

Carica papaya L.: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

TAYNARA THAIS MANHÃES DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL - 2023

Carica papaya L.: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

TAYNARA THAIS MANHÃES DE SOUZA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.”

Orientador: Prof. Daniela Barros de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S729 Souza, Taynara Thais Manhães de.

Carica papaya L.: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE / Taynara Thais Manhães de Souza. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

74 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2023. Orientadora: Daniela Barros de Oliveira.

1. Mamão. 2. 5-HMF. 3. Antioxidante. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

Carica papaya L.: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

TAYNARA THAIS MANHÃES DE SOUZA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.”

Aprovada em 25 de abril de 2023.

Comissão examinadora:

Prof. Rafael de Oliveira Costa (D.Sc., Ciências Naturais) – IFF

Prof(a). Silvia Menezes Faria Pereira (D.Sc, Engenharia e Ciências dos Materiais)
– UENF

Prof(a). Luana Pereira de Moraes (D.Sc., Engenharia de Alimentos) – UENF

Prof(a). Daniela Barros de Oliveira (D.Sc., Ciência e Tecnologia de Alimentos) -
UENF (orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por permitir o meu desenvolvimento durante todo o curso de mestrado e por ter me dado forças para superar todas as dificuldades e obstáculos. Agradeço também a Deus e a Santo Amaro por me guiar no percurso todas as vezes em que precisei me deslocar até à Universidade;

À minha família, em especial à minha mãe, Maria Inês Manhães de Souza; meu pai, Aldair Luiz de Souza Neves; meu irmão, Lukas Alexandre Manhães de Souza; minha avó Maria José de Souza Neves e ao meu noivo, Franciney Neves de Carvalho, que sempre me incentivaram a conquistar meus objetivos e não desistir diante dos obstáculos;

À minha orientadora, Daniela Barros de Oliveira, por ter me aceitado como sua orientanda e por sempre compartilhar sugestões nas quais fizeram total diferença para minha vida acadêmica. Agradeço também pela amizade, incentivo, dedicação e empenho durante todo trabalho, sem os quais não seria possível a conclusão deste trabalho. Sua orientação serviu de inspiração e incentivo para minha carreira profissional;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, que contribuíram de diversas formas para minha vida acadêmica;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) e a todos que me ajudaram, tanto na utilização de materiais e equipamentos quanto na utilização do espaço;

À Capes por me proporcionar a bolsa durante todo o curso de mestrado;

À professora e amiga, Silvia Menezes Faria Pereira, por ter me ajudado nas análises do meu experimento e pelas dicas e sugestões. Sua dedicação me incentivou a não desistir;

Ao professor, Rodrigo Rodrigues de Oliveira, por ter disponibilizado o seu tempo para me auxiliar nas análises e por ter disponibilizado o seu laboratório e materiais para executar o experimento;

À Lorena Provalero Mendanha e à Jéssica da Silva Maciel, por terem me ajudado nas etapas do experimento do meu trabalho de dissertação;

À Doutora Carolina Chaves Ramos, por toda ajuda, companheirismo e dedicação nas etapas finais do meu trabalho;

Às técnicas do LTA, Valdinéia E. P. de Sousa Ferreira e Ana Lúcia Paes Barbosa, por sempre me ajudarem no empréstimo de equipamentos e materiais de laboratório;

Aos professores, Karla Silva Pereira, Nádia Rosa Pereira e Henrique Duarte Vieira, por terem emprestado alguns reagentes para a realização do meu experimento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Carica papaya</i> L. (<i>Caricaceae</i>)	3
2.2 Composição química do <i>Carica papaya</i> L.	4
2.3 Métodos Cromatográficos	12
2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	14
2.5 Atividade antioxidante	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Coleta do material vegetal	20
3.2 Preparo do extrato e frações	20
3.3 Avaliação do perfil químico do extrato bruto da polpa de <i>Carica papaya</i> L. por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	22
3.4 Análise de carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	23

3.5 Fracionamento e isolamento das substâncias	23
3.5.1 Extração líquido/líquido	23
3.5.2 Extração com celulose da fração em acetato de etila.....	24
3.6 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	25
3.7 Cromatografia Contracorrente de Alto Desempenho (CCCAD)	25
3.7.1 Isolamento da substância T1 por CCCAD	27
3.7.2 Isolamento da substância T2 por CCCAD	27
3.8 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	28
3.9 Análise de fenóis totais	28
3.10 Avaliação da atividade antioxidante	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Análise de carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	32
4.2 Caracterização química do extrato etanólico da polpa de <i>Carica papaya</i> L	34
4.3 Substâncias identificadas em <i>Carica papaya</i> L.....	36
4.3.1 Substância T1.....	36
4.3.2 Substância T2.....	40
4.4 Análise de fenóis totais	46
4.5 Atividade antioxidante.....	47
5. RESUMO E CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas das classes das substâncias identificadas na polpa do mamão. Fonte: Prata et al., 2021; Husin et al., 2019; Tan et al., 2012; Sancho et al., 2011; Oloyede et al., 2011; Pino e Queris, 2011; Schweigiger et al., 2011; Lee et al., 2010.	6
Figura 2. Reações de formação de furanos a partir de carboidratos.	8
Figura 3. Esqueleto básico dos esteróis.	9
Figura 4. Reação de biossíntese dos esteróis.	11
Figura 5. Reação entre o radical DPPH com molécula antioxidante (adaptado de Ali et al., 2008; Amié et al., 2003).	16
Figura 6. Esquema das etapas do estudo químico da polpa de <i>Carica papaya</i> L	19
Figura 7. A) Frutos antes da maturação; B) Frutos maduros.	20
Figura 8. A) Polpa de mamão fatiada em estufa para secagem e B) Polpa seca triturada.	21
Figura 9. Extração da polpa do mamão por Soxhlet.	21
Figura 10. Fracionamento do extrato etanólico bruto da polpa de <i>Carica papaya</i> L. por extração líquido/líquido.	24
Figura 11. Sistema de extração com celulose.....	25
Figura 12. Análise de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu.....	29
Figura 13. Ensaio de atividade antioxidante utilizando o método DPPH.....	30
Figura 14. Identificação de carboidratos no extrato etanólico bruto por CLAE.....	33
Figura 15. Concentração dos carboidratos glicose e frutose em 100 g de extrato etanólico da polpa do mamão.	33

Figura 16. Cromatograma do extrato etanólico bruto da polpa do mamão e espectro de UV do pico majoritário (TR: 6,17 min) do extrato etanólico bruto da polpa do mamão.	35
Figura 17. Placa cromatográfica da fração 31 obtida do CCCAD da amostra EC1, referente à substância T1.	36
Figura 18. Espectro de RMN 1H da substância T1.	37
Figura 19. Espectro de RMN 13C da substância T1.	38
Figura 20. Espectro de correlação heteronuclear HSQC da substância T1.	39
Figura 21. Estrutura química da substância T1 (5-hidroximetilfurfural).	40
Figura 22. Placa cromatográfica das frações 93 e 95 obtidas por CCCAD da amostra LCC1, referente à substância T2.	41
Figura 23. Espectro de RMN ¹³ C da substância T2.	42
Figura 24. Espectro de RMN 1H da substância T2.	43
Figura 25. Mapa de correlação heteronuclear HSQC da substância T2.	44
Figura 26. Estrutura química da substância T2 (β-sitosterol).	46
Figura 27. Concentração de fenóis totais na polpa de mamão.	46
Figura 28. Porcentagem de inibição de DPPH das amostras do mamão e dos antioxidantes comerciais. *** = < p 0,001.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos principais métodos de análise da atividade antioxidante.....	17
Tabela 2. Método utilizado: corrida em gradiente na CLAE	22
Tabela 3. Dados de RMN 1H e RMN 13C de T1 em CDCl3 e comparação com os valores de referência da literatura, em CDCl3. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J), em Hz	39
Tabela 4. Dados de RMN 1H e RMN 13C de T2 em CDCl3 e comparação com os valores de referência da literatura, em CDCl3. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J), em Hz	45

RESUMO

Souza, Taynara Manhães de; M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2023. *Carica papaya* L.: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE. Orientadora: Prof(a). Daniela Barros de Oliveira.

Carica papaya L. é uma das espécies de plantas mais cultivadas em todo o mundo. Pertencente à família *Caricaceae*, é uma planta que produz um fruto popularmente conhecido como mamão. Este fruto vem sendo estudado e utilizado em várias partes do mundo devido aos seus benefícios para a saúde, visto que em quase todas as partes do *Carica papaya* existem fitoconstituintes que atuam frente a algumas doenças crônicas. Diante disso, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico e das substâncias isoladas da polpa do mamão. As substâncias presentes na polpa do mamão foram extraídas com solvente etanol por Soxhlet. Foram utilizadas técnicas de separação cromatográficas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Contra Corrente de Alto Desempenho (CCCAD), e técnicas de identificação e caracterização como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método do DPPH. Duas substâncias foram identificadas a partir da polpa do mamão: o 5-hidroximetilfurfural (furano) e o β -sitosterol (esteroide). Das quatro amostras analisadas (extrato bruto, fração acetato, o 5-hidroximetilfurfural e o β -sitosterol), apenas três apresentaram atividade antioxidante, o extrato bruto, a fração em acetato de etila e o 5-HMF. Dessa forma foi possível concluir que na

polpa do mamão existem substâncias com potencial para atuar como antioxidantes frente às doenças causadas por radicais livres, sendo o mamão uma fonte natural de antioxidantes presente na alimentação da população.

Palavras-chave: mamão, 5-HMF, antioxidante.

ABSTRACT

Souza, Taynara Manhães de; M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April 2023. *Carica papaya* L.: ISOLATION, CHEMICAL IDENTIFICATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY. Advisor: Daniela Barros de Oliveira.

Carica papaya L. is one of the most cultivated plant species in the world. Belonging to the *Caricaceae* family, it is a plant that produces a fruit popularly known as papaya. This fruit has been studied and used in various parts of the world due to its health benefits, since in almost all parts of *Carica papaya* there are phytoconstituents that act against some chronic diseases. Therefore, the present work aimed to evaluate the antioxidant activity of the ethanol extract and the substances isolated from papaya pulp. Substances present in papaya pulp were extracted with ethanol solvent by Soxhlet. Chromatographic separation techniques such as High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Thin Layer Chromatography (TLC) and High-Performance Counter Current Chromatography (CCCAD) were used, as well as identification and characterization techniques such as Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The assessment of antioxidant activity was performed using the DPPH method. Two substances were identified from papaya pulp: 5-hydroxymethylfurfural (furan) and β -sitosterol (steroid). Of the four samples analyzed (crude extract, acetate fraction, 5-hydroxymethylfurfural and β -sitosterol), only three showed antioxidant activity, the crude extract, the ethyl acetate fraction and 5-HMF. In this way, it was possible to conclude that in papaya pulp there are substances with the potential to act as antioxidants against diseases caused by free

radicals, papaya being a natural source of antioxidants present in the populations.

Keywords: papaya, 5-HMF, antioxidante.

1. INTRODUÇÃO

Carica papaya L. (Caricaceae) é uma das espécies de planta mais cultivadas em todo o mundo, popularmente conhecida como mamão. A espécie teve sua origem na América Tropical, mais precisamente no México, sendo naturalizada em várias partes do mundo (Embrapa, 2021; Sharma et al., 2020).

O mamoeiro é uma planta que se assemelha a uma árvore semi-herbácea por possuir um caule fibroso e frágil, sendo este oco e cilíndrico (Sharma et al., 2020). O mamão possui casca âmbar e em seu interior há presença de massa substancial de sementes de cor preta (Pierson, 2012). O mamão é amplamente usado em vários países devido aos seus benefícios para saúde, uma vez que ele é fonte de minerais, carotenoides, compostos fenólicos, fibras, folato e vitaminas A, C e E (Sharma et al., 2020).

Dessa forma, em quase todas as partes do *Carica papaya*, há ampla disponibilidade de fitoconstituintes que caracterizam sua eficiência no tratamento de algumas doenças (Sharma et al., 2020). Essas substâncias são responsáveis por ações anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante e inseticida. Dentre essas atividades, o seu poder antioxidante permite colaborar com a promoção da saúde, atuando no sequestro dos radicais livres que são os responsáveis pelo desenvolvimento de problemas crônicos de saúde (Sharma et al., 2020). O *C. papaya* contém substâncias como: o ácido cafeico, flavonoides (campeferol, miricetina, quercetina, rutina), carotenoides (β -caroteno, licopeno), saponinas,

alcaloides, α -tocoferol, vitamina C, papaína e isotiocianato de benzila (Kong et al., 2021).

Sendo assim, as substâncias presentes no *C. papaya* são capazes de atuar como anti-inflamatórias, amenizando sintomas de inflamações tais como o calor, dor, rubor entre outros, e contra o estresse oxidativo. Dessa forma, o *C. papaya* participa de forma benéfica frente às doenças crônicas tais como o diabetes, Alzheimer e câncer (Kong et al., 2021).

Assim, tendo em vista as propriedades químicas do *C. papaya*, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico e das substâncias isoladas da polpa do mamão. O consumo de frutas proporciona efeitos positivos para a prevenção e, conseqüentemente, diminuição no desenvolvimento de doenças crônicas (Pierson et al., 2011).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Carica papaya* L. (*Caricaceae*)

Carica papaya é uma espécie pertencente à família *Caricaceae*. O gênero *Carica* é amplamente conhecido e cultivado na Índia. O mamão é cultivado em regiões tropicais e subtropicais, mas, provavelmente, teve sua origem no sul do México e Costa Rica. Essa fruta vem de uma espécie de planta fêmea, macho ou hermafrodita; o mamoeiro tem alto porte atingindo cerca de 3 a 10m; em seu caule carnudo existem cicatrizes que marcam as antigas folhas, que são longas, possui flores perfumadas, estando sozinhas ou em cachos, frutas grandes com forma globosa e alongada e, em seu interior, existem sementes (Lara-Abia et al., 2022; Krishna et al., 2008; Zhou et., 2021).

Entre as variadas espécies de frutas, o mamão é uma das mais consumidas, pois possui um alto valor nutritivo e baixo teor calórico (Sharma et al., 2020; Krishna et al., 2008). O consumo do mamão previne doenças causadas por radicais livres e reduz altas taxas de colesterol no sangue (Adeneye et al., 2009). Adeneye e colaboradores (2009) realizaram experimentos em ratos para avaliar o potencial hipoglicêmico a partir do pó das sementes do *C. papaya*. O resultado mostrou uma diminuição significativa do nível de glicose no sangue dos ratos. Ademais, Somanah e colaboradores (2012) verificaram que o extrato fermentado do mamão apresenta atividade protetora no avanço do diabetes se mostrando capaz de estabilizar o nível de glicose no sangue, uma vez que o extrato fermentado reduziu

o nível de aspartato aminotransferase, aumentando a sensibilidade na detecção da insulina do fígado. Além disso, se mostrou um aliado na prevenção da doença de Alzheimer (Kong et al., 2021).

O mamão é um ótimo auxiliar no processo digestivo visto ser uma fruta rica em enzimas que auxiliam na digestão das proteínas contidas nos alimentos. Dentre essas enzimas existe a papaína que é utilizada para acelerar o processo de digestão nos organismos que possuem metabolismo lento (Yogiraj et al., 2014). Sendo assim, o fruto maduro de *C. papaya* possui atividade laxante que permite que o intestino fique regulado, já que o suco leitoso extraído do fruto possui enzimas que auxiliam na digestão. Desta forma, o mamão apresenta diversos benefícios para a saúde humana, pois atua como anti-inflamatório frente à prevenção de câncer no cólon, proteção frente à poliartrite, previne o câncer de próstata e, além disso, ajuda a manter o pulmão saudável e tem efeito anticoagulante (Yogiraj et al., 2014).

