEGER, 2003). A técnica empregada na obtenção dos extratos ricos ou pobres em isotiocianato de benzila influencia diretamente na qualidade e composição final do produto, ou seja, a definição do método de extração a ser utilizado bem como o solvente utilizado parte do tipo de compostos que se deseja obter, da quantidade de extrato volátil presente e de sua possível localização na planta.

O solvente mais utilizado em plantas extratoras de óleo é o hexano, uma vez que é um componente apolar com grande afinidade por outros compostos apolares o que possibilita um alto rendimento de extração, outra propriedade importante é o seu

baixo ponto de ebulição, facilitando sua separação e diminuindo a decomposição do óleo (FREITAS e LAGO, 2007).

O etanol, outro solvente com características interessantes, destaca-se por ser atóxico, em contrapartida apresenta dificuldade em extrair sozinho componentes oleosos, pois possui uma extremidade polar em sua estrutura o que possibilita a ligação de hidrogênio com compostos polares, como a água por exemplo (FREITAS e LAGO, 2007).

Como um solvente polar em temperatura ambiente, a água solubiliza principalmente compostos polares, em temperaturas mais altas ocorre a queda da polaridade da água, aumentando assim sua capacidade de solvatar compostos de polaridade média ou baixa (RODRIGUES *et al.*, 2019).

As técnicas de extração para matrizes vegetais podem ser classificadas como sólido-líquido e podem ser divididas em convencionais e não convencionais. Os métodos convencionais são conhecidos por se basear na aplicação de solventes orgânicos, calor ou agitação, como a extração assistida por ultrassom e Soxhlet, por exemplo. Os métodos não convencionais são as técnicas de extração que usam líquidos pressurizados, pulso elétrico, micro-ondas (HALL, 2018). A seguir será feita uma breve discussão sobre alguns métodos de extração mais utilizados.

A maceração é uma das formas mais tradicionais de extração, é um processo não seletivo e empregado principalmente quando o composto de interesse pode sofrer alteração pelo calor e são solúveis em temperatura ambiente. Consiste no contato direto entre solvente e matriz vegetal, em recipiente fechado com ou sem agitação (AZMIR *et al.*, 2013).

A extração por solvente orgânico é comumente usado para a extração de componentes lipofílicos através de sua solubilização. Os solventes utilizados devem apresentar seletividade, baixa temperatura de ebulição, ser quimicamente inerte e possuir baixo custo, geralmente hexano e propano são os solventes mais utilizados (BIASI E DESCHAMPS, 2009).

A técnica de extração assistida por ultrassom é considerada, ambientalmente amigável para a indústria devido às características atribuídas do ultrassom. Nesses processos, ondas mecânicas se propagam através do meio em ciclos de compressão e refração em frequências entre 20 kHz e 100 kHz, promovendo o fenômeno de cavitação, o qual melhora a transferência de calor e massa através da ruptura da parede celular, proporcionando uma boa eficiência de extração. Otimizando

parâmetros como frequência, potência e o tempo de ultrassom, é possível obter extrações de compostos de interesse com recuperações semelhantes às dos métodos clássicos (FERREIRA *et al.*, 2020).

A extração supercrítica é uma técnica que consiste na utilização de uma molécula em condições de pressão e temperatura que esteja acima de sua pressão e temperatura crítica como solvente de extração. Além disso, a ausência de luz e ar durante a extração reduz o risco de degradação. O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono (CO₂), por ser barato, atóxico, não inflamável e apresenta alta difusividade, devido a sua combinação de propriedades de líquido (capacidade de solvatação) e de vapor (alta penetrabilidade) que favorece a extração de óleos e facilmente separado do extrato (PRADHAN *et al.*, 2010).

A extração subcrítica com CO₂ opera de maneira semelhante à extração supercrítica de CO₂, a diferença é que na subcrítica a operação ocorre abaixo da temperatura e pressão críticas de CO₂, assim é capaz de reter a maioria dos componentes bioativos termicamente sensíveis nos materiais vegetais. Um óleo, por exemplo, extraído via subcrítica geralmente tem uma cor mais clara e contém menos ceras e resinas.

A hidrodestilação é uma técnica antiga e versátil que se fundamenta na diferença de composição dos constituintes presentes nas fases líquida e vapor, e que, devido a diferença de pressão de vapor desses constituintes na amostra é possível fazer uma separação dessas duas frações. A hidrodestilação pode ser realizada em aparelho tipo Clevenger, ou por arraste a vapor, dependendo do interesse do produto final (SILVEIRA, 2012).

Rafinska *et al.* (2019) avaliaram os efeitos de diferentes solventes (etanol 70% e 96%, água deionizada e CO₂) e técnicas de extração (maceração, fluido supercrítico e ultrassom) na composição e atividades biológicas de extratos de *Lepidium sativum* (agrião de jardim), e observaram que ambas as extrações com fluido supercrítico e maceração com água são as técnicas que apresentaram maior seletividade devido ao menor número de interferentes, apresentando 2,94 µg/g (broto seco à 50°C) e 3,82 (broto liofilizado) µg/g, respectivamente de isotiocianato de benzila.

Abdel-Kader *et al.* (2018) avaliaram a presença de isotiocianato de benzila em extratos de raízes de *Salvadora pérsica* utilizando extração a frio (maceração) e a quente (Soxhlet) e diferentes solventes (clorofórmio, acetona e etanol), como resultado para ambas as técnicas de extração o extrato com o solvente clorofórmio foi

que apresentou maior concentração de isotiocianato de benzila para raízes frescas e secas, 2,410% e 0,210%, respectivamente, pela técnica de maceração, já para soxhlet foi de 0,880% e 0,170% para raízes frescas e secas, respectivamente.

Getahun, Sharma e Gupta (2020) avaliaram a composição do óleo essencial de sementes de *Lepidium sativum* L. por diferentes métodos de extração, hidrodestilação por aparelho tipo Clevenger, destilação simples e destilação simultânea (água deionizada e éter dietílico), desses o método de hidrodestilação por destilação simultânea obteve maior concentração de isotiocianato de benzila, seguido pela destilação simples e por último por aparelho tipo Clevenger, 8,71, 3,64 e 1,19%, respectivamente.

A extração de uma matriz vegetal pode resultar em diferentes concentrações de isotiocianato de benzila dependendo do tipo de extração, solvente, parte vegetal, temperatura, tempo, dentre outros parâmetros que possam influenciar na concentração de isotiocianato de benzila. A Tabela 1 apresenta algumas concentrações de isotiocianato de benzila presentes em diferentes matrizes vegetais obtidas em diferentes condições e técnicas de extração.

Tabela 1- Concentração de isotiocianato de benzila extraído por diferentes métodos de extração.

Métodos de Extração	Material vegetal	Concentração de isotiocianato de benzila	Referências
Fluído supercrítico (T= 80 °C e P=100 bar)	Semente de mamão (<i>Carica papaya</i> Linn)	1,0 %	BARROSO <i>et al.</i> (2016)
Fluído supercrítico (T= 40 °C e P=150 bar)		11 %	
Hidrodestilação	Semente de mamão	99,36 %	HE <i>et al.</i> (2017)

(<i>Carica papaya</i> Linn)			
Destilação	Polpa (mamão verde)	85,6 %	NAKAMURA, MURATA e NAKAMURA (2019)
Maceração com água (t= 24 h e T= 50 °C)		2,04 µg/g	
Fluído supercrítico (T= 50 °C e P=10 MPa)	Sementes de <i>Lepidium sativum</i>	2,76 µg/g	RAFINSKA <i>et al.</i> (2019)
Ultrassom (etanol 96%) (t= 24 h, T= 50 °C e f= 45kHz)		2,08 µg/g	
Maceração com água (t= 24 h e T= 50 °C)	Broto de <i>Lepiduum sativum</i> seco à 50 °C	2,64 µg/g	RAFINSKA <i>et al.</i> (2019)
Fluído supercrítico (T= 50 °C e P=10 MPa)		2,94 µg/g	
Maceração com água (t= 24 h e T= 50 °C)	Broto de <i>Lepiduum sativum</i> liofilizado	3,82 µg/g	RAFINSKA <i>et al.</i> (2019)
Fluído supercrítico (T= 50 °C e P=10 MPa)		2,04 µg/g	

Ultrassom (etanol 96%) (t= 24 h, T= 50 °C e f= 45kHz)		2,04 µg/g	
Maceração (acetona)		0,120 %	ABDEL- KADER <i>et al.</i> (2019)
Maceração (clorofórmio)		2,410 %	
Maceração (etanol)	Raíz <i>Salvadora</i>	0,063 %	
Soxhlet (acetona)	<i>persica fresca</i>	0,110 %	
Soxhlet (clorofórmio)		0,880 %	
Soxhlet (etanol)		0,059 %	
Maceração (acetona)		0,037 %	
Maceração (clorofórmio)		0,210 %	
Maceração (etanol)	Raíz de <i>Salvadora</i>	0,040 %	ABDEL- KADER <i>et al.</i> (2019)
Soxhlet (acetona)	<i>persica seca</i>	0,061 %	
Soxhlet (clorofórmio)		0,170 %	
Soxhlet (etanol)		0,021 %	
Hidrodestilação		1,19 %	

Destilação simples	Sementes de <i>Lepidium sativum</i> L.	3,64 %	GETAHUN, SHARMA e GUPTA (2020)
Destilação simultânea		8,71 %	

Fonte: Barroso *et al.* (2016); He *et al.* (2017); Nakamura, Murata e Nakamura (2019); Rafinska *et al.* (2019); Abdel-Kader *et al.* (2019); Getahun, Sharma e Gupta (2020).