Husin e colaboradores (2019) citaram em seu trabalho que, em países tropicais e subtropicais, as folhas do *C. papaya* são usadas como um reforço imunológico, principalmente para doenças como a dengue e a malária. Além disso, eles também relataram que quase todas as partes do *C. papaya*, tais como: fruto, folhas, sementes e raízes possuem contribuições medicinais. O extrato da semente do *C. papaya* possui atividade inseticida e repelente, no qual o extrato aquoso das sementes e das cascas do mamão apresentaram atividade frente ao mosquito *Aedes aegypti* (Husin et al., 2019).

O mamão também pode ser usado em queimaduras de tecidos, infecção microbiana, como antioxidante, imunomodulador e hipomeliante (Jaswal et al., 2010). Segundo Jaswal e colaboradores (2010), no hospital Royal Victoria, na Gâmbia, a polpa do mamão é esmagada e aplicada em queimaduras infectadas, evitando uma maior infecção da ferida.

2.2 Composição química do *Carica papaya* L.

O mamão é uma fruta rica em vitamina C, vitamina A, riboflavina, folato de cálcio, tiamina, ferro, niacina, potássio, magnésio, fibras, carotenoides, compostos fenólicos, proteínas, minerais, fibras, lipídios e carboidratos como os constituintes nutritivos presentes na fruta (Sharma et al., 2020; Krishna et al., 2008;). Dentre

essas substâncias presentes no mamão, os compostos fenólicos, carotenoides e a vitamina C são os principais componentes responsáveis pela sua atividade antioxidante (Maoka, 2019).

Quando se trata da matéria seca da polpa do mamão, o seu maior componente são os carboidratos, sendo a glicose o carboidrato mais representativo no início de maturação do fruto e, de acordo com o seu amadurecimento, a concentração de sacarose aumenta, tornando-se cerca de 80% dos carboidratos totais presentes (Didier et al., 2017). A parte comestível do mamão, (a polpa), possui macronutrientes como fósforo, potássio, magnésio e micronutrientes como ferro, cobre, zinco e manganês (Didier et al., 2017).

Carotenoides, tais como, β -criptoxantina, β -caroteno, licopeno, β -criptoxantina cuprato, β -criptoxantina laurato e β -criptoxantina miristal foram identificados em *C. papaya* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massa (CLAE/UV-DAD/ESI-EM) nos trabalhos de Sancho e colaboradores (2011) e Schweigger e colaboradores (2011).

Os fenólicos são provenientes do metabolismo secundário das plantas e são os principais antioxidantes encontrados na alimentação e, por isso, o consumo de frutas vem aumentando em todo o mundo (Karak, 2019; Granato et al., 2018; Pierson et al., 2011). Segundo Saltveit (2010) cerca de dez mil compostos fenólicos foram encontrados nas plantas.

Ácidos fenólicos, tais como, o ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico, já foram identificados a partir do extrato da casca do *C. papaya*. Os compostos fenólicos, pertencentes à classe dos flavonoides, também já foram identificados no mamão. Também possuem flavonoides, tais como, a catequina e quercetina, apigenina, campeferol, miricetina, isorhamnetina, quercetina, naringenina, hesperitina e catequina (Husin et al., 2019; Tan et al., 2012). A Figura 1 apresenta a estrutura de algumas substâncias já identificadas no mamão.

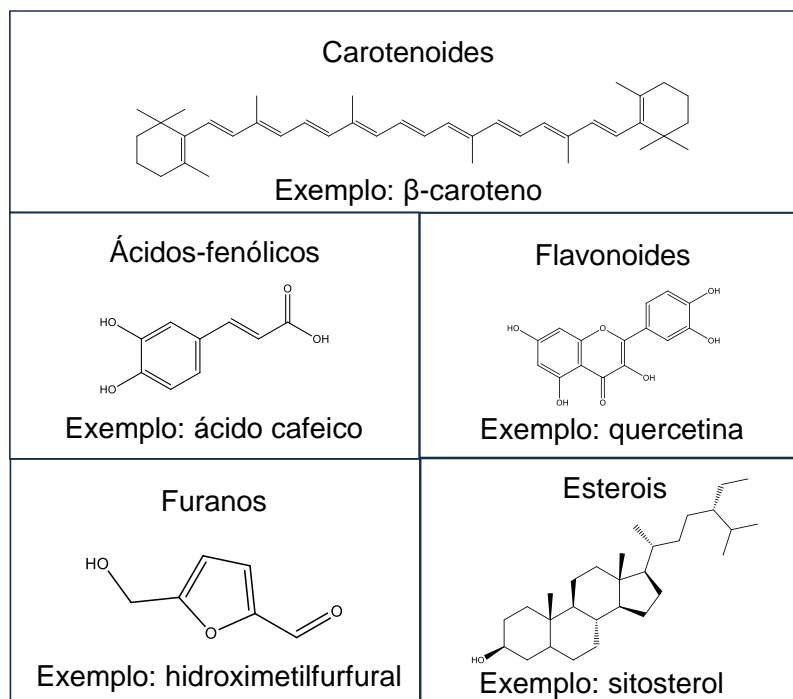


Figura 1. Estruturas das classes das substâncias identificadas na polpa do mamão. Fonte: Prata et al., 2021; Husin et al., 2019; Tan et al., 2012; Sancho et al., 2011; Oloyede et al., 2011; Pino e Queris, 2011; Schweigger et al., 2011; Lee et al., 2010.

Além dessas substâncias presentes no *Carica papaya*, substâncias pertencentes às funções orgânicas aldeído, éteres, ésteres, álcoois, cetonas, e substâncias pertencentes à classe dos esteróis e furanos, já foram identificadas no mamão. Substâncias voláteis, tais como o benzaldeído, isotiocianato de benzila, β -damascenona, que estão presentes no suco natural do mamão, foram identificadas no suco fermentado de mamão e no vinho de mamão. Substâncias como o hidroximetilfurfural, pertencente à função orgânica aldeído, e o sitosterol, pertencente à classe dos esteróis, já foram identificadas na polpa de mamão (Prata et al., 2021; Oloyede et al., 2011; Pino e Queris, 2011; Lee et al., 2010).

Os compostos orgânicos pertencentes à classe dos furanos possuem, em sua estrutura, um anel de quatro carbonos e um oxigênio, originando a fórmula C_4H_4O , que classifica a substância como furano. Essas substâncias são encontradas em baixa concentração, de forma natural, nos alimentos. Elas podem ser obtidas a partir da desidratação de carboidratos e, por isso, a sua concentração aumenta com o tempo de armazenamento do alimento (Serra-Cayuela et al., 2013; Campos et al., 2007). A concentração dos furanos aumenta com o aumento da

temperatura durante o processamento do alimento (Emektar et al., 2022; Palmers et al., 2015). A Figura 2 mostra três vias de formação do furano a partir da glicose (Vranová e Ciesarová, 2009). Segundo Didier e colaboradores (2017), o *Carica papaya*, é um exemplo de fruto rico em carboidratos.

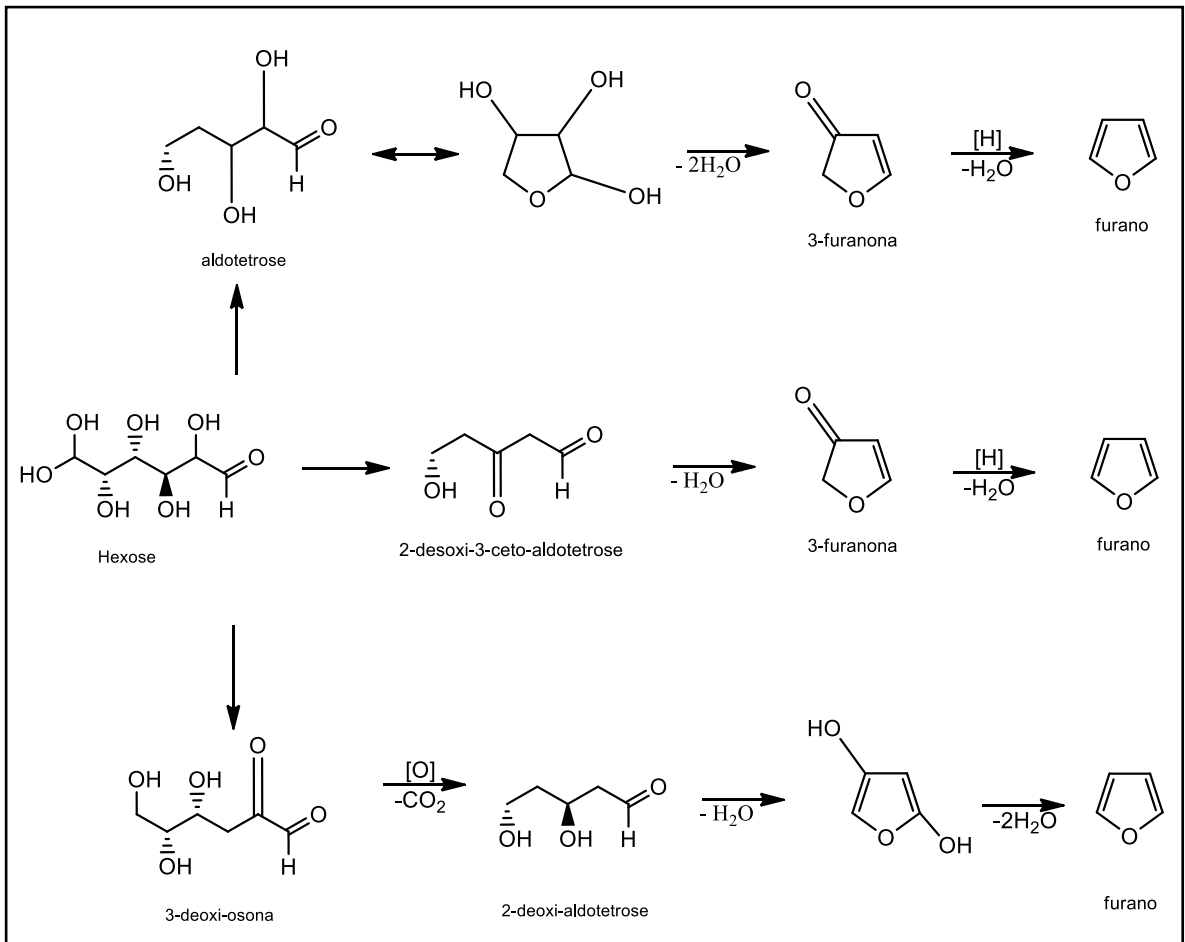


Figura 2. Reações de formação de furanos a partir de carboidratos.

Quando o consumo de furanos ultrapassa 30 mg por dia, essa substância contribui negativamente na saúde humana, podendo ter ações carcinogênica, genotóxica, organotóxica, entre outras. Contudo, o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) traz benefícios para a saúde, visto que pode atuar como aromatizante em alimentos, pois possui odor de flores de camomila. Além disso, ele pode atuar como antioxidante, anticarcinogênico, anti-inflamatório, entre outros (PUBCHEM; Choudhary et al., 2020; Abraham et al., 2011).

O hidroximetilfurfural, substância pertencente à classe dos furanos, foi identificada em alguns tipos de vinhos, cafés, cereais, frutos como mamão, laranja, maçã, entre outros. (Prata et al., 2021; Choudhary et al., 2020; Abraham et al., 2011).

As substâncias pertencentes à classe dos esteróis possuem função estrutural, visto que são um dos componentes das membranas celulares responsáveis por regular a permeabilidade e a fluidez das membranas. Nos vegetais os esteróis participam da produção de substâncias provenientes do metabolismo secundário das plantas, como as saponinas, por exemplo (Valitova et al., 2016; Hartmann, 1998).

Os compostos orgânicos pertencentes à classe dos esteróis possuem uma estrutura básica composta por quatro anéis (A, B, C e D), como apresentado na Figura 3 (Valitova et al., 2016; Hartmann, 1998; Grunwald, 1975).

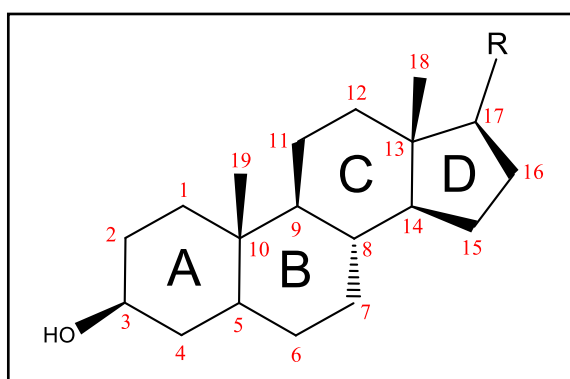


Figura 3. Esqueleto básico dos esteróis.

Os esteróis encontrados em maior concentração nos vegetais são o sitosterol e o estigmasterol (Hartmann, 1998). O β -sitosterol, substância pertencente à classe dos esteróis, é encontrado em vegetais, chás, frutos, dentre eles o mamão, entre outros alimentos. A reação de síntese das substâncias pertencentes à classe dos esteróis pode ser vista na Figura 4 (Valitova et al., 2016; Hartmann, 1998).

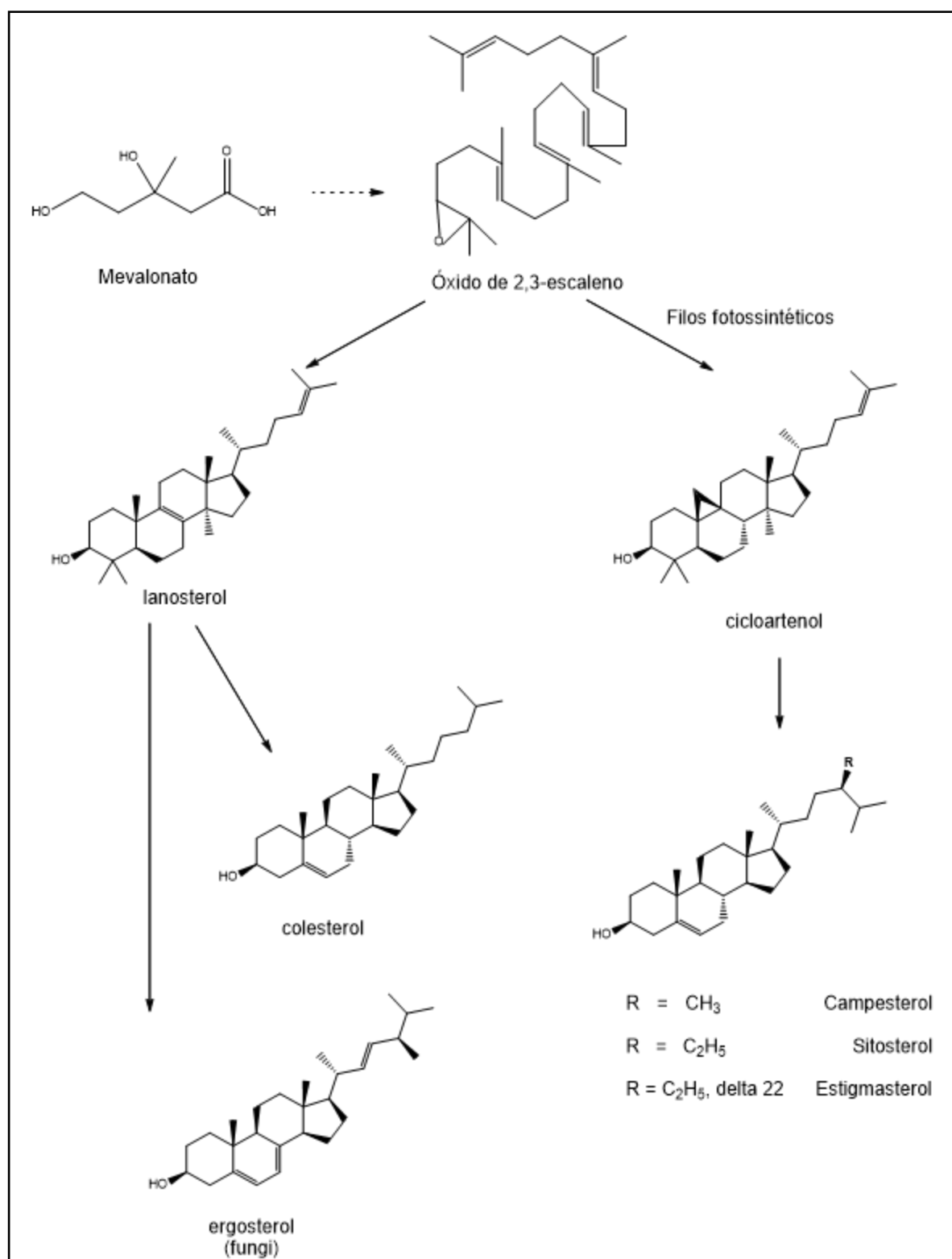


Figura 4. Reação de biossíntese dos esteróis.

2.3 Métodos Cromatográficos

A Cromatografia é um método instrumental que analisa as substâncias químicas, sendo essa uma técnica de separação físico-química capaz de detectar, identificar e quantificar substâncias presentes em uma mistura, a partir da interação dos componentes com a fase móvel e estacionária do sistema cromatográfico. As substâncias presentes na mistura são distribuídas à medida que a fase móvel percola pela fase estacionária (Juszczak et al., 2019; Coskun, 2016; Kumar e Sarangi, 2013).

A cromatografia é subdividida em dois tipos de técnicas: a cromatografia em coluna e a cromatografia planar. A primeira possui forma física na qual a fase estacionária é colocada num tubo cilíndrico e a segunda, a fase estacionária, é distribuída em uma superfície planar. Com relação à fase móvel existe a cromatografia gasosa, na qual a fase móvel é um gás, a cromatografia líquida, fase móvel é um líquido e a cromatografia supercrítica, a fase móvel é um vapor pressurizado (Coskun, 2016; Collins et al., 1993). Os diferentes tipos de cromatografia podem ser usados em sequência a fim de obter uma amostra cada vez mais pura (Peres, 2002).

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) consiste na utilização de uma superfície plana, chamada de placas, que contém uma camada delgada de adsorvente, tais como a sílica, alumina, celulose e poliamida, onde será depositada uma pequena porção de amostra. A separação dos componentes da mistura se dá quando a fase móvel começa a percolar na placa (Peres, 2002; Collins et al., 1993). No entanto, para uma separação eficiente é importante selecionar a fase móvel cuidadosamente, visto que ela tem papel fundamental na separação de misturas. Sendo assim, para a escolha da fase móvel é necessário considerar a natureza química das substâncias a serem separadas e a sua polaridade, visto que existe uma competição entre as moléculas da fase móvel e da amostra na superfície do adsorvente (Coskun, 2016; Kumar e Sarangi, 2013; Collins et al., 1993).

Após a eluição da fase móvel na placa, as substâncias separadas precisam ser reveladas, visto que algumas não possuem coloração. Para isso, existem os métodos físicos, tais como a utilização de lâmpadas ultravioletas que revelam substâncias fluorescentes quando absorvem radiações em determinado comprimento de onda, e métodos químicos, tais como a utilização de solventes.

Esta técnica é de fácil execução, as separações ocorrem num pequeno espaço de tempo, é versátil, possui grande reprodutibilidade e possui baixo custo (Kumar e Sarangi, 2013; Collins et al., 1993).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é capaz de realizar a separação de várias substâncias diferentes presentes na amostra em um curto período, além de possuir alta resolução, sensibilidade e eficiência. Nesse tipo de cromatografia, os equipamentos são sofisticados e automatizados, e possuem pequenas colunas onde fica a fase móvel, como a sílica, por exemplo, que é eluída em altas pressões. Essas colunas são reaproveitáveis, porém, necessitam de um sistema de bombas de alta pressão para que a fase móvel migre numa velocidade razoável pela coluna a ponto de não a danificar, visto que a coluna possui resistência à vazão da fase móvel, podendo ocorrer perda de carga (Lanças, 2009).

Para aplicar a amostra na CLAE é necessário utilizar microseringas. A detecção das substâncias pela CLAE se dá por vários tipos de detectores espectrofotométricos com diferentes comprimentos de onda, e existe a possibilidade de acoplamento com o espectrômetro de massas, ou seja, isso permite uma grande escala de detecção de vários compostos de amostras complexas, tais como a urina, sangue, alimentos, entre outros (Coskun, 2016; Collins et al., 1993).

A Cromatografia Contracorrente de Alto Desempenho (CCCAD) é uma técnica de separação de misturas complexas em que a partição ocorre com a utilização de um sistema de solventes imiscíveis, sendo uma mistura composta por duas fases. Desse sistema de solventes, um é utilizado como fase estacionária e o outro como a fase móvel. No entanto, a escolha do sistema de solventes é fundamental para ocorrer uma separação eficiente. Para isso, é necessário: que a distribuição da concentração dos componentes presentes na amostra seja a mesma nas duas fases do sistema de solventes; que o volume de cada fase do sistema de solventes seja próximo; e que a fase escolhida como estacionária fique retida na coluna (Fang et al., 2011).

Quando a polaridade da substância de interesse é desconhecida sugere-se começar testando pelo sistema de solventes composto por hexano, acetato de etila, metanol e água nas proporções 3:5:3:5. Tanto a proporção quanto o solvente orgânico podem ser alterados até encontrarem o sistema de solventes adequado para a distribuição da amostra (Friesen et al., 2015; Pauli et al., 2008).

2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um método preciso capaz de identificar a substância presente na amostra. Nessa técnica, a amostra é submetida a um campo magnético no qual sofre a ação de ondas de rádio em determinada frequência. Nesse momento, os núcleos atômicos dos elementos da substância presente na amostra absorvem energia na qual uma parte dessa energia é emitida em forma de sinais de rádio. A quantidade de sinais em cada frequência origina o espectro de RMN (Hage e Iwasaki, 2009; Purcell et al., 1946 e Pykett et al., 1982).

Os núcleos atômicos dos elementos químicos possuem o número quântico de *spin*, ou seja, esse número é responsável por indicar a rotação do elétron dentro de um orbital atômico. A esse *spin* existe uma energia associada que permite a sua quantificação. De acordo com as leis básicas do eletromagnetismo, uma partícula em rotação gera um momento magnético (Bathista, 2005; Koutcher e TylerBurt, 1984).

Nessa técnica, os núcleos, que podem agir como “ímãs”, tendem a se orientar na direção do campo magnético ao qual está sendo submetido. No entanto, o átomo de hidrogênio, por exemplo, quando submetido ao campo magnético apresenta duas orientações: uma no sentido contrário do campo magnético (estado excitado) e a outra no sentido do campo magnético (estado fundamental). Contudo, os sinais observados no RMN são referentes ao excesso de núcleos no estado fundamental. No estado excitado, o sinal de RMN é perdido pois os núcleos atômicos perdem a sua rotação uma vez que quando o *spin* retorna ao seu estado inicial ocorre a liberação de energia, processo chamado de relaxamento do *spin* (Silva, 2005; Purcell et al., 1946; Harms et al., 1984).

2.5 Atividade antioxidante

As plantas são importantes fontes naturais de antioxidantes. Os antioxidantes provenientes de fontes naturais são preferíveis quando comparados aos antioxidantes artificiais, visto que os efeitos colaterais são mínimos e, além disso, os antioxidantes naturais possuem baixa toxicidade em relação aos antioxidantes artificiais (Jideane et al., 2020). A atividade antioxidante presente nos vegetais está associada às moléculas fitoquímicas que funcionam como protetores

dos alimentos e que, no organismo humano, é capaz de eliminar os radicais livres (Granato et al., 2018).

Os radicais livres são espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio, conhecida pelas siglas ERO e ERN, respectivamente, e que causam efeitos deletérios, pois ocasionam o estresse oxidativo ou nitrosativo no organismo vivo. Mas em baixas concentrações são benéficas para o organismo, uma vez que pode atuar na defesa de infecções (Valko et al., 2006). Esses radicais livres são substâncias que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, tornando-as instáveis e, por esse motivo, desencadeiam reações metabólicas ocasionando um desequilíbrio em relação às reações dos antioxidantes, pois para alcançar a estabilidade, os radicais sequestram os elétrons de outras substâncias (Ali et al., 2008). O excesso de radicais livres no organismo prejudica as funções das células, pois estes danificam os lipídeos, o DNA e as proteínas (Molaei et al., 2023; Granato et al., 2018; Valko et al., 2006).

Os antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou impedir a oxidação de substâncias que, quando oxidadas, se tornam radicais livres, ou seja, um antioxidante é capaz de eliminar as ERO e ERN (Kozarski et al., 2015; Halliwell, 1996). O ácido ascórbico, os compostos fenólicos e os carotenoides são moléculas fitoquímicas que são capazes de atuar como antioxidantes naturais (Ali et al., 2008).

O método DPPH consiste em uma reação química em que o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), de cor roxa, é reduzido ao radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), de cor amarela, através da ação de um antioxidante. Quando ocorre a reação do radical (roxo) com o antioxidante, o meio fica amarelo, pois o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil doa um átomo de hidrogênio para o radical tornando-o estável (Ali et al., 2008; Amié et al., 2003). A Figura 5 ilustra a reação entre o radical DPPH• e uma molécula antioxidante.

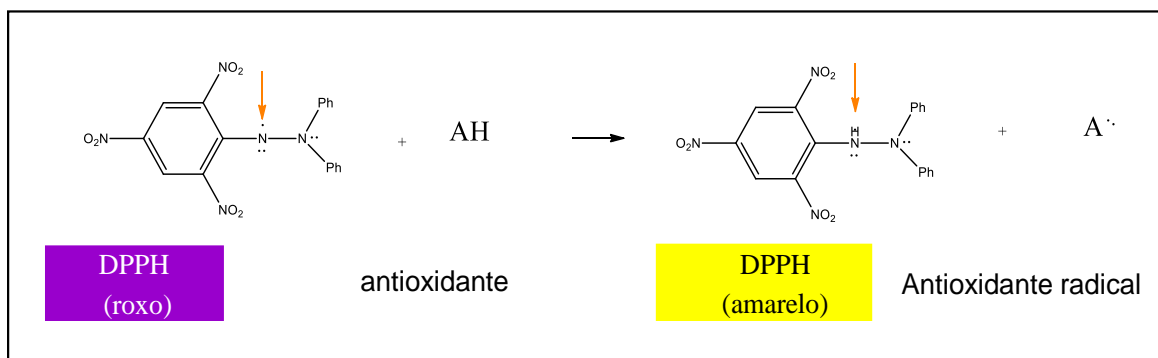


Figura 5. Reação entre o radical DPPH com molécula antioxidante (adaptado de Ali et al., 2008; Amié et al., 2003).

O método FRAP é baseado na medição através do espectrofotômetro, da redução do complexo férrico e cloreto de 2,3,5-tri-fenil-1,3,4-triaza-2-azoniaciclopenta-1,4-dieno (TPTZ) ao complexo ferroso; o ensaio ABTS consiste na oxidação do ABTS a ABTS⁺, que possui cor, que reage com o composto fenólico tornando o meio incolor pela formação do ABTS (Moharram e Youssef, 2014). A Tabela 1 detalha algumas características importantes destes métodos.

Tabela 1. Características dos principais métodos de análise da atividade antioxidante

Método	Nome	Princípio	Determinação do produto	Vantagens	Desvantagens
DPPH	Eliminação de radicais livres	Reação antioxidante com radical orgânico	Colorimetria	-Fácil de usar e baixo custo; -Alcança o estado estacionário rápido; -Boa repetibilidade.	-Solúvel em solventes orgânicos; -pH sensível e reação lenta; -A cor interfere podendo causar erros na avaliação da atividade antioxidante.
FRAP	Poder antioxidante redutor férrico	Reação antioxidante com complexo férrico	Colorimetria	-Pode ser expresso em equivalentes de ácido ascórbico; -Fácil e baixo custo.	-Não mede diretamente a atividade antioxidante, e sim, com base no potencial redutor do íon férrico. -Interferência no resultado de amostras biológicas de cor intensa. -Antioxidantes proveniente do grupo SH não são detectados.
ABTS	Eliminação do radical ABTS	Reação antioxidante com radical cátion orgânico	Colorimetria	-Pode ser usado em meio aquoso ou orgânico; -O resultado pode ser expresso em peso de uma fonte natural, visto que, a vitamina C é usada como padrão; -Pode ser usado para estudar o efeito do pH na atividade, pois é estável ao pH.	-Muito sensível à luz e temperatura; -Necessário ter uma etapa extra para gerar o radical livre a partir do sal ABTS; -Não padronizado, e por isso não é possível comparar valores.

Fonte: adaptado de Moharram e Youssef, 2014 e Yoo et al, 2007

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) e no Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI), no Centro de Ciências e Tecnologias (CCT), na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes. O material vegetal para a realização dos experimentos, a polpa do fruto de *Carica papaya* L., foi disponibilizado pela empresa Caliman.

Para o fracionamento do extrato e isolamento das substâncias presentes na polpa do mamão, foram utilizadas técnicas, tais como: extração líquido/líquido e com celulose, Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Contracorrente de Alto Desempenho (CCCAD). Para análise do perfil químico e identificação das substâncias presentes, foram utilizadas técnicas cromatográficas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e técnicas espectroscópicas como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O resumo das etapas realizadas é apresentado na Figura 6.

Para avaliar a atividade antioxidante da polpa do mamão foram utilizadas a amostra do extrato bruto, a fração em acetato de etila e as amostras isoladas. Para isso foi utilizado método de DPPH.