4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

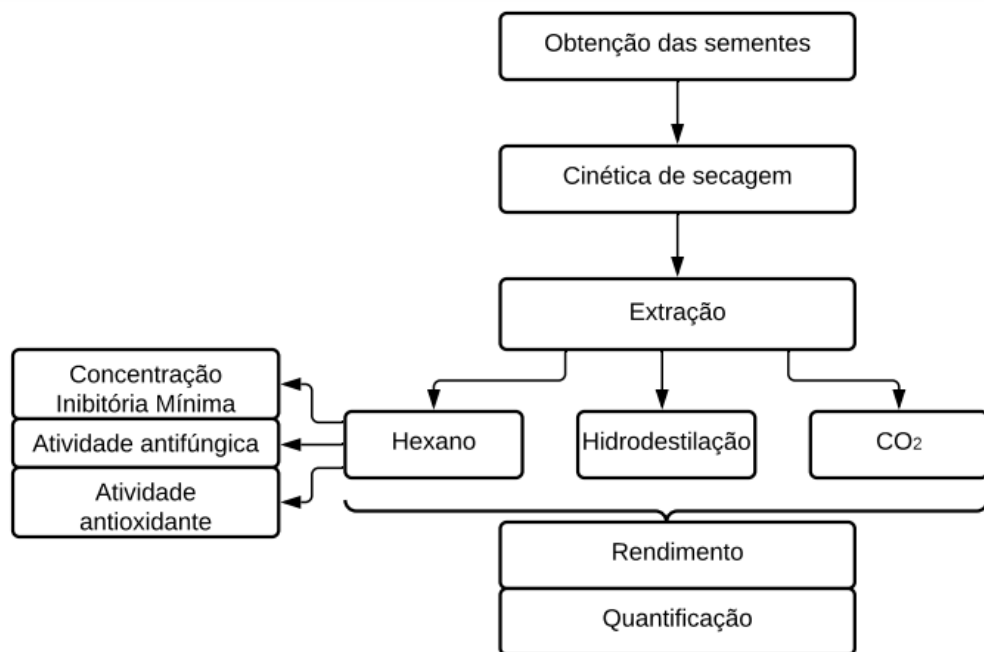
Considerando a semente de mamão um resíduo obtido tanto pelo processamento industrial quanto pelo consumo *in natura*, a semente tornou-se um alvo de estudo para extração de óleo, além disso apresenta em sua composição o isotiocianato de benzila, um composto volátil que possui propriedades biológicas e medicinais. Na literatura vários estudos foram realizados sobre a secagem das sementes em diferentes temperaturas e velocidade do ar, desses estudos poucos relatam a utilização de temperaturas mais brandas durante a secagem das sementes afim de preservar e obter um extrato com alto teor de isotiocianato de benzila.

A extração do princípio ativo da semente de mamão é uma etapa crucial para a obtenção de um produto final com alto teor da substância de interesse. Inúmeros trabalhos relatam a presença de isotiocianato de benzila nas sementes de mamão e em outras matrizes vegetais obtidos por diferentes técnicas de extração: fluido supercrítico, hidrodestilação, maceração, utilização de solventes orgânicos e ultrassom, algumas apresentando maiores concentrações, e outras apenas traços de isotiocianato de benzila. Na literatura não foram encontrados relatos sobre a utilização da técnica de extração com CO₂ subcrítico para obtenção do isotiocianato de benzila. Dessa forma, o estudo de aplicação da mesma pode torna-se uma alternativa para a obtenção de extratos com alto teor deste princípio ativo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção estão apresentados os materiais e métodos utilizados nos experimentos de cinética de secagem da semente de mamão, extração através das técnicas de Soxhlet, hidrodestilação e CO₂ subcrítico e quantificação do isotiocianato de benzila. Além das análises de rendimento, atividade antioxidante, concentração inibitória mínima (CIM), atividade antifúngica obtidos dos extratos hexanoicos da semente de mamão e do padrão de isotiocianato de benzila. Todos os experimentos foram realizados nos Laboratórios da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim. A Figura 3 demonstra um esquema das etapas realizadas experimentalmente neste trabalho.

Figura 3- Esquema das etapas experimentais realizadas no estudo.

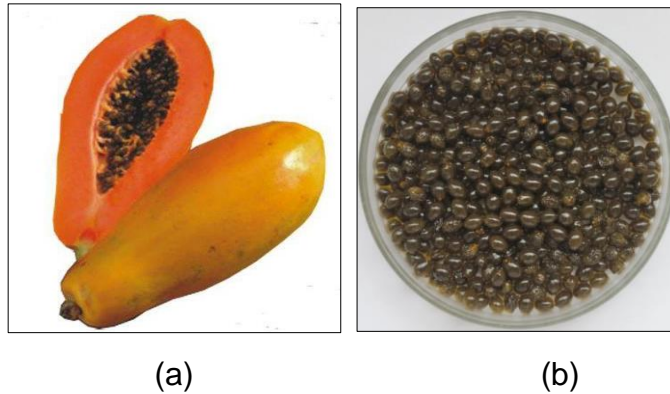


Fonte: Autora (2021).

5.1 Obtenção das sementes

Os frutos de mamão (*Carica papaya Linn*) do grupo Formosa foram obtidos ao longo do ano de 2020 no comércio local de Erechim – RS, sendo utilizados somente os frutos totalmente maduros (Figura 4).

Figura 4- Ilustração do estágio de maturação (a) e das sementes do mamão (b).



Fonte: Autora (2021).

Os mamões foram cortados ao meio, sementes retiradas e lavadas com água para a remoção de partes da polpa aderida. Após as sementes foram colocadas em uma peneira e friccionadas manualmente com auxílio de um pistilo para promover o rompimento da exotesta. Em seguida foi realizada uma nova lavagem em água corrente e as sementes foram dispostas em uma bandeja a temperatura ambiente (25°C) para retirada do excesso de água.

5.2 Cinética de Secagem

O teor de água inicial das sementes de mamão foi avaliado pelo método padrão em estufa com circulação e renovação de ar (MARCONI MA 037, Brasil) a 105 °C, por um período de 24 h, utilizando 4 g de sementes de mamão. As sementes foram distribuídas formando camadas uniformes em recipientes metálicos (4 cm x 3,5 cm) colocados na parte central da estufa. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata. As pesagens foram realizadas em balança analítica (Marte, Brasil) com precisão de 0,001 g.

Os estudos das cinéticas de secagem foram realizadas nas temperaturas de 45 e 55 °C, pois segundo Chielle *et al.* (2016) apresentam menor degradação dos componentes sensíveis ao calor. Quando o equipamento atinja a temperatura desejada as amostras eram introduzidas, para registrar a temperatura interna da estufa foi utilizado um termômetro de mercúrio (Incoterm L 0,27/12, Brasil).

Aproximadamente 10 g de sementes de mamão foram distribuídas em placas de Petri (9,2 cm x 1,8 cm), e a massa das mesmas foram medida em intervalos de

tempo pré determinados, sendo a cada 10 min durante 2 h, a cada 20 min durante 2 h e a cada 30 min até atingir massa constante.

Os dados experimentais da secagem das sementes de mamão foram ajustados para os modelos matemáticos apresentados na Tabela 2. Nas Equações 1, 2, 3 e 4 MR é a taxa de umidade (adimensional), k (min^{-1}) é a constante de secagem, t é o tempo e a , n são parâmetros do modelo.

Tabela 2- Modelos matemáticos utilizados.

Modelos	Equação	Número	Referências
Lewis	$MR = \exp(-k \cdot t)$	(1)	Bruce (1985)
Henderson e Pabis	$MR = a \cdot \exp(-k \cdot t)$	(2)	Henderson e Pabis (1961)
Page	$MR = \exp(-k \cdot t^n)$	(3)	Page (1949)
Overhults	$MR = \exp[-(k \cdot t)^n]$	(4)	Barrozo (1995)

Fonte: Autora (2021).

No presente estudo, os dados da perda de massa registradas em diferentes intervalos de tempo foram convertidas para dados de perda de umidade. A partir desses dados a taxa de umidade (MR) adimensional foi calculada conforme Equação (5).

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_i - M_e} \quad (5)$$

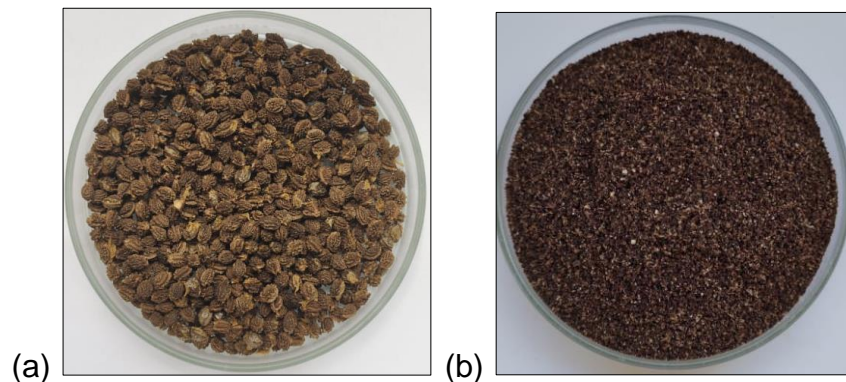
Onde M_t é o teor de umidade no tempo t , M_e é a umidade de equilíbrio e M_i é a umidade inicial da amostra.

Os parâmetros cinéticos foram determinados pelo ajuste dos modelos com os dados experimentais das curvas de secagem por meio de regressão não linear pelo método Quasi Newton, por meio do software Statistica versão 7.0 (Statsoft, EUA). O ajuste dos modelos foi avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2) e função objetiva (F_0).

5.3 Extração

As sementes secas nas diferentes temperaturas passaram pelo processo de moagem em moinho de facas (MARCONI MA 340) utilizando peneira de mesh 10 (1,70 mm) (Figura 5). Posteriormente, foram estudados as extrações com solvente hexano, hidrodestilação e extração com CO₂ subcrítico das sementes desidratadas a 45 e 55 °C.

Figura 5- Sementes de mamão (a) desidratada e (b) moídas.



Fonte: Autora (2021).