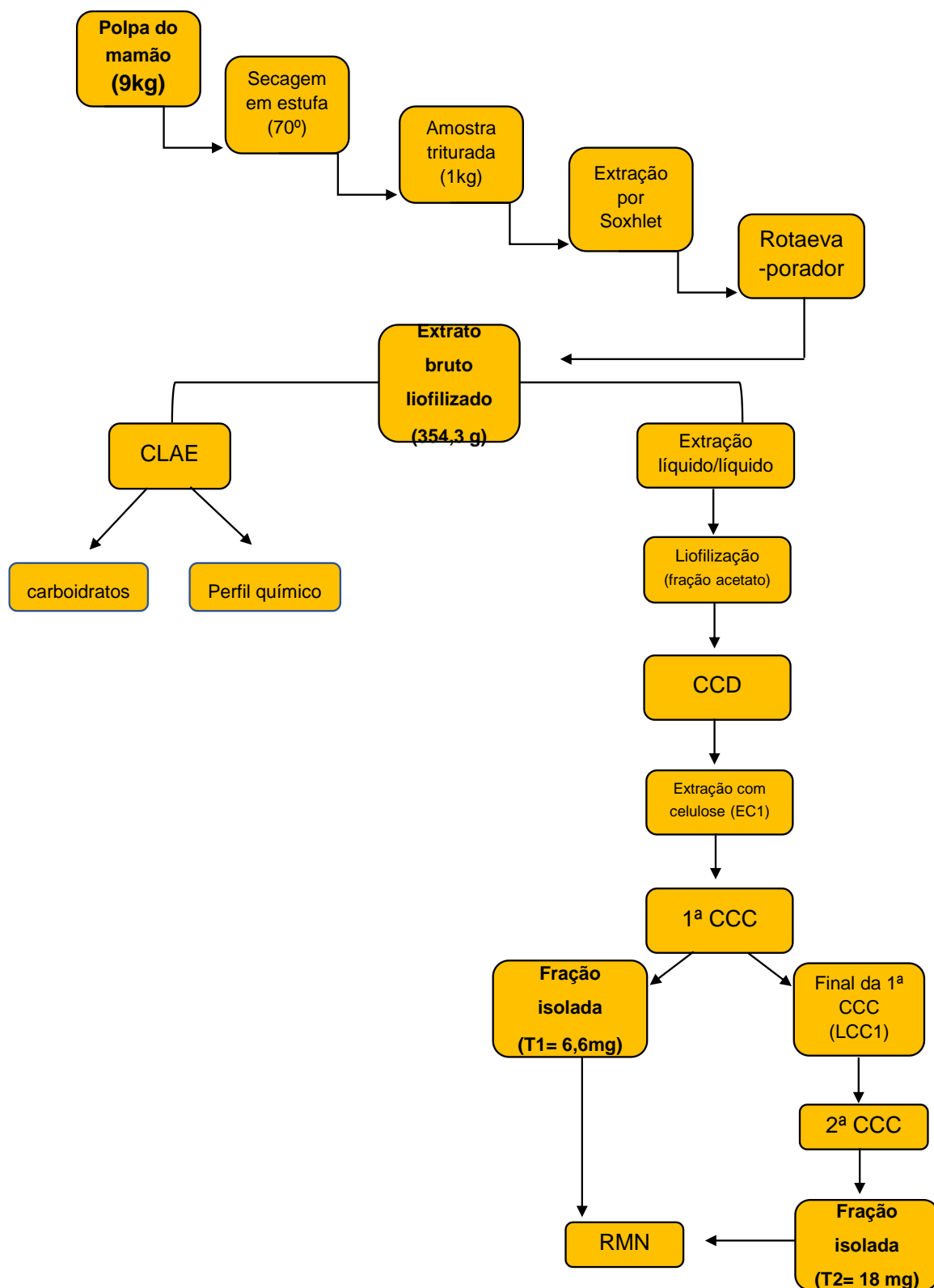


Figura 6. Esquema das etapas do estudo químico da polpa de *Carica papaya* L.

3.1 Coleta do material vegetal

Os frutos foram coletados na Empresa Caliman Agrícola, localizada na cidade de Linhares no estado do Espírito Santo, Brasil. Os frutos pertencem às plantas do mamoeiro de cultivar 'Aliança' e foram colhidos em um talhão comercial. Os mamões estavam plantados a 1,5 metros entre plantas na linha e 3,5 metros entre linhas. Para realizar as análises os frutos ficaram sete dias ao abrigo de luz para a sua maturação (Figura 7).



Figura 7. A) Frutos antes da maturação; B) Frutos maduros.

3.2 Preparo do extrato e frações

Os frutos foram lavados com água deionizada e separados (casca, sementes e polpa) manualmente com auxílio de uma faca. Posteriormente, as polpas foram fatiadas, colocadas nas bandejas da Estufa com Circulação de Ar Forçada, que foram forradas com papel alumínio, onde ficaram por 72 horas na temperatura de 70 °C a fim de obter a polpa desidratada. Após esse período, o material vegetal seco foi triturado no liquidificador a fim de se obter a amostra triturada (Figura 8).



Figura 8. A) Polpa de mamão fatiada em estufa para secagem e B) Polpa seca triturada.

Foi realizada uma extração por Soxhlet com solvente etanol, pois as substâncias extraídas são polares. Foi utilizada cerca de 1 kg de amostra triturada da polpa do mamão. Esta foi colocada no papel de filtro, que foi fechado com grampo, obtendo-se então o “cartucho de extração”. Posteriormente, o “cartucho” foi colocado na câmara de extração do aparelho Soxhlet (Figura 9). Um volume de 330 mL do solvente de extração, o etanol 99,8% P.A., foi adicionado no frasco de destilação do aparelho seguido de aquecimento (Gupta e Kumar, 2020).

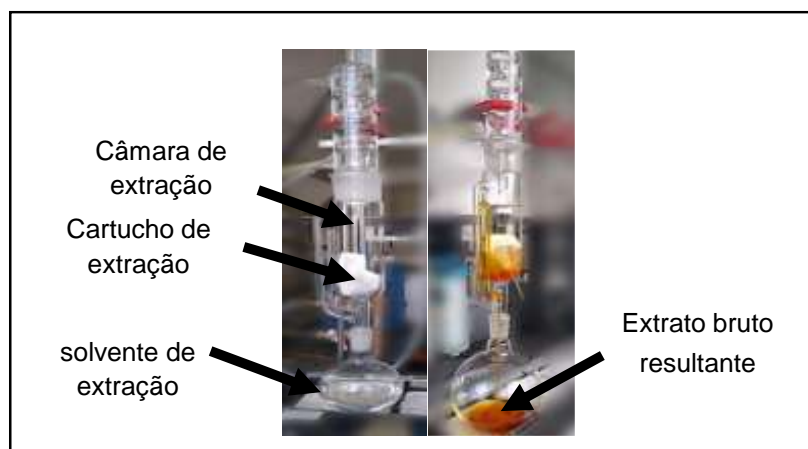


Figura 9. Extração da polpa do mamão por Soxhlet.

A extração ocorreu por quatro horas, conforme procedimento já realizado no LTA. Após a extração o extrato bruto resultante foi colocado no Rotaevaporador por, aproximadamente, 60 minutos a fim de evaporar o solvente utilizado na extração (Ghafar et al., 2017). Após a evaporação do solvente o extrato foi liofilizado obtendo 35% de rendimento.

3.3 Avaliação do perfil químico do extrato bruto da polpa de *Carica papaya* L. por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Foi utilizado o equipamento CLAE da marca Shimadzu, detector de índice de refração (RID-10A), coluna cromatográfica C-18, à temperatura de 35 °C. A fase móvel utilizada foi a água acidificada a pH= 3,2 e acetonitrila com fluxo de 1 mL/min. Essa técnica foi feita em gradiente de acordo com método detalhado na Tabela 3.

Tabela 2. Método utilizado: corrida em gradiente na CLAE

Tempo (min)	Concentração de água acidificada (%)	Concentração de acetonitrila (%)
0,01	90	10
10	70	30
15	50	50
20	30	70
25	10	90
30	0	100
32	90	10

A amostra do extrato bruto foi preparada na concentração de 5 mg/mL de fase móvel (500 µL de água acidificada e 500 µL de acetonitrila).

3.4 Análise de carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O cromatógrafo utilizado para a realização da análise de açúcar foi da marca Shimadzu, detector de índice de refração (RID-10A), coluna cromatográfica Rezex RCM-Monosaccharide Ca⁺² (8%), tamanho 300 X 7,8 mm. Foi utilizada água ultrapura como fase móvel em temperatura de 85 °C, fluxo de 0,6 mL/min e eluição isocrática.

Para o preparo da amostra foi utilizado 1 g do extrato bruto da polpa do mamão e dissolvido em 10 mL de água ultrapura. A mistura formada foi colocada na centrífuga por 10 minutos na velocidade máxima. Uma alíquota de 20 uL da mistura foi injetada no equipamento.

A identificação e quantificação dos carboidratos se deu a partir da injeção de padrões dos carboidratos, glicose e frutose. A identificação foi baseada no tempo de retenção dos picos apresentados no cromatograma do extrato bruto comparado ao tempo de retenção dos picos dos padrões. Para a quantificação foram feitas curvas padrões com diferentes concentrações e, por regressão linear, encontrou-se a equação para o cálculo da concentração do carboidrato presente na polpa do extrato bruto.

3.5 Fracionamento e isolamento das substâncias

Para purificar e concentrar as substâncias majoritárias presentes na polpa do mamão foram realizadas a extração líquido/líquido e a extração com celulose. Para verificar a separação das substâncias realizou-se a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) das frações de interesse. Para isolamento das substâncias foi utilizada a técnica de Cromatografia Contracorrente de Alto Desempenho (CCCAD).

3.5.1 Extração líquido/líquido

Foram adicionados 200 mL de solução 30% de metanol e 70% de água destilada em 20 g de extrato bruto. A solução resultante foi transferida para um funil de decantação de 1000 mL, que em seguida foram adicionados 200 mL de acetato

de etila. Após a homogeneização, a mistura foi deixada em repouso até formar uma mistura heterogênea. As duas fases formadas foram coletadas em frascos diferentes, na qual a fase aquosa foi armazenada e a fase em acetato de etila foi para o rota evaporador a fim de evaporar todo o solvente. Esse procedimento foi realizado seis vezes a cada 20g de extrato bruto. A Figura 10 mostra a mistura formada durante a extração líquido/líquido.

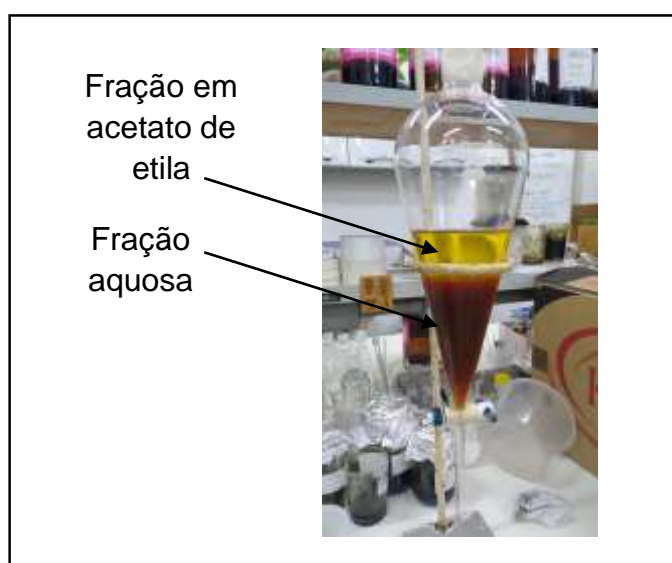


Figura 10. Fracionamento do extrato etanólico bruto da polpa de *Carica papaya* L. por extração líquido/líquido.

3.5.2 Extração com celulose da fração em acetato de etila

A pastilha da amostra foi preparada pesando-se 2 g de celulose e 2 g da fração em acetato de etila. Em seguida, a mistura foi colocada no rotaevaporador até a amostra secar. Para a extração pesou-se 40 g de celulose e adicionou-se 20 mL de água destilada. A mistura de celulose e água foi colocada no filtro e, sob ela, foi colocada a pastilha da amostra. Em seguida adicionou-se 200 mL de clorofórmio e 200 mL de acetona. O extrato (EC1) foi recolhido e deixado em repouso à temperatura ambiente até a evaporação dos solventes. A Figura 11 mostra a montagem do sistema de extração com a celulose.

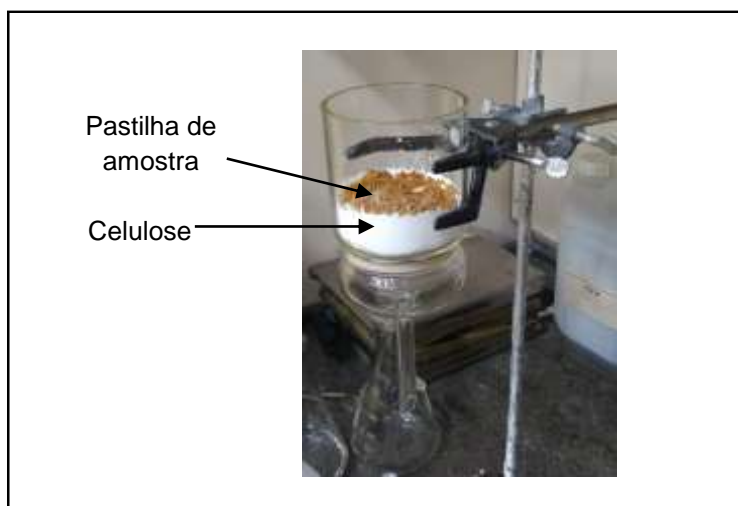


Figura 11. Sistema de extração com celulose.

3.6 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Realizou-se uma avaliação a partir da Cromatografia em Camada Delgada (CCD), na qual foram utilizadas placas cromatográficas de sílica gel 60F₂₅₄, em alumínio, espessura 0,2 mm. As placas foram cortadas em 4 cm de comprimento e as amostras foram aplicadas cerca de 0,7 cm acima da borda inferior da placa e 0,5 cm de distância das bordas laterais. A fase móvel deve ser escolhida com cuidado, pois possui papel fundamental na separação de misturas (Juszczak, et al., 2019).

Após a eluição da CCD foram utilizados reveladores químicos e físicos (Sabudak et al., 2005). Para o método físico utilizou-se lâmpada de UV com comprimento de onda de 254 e 365 nm; para o método químico utilizou-se a solução de vanilina sulfúrica. Dessa forma, a solução reveladora foi depositada sob a placa cromatográfica, com auxílio de um algodão. Em seguida, a placa foi aquecida e, assim, as manchas correspondentes às substâncias de interesse foram reveladas.

3.7 Cromatografia Contracorrente de Alto Desempenho (CCCAD)

O cromatógrafo utilizado foi da marca *Dynamic Extractions* (Berkshire, Reino Unido). Este equipamento possui um par de colunas preparativas com

capacidade de 142 mL e um par de colunas analíticas com capacidade de 27,5 mL. A velocidade de rotação do equipamento pode ser ajustada até 1600 rpm e os valores de β variam de 0,52 a 0,86. O sistema que compõe o equipamento para CCCAD possui duas bombas *Smartline* 100 V5010 (Knauer, Berlim, Alemanha), um coletor automático de frações C-660 (Büchi, Suíça), um detector de ultravioleta *Smartline* 2500 V7604 (Knauer, Berlim, Alemanha), um refrigerador *Smart* H150-1500 (LabTech, Itália) e uma válvula de injeção manual de 5 mL de capacidade (HiChrom, EUA).

Para a realização dessa técnica cromatográfica é necessário determinar um sistema de solventes ideal para cada amostra, em que são formadas duas fases. Para isso, utilizamos o método de agitação em tubo de ensaio (Berthod; Carda-Broch, 2004). O sistema de solventes escolhido é aquele em que a amostra se distribui em quantidades aproximadas nas duas fases. Até a definição do sistema de solventes adequado são realizados testes nos quais um conjunto de solventes, em determinadas proporções, é utilizado para dissolver uma pequena quantidade de amostra. Após a formação da mistura heterogênea, a mesma quantidade de amostra de cada fase é aplicada na placa cromatográfica.

Com a definição do sistema de solventes a ser utilizado, procede-se à preparação do sistema em quantidade adequada para a realização do CCCAD. Para isso, o volume de cada solvente é medido com auxílio de uma proveta. Todos os solventes são transferidos para um mesmo Erlenmeyer, que fica no agitador por 30 minutos. Após a solubilização dos solventes, o sistema é transferido para um frasco com tampa que fica por 30 minutos no equipamento ultrassom.

Após o preparo do sistema, 2 mg de amostra foram transferidos para um frasco no qual foi adicionado 1 mL da fase superior e 1 mL da fase inferior do sistema de solventes. A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso até atingir o equilíbrio. Após o repouso, duas fases foram formadas. O mesmo volume de cada fase foi aplicado em placas da CCD e eluído com sistema de solventes adequado à fração em análise. Após a eluição, as placas foram analisadas em câmara escura com luz ultravioleta a 254 nm e 365 nm, e pelo revelador químico vanilina.

3.7.1 Isolamento da substância T1 por CCCAD

A coluna do equipamento da CCCAD foi preenchida com a fase estacionária (fase superior do sistema de solventes) com fluxo de 2 mL/min. Em seguida, a fase móvel (fase inferior do sistema de solventes) foi bombeada com um fluxo de 1,5 mL/min com rotação de 1200 rpm no sentido reverso, do centro para periferia. O sistema de solventes utilizado foi composto por hexano, acetato de etila, metanol e água (1:2:1:1, v/v).

A amostra EC1 (970 mg) foi dissolvida em 2,5 mL de cada fase do sistema de solventes e foi injetada no cromatógrafo. De forma automática, a cada 3 mL uma fração foi recolhida no tubo. Após a corrida da amostra a limpeza da coluna foi feita utilizando o solvente acetato de etila. Foram coletadas 139 frações.

As frações obtidas foram analisadas por CCD e eluídas com solução composta de clorofórmio, acetato, metanol e água (7:3:5:7, v/v,) e posterior revelação com vanilina. As frações que apresentaram perfil químico similar foram reunidas. As frações 29 e 30 apresentaram uma única mancha na CCD, o que demonstra a possibilidade de se tratar de uma substância isolada (T1; 6,6 mg). A amostra T1 foi encaminhada para identificação por RMN. Além disso, a análise das frações 124 a 139 demonstrou a presença de substâncias de interesse, e estas foram reunidas (LCC1; 348,5 mg) para posterior isolamento.

3.7.2 Isolamento da substância T2 por CCCAD

A coluna do equipamento da CCCAD foi preenchida com a fase estacionária (fase superior do sistema de solventes) com fluxo de 2 mL/min. Em seguida, a fase móvel (fase inferior do sistema de solventes) foi bombeada com um fluxo de 1,5 mL/min com a rotação de 1200 rpm no sentido reverso, do centro para periferia. O sistema de solventes utilizado foi composto por heptano, diclorometano e acetonitrila (10:3:8, v/v).

A amostra (LCC1; 348,5 mg) foi dissolvida em 2,5 mL de cada fase do sistema de solventes e foi injetada no cromatógrafo. De forma automática, a cada 3 mL uma fração era recolhida no tubo. Após a eluição da amostra, a limpeza da coluna foi feita utilizando o solvente acetona. Foram coletadas 150 frações.

As frações resultantes da CCCAD foram eluídas com os solventes clorofórmio e metanol (9:1, v/v) e reveladas com vanilina. As frações que apresentaram perfil químico similar foram reunidas. As frações 93 a 96 apresentaram uma única mancha na CCD, o que demonstra a possibilidade de se tratar de uma substância isolada (T2; 18,0 mg). A amostra T2 foi encaminhada para identificação por RMN.

3.8 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a identificação e caracterização das substâncias isoladas foi utilizada a técnica de RMN de ^1H e ^{13}C e técnicas bidimensionais. Foi utilizado o equipamento de RMN modelo *Bruker Ascend 500* (Alemanha), operando em 500 MHz para ^1H (500 MHz) e 125 MHz para ^{13}C . Foram realizadas análises uni e bidimensionais. As frações analisadas foram solubilizadas utilizando os solventes Clorofórmio deuterado (CDCl_3), e Metanol deuterado (CD_3OD). As amostras foram acondicionadas em tubos de 5 mm específicos para análises de RMN.

3.9 Análise de fenóis totais

A quantificação dos fenóis totais foi realizada com o extrato bruto e com a fração em acetato de etila. Realizou-se o método utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (Zuhair et al., 2013; Musa et al., 2011; Slinkard e Singleton, 1997).

Para a análise, 1,0 mg de cada amostra foi dissolvido no solvente metanol. Após o preparo da solução de amostra, uma alíquota de 30 μL foi transferida para uma placa que contém poços. Juntamente com a solução, no mesmo poço, foi adicionado 50 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 100 μL de carbonato de sódio. As amostras foram homogeneizadas e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 760 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Figura 12).

Para a quantificação dos fenóis, foi feita uma curva de ácido gálico que apresentou a equação da reta $Y = 0,039x + 0,0524$ e a concentração de fenóis foi dada em mg EAG/g de extrato.

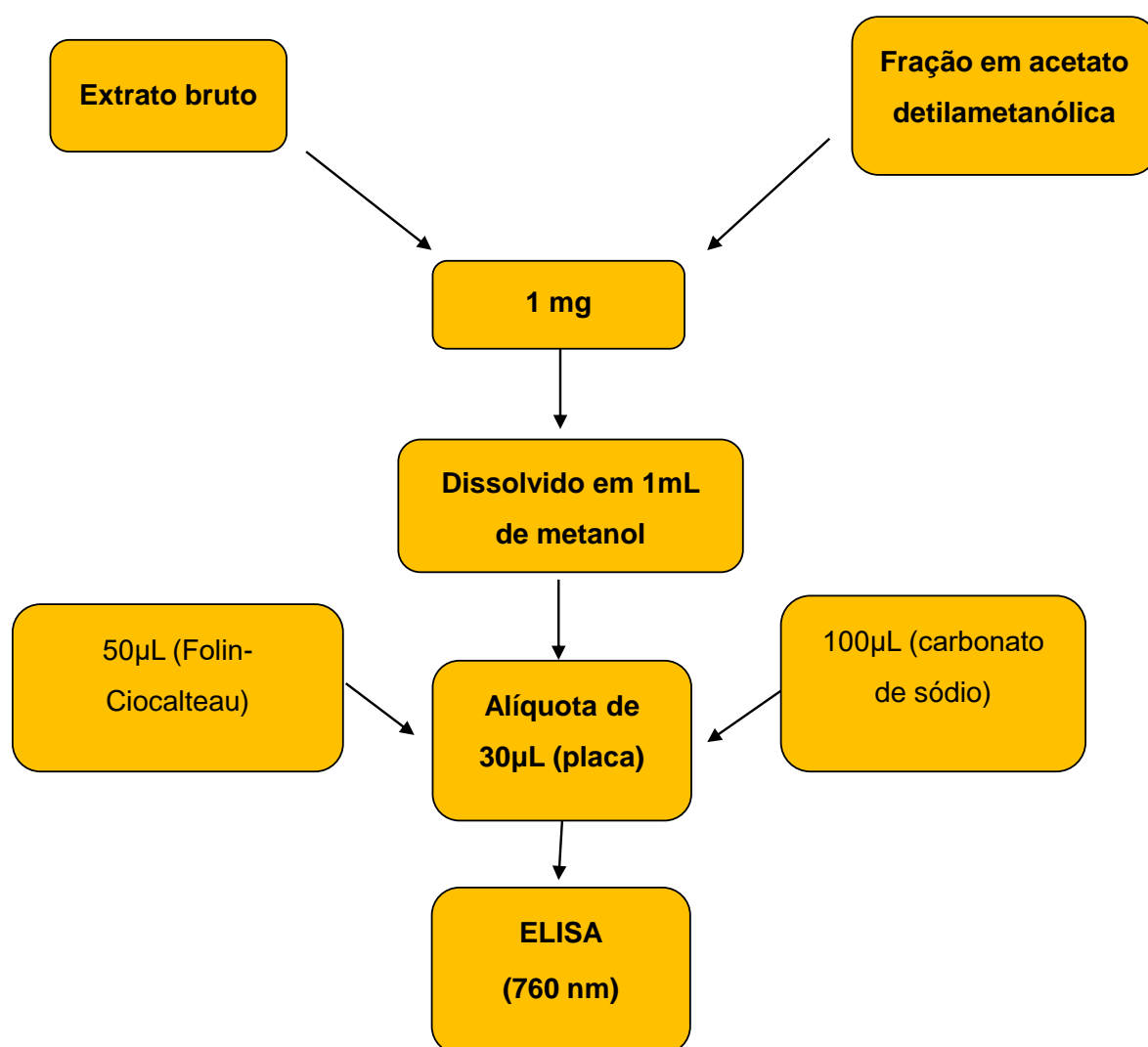


Figura 12. Análise de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu.

3.10 Avaliação da atividade antioxidante

Foi utilizado o método de sequestro de radicais livres DPPH que consiste no ensaio que quantifica a redução do 2,2-difenilpicrilhidrazil através do espectrofotômetro (Moharram e Youssef, 2014). Este método é fácil de usar, possui baixo custo, boa estabilidade e possui boa repetibilidade (Kandi e Charles, 2019). O procedimento para cada amostra se baseia na Figura 13.

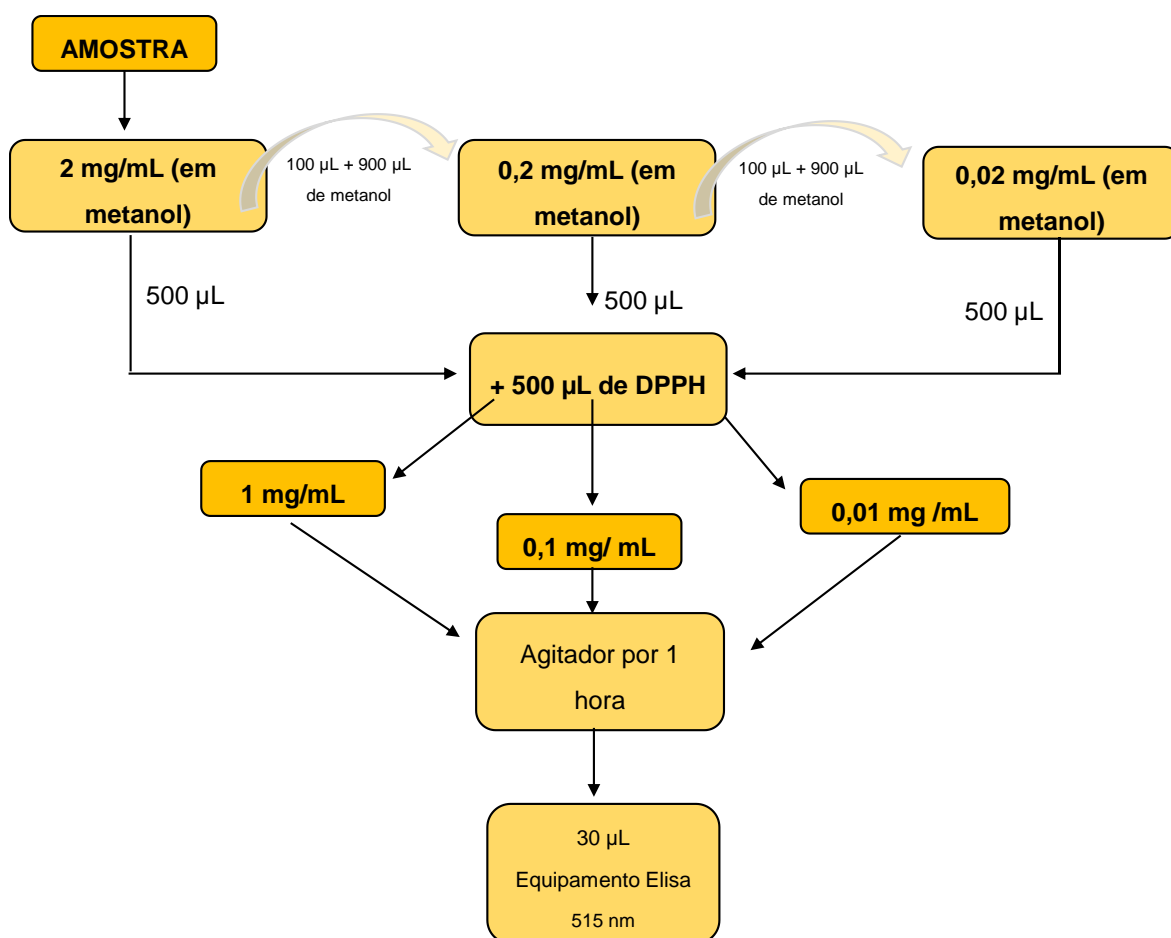


Figura 13. Ensaio de atividade antioxidante utilizando o método DPPH.

A reação ocorre em temperatura ambiente e a absorção do DPPH foi verificada no comprimento de onda de 515 nm em um espectrofotômetro UV-Vis, conforme realizado no LTA. A avaliação da atividade antioxidante foi expressa a

partir do sequestro de radicais livres de cada extrato através da absorção de DPPH, o qual foi baseado na solução de DPPH ausente de extrato (controle negativo) e uma solução padrão de substância aromática (controle positivo), o 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT) e o ácido ascórbico.

Neste método, 2 mg de cada amostra, do BHT e do ácido ascórbico, foram dissolvidos em 1,0 mL de metanol. Dessas soluções preparadas, uma alíquota de 100 µL foi dissolvida em 900 µL de metanol, obtendo uma solução de concentração igual a 0,2 mg/mL. A partir dessa solução diluída foi preparada outra solução de concentração 0,02 mg/mL.

Após o preparo das diferentes concentrações das amostras, do BHT e do ácido ascórbico, 500 µL de cada solução foi transferida para o *ependorf* e adicionado 500 µL de solução de DPPH de concentração igual a 4% m/v, resultando nas concentrações de 1 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL. Posteriormente, as misturas foram levadas para o agitador por uma hora. Após esse tempo, 30 µL de cada mistura foi transferida para uma placa contendo poços para a leitura no equipamento Elisa com comprimento de onda igual a 515 nm.

O resultado foi expresso em percentual de inibição da oxidação do radical e será calculada a partir da Equação 1 (Roque et al., 2017). Nessa fórmula, a Abs_1 é a absorbância da solução de DPPH mais o metanol (branco) e a Abs_2 é a absorbância da amostra em solução.

Equação 1:

$$\% \text{ Inibição DPPH} = \frac{(Abs_1 - Abs_2)}{Abs_1} \times 100$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato etanólico bruto foi submetido à CLAE para identificar e quantificar os carboidratos. No cromatograma obtido (Figura 14), foi possível identificar dois picos majoritários. Estes picos são referentes aos carboidratos glicose e frutose com tempo de retenção igual a 11,55 e 14,00 minutos, respectivamente. Esses dados são semelhantes aos encontrados no trabalho de Gomez e colaboradores (2002), em que eles identificaram e quantificaram os carboidratos glicose, frutose e sacarose. O fato de os valores do tempo de retenção para os carboidratos não serem o mesmo ocorre pelo fato de a metodologia de extração e CLAE serem diferentes.

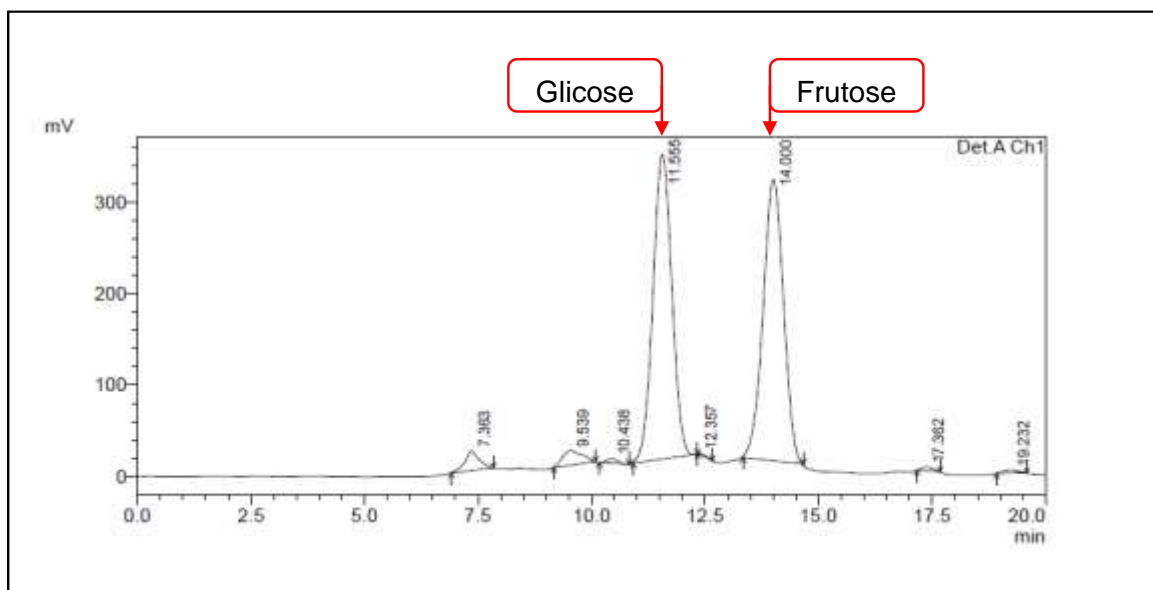


Figura 14. Identificação de carboidratos no extrato etanólico bruto por CLAE.