5.3.1 Extração com solvente

Para a extração por solvente, utilizou-se cartuchos de papel filtro contendo aproximadamente 20 g de amostra moída, os mesmos foram dispostos em aparelho tipo Soxhlet (Nova técnica, Brasil) (Figura 6) com solvente hexano (Química Moderna, Brasil) por um tempo de 2 h. Os extratos obtidos passaram por um processo de separação do solvente, em rotaevaporador com banho termostático (Marconi MA/20, Brasil) a 45 °C, em seguida foram acondicionados em frasco âmbar e armazenados à 4 °C até as análises.

Figura 6- Aparelho tipo Soxhlet utilizado na extração com solvente.



Fonte: Autora (2021).

5.3.2 Hidrodestilação

A extração por hidrodestilação foi realizada em aparelho tipo Clevenger (Figura 7) acoplado a um balão de fundo redondo de 5 L e manta de aquecimento. Ao balão foram adicionados, aproximadamente, 175 g de amostra moída e 2,5 L de água. O tempo de extração foi de 2h e 30 min. No topo da trava hidráulica foi adicionado 1 mL de hexano para melhorar a captura do do óleo essencial extraído. O extrato obtido foi acondicionado em eppendorf para posterior análise.

Figura 7- Aparelho tipo Clevenger utilizado para extração por hidrodestilação.



Fonte: Autora (2021).

5.3.3 Extração com CO₂ subcrítico

A extração com CO₂ subcrítico (Figura 8) foi realizada por meio da abertura da válvula com o gás CO₂ (White Martins com 99,8 % de pureza) usada para alimentação da bomba de pressurização do tipo seringa (Isco Model 500D).

Figura 8- Unidade de extração subcrítica.



Fonte: Autora (2021).

Atingindo a capacidade total da bomba a alimentação foi parada, e o sistema através do fechamento da válvula. Nesse momento começava a pressurização do

sistema até atingir a pressão desejada de 100 bar. Após, a válvula foi aberta para o fluido pressurizado alimentar a célula extratora e iniciar a pressurização da mesma, mantendo-se a válvula aberta até o final do processo de extração. Na célula extratora foram colocadas 20 g de sementes de mamão secas e moídas, com o fundo e o topo preenchidos com algodão para um melhor deslocamento do solvente dentro da unidade.

O processo de extração teve início a partir do momento em que a pressão no manômetro e a pressão da bomba se igualaram a 100 bar e a temperatura do banho ultratermoestático (Spencer, Brasil) atingiu 7 °C, sendo estas condições escolhidas por evitar a degradação do isotiocianato de benzila de acordo com Chielle et al. (2016). Os experimentos de extração utilizando CO₂ subcrítico foram realizados com fluxo de 1,45 mL/min e o tempo de extração dinâmica foi de 2h. O extrato foi coletado em frasco âmbar para posterior análise.

5.4 Rendimento

O rendimento das extrações com solvente, hidrodestilação e extração com CO₂ subcrítico foi obtido a partir da Equação 6 (BIMARK et al., 2012):

$$\text{Rendimento da extração (\%)} = \frac{\text{Quantidade de óleo}}{\text{Quantidade inicial de amostra}} \times 100 \quad (6)$$

5.5 Quantificação

O conteúdo de isotiocianato de benzila dos extratos resultantes dos diferentes processos de extração foram quantificados por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar DB5 (30 m x 0,025 mm x 0,25 µm de espessura de filme), detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 80 °C/ 5 min, 80-220°C (10°C/min), 220°C (10min), temperatura do injetor 80 °C, detector a 220 °C, modo de injeção split, razão de split 50:1, gás de arraste H₂ (56KPa), volume injetado 1 µL de amostra diluída em diclorometano (1:9). Para a quantificação do isotiocianato de benzila presente nos extratos foi utilizada uma solução do padrão de isotiocianato

de benzila (Sigma-Aldrich, 98%) com concentração conhecida (0,1 g/mL). A concentração de isotiocianato de benzila foi obtida a partir da Equação (7).

$$C_{\text{isotiocianato de benzila}} = \frac{m_{\text{isotiocianato de benzila}} \times 100}{m_{\text{inicial}}} \quad (7)$$

Onde $m_{\text{isotiocianato de benzila}}$ é a massa de isotiocianato de benzila (g) obtida a partir do volume de extrato e m_{inicial} é a massa de semente de mamão desidratada (g) utilizada para extração.

5.6 Concentração Inibitória Mínima

Para os testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de semente de mamão foram selecionados quatro micro-organismos, duas bactérias Gram-positivas, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e duas bactérias Gram-negativa, *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), obtidas da American Type Culture Collection (USA). As cepas foram crescidas previamente em meio Luria Bertani (LB) (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl) durante 24 h à 36 ± 1 °C em estufa bacteriológica (J.PROLAB JP 101, Brasil). Após esse período a suspensão bacteriana correspondeu a aproximadamente 10^8 células/mL.

O teste consistiu em microdiluições seriadas com caldo LB com 1% de Dimetilsufóxido (DMSO) em microplacas de ELISA até a obtenção das concentrações de 500, 400, 300, 250, 200, 150, 125 e 100 mg/mL para o extrato de semente de mamão. Para o teste com o padrão de isotiocianato de benzila as microdiluições seriadas se deram até a obtenção das concentrações de 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,15625, 0,07813, 0,03906, 0,01953 e 0,00977 mg/mL. Em seguida inoculou-se 10 µL de bactéria, efetuou-se a leitura (0 h) em leitor de microplaca ELISA (Bio Tek Instruments EL 800) no comprimento de 490 nm, e incubou-se a placa por 24 h a 36 ± 1 °C em estufa bacteriológica. Após esse período realizou-se a leitura (24 h) da microplaca e averiguou-se a diferença da densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano após 24 h (GAIO *et al.*, 2015). A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração do extrato e padrão em mg/mL, capaz de inibir o crescimento microbiano.

5.7 Atividade Antifúngica

A atividade antifúngica foi testada sobre três fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium crustosum*. As diluições do extrato foram realizadas em água destilada estéril com 1% de Tween 80, nas concentrações 50 e 25 mg/mL, e 0,25, 0,1 e 0,05 mg/mL para o padrão de isotiocianato de benzila, sendo agitadas por 3 minutos em agitador antes da sua utilização (LAUXEN, 2012). Os ensaios de avaliação da atividade antifúngica do extrato foram realizados pelo método de difusão em meio sólido utilizando cavidades em placa (HADACECK; GREGER, 2000).

Em um erlenmeyer com meio Ágar Batata Dextrose (PDA) fundido e resfriado a 40-45 °C adicionou-se suspensão fúngica, crescida em meio PDA, e plaqueou-se. Após a solidificação do ágar, foram feitas três cavidades com cânulas de vidro estéreis (6 mm de diâmetro) onde foi depositado 50 µL da solução com o extrato na concentração desejada, uma placa foi utilizada para realizar quatro cavidades, onde foi depositado 50 µL da solução com o extrato, 50 µL de Tween 80 (Vetec Química Fina, Brasil), utilizado como controle negativo, 50 µL de água estéril (controle negativo) e 50 µL de antifúngico comercial Canesten® 1% como controle positivo. Em seguida, incubou-se o sistema por 72 h a 28 °C em estufa (Tecnal, TE 392/2), sendo verificado a cada 24 h (LAUXEN, 2012).

Após término do período de incubação, foi medido o diâmetro total do halo e considerou-se como concentração inibitória mínima a concentração do extrato capaz de desenvolver um halo de inibição do crescimento fúngico maior ou igual a 10 mm de diâmetro (LIMA *et al.*, 2006). Os resultados foram expressos em milímetros pela média aritmética dos valores dos halos obtidos nas três repetições de cada fungo.

5.8 Atividade Antioxidante

O potencial antioxidante dos extratos da semente de mamão procedeu-se com a análise de 2,2- difenil-1-picril hidrazil (DPPH). Esta metodologia é baseada na medida da absorção do radical DPPH em 515 nm (VIGNOLI *et al.*, 2012) com modificações. A determinação da atividade antioxidante foi realizada em duplicata, por método espectrofotométrico. A técnica consistiu na incubação das amostras dos extratos da semente de mamão e padrão isotiocianato de benzila por 30 min, de

500 µL de uma solução etanólica de DPPH 0,1 mM com soluções contendo concentrações decrescente de extratos em etanol. A solução denominada “branco” (sem amostra e sem DPPH), e a solução controle (mistura de etanol-DPPH) foram preparadas. A determinação da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível (Logen Scientific UV/VIS - LS7052) em comprimento de onda de 515 nm. A atividade de captura de radicais pelos extratos foi obtida pela Equação 8.

$$AA\% = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco})x100] \div Abs_{controle}\} \quad (8)$$

Onde, $Abs_{amostra}$ é a absorbância da amostra, Abs_{branco} é a absorbância do branco e $Abs_{controle}$ é a absorbância do controle.

Após a avaliação da faixa de concentração ideal, calculou-se, por análise de regressão linear, a concentração de extrato necessário para capturar 50% do radical livre DPPH (IC_{50}) (CARBONARI, 2005).

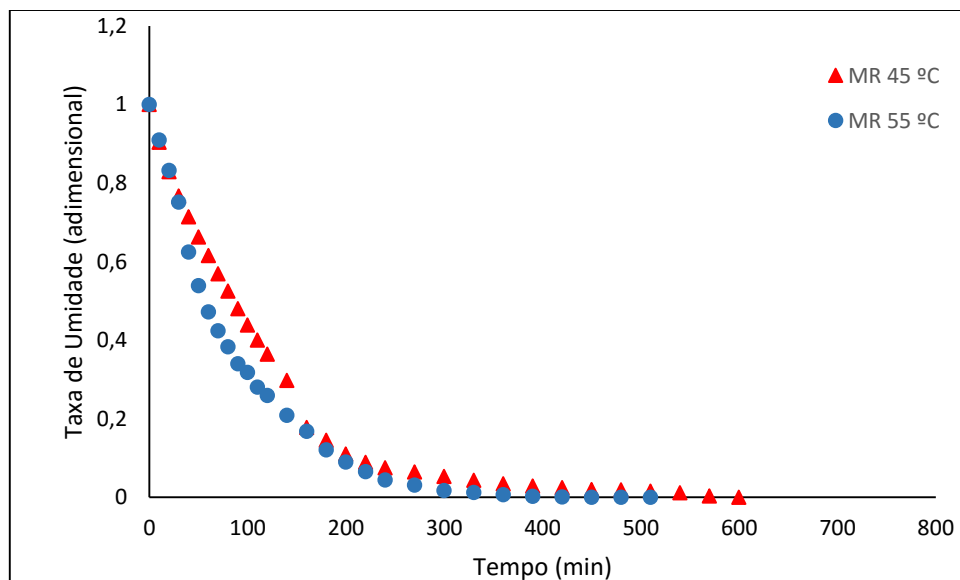
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos, de forma a mencionar qual modelo matemático melhor se ajustou na secagem das sementes, os teores de isotiocianato de benzila em diferentes extratos, bem como as atividades biológicas realizadas com o extrato hexanoico e padrão de isotiocianato de benzila.