Para a quantificação dos carboidratos foi utilizada a equação $y = 240,77x + 391683$ para a glicose, e a equação $y = 256,07x - 18085$ para a frutose. A Figura 15 apresenta o gráfico da concentração dos carboidratos identificados na polpa do mamão.

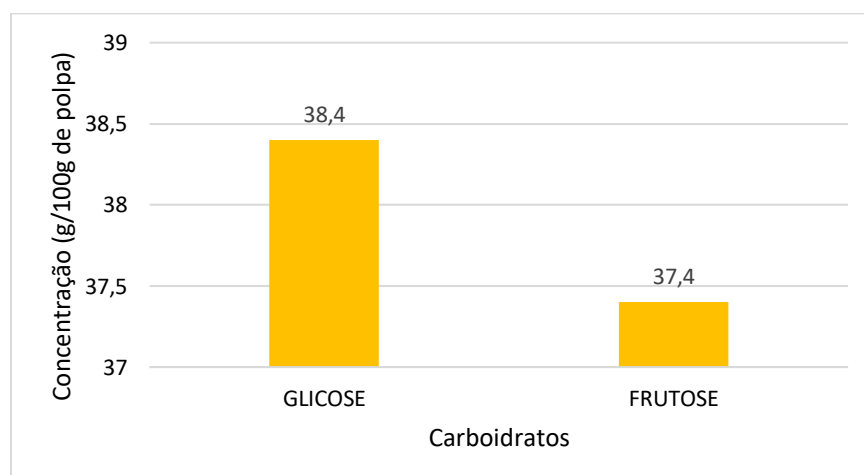


Figura 15. Concentração dos carboidratos glicose e frutose em 100 g de extrato etanólico da polpa do mamão.

Dos carboidratos presentes no mamão, o que possui maior concentração é a glicose (38,4 g/100g). No trabalho de Kelebek e colaboradores (2015), a concentração de glicose e frutose quantificada em duas variedades de mamão maduros foram, respectivamente: 4,1 g/100g, e 3,5 g/100g; 3,7 g/100g, e 2,9 g/100g. Já no trabalho de Gomez e colaboradores (2002), a concentração de glicose e frutose foram, respectivamente, 1,3 g/100g e 0,6 g/100g. No entanto, no presente trabalho as concentrações dos dois carboidratos identificados foram maiores. Isso pode ser justificado pela diferença no estágio de maturação dos frutos bem como a metodologia utilizada.

Durante o amadurecimento do mamão a sua aparência e sabor modificam. Dentre essas mudanças, a concentração de carboidratos também muda, sendo a glicose o açúcar predominante no início da maturação (Kelebk et al., 2015; Gomez et al., 2002).

4.2 Caracterização química do extrato etanólico da polpa de *Carica papaya* L

O extrato etanólico bruto da polpa de mamão foi submetido à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a fim de analisar o seu perfil químico. No cromatograma obtido é possível observar um pico majoritário com tempo de retenção de 6,17 min (Figura 16).

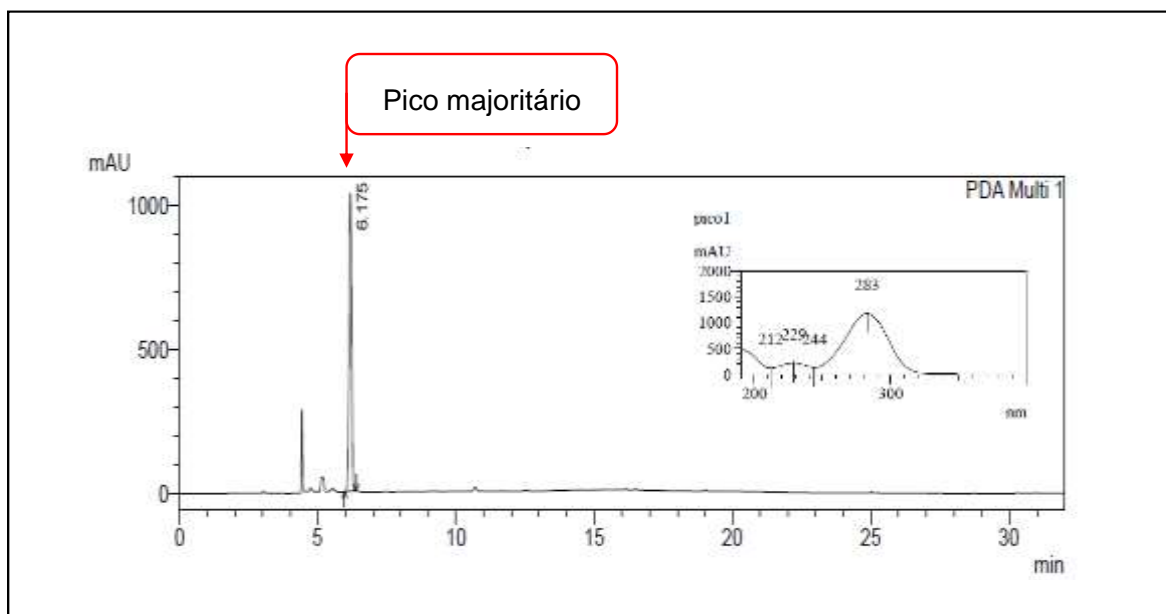


Figura 16. Cromatograma do extrato etanólico bruto da polpa do mamão e espectro de UV do pico majoritário (TR: 6,17 min) do extrato etanólico bruto da polpa do mamão.

No entanto, para avaliar o comportamento da substância referente ao pico majoritário frente à radiação UV, foi feito o espectro de UV referente a este pico majoritário. Na Figura 15 observa-se o espectro de UV referente ao pico majoritário (TR: 6,17 min). O comprimento de onda que a substância absorve é de 283 nm. Esse comprimento de onda é característico dos compostos fenólicos (absorção máxima em 284 nm), mas também, pode se referir às substâncias pertencentes à classe dos furanos (absorção máxima em 283 nm) (Campos, 2007; Bosch-Fusté et al., 2009; Serra-Cayuela et al., 2011; PUBCHEM).

O furano, conhecido como 5-hidroximetil-2-fufural (5-HMF), foi identificado em vinho espumante Cava, no trabalho de Serra-Cayuela e colaboradores (2013). A partir das análises espectroscópicas, essa substância apresentou absorção de UV em 283.9 nm. O espectro de UV do extrato bruto da polpa de mamão apresentou absorção de UV em 283 nm, ou seja, este comprimento de onda corrobora o 5-HMF identificado no trabalho de Serra-Cayuela e colaboradores (2013).

4.3 Substâncias identificadas em *Carica papaya* L.

O fracionamento das frações EC1 e LCC1 por Cromatografia Contracorrente de Alto Desempenho (CCCAD) resultou na obtenção de duas substâncias isoladas: T1 (6,6 mg) e T2 (18 mg). As amostras foram inicialmente analisadas por CCD para verificação do perfil químico. Ambas foram, posteriormente, analisadas pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para determinação de sua estrutura química.

4.3.1 Substância T1

A amostra T1 (6,6 mg) foi obtida a partir da fração EC1. A análise de T1 pela CCD revelou uma mancha referente à substância isolada com fator de retenção (R_f) igual a 0,7. Quando submetida à luz com comprimento de onda 254 nm, a mancha possui coloração roxa. No entanto, quando revelada com solvente vanilina, a olho nu, apresenta coloração verde (Figura 17).

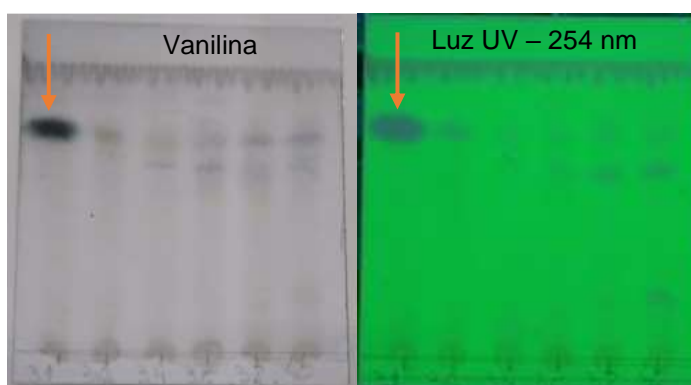


Figura 17. Placa cromatográfica da fração 31 obtida do CCCAD da amostra EC1, referente à substância T1.

A substância codificada por T1 foi obtida a partir da extração líquido/líquido em acetato de etila seguido de extração por celulose em clorofórmio e acetona. Para identificar a substância isolada realizou-se a análise do espectro de RMN ^{13}C e RMN ^1H .

O espectro de RMN ^1H , referente à substância T1, apresentou oito sinais (δ_{H}) que podem ser observados na Figura 18. O sinal δ_{H} 9,52 se refere ao hidrogênio “a” (H-a) da estrutura, que representa um hidrogênio singlete. Este hidrogênio se refere ao aldeído, visto que o hidrogênio do aldeído apresenta sinais na faixa de δ_{H} 9,00 e 10,00 (Bruice, 2004; Pavia, 2010). Na região do espectro entre δ_{H} 7,5 e 6,0 foram detectados dois sinais. Estes se referem ao hidrogênio “b” e “c” (H-b e H-c) com sinais em, respectivamente, δ_{H} 7,39 e 7,38, referindo-se a um duplete e δ_{H} 6,58 e 6,59, também se referindo a um duplete. O sinal δ_{H} 4,62 se refere a dois hidrogênios singletos iguais. Comparações dos dados espectrais com dados da literatura permitiram identificar a substância T1 como sendo o 5-HMF identificado por Serra-Cayuela e colaboradores (2013).

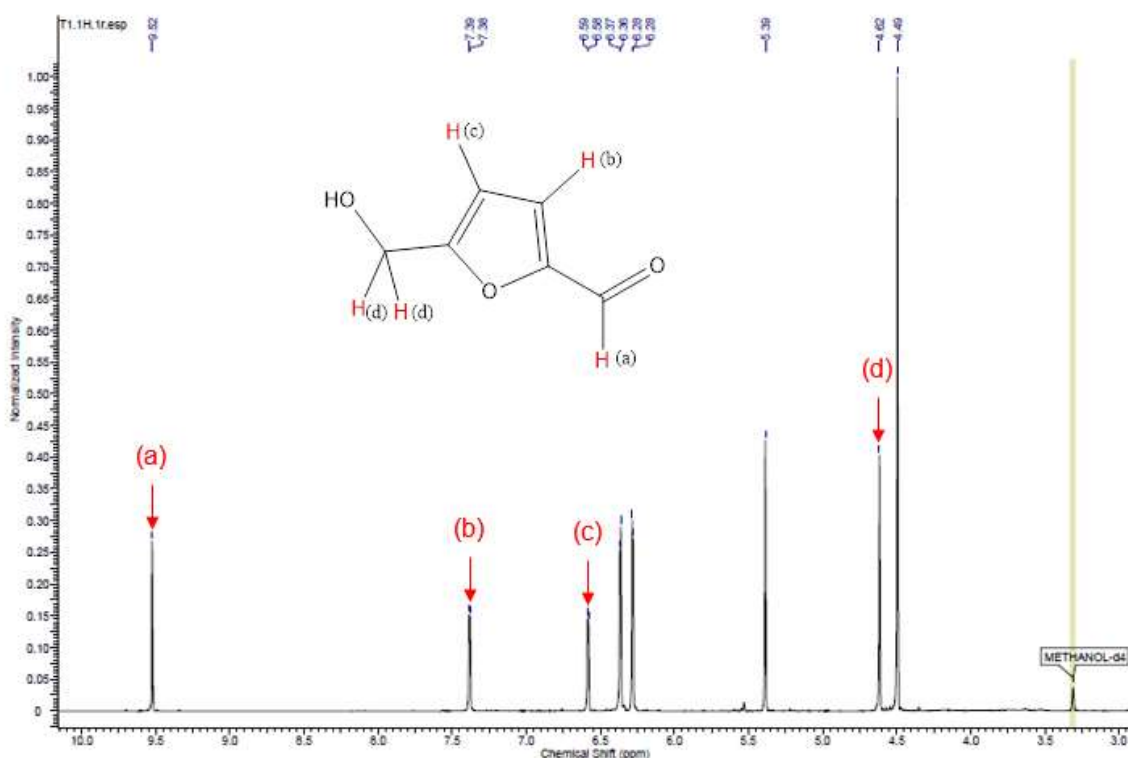


Figura 18. Espectro de RMN ^1H da substância T1.

O espectro de RMN ^{13}C referente à substância apresentou seis sinais (δ_{C}) referentes aos carbonos da substância T1 (Figura 19). O sinal δ_{C} 179,61 se refere

ao carbono 1 da estrutura. Este carbono representa o carbono da função aldeído da estrutura da substância T1. Visto que o sinal de aldeído para carbono é apresentado na faixa δ_C 150 a 200. O sinal δ_C 163,30 representa o carbono 2 no qual realiza ligação dupla. O sinal δ_C 125,01 se refere ao carbono 3, o sinal δ_C 110,32 ao carbono 4, o sinal δ_C 152,06 ao carbono 5 e o sinal δ_C 57,48 o carbono 6. Este último carbono faz ligação com o grupo hidroxila. Isso é confirmado, pois a ligação entre carbono e oxigênio apresentam sinais na faixa de δ_C 100 a 50. Esses dados corroboram o banco de dados PUBCHEM.

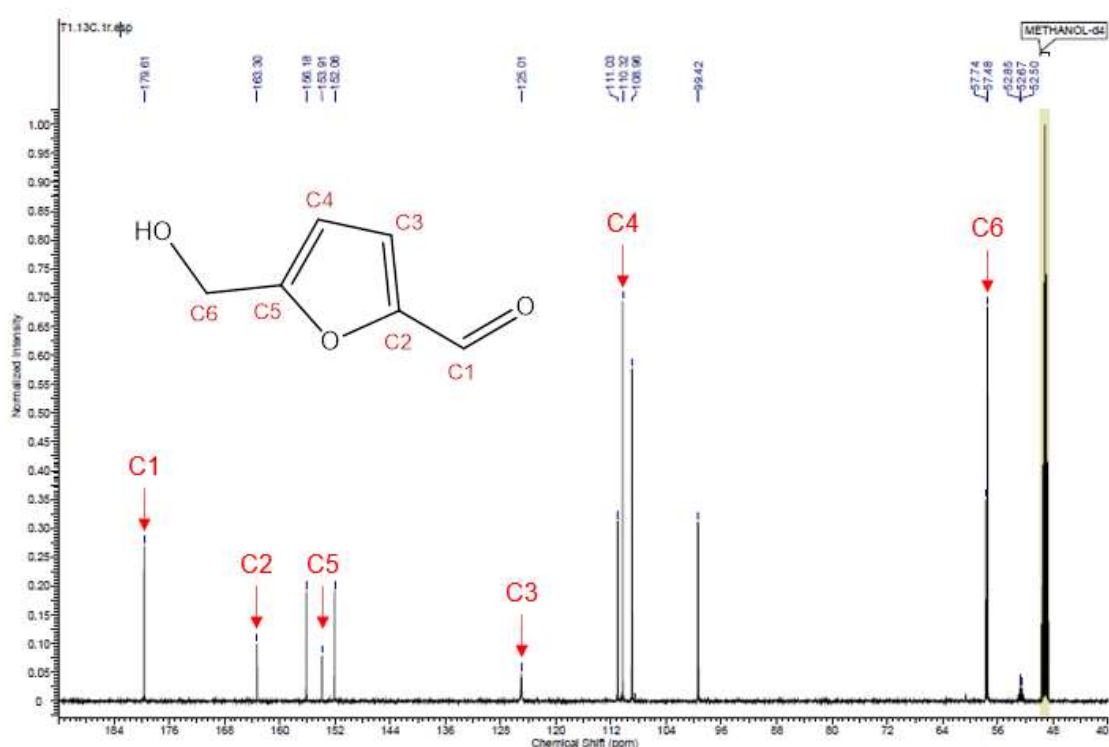


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C da substância T1.

Na técnica bidimensional foi obtido o espectro de correlação heteronuclear HSQC (Figura 20), e foi possível verificar que quatro carbonos da estrutura fazem acoplamento com o hidrogênio. O carbono 1 (δ_C 179,61) acopla com o hidrogênio “a” (δ_H 9,52); o carbono 3 (δ_C 125,01) acopla com o hidrogênio “b” (δ_H 7,39 e 7,38); o carbono 4 (δ_C 110,32) acopla com o hidrogênio “c” (δ_H 6,59 e 6,58); o carbono 6

(δ_C 57,48) acopla com os hidrogênios “d” (δ_H 4,62). O carbono 2 não possui hidrogênio pois realiza uma ligação simples com um carbono, uma ligação dupla com outro carbono e outra ligação com o oxigênio. Essa ligação com o hidrogênio deixa o carbono 2 (δ_C 163,30) mais desblindado e, por esse motivo, o seu sinal é deslocado para a esquerda do espectro de RMN ^{13}C . O mesmo vai ocorrer com o carbono 5 (δ_C 152,06), que não possui hidrogênio, pois realiza as quatro ligações com carbonos e oxigênio. Os dados dos espectros de RMN 1H e ^{13}C dessa substância podem ser vistos na Tabela 3.

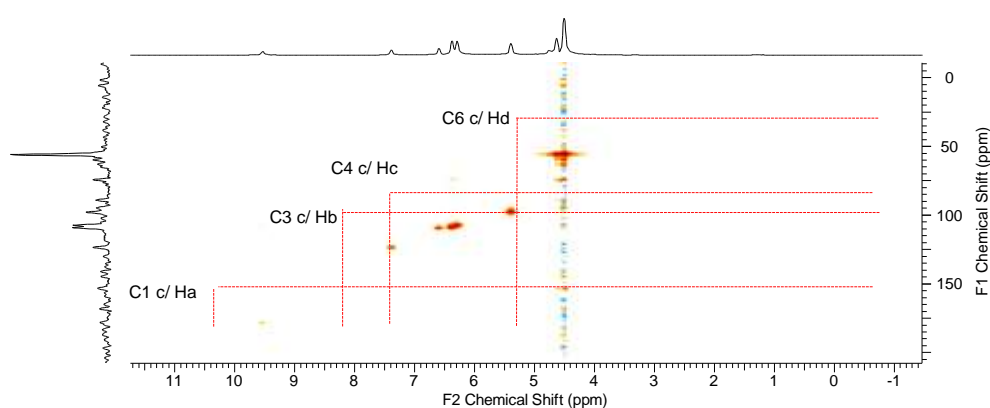


Figura 20. Espectro de correlação heteronuclear HSQC da substância T1.

Tabela 3. Dados de RMN 1H e RMN ^{13}C de T1 em $CDCl_3$ e comparação com os valores de referência da literatura, em $CDCl_3$. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J), em Hz

Nº do C	Substância T1		Dados da literatura	
	HSQG		PUBCHEM	Serra-Cayuela et al., 2013
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	179,61	9,52	178	9,3
2	163,3	-	161,44	-
3	125,01	7,39 (d, J=3,4)	123,86	7,4
4	110,32	6,59 (d, J=3,4)	110,05	6,55
5	152,06	-	152,07	-
6	57,48	4,62	57,17	4,58

O 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) possui fórmula química $C_6H_6O_3$, funções aldeído, álcool e pertence à classe dos furanos. Sua massa molar é igual a 126,1 g/mol e (PUBCHEM) (Figura 21).

O 5-HMF possui absorção no espectro de UV em 283 nm. Comprimento este que foi detectado na avaliação do perfil químico do extrato bruto da polpa do mamão. As substâncias pertencentes às classes dos furanos podem ser originadas a partir da desidratação de carboidratos, e a sua concentração aumenta com o tempo de armazenamento do alimento (Serra-Cayuela et al., 2013; Campos et al., 2004).

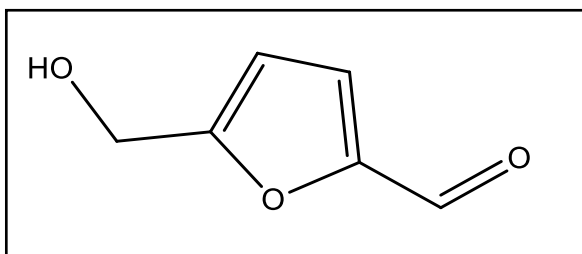


Figura 21. Estrutura química da substância T1 (5-hidroxiacetilfurfural).

4.3.2 Substância T2

A amostra T2 (18 mg) foi obtida a partir da fração LCC1. A análise de T2 pela CCD revelou uma mancha ($R_f = 0,3$) referente à substância isolada, que não foi revelada na lâmpada de UV (Figura 22). No entanto, quando revelada com solução de vanilina, a mancha apresentou coloração roxa, conforme trabalho de Rashed e Fouche (2013) que identificou a substância β -sitosterol e estigmasterol no mamão.

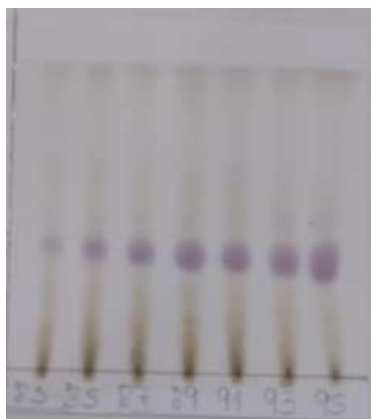


Figura 22. Placa cromatográfica das frações 93 e 95 obtidas por CCCAD da amostra LCC1, referente à substância T2.

A substância identificada, codificada por T2, foi obtida a partir das frações finais do primeiro Contracorrente que foram reunidas (124 a 139 – LCC1). Essas frações apresentaram-se como cristais de cor branca, que quando submetidos à Cromatografia em Camada Delgada (CCD), no qual utilizou-se como eluente os solventes clorofórmio e metanol, observou-se uma mancha que quando revelada com vanilina apresentou coloração roxa.

No espectro de RMN ^{13}C e RMN ^1H foi possível observar vários sinais entre δ_{C} 140,79 e 10 e δ_{H} 5,5 e δ_{H} 0,5. No espectro de carbono da substância T2 foi possível identificar a presença de uma dupla ligação, visto que, carbonos que possuem dupla ligação apresentam sinais na faixa de δ_{C} 150 a δ_{C} 100. O espectro de carbono da substância T2 apresentou o sinal em δ_{C} 140,79, que é característico quando há presença desse tipo de insaturação (Bruice, 2004; Pavia, 2010). Sinais na faixa de δ_{C} 100,79 e δ_{C} 50,00 são característicos de carbonos que fazem ligação com oxigênio. A substância T2 apresenta uma hidroxila, dessa forma, o carbono ligado a esse grupo apresentou sinal em δ_{C} 71,83. Os espectros de RMN ^{13}C e RMN ^1H podem ser vistos nas Figuras 23 e 24.

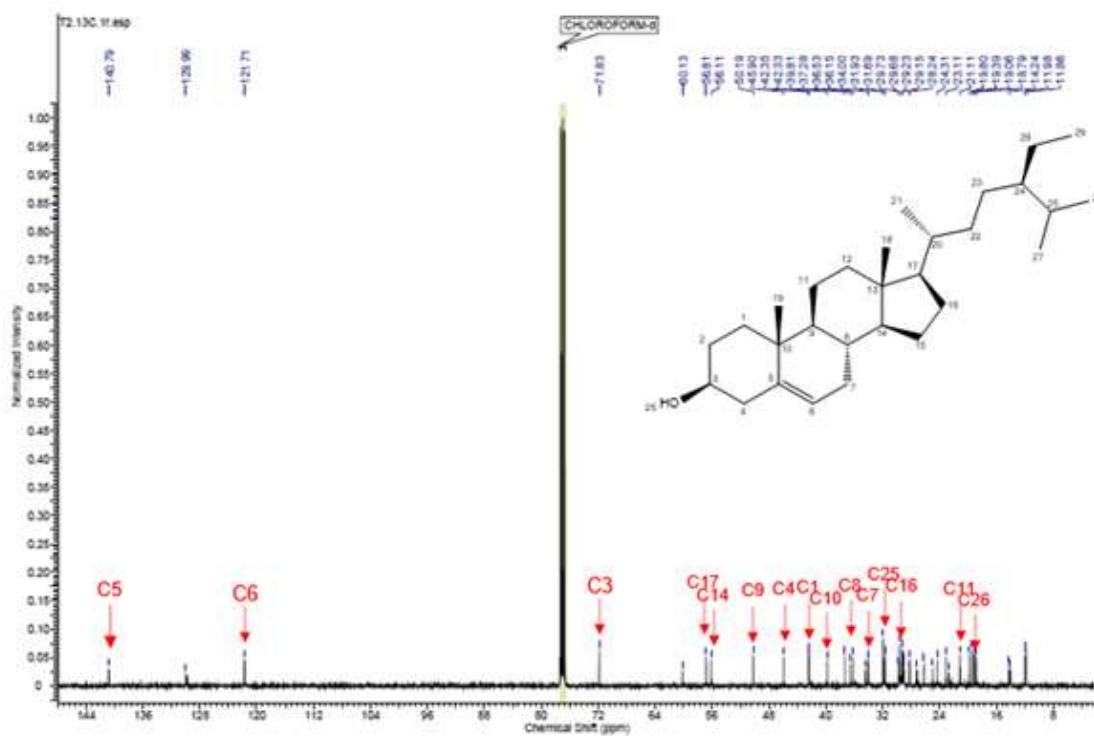


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C da substância T2.

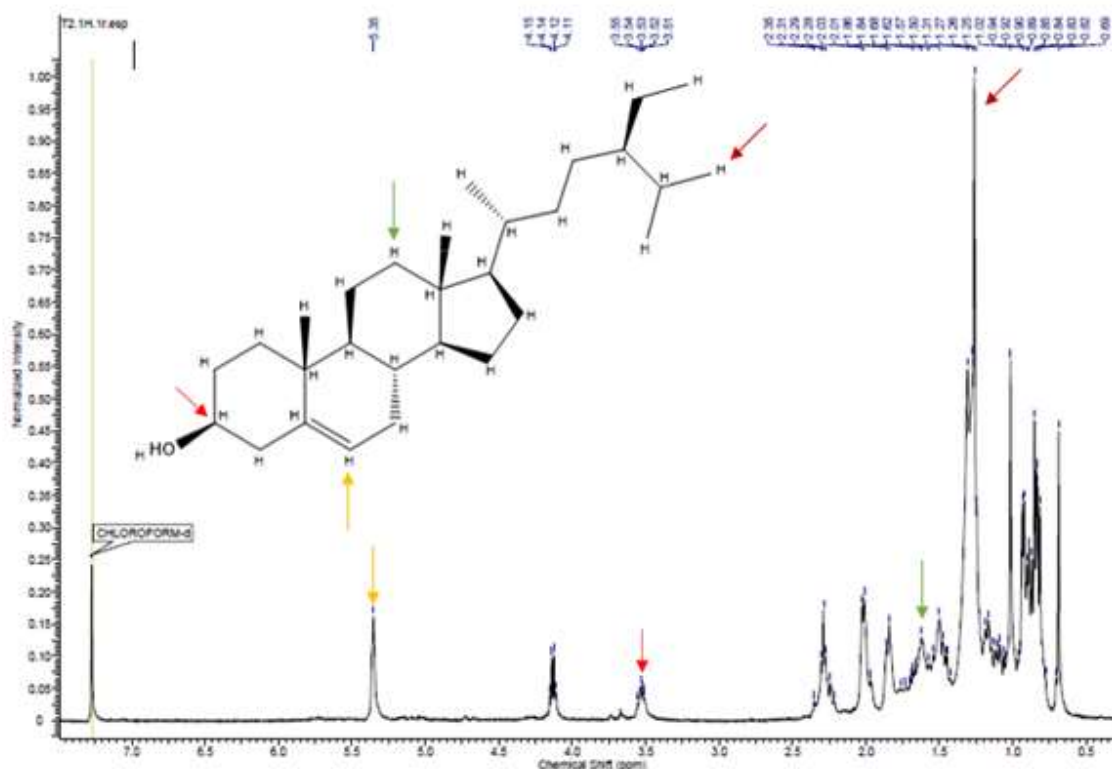


Figura 24. Espectro de RMN 1H da substância T2.

Na técnica bidimensional foi obtido o espectro de correlação heteronuclear HSQC (Figura 25), no qual foi possível verificar os acoplamentos entre carbono e hidrogênio. Dentre os sinais apresentados alguns foram possíveis de interpretar através da comparação com a literatura. O sinal δ_c 140,79 se refere ao carbono que possui a ligação dupla, como já citado anteriormente. Este carbono não acopla com nenhum hidrogênio, visto que, realiza as quatro ligações com outros carbonos. O sinal em δ_c 121,71 acopla com o sinal em δ_H 5,35. O sinal δ_c 71,83 se refere ao carbono que faz ligação com oxigênio, e que na estrutura da T2 é uma hidroxila (OH). Dessa forma, o sinal em δ_c 71,83 acopla com δ_H 3,54, sendo este o carbono 3 conforme Sales (2019).

Os demais acoplamentos identificados ocorreram em sinais δ_c 11,98 com δ_H 0,70; δ_c 19,06 com δ_H 1,02 e δ_c 29,23 com δ_H 1,31. Esses dados corroboram a substância identificada por Sales (2019) e por Rashed e Fouche (2013), que

identificaram o β -sitosterol em *Carica papaya*. Os dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C dessa substância podem ser vistos na Tabela 4.