6.1 Cinética de secagem

As curvas da taxa de secagem nas temperaturas de 45 e 55 °C estão apresentadas na Figura 9. Observa-se que quanto maior a temperatura menor o tempo de secagem das sementes de mamão. O tempo necessário para reduzir o teor de água das sementes de mamão de $49,9 \pm 1,2$ % b.u. para 0,094 % b.u. foi de 600 min na secagem a 45 °C, a partir do tempo de 540 min observa-se a taxa de secagem mais estável. Com o aumento da temperatura para 55 °C, verificou-se uma redução no tempo de secagem para 510 min, logo a taxa de secagem foi observada em um tempo de 420 min.

Figura 9- Relação da taxa de umidade das sementes em relação ao tempo.



Fonte: Autora (2021).

Os modelos, as constantes e os coeficientes utilizados para representar as curvas cinéticas secagem das sementes de mamão e os resultados estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3- Parâmetros cinéticos para secagem das sementes de mamão e modelos utilizados.

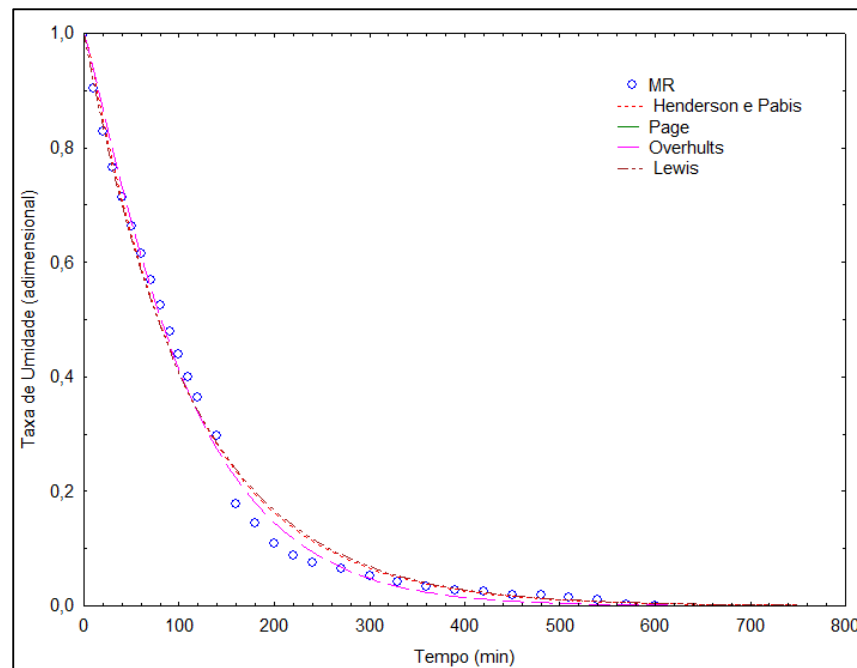
Modelos	T (°C)	K (min⁻¹)	R²	Fo
Lewis	45	0,00896	0,9923	0,02329725
	55	0,01171	0,9968	0,00737403
Henderson e Pabis	45	0,00918	0,9927	0,02369169
	55	0,01201	0,9973	0,00615483
Page	45	0,00492	0,9953	0,01414643
	55	0,00963	0,9973	0,00627144
Overhults	45	0,00896	0,9953	0,01414600
	55	0,01169	0,9973	0,00627142

Fonte: Autora (2021).

Para todos os modelos observa-se que a constante de secagem (k) aumenta conforme o aumento da temperatura de secagem, o que é esperado, já que a perda da umidade ocorre a uma taxa maior em temperaturas mais elevadas.

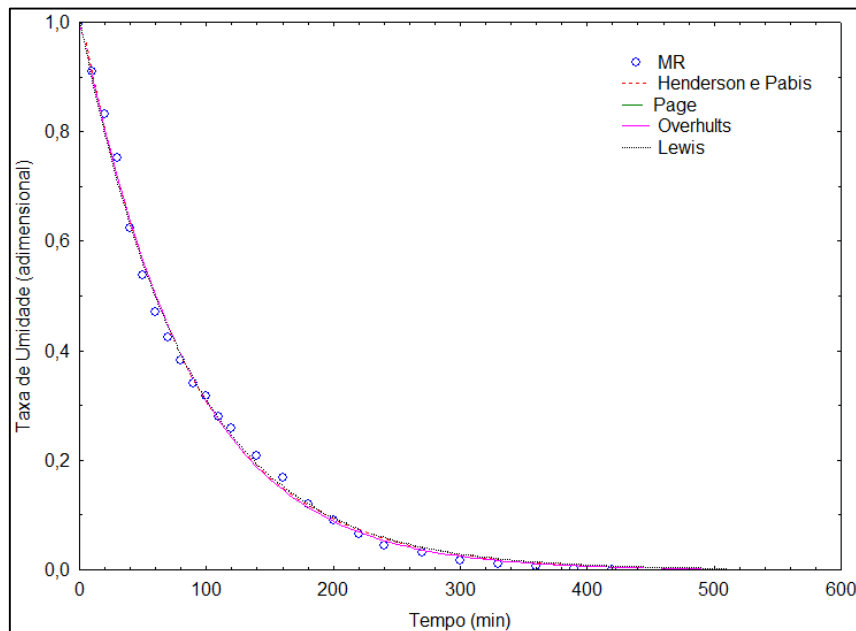
A partir da análise da Tabela 3 e Figuras 10 e 11, observa-se que os quatro modelos matemáticos apresentaram um ajuste muito próximo aos dados experimentais. O modelo de Lewis que tende ser mais distante dos dados ajustados, devido ao fato deste possuir apenas um termo para ajuste. O modelo de Henderson e Pabis apresentou ajustes satisfatórios em relação ao modelo de Lewis, obtendo valores do coeficiente de determinação (R^2), acima de 0,99, além de valores menores de Fo. Os modelos de Overhults e Page foram os modelos que proporcionaram coeficiente de determinação (R^2) maiores e iguais para ambas as temperaturas de 45 e 55 °C, variando de 0,9953 a 0,9973, respectivamente. Quando comparados com o valor da função objetiva (Fo) o modelo de Overhults apresenta os menores valores de resíduos, ajustando melhor aos dados experimentais. Logo, o modelo de Overhults atendeu tanto a análise de Fo quanto a análise de R^2 , sendo o mais adequado para representar a cinética de secagem das sementes de mamão.

Figura 10- Ajuste aos modelos matemáticos da cinética de secagem da semente de mamão para temperatura de 45 °C.



Fonte: Autora (2021).

Figura 11- Ajuste aos modelos matemáticos da cinética de secagem da semente de mamão para temperatura de 55 °C.



Fonte: Autora (2021).

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os encontrados por Chielle *et al.* (2016) onde o modelo matemático mais adequado para representar as

curvas de secagem de sementes de mamão pela taxa de secagem (MR) e curvas cinéticas de secagem foi de Overhults. Keneni, Hvoslef-Eide e Marchetti (2019) avaliaram a modelagem matemática da cinética de secagem de sementes de *Jatropha curcas L.* em cinco temperaturas, 313, 323, 333, 343 e 353 K. A perda de umidade foi registrada e ajustado para quatro modelos semi-teóricos Lewis, Henderson e Pabis, Page e Avhad e Marchetti. Dos modelos testados, o Avhad e Marchetti apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais com R^2 variando de 0,9914 a 0,9969 e 0,9908 a 0,9917 para as sementes inteiras e esmagadas de *Jatropha*, respectivamente, e para todas as temperaturas testadas.

O modelo matemático de Overhults apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais de taxa de secagem das sementes de mamão, esse fato pode estar relacionado ao número de parâmetros utilizados (k, n) quando comparado ao modelo de Lewis, que leva em consideração apenas o parâmetro k.

6.2 Rendimento

A Tabela 4 apresenta os rendimentos das extrações obtidas com solvente, hidrodestilação e extração com CO₂ subcrítico das sementes de mamão desidratadas a 45 e 55 °C.

Tabela 4- Rendimentos dos extratos das sementes de mamão desidratadas a 45 e 55 °C obtidos por fluido CO₂ subcrítico, hidrodestilação e extração com hexano.

Método de extrações	Rendimento (%)	
	45 °C	55 °C
Fluído CO ₂ subcrítico	1,4	0,7
Hidrodestilação	1,3	1,3
Hexano	34,2	33,2

Fonte: Autora (2021).

A extração com hexano em aparelho tipo Soxhlet apresentou maior rendimento, 34,2 % e 33,2 %, em ambas temperaturas de secagem das sementes de mamão, 45 °C e 55 °C, respectivamente (Tabela 4). Esses valores são maiores do que encontrados por Hall *et al.* (2018), que obtiveram rendimento de 24,3 ± 0,7 % e Lee,

Lee e Su (2011) que obtiveram $28,5 \pm 6,0$ % de rendimento utilizando sementes de mamão secas à 40 °C com hexano.

O maior rendimento de extração com hexano pode ser explicado pelo fato do hexano ser um solvente apolar, capaz de extrair além de isotiocianato de benzila todos os outros metabólitos secundários de baixa polaridade presentes na semente de mamão, tais como ácidos graxos, terpenoides de alto peso molecular, ceras entre outros.

A temperatura de secagem das sementes não influenciou no rendimento da extração por hidrodestilação, a qual obteve 1,3 % em ambas temperaturas avaliadas. O rendimento encontrado foi maior ao reportado por He *et al.* (2017) que obtiveram 0,2 % de rendimento na extração por hidrodestilação a partir de sementes de mamão secas à 60 °C. O maior rendimento nesse estudo pode ser atribuído ao fato de ter sido utilizado 1 mL de hexano para melhorar a captura do óleo essencial obtido. Getahun, Sharma e Gupta (2020) também avaliaram o rendimento de sementes de *Lepidium sativum* L. (agrião de jardim) pelos métodos de hidrodestilação por destilação simultânea, destilação simples e por aparelho tipo Clevenger e obtiveram 3,32, 2,71 e 2,13 % de rendimento, respectivamente.

Os extratos obtidos a partir das sementes desidratadas à 45 °C usando CO₂ subcrítico apresentaram o dobro de rendimento em relação aos extratos das sementes desidratadas à 55 °C. Rodrigues *et al.* (2019) realizaram extração de sementes de mamão desidratadas à 45 °C utilizando água subcrítica (T= 150 °C e P= 10MPa) e obtiveram maior rendimento, $26,3 \pm 0,6$ %, quando utilizaram a temperatura de 150 °C para a extração. Hall *et al.* (2018) encontraram rendimento de 21,6 % usando CO₂ supercrítico para extratos de sementes de mamão a temperatura 40 °C de e pressão de 30 MPa. Como no presente estudo a extração com CO₂ foi realizada a baixa temperatura (7 °C), e o solvente (CO₂) pode ter contribuído na maior seletividade dos compostos extraídos e interferido no menor rendimento.

A partir dos resultados obtidos, o extrato hexanoico foi selecionado para realizar as atividades biológicas por apresentar maior rendimento em relação aos outros métodos de extração.

6.3 Quantificação

Os cromatogramas dos extratos das sementes do mamão obtidos por extração com CO₂ subcrítico, hidrodestilação e extração com hexano estão apresentados no Apêndice A.

A Tabela 5 apresenta a concentração de isotiocianato de benzila obtido nas diferentes extrações. Observa-se que a temperatura de secagem da semente de mamão influenciou na concentração obtida de isotiocianato de benzila nas diferentes extrações. A maior concentração foi obtida pela extração subcrítica 0,0781 e 0,0322 g de isotiocianato de benzila/100 g em 45 °C e 55 °C, respectivamente. A menor concentração encontrada foi na extração por hidrodestilação com secagem de semente de mamão à 55 °C, com 0,0026 g de isotiocianato de benzila/100 g.

Essa maior concentração encontrada na extração com fluido subcrítico pode ser devido a baixa temperatura empregada, levando a preservação do conteúdo fenólico, assim apresentando uma maior quantidade de compostos bioativos, como o isotiocianato de benzila.

Tabela 5- Concentração do isotiocianato de benzila nos diferentes extratos das sementes de mamão desidratadas à 45 e 55 °C.

Método de extrações	Concentração de isotiocianato de benzila (g/100g)	
	45 °C	55 °C
Fluído CO ₂ subcrítico	0,0781	0,0322
Hidrodestilação	0,0316	0,0026
Hexano	0,0322	0,0063

Fonte: Autora (2021).

Observa-se que a temperatura de secagem, assim como a temperatura de extração, influenciaram no teor de isotiocianato de benzila nos extratos, sendo que a maior concentração foi encontrada nos extratos obtidos por extração subcrítica (temperatura de extração 7 °C) a partir de sementes desidratadas à 45 °C e a menor concentração encontrada nos extratos obtidos por hidrodestilação (temperatura de extração 100 °C) a partir das sementes desidratadas à 55 °C. Esse fato pode ser

explicado pela baixa estabilidade térmica e alta volatilidade do nosso composto de interesse.

Barroso *et al.* (2016) avaliaram a composição do óleo extraído das sementes de mamão com CO₂ supercrítico em diferentes condições de temperatura (40, 60 e 80 °C) e pressão (100, 150 e 200 bar), as concentrações de isotiocianato de benzila variaram de 1 % (T= 80 °C e P= 100 bar) a 11 % (T= 40 °C e P= 150 bar). He *et al.* (2017) obtiveram 99,36 % de isotiocianato de benzila a partir do óleo essencial de semente de mamão obtido por hidrodestilação. Nakamura, Murata e Nakamura (2019) a partir da extração por destilação da polpa do mamão verde obtiveram 85,6 % de isotiocianato de benzila. No nosso estudo a concentração encontrada por hidrodestilação refere-se a quantidade de isotiocianato de benzila presente em 100 g de sementes desidratadas, já nos estudos citados acima, a concentração de isotiocianato de benzila é maior pois se refere ao extrato obtido.

Estudos realizados com sementes de *Lepidium sativum* L. apresentaram diferentes concentrações de isotiocianato de benzila dependendo do método de extração, Getahun, Sharma e Gupta (2020) avaliaram pelo método de hidrodestilação, destilação simples e destilação simultânea e obtiveram 1,19, 3,64 e 8,71 % de isotiocianato de benzila, Rafinska *et al.* (2019) pelos métodos de maceração com água, fluido supercrítico e ultrassom (etanol 96%) obtiveram 2,04, 2,76 e 2,08 µg/g respectivamente.

A maior concentração de isotiocianato de benzila obtido no extrato de CO₂ subcrítico pode ser atribuída ao fato de utilizar temperatura mais baixa na extração, preservando o composto de interesse. Desse modo, pode ser utilizado como um método alternativo na obtenção de isotiocianato de benzila em sementes de mamão desidratadas.

6.4 Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi avaliada no extrato hexanoico de semente de mamão obtidas nas temperaturas de secagem de 45 e 55 °C (Tabela 6).

Tabela 6- Concentração inibitória mínima do extrato hexanoico e do padrão isotiocianato de benzila.

Bactérias	Extrato hexanoico (mg/mL)		Padrão (mg/mL)
	45 °C	55 °C	Isotiocianato de benzila
Gram negativas			
<i>Escherichia coli</i>	400	250	0,625
<i>Salmonella choleraesuis</i>	300	400	2,5
Gram positivas			
<i>Staphylococcus aureus</i>	200	200	0,625
<i>Listeria monocytogenes</i>	400	250	5

Fonte: Autora (2021).

Ambos os extratos hexanoicos obtidos, independentemente da temperatura de secagem da semente de mamão, foram mais ativos para as bactérias Gram-positivas, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, porém na temperatura de 55 °C há uma maior inibição desse grupo de bactérias.

Al-Judaibi *et al.* (2015) compararam a atividade antimicrobiana (CIM) em três diferentes extratos, metanólico, etanólicos e aquoso, para as sementes de mamão, e observaram os extratos foram mais efetivos contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, com concentração inibitória mínima de 8, 8 e 32 μ L para extratos metanólicos, etanólicos e aquoso, respectivamente, já para *E. coli* a concentração inibitória mínima foi de 4, 4 e 32 μ L para extratos metanólicos, etanólicos e aquoso, respectivamente.

O mesmo foi relatado por Tumpa *et al.* (2015) utilizando extrato metanólico observou que ambos os extratos da fruta e sementes de mamão foram mais ativos para bactérias gram positivas, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*, do que para Gram-negativas *E. coli* e *S. typhi*. Quando maior a concentração do extrato maior foi a inibição do crescimento das bactérias, assim a melhor concentração do extrato metanólico foi de 25 μ L.

As bactérias Gram-positivas diferencia-se das bactérias Gram-negativas pela parede celular, a qual é responsável pela forma, rigidez bacteriana, divisão celular e manutenção osmótica, formada por um complexo macromolecular conhecido como peptidoglicano. Nas bactérias Gram-negativas esse complexo representa uma menor

fração em relação as gram positivas, porém na parede celular das gram negativas é quimicamente mais complexa, possuindo maior quantidade de aminoácidos e de lipídeos. Sua fração de lipossacarídeo externa determina sua toxigenicidade e antigenicidade, essa porção característica para Gram-positivas é dos ácidos teicoicos. Assim o extrato hexanoico pode ser considerado mais ativo para as bactérias Gram-positivas.

O padrão isotiocianato de benzila mostrou-se muito mais eficiente contra todas as bactérias testadas especialmente contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, ambos na concentração de 0,625 mg/mL. A maior concentração de isotiocianato de benzila foi de 5 mg/ml para a bactéria *L. monocytogenes*.

A baixa atividade antimicrobiana do extrato hexanóico contra bactérias testadas em relação ao padrão pode ser explicada pelo fato que o mesmo possui baixa concentração do princípio ativo quando comparado com extrato obtido por CO₂ subcrítico (Tabela 5). Infelizmente por causa de baixíssimo rendimento (Tabela 3) não foi possível realizar os ensaios com outros dois extratos.

6.5 Atividade antifúngica

Os resultados da atividade antifúngica do extrato hexanoico obtidos das sementes de mamão desidratadas a 45 e 55 °C estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Atividade antifúngica do extrato hexanoico obtido na secagem de 45 e 55 °C.

Extrato (mg/mL)	Halo de inibição (mm)		
	<i>A. alternata</i>	<i>A. flavus</i>	<i>P. crustosum</i>
	45 °C		
50	6 ± 0,1	17,3 ± 3,8	30 ± 1,0
25	-	11,3 ± 0,6	-
	55 °C		
50	-	17,3 ± 0,6	19 ± 1,0
25	-	-	13 ± 1,4

Fonte: Autora (2021).

O fungo *A. alternata* não apresentou atividade antifúngica em nenhuma das concentrações de extrato hexanoico utilizadas (Tabela 7) e temperatura de secagem da semente não mostrou influência na atividade antifúngica. Para os fungos *A. flavus* e *P. crustosum* houve atividade antifúngica.

Com temperatura de secagem da semente à 45 °C, *A. flavus* e *P. crustosum* apresentaram formação de halo de inibição em 100 % (50 mg/mL), sendo mais efetivo para *P. crustosum*, enquanto que em 50 % (25 mg/mL) houve formação de halo apenas para *A. flavus*. Já para a temperatura de secagem da semente à 55 °C, o processo foi inverso, *P. crustosum* apresentou formação de halo de inibição nas concentrações de 100 e 50 %, 50 e 25 mg/mL, respectivamente, enquanto que para *A. flavus* houve formação de halo de inibição apenas na concentração de 50 mg/mL.

He *et al.* (2017) avaliaram atividade antifúngica do óleo essencial de semente de mamão, o qual apresentou efeito inibitório contra todas as cepas de *Candida* testadas, (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*) com halos de inibição entre 14,2 a 33,2 mm e com concentração fungicida mínima entre 16 e 64 µg/g.

Em todas as concentrações utilizadas para o padrão isotiocianato de benzila (0,25, 0,1 e 0,05 g/mL) não houve crescimento dos fungos *A. alternata*, *P. crustosum* e *A. flavus*. A fácil volatilização do isotiocianato de benzila pode estar relacionada a inibição do crescimento dos fungos testados.

Saladino *et al.* (2017) avaliaram o potencial antifúngico dos isotiocianatos de alila, fenila e benzila em fatias de pão inoculadas com *Aspergillus parasiticus*, fungo produtor de aflatoxinas, todos os tratamentos obtiveram redução de 60% do conteúdo de aflatoxinas em concentrações variando de 0,5, 1 e 5 µL/L dos isotiocianatos de alila, fenila e benzila.

Azaiez *et al.* (2013) determinaram o efeito dos isotiocianatos de alila, benzila e fenila sobre a estabilidade das fumonisinas (FB₁, FB₂) produzidas por diversas cepas de *Fusarium spp.*, usando soluções aquosas tamponadas em três níveis de pH 4, 7 e 9 juntamente com 1 mg/mL de isotiocianato, observaram que a redução de FB₁ e FB₂ devido à reação dos isotiocianatos foi dependente do pH. Dos três isotiocianatos testados o de benzila reagiu igualmente em todos os níveis de pH para FB₁ (81,3 ± 1,5 % - 89 ± 1,6 %) e melhor para FB₂ quando aplicado em pH extremos (pH= 9 - 86,3 ± 2,0 % e pH= 4 - 95,7 ± 2,2 %).

6.6 Atividade antioxidante

Os resultados de atividade antioxidante obtidos através da extração por solvente das sementes de mamão utilizando radical estável 1, 1- difenil-2picril-hidrazila (DPPH) expressos IC_{50} (mg/mL) estão apresentados na Tabela 8. Uma curva de atividade antioxidante de cada extrato das sementes de mamão está apresentada no Apêndice B.

Tabela 8- Atividade antioxidante dos extratos hexanoicos expressos em IC_{50} (mg/mL) obtidos das sementes de mamão desidratadas à 45 e 55 °C.

Extrato hexanoico	IC_{50} (mg/mL)
45 °C	48,8 ± 0,47
55 °C	54,6 ± 2,12

Fonte: Autora (2021).

Este estudo apresentou altos valores de IC_{50} , sugerindo que o extrato hexanoico de semente de mamão possui baixa atividade antioxidante, e o padrão de isotiocianato de benzila não apresentou atividade antioxidante nas concentrações testadas. Observa-se que a temperatura de secagem das sementes influencia na atividade antioxidante.

Samaram *et al.* (2015), investigaram os efeitos da extração de ultrassom quanto a atividade antioxidante do óleo de semente de mamão. E obtiveram melhores resultados de atividade antioxidante quando a extração ocorreu em temperatura mais elevada e menor proporção de solvente e amostra, nessas condições conseguiram atividade antioxidante de 88,1 ± 0,8 %.

Rodrigues *et al.* (2019) utilizou extração subcrítica com água em sementes de mamão e avaliou atividade antioxidante. Em seu estudo obteve maior atividade antioxidante quando utilizou as temperaturas de 70 e 90 °C, com 4,1 ± 0,1 e 3,4 ± 0,4 µg/mL, respectivamente.

Considerando as temperaturas de secagem da semente de mamão, o extrato hexanoico obtido a partir de sementes desidratadas à 45 °C apresentou a melhor atividade antioxidante (48,8 ± 0,47 mg/mL) devido a menor degradação dos compostos presentes.

7 CONCLUSÃO

A temperatura de secagem das sementes de mamão de 55 °C reduziu significativamente o tempo de secagem das sementes e apresentou maior valor para constante de secagem, e o modelo matemático que melhor ajustou os dados experimentais foi de Overhults para ambas temperaturas de 45 e 55 °C.

O maior rendimento foi constatado na extração por Soxhlet utilizando hexano como solvente (34 %), com sementes desidratadas à 45 °C. A temperatura de secagem das sementes de mamão influenciou na concentração do isotiocianato de benzila presentes nos extratos estudados, a melhor técnica para a obtenção de maior concentração do isotiocianato de benzila foi a extração com CO₂ subcrítica (T= 7 °C e P= 100 bar) com 0,0781 g de isotiocianato de benzila/ 100 g de sementes de mamão desidratadas à 45 °C.

A concentração inibitória mínima do extrato hexanoico foi mais efetiva para as bactérias gram positivas, variando de 200 a 400 mg/mL, sendo mais efetiva na temperatura de 55 °C de secagem das sementes de mamão. O padrão isotiocianato de benzila foi mais efetivo para bactérias gram negativas nas concentrações de 2,5 e 0,625 mg/mL, para *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*, respectivamente.

O extrato hexanoico não apresentou atividade antifúngica para *Alternaria alternata*, em ambas temperaturas de 45 e 55 °C de secagem de sementes de mamão. A partir das sementes desidratadas à 45 °C, o extrato hexanoico apresentou atividade antifúngica nas concentrações de 50 e 25 mg/mL para *Aspergillus flavus* e para *Penicillium crustosum* apenas na concentração de 50 mg/mL. Para o extrato hexanoico obtido a partir de sementes de mamão desidratadas à 55 °C a atividade antifúngica foi efetiva nas duas concentrações para *Penicillium crustosum* e para *Aspergillus flavus* apenas na concentração de 50 mg/mL. O padrão isotiocianato de benzila apresentou atividade antifúngica, inibindo o crescimento dos fungos testados para ambas concentrações.

A atividade antioxidante sofreu influência da temperatura de secagem das sementes de mamão, assim o extrato obtido a partir de sementes desidratadas à 45 °C apresentou melhor atividade antioxidante.

Assim, o extrato obtido a partir de sementes desidratadas à 45 °C foi considerado o melhor em relação a extração, rendimento, quantificação e atividades biológicas avaliadas, além disso a extração subcrítica com CO₂ mostrou-se ser uma nova alternativa para extração e obtenção de extratos com maior teor de isotiocianato de benzila.

8 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar a extração do óleo de semente de mamão por extração com CO₂ subcrítica, bem como diferentes solventes;
- Avaliar a toxicidade do isotiocianato de benzila;
- Avaliar a atividade antifúngica do isotiocianato de benzila por volatilização;
- Desenvolver um método para identificação e quantificação do isotiocianato de benzila presente no mamão (*Carica papaya Linn*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-KADER, M. S.; KHAMIS, E. H.; FOUDAH, A. I.; ALQARNI, M. H. GC quantitative analysis of benzyl isothiocyanate in *Salvadora persica* roots extract and dental care herbal products. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 462-466, 2018.
- ANWAR, M.; RASUL, M. G.; ASHWATH, N. Production optimization and quality assessment of papaya (*Carica papaya*) biodiesel with response surface methodology. **Energy Conversion and Management**, v. 156, p. 103-112, 2018.
- AL-JUDAIBI, A. Comparative study of plant extracts as broad-spectrum antibacterial agents. **International Journal of Engineering and Science**, v. 5, n. 7, p. 27–33, 2015.
- AZAIÉZ, I.; MECA, G.; MANYES, L.; LUCIANO, F. B.; FERNÁNDEZ-FRANZON, M. Study of the chemical reduction of the fumonisins toxicity using allyl, benzyl and phenyl isothiocyanate in model solution and in food products. **Toxicon**, v. 63, p. 137-146, 2013.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426–436, 2013.
- BARROSO, P. T. W.; CARVALHO, P. P.; ROCHA, T. B.; PESSOA, F. L. P.; AZEVEDO, D. A.; MENDES, M. F. Evaluation of the composition of *Carica papaya* L. seed oil extracted with supercritical CO₂. **Biotechnology Reports**, v. 11, p. 110–116, 2016.
- BARROZO, M. A. S. Transferência de calor e massa entre o ar e sementes de soja em leito deslizante e escoamento cruzado. Tese de Doutorado em Engenharia Química- Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 163p., 1995.
- BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda.
- BRUCE, D. M. Exposed-layer barley drying, three models fitted to new data up to 150°C. **Journal of Agricultural Engineering**, v. 32, p. 337-347, 1985.
- CARBONARI, K.A. Avaliação do potencial antioxidante (in vitro e in vivo) e anti-inflamatório de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifoliae* *Marlierea obscura*. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)** – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- CEAGESP. **Mamão**. São Paulo. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/entrepostos/servicos/hortiescolha/mamao/>. Acesso em: 22 de abril de 2020.

CHIELLE, D. P.; BERTUOL, D. A.; MEILI, L.; TANABE, E. H.; DOTTO, G. L. Convective drying of papaya seeds (*Carica papaya* L.) and optimization of oil extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 221-228, 2016.

FAHEY, J. W.; ZALCMANN, A. T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 5–51, 2001.

CLARKE, D. B. Glucosinolates, structures and analysis in food. **Analytical Methods**, v. 2, n. 4, p. 310-325, 2010.

FAO. **FAOSTAT. Production.** 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 24 de abril de 2020.

FERREIRA, B. L.; BEIK, J. V.; ALVES, S. J. Z.; HENRIQUE, F. A.; CHORNOBAI, C. A.; BOWLES, S.; CHAVES, E. S. Extração assistida por ultrassom para determinação de lipídeos em alimentos: um experimento de laboratório. **Química Nova**, v. 43, n. 9, p. 1320-1325, 2020.

FREITAS, S. P.; LAGO, R. C. A.; Equilibrium data for the extraction of coffee and sunflower oils with ethanol. **Brazilian Journal of Food Technol.** Campinas, v. 10, n. 3, p. 220-224, jul./set. 2007.

GAIO, I. et al. Antibacterial activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) in Italian-type sausage. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 10, p. 323–329, 2015.

GARMUS, T. T.; BEZERRA, J. R. M. V.; RIGO, M.; CÓRDOVA, K. R. V. Elaboração de biscoitos com adição de farinha de casca de batata (*Solanum tuberosum* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindústria**, v. 3, n. 2, p. 56-65, 2009.

GETAHUN, T.; SHARMA, V.; GUPTA, N. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of oils obtained by different extraction methods from *Lepidium sativum* L. seeds. **Industrial Crops & Products**, v. 156, p. 1-9, 2020.

HABTEMARIAM, S. The chemical and pharmacological basis of papaya (*Carica papaya* L.) as potential therapy for type-2 diabetes and associated diseases. *In: Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases*. [S. l.: s. n.], 2019. cap. 11, p. 333-363.

HADACECK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemistry Anal**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HALL, R. M. Simulating large scale SFE applied to recover bioactive compounds from papaya seeds. **The Journal of Supercritical Fluids**, n. 140, p. 302-309.

HE, X.; MA, Y.; YI, G.; WU, J.; ZHOU, L.; GUO, H. Chemical composition and antifungal activity of *Carica papaya* Linn seeds essential oil against *Candida* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 350–354, 2017.

HENDERSON, S. M.; PABIS, S. Grain drying theory. II temperature effects on drying coefficients. **Journal of Agricultural**, v. 44, p. 1111-11-22, 1961.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Produção agrícola- Lavoura permanente**. 2018. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/0>. Acesso em: 23 de abril de 2020.

JORGE, N.; MALACRIDA, C. R. Extratos de sementes de mamão (*Carica papaya L.*) como fonte de antioxidantes naturais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 3, p. 337-340, 2008.

KENENI, Y. G.; HVOSLEF-EIDE, A. K.; MARCHETTI, J. M. Mathematical modelling of the drying kinetics of *Jatropha curcas L.* seeds. **Industrial Crops & Products**, v. 132, p. 12-20, 2019.

KERMANSYAI, R.; McCARRY, B. E.; ROSENFELD, J.; SUMMERS, P. S.; WERETILNYK, E. A.; SORGER, G. J. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. *Phytochemistry*, n. 57, p. 427-435, 2001.

KUANG, Y. F.; CHEN, Y. H. Induction of apoptosis in a non-small cell human lung cancer cell line by isothiocyanates is associated with P53 and P21. **Food and Chemical Toxicology**, n. 10, v. 42, p. 1711-1718, 2004.

LAUXEN, F.R. **Estudo do efeito repelente, inseticida e antifúngico do óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. no controle de insetos e fungos em grãos armazenados**. 2012. p.64. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2012.

LEE, W.J.; LEE, M. H.; SU, N. W. Characteristics of papaya seed oils obtained by extrusion–expelling processes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2348-2354, 2011.

LIU, Y.; ZHANG, L.; MENG, Y.; HUANG, L. Benzyl isothiocyanate inhibits breast cancer cell tumorigenesis via repression of the FoxH1-Mediated Wnt/-catenin pathway. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, 2015.

MELO, M. L. S. Caracterização, estabilidade oxidativa e determinação do potencial energético do biodiesel derivado do mamão (*Carica papaya L.*): uma fonte não convencional. 2010. 130 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2010.

NAKAMURA, T.; MURATA, Y.; NAKAMURA, Y. Characterization of benzyl isothiocyanate extracted from mashed green papaya by distillation. **Food Chemistry**, v. 299, p. 1-5, 2019.

NASCIMENTO FILHO, W. B.; FRANCO, C. R. Avaliação do Potencial dos resíduos produzidos através do processamento agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual de Química**. n. 6, p. 1968-1987. 2015.

PAGE, G. E. Factors influencing the maximum rates of air drying shelled com in thin layers. **Department of Mechanical Engineering**, Purdue University, 1949.

PRADHAM, R.C NAIK, S.; MEDA, V.; ROUT, P.K., Supercritical CO₂ extraction of fatty oil from flaxseed and comparison with screw press expression and solvent extraction processes. **Journal of food Engineering**, v.98, p.393-397, 2010.

RAFINSKA, K.; POMASTOWSKI, P.; RUDNICKA, J.; KRAKOWSKA, A.; MARUSKA, A.; NARKUTE, M.; BUSZEWSKI, B. Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity of *Lepidium sativum* extracts. **Food Chemistry**, v. 289, p. 16-25, 2019.

RODRIGUES, L., G., G.; MAZZUTTI, S.; VITALI, L.; MICKE, A. G.; FERREIRA, S., R., S. Recovery of bioactive phenolic compounds from papaya seeds agroindustrial residue using subcritical water extraction. **Biocatalyses and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 1-8, 2019.

SALADINO, F.; QUILES, J. M.; LUCIANO, F. B.; MAÑES, J.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; MECA, G. Shelf life improvement of the loaf bread using allyl, phenyl and benzyl isothiocyanates against *Aspergillus parasiticus*. **LWT**, v. 78, p. 208-114, 2017.

SAMARAM, S.; MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; GHAZALI, H. M.; BORDBAR, S.; SERJOUIE, A. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of oil from papaya seed by response surface methodology: Oil recovery, radical scavenging antioxidant activity, and oxidation stability. **Food Chemistry**, v. 172, p. 7-17, 2015.

SEBRAE. **O cultivo e o mercado do mamão**. 2016. Disponível em: <<https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-do-mamao,937a9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD>>. Acesso em: 22 de abril de 2020.

SILVEIRA, J. C.; BUSATO, N. V.; COSTA, A. O. S.; COSTA JUNIOR, E. F. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. Centro Científico Conhecer Enciclopédia Biosfera, v. 8, n. 15; p. 2038-2052, 2012.

SUNDARAM, M. K.; R P.; HAQUE, S.; AKHTER, N.; KHAN, S.; AHMED, S.; HUSSAIN, A. Dietary isothiocyanates inhibit cancer progression by modulation of epigenome. **Seminars in Cancer Biology**, 2021.

TUMPA, S. I.; HOSSAIN, M. I.; ISHIKA, T. Antimicrobial activities of *Psidium guajava*, *Carica papaya* and *Mangifera indica* against some gram positive and gram negative bacteria. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 6, p. 125–129, 2015.

UPPAL, S.; SHARMA, P.; KUMAR, R.; KAUR, K.; BHATIA, A.; MEHTA, S. K. Effect of benzyl isothiocyanate encapsulated biocompatible nanoemulsion prepared via ultrasonication on microbial strains and breast cancer cell line MDA MB 231. **Colloids and Surfaces A** . 596, 2020.

VIGNOLI LL, SANTOS LCO, GARCIA RO, PASCHOAL RC, ZACHI ARL, BARROS ALF, MEJA CF. Theoretical and Simulational Aspects of Single Bubble Sonoluminescence. In: Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada. Águas de Lindóia, Anais. São Paulo. 2012.

VILAS BOAS, E. V. B. 1-MCP: um inibidor da ação do etileno. In: Simpósio de controle de doenças de plantas: patologia pós-colheita de frutos e hortaliças. 2002. Lavras. **Palestras...** Lavras: UFLA-NEFIT, 2002. p. 24-30.

ZHOU, T.; LI, G.; CAO, B.; LIU, L.; CHENG, Q.; KONG, H.; SHAN, C.; HUANG, X.; CHEN, J.; GAO, N. Downregulation of Mcl-1 through inhibition of translation contributes to benzyl isothiocyanate-induced cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia cells. **Cell Death and Disease**, v. 4, p. 1-11, 2013.

ZHU, M.; LI, W.; DONG, X.; CHEN, Y.; LU, Y.; LIN, B.; GUO, J.; LI, M. Benzil-isotiocianato induz apoptose e inibe a migração e invasão de células de carcinoma hepatocelular *in vitro*. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 2, p. 240-248, 2017.

YANG, C. X.; WU, H. T.; LI, X. X.; WU, H. Y.; NIU, T. X.; WANG, X. N.; LIAN, R.; ZHANG, G. L.; HOU, H. M. Comparison of the inhibitory potential of benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate on Shiga toxin-producing and enterotoxigenic *Escherichia coli*. **LWT- Food Science and Technology**, v. 118, p. 1-6, 2020.

APÊNDICE A

Figura 12- Cromatograma padrão isotiocianato de benzila (C= 0,1 g/mL).

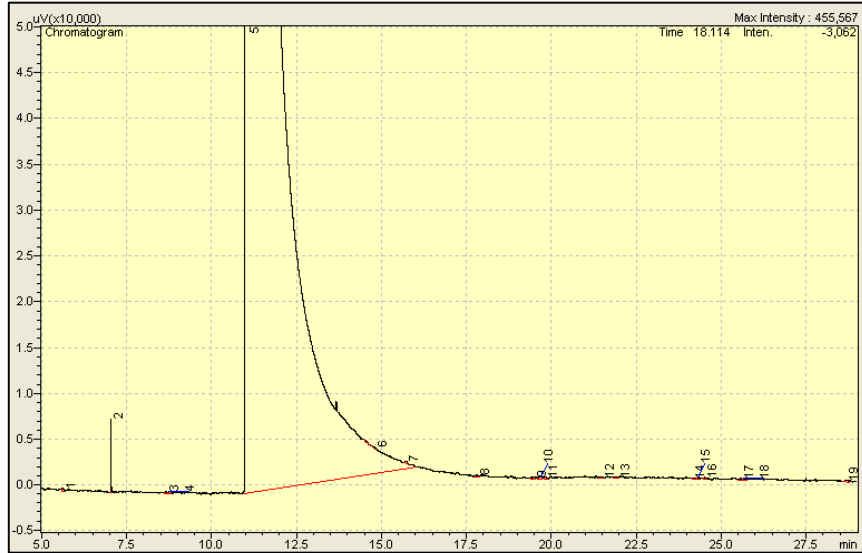


Figura 13- Cromatogramas dos extratos hexanoicos obtidos a partir de sementes desidratadas à 45 °C (a) e 55 °C (b).

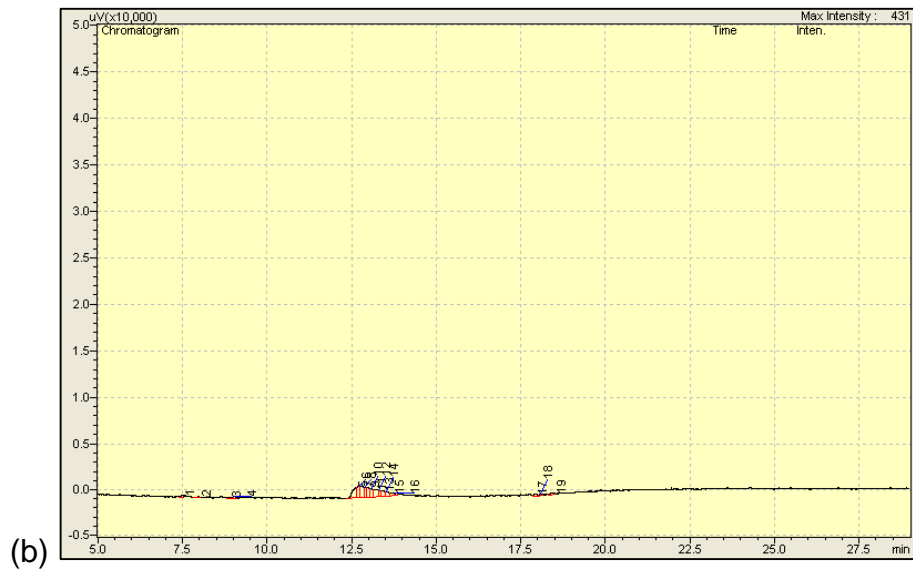
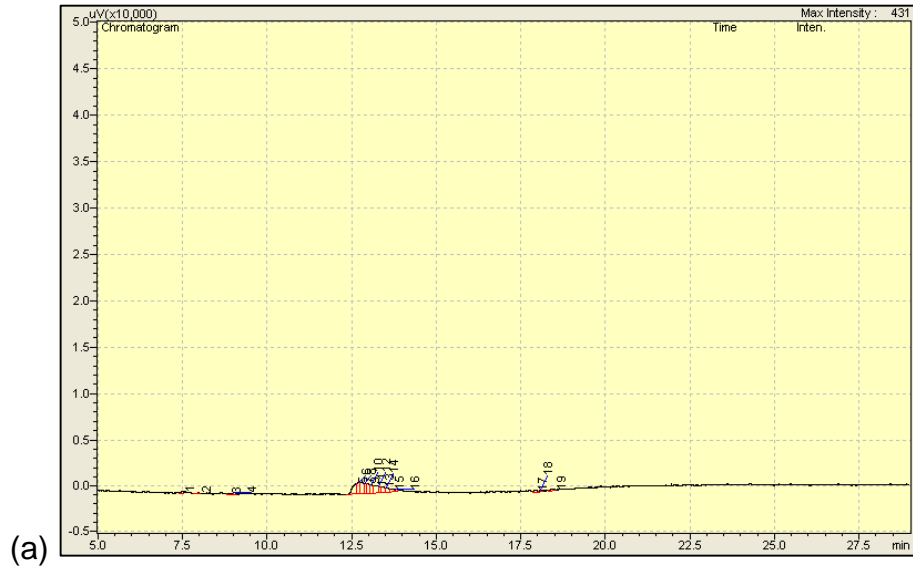


Figura 14- Cromatogramas do extrato obtido por CO₂ subcrítico a partir de sementes desidratadas à 45 °C (a) e 55 °C (b).

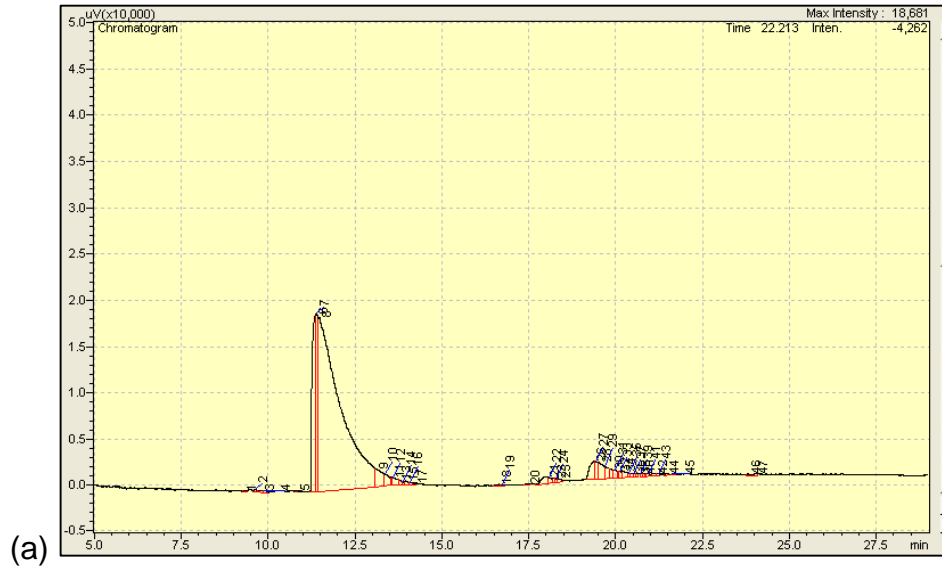
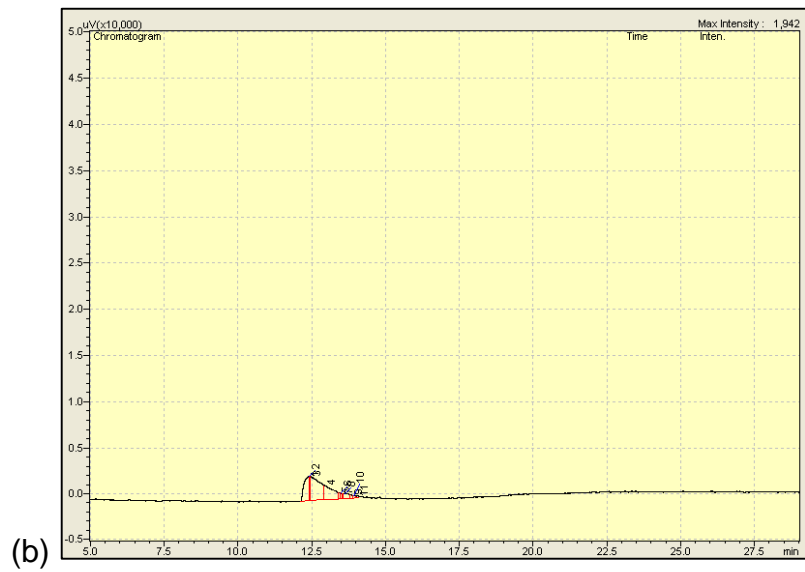


Figura 15- Cromatogramas obtidos por hidrodestilação a partir de sementes desidratadas à 45 °C (a) e 55 °C (b).



APÊNDICE B

Figura 16- Curva de atividade antioxidante do extrato hexanoico obtido a partir de sementes desidratadas à 45 °C.

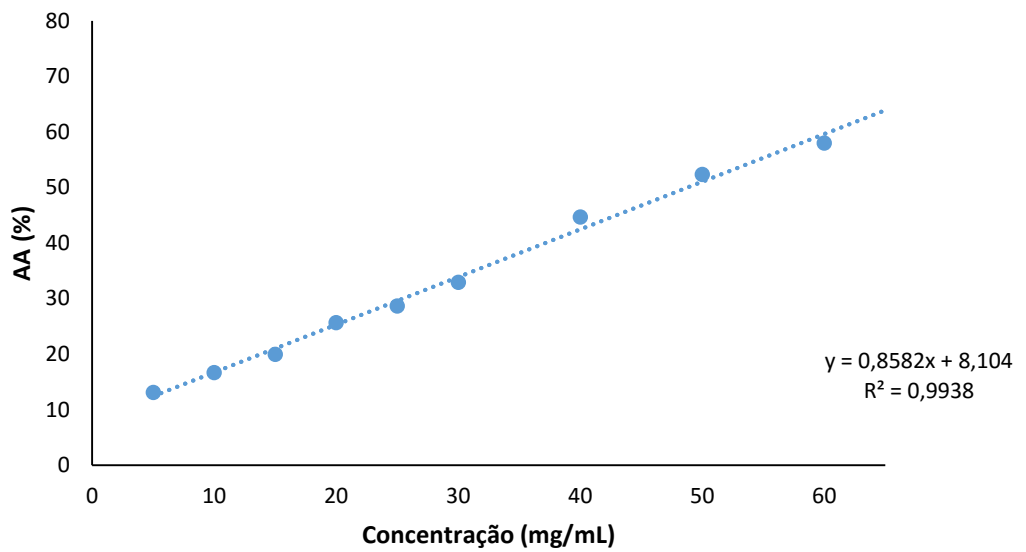


Figura 17- Curva de atividade antioxidante do extrato hexanoico obtido a partir de sementes desidratadas à 55 °C.