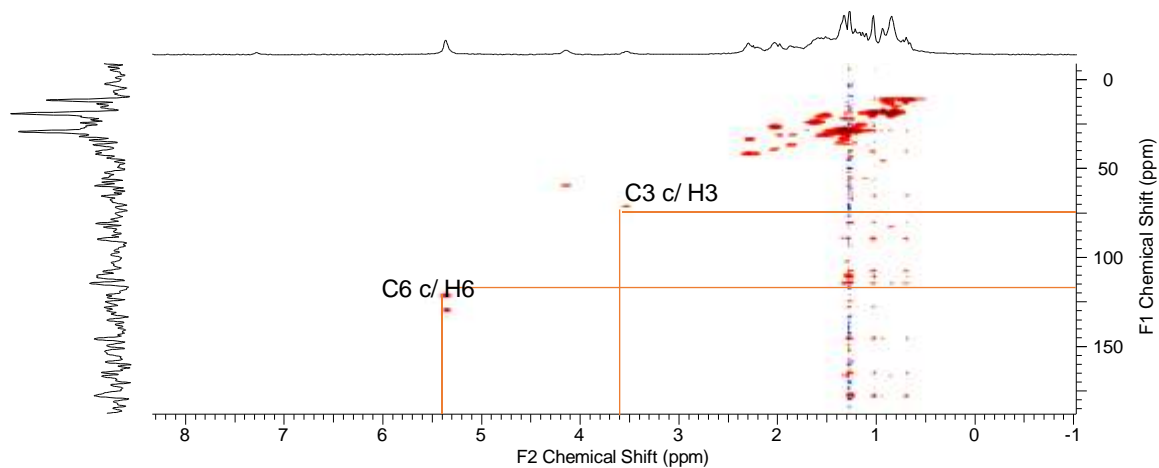


Figura 25. Mapa de correlação heteronuclear HSQC da substância T2.

Tabela 4. Dados de RMN 1H e RMN 13C de T2 em CDCl₃ e comparação com os valores de referência da literatura, em CDCl₃. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J), em Hz

Substância T2			Dados da literatura		
Nº do C	HSQG		Sales, 2019		Rashed e Fouche, 2013
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	37,28	-	37,20	-	37,60
2	-	-	31,90	-	31,40
3	71,83	3,54 (m)	71,80	3,54	71,60
4	42,33	-	43,30	-	42,80
5	140,79	-	140,70	-	140,40
6	121,71	5,35	121,70	5,37	121,05
7	31,69	-	31,60	-	31,70
8	31,93	-	31,90	1,52	31,70
9	50,19	0,94 (d, J=6,3)	50,10	0,94	50,30
10	36,15	-	36,10	-	36,70
11	21,11	-	21,10	-	21,10
12	39,81	1,31	39,80	-	39,80
13	42,35	-	42,30	-	42,80
14	56,11	-	56,70	1,02	56,40
15	-	-	24,30	-	24,50
16	29,23	-	28,20	-	28,40
17	56,81	-	56,00	1,12	57,20
18	-	-	11,80	0,70	-
19	19,39	-	19,40	1,11	19,50
20	-	-	36,50	1,35	35,90
21	19,06	-	19,00	1,02	18,60
22	-	-	33,90	-	34,20
23	-	-	26,10	-	26,20
24	45,90	-	45,80	-	46,30
25	29,68	-	28,20	-	29,20
26	19,80	1,02	19,80	1,11	19,80
27	-	-	18,70	1,12	19,20
28	-	-	23,00	-	23,40
29	11,86	-	11,90	0,70	-

A substância β -sitosterol, de fórmula química $C_{29}H_{50}O$, possui massa molar 414,7 g/mol e pertence à classe dos fitoesteróis (PUBCHEM) (Figura 26).

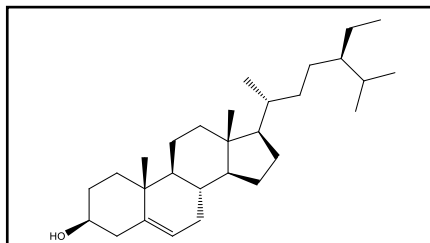


Figura 26. Estrutura química da substância T2 (β -sitosterol).

4.4 Análise de fenóis totais

A partir dos espectros de UV do extrato bruto e da fração em acetato de etila, que sugeriram a presença de compostos fenólicos, realizou-se o método de Folin-Ciocalteu para quantificar os compostos fenólicos presentes no extrato bruto e na fração em acetato de etila (Figura 27).

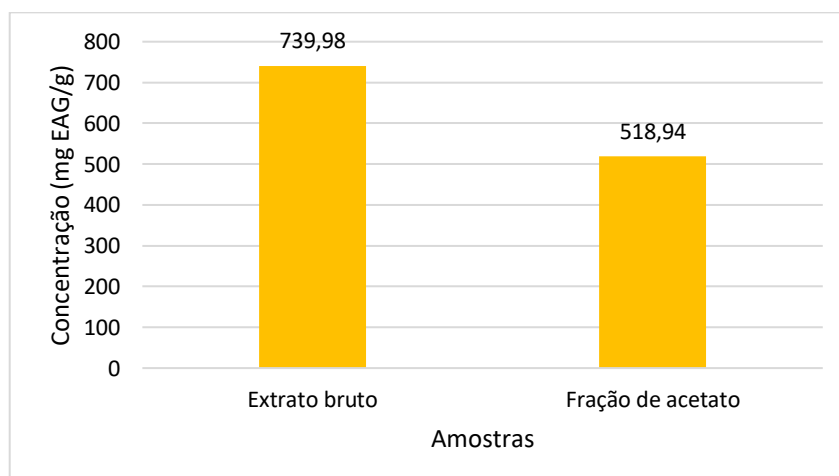


Figura 27. Concentração de fenóis totais na polpa de mamão.

É possível observar que as concentrações de fenóis quantificadas na polpa de mamão foram altas, quando comparadas aos trabalhos de Zuhair e colaboradores (2013), que encontraram 0,6 mg EAG/g, e Castro-Vargas e colaboradores (2019), que encontraram 34 mg EAG/g.

Em amostras com altas concentrações de carboidratos, quando submetidas ao aquecimento, pode ocorrer a desidratação dos carboidratos. Essa reação de desidratação pode levar à formação de uma substância chamada de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). O 5-HMF frente à luz UV se comporta como os compostos fenólicos, apresentando banda de absorção em 283 nm e, por esse motivo, a sua presença pode ser confundida com os compostos fenólicos, que possuem absorção máxima em 284 nm (Serra-Cayuela et al., 2011; Bosch-Fusté et al., 2009). Foi possível quantificar altas concentrações de carboidratos, os quais podem ter sofrido reação de desidratação, visto que no método de extração houve aquecimento. Portanto, os carboidratos presentes na polpa de mamão, quando submetidos ao aquecimento, podem ter se desidratado e formado a substância 5-HMF, que na análise de fenóis foi quantificada como se fosse os fenóis. Essa suspeita pode ser confirmada através do espectro de UV realizada com o espectro bruto em que a substância apresentou pico de absorção em 283 nm.

4.5 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada com quatro amostras obtidas da polpa do mamão: o extrato bruto, a fração em acetato de etila, o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e o β -sitosterol. O 5-HMF e o β -sitosterol foram as substâncias isoladas da polpa do mamão. Da massa da fração em acetato de etila aplicada no equipamento de Contracorrente, 0,7 % se referiram ao 5-HMF; já a massa das frações restantes do primeiro Contracorrente (LCC1), 5,2% se referiram ao β -sitosterol.

O teste da atividade antioxidante foi realizado nas concentrações de 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL e 1 mg/mL. Para comparar a porcentagem de inibição antioxidante dessas amostras utilizou-se os antioxidantes comerciais BHT e ácido ascórbico como o controle positivo, pois essas substâncias atuam no sequestro dos radicais livres. Dessa forma, as amostras que não apresentaram diferença significativa frente aos antioxidantes comerciais, BHT e ácido ascórbico, podem ser

consideradas antioxidantes; logo, se houver diferença significativa da amostra frente a esses antioxidantes, apresentando $p < 0,001$, estas não podem ser consideradas antioxidantes. Vale ressaltar que a concentração mínima do antioxidante deve reduzir em pelo menos 50% a concentração inicial do DPPH para ser considerada um antioxidante (Brand-Williams et al., 1995; Cheng e Yu, 2006).

O β -sitosterol (T2) foi a única amostra analisada que não apresentou atividade antioxidante, visto que quando comparada aos controles positivos apresentou diferença significativa, ou seja, $p < 0,001$. O extrato bruto, a fração em acetato de etila e o 5-HMF (T1) não apresentaram diferença significativa quando comparada aos controles positivos, portanto, foram amostras que apresentaram atividade antioxidante (Figura 28).

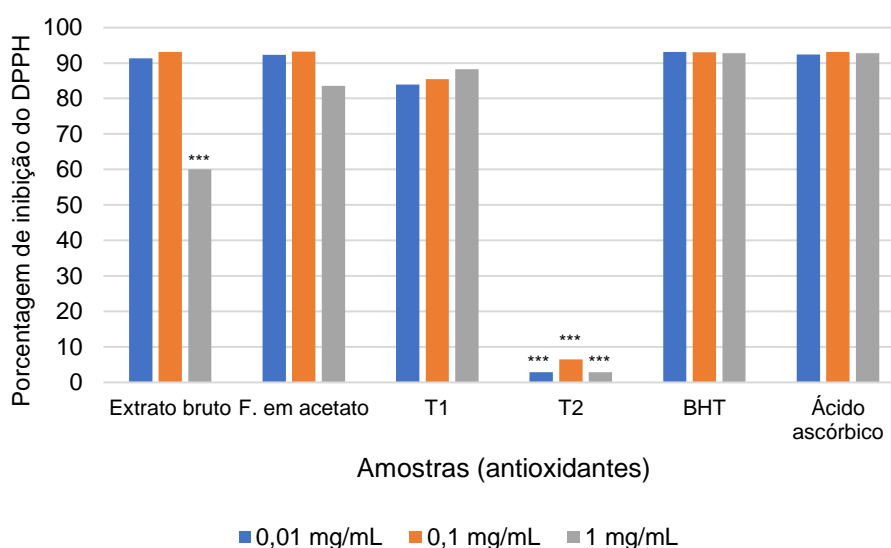


Figura 28. Porcentagem de inibição de DPPH das amostras do mamão e dos antioxidantes comerciais. *** = $p < 0,001$.

Os resultados demonstraram que a porcentagem de inibição do extrato bruto nas três concentrações testadas (0,01 mg/mL; 0,1 mg/mL e 1 mg/mL) apresentaram porcentagens de inibição, respectivamente, 91,4%, 93,1% e 60,0%. No entanto, apesar do extrato bruto apresentar porcentagem de inibição superior a 50% na concentração de 1 mg/mL, nessa concentração este não é capaz de atuar

como antioxidante quando comparado ao BHT e ao ácido ascórbico, pois apresentou $p < 0,001$ e, portanto, houve diferença significativa frente aos controles positivos. Sugere-se que na maior concentração do extrato bruto a porcentagem de inibição foi menor devido à interferência da cor que causou erro na leitura do espectrofotômetro, uma vez que este fato ocorreu na amostra mais concentrada e uma das desvantagens do método DPPH é a interferência da cor na avaliação da atividade antioxidante, visto que esta é uma análise colorimétrica. Nas concentrações de 0,01 mg/mL e 0,1 mg/mL, o extrato bruto não apresentou diferença significativa frente aos controles positivos, ou seja, esse extrato possui substâncias capazes de atuar como antioxidantes nestas concentrações.

A fração em acetato de etila apresentou porcentagem de inibição de 92,3%, 93,2% e 83,4%, respectivamente, nas concentrações de 0,01 mg/mL; 0,1 mg/mL e 1 mg/mL. Desta forma, nas três concentrações testadas essa fração não apresentou diferença significativa frente aos controles positivos, podendo ser considerada uma amostra que contém substâncias antioxidantes.

A T1 apresentou porcentagens de inibição nas concentrações de 0,01 mg/mL; 0,1 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente, iguais a 84,0%, 85,4%, 88,2%. Essa substância pode ser considerada antioxidante, visto que não apresentou diferença significativa frente aos controles positivos. Apesar do 5-HMF ter sido oriundo do extrato bruto e da fração em acetato de etila, nas concentrações de 0,01 mg/mL e 0,1 mg/mL ele inibe menos a ação do radical do que o extrato bruto e a fração em acetato de etila, nas mesmas concentrações. Este fato pode ter ocorrido, visto que na amostra do extrato bruto e na fração em acetato de etila, provavelmente, existe mais de uma substância que pode atuar como antioxidante; ao contrário da amostra do 5-HMF, que possui somente ele como substância antioxidante. É importante ressaltar que a presença da hidroxila (OH) na estrutura do 5-HMF o potencializa como doador de átomos de hidrogênios para os radicais presentes no meio (Chen et al., 2014).

Zuhair e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antioxidante do mamão por cinco métodos diferentes: conteúdo total de fenóis (TPC), conteúdo total de flavonoides (TFC), poder antioxidante redutor férrico (FRAP), atividade sequestrante de radicais contra 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), e atividade de eliminação contra radicais ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina)-6-ácido

sulfônico (Ensaio ABTS), em diferentes estágios de maturação do *C. papaya*, e verificaram que no estágio de maior maturação o potencial antioxidante foi maior.

Nesse trabalho, os autores submeteram o extrato metanólico da polpa do mamão à avaliação antioxidante pelo método DPPH, que apresentou 72,19% de inibição do DPPH no estágio de maior maturação. Já no trabalho de Iordanescu e colaboradores (2021), a avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico da polpa madura do mamão foi de 86,44% de inibição do DPPH. No presente trabalho a porcentagem de inibição do extrato bruto nas concentrações de 0,01 mg/mL e 0,1 mg/L foi de 91,4%, 93,1%.

O 5-HMF é uma substância formada a partir da desidratação de carboidratos presentes no alimento sob a influência da temperatura. Desta forma, Kowalski (2013) realizou um trabalho com diferentes tipos de mel relacionando à concentração de 5-HMF quando aquecidos, e à relação com a atividade antioxidante. Das amostras de mel analisadas, o mel de lima foi o único que obteve relação da concentração do 5-HMF com a atividade antioxidante, apresentando inibição de 69,04% e 75,88% do DPPH quando o mel foi aquecido em banho-maria e por micro-ondas, respectivamente. No trabalho de Li e colaboradores (2009), o 5-HMF, isolado da alga marinha vermelha, foi submetido ao teste de DPPH em diferentes concentrações do 5-HMF (100 μ M, 25 μ M, 10 μ M e 1 μ M) e as porcentagens de inibição foram, respectivamente, 75,6%, 56,3%, 35,6% e 10,4%. As porcentagens de inibição do DPPH para o 5-HMF deste trabalho (84,0%, 85,4%, 88,2%.) foram superiores aos valores encontrados no trabalho de Kowalski (2013) e Li e colaboradores (2009).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A polpa de mamão possui altas concentrações de carboidratos e, por isso, quando a polpa foi submetida à extração por aquecimento, ocorreu a reação de desidratação dos monômeros de carboidratos presentes que, portanto, levaram à formação da substância 5-hidroximetilfurfural (5-HMF).

As substâncias isoladas e identificadas neste trabalho, o 5-HMF e o β -sitosterol, já foram identificadas no mamão. O 5-HMF foi identificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O β -sitosterol foi isolado a partir do mamão e identificado por Ressonância Magnética Nuclear.

Das quatro amostras analisadas pelo método DPPH, apenas três amostras apresentaram atividade antioxidante, o extrato bruto, a fração em acetato de etila e o 5-HMF. No entanto, apesar de na maior concentração o extrato bruto não ter apresentado atividade antioxidante significativa, nas outras duas concentrações ele apresentou atividade antioxidante. Já o β -sitosterol não pode ser considerado uma substância antioxidante pelo método do DPPH, pois quando comparado aos antioxidantes comerciais ele não apresentou atividade antioxidante.

Sendo assim, é possível concluir que o mamão pode ser uma fonte de antioxidante natural na alimentação, visto que possui substâncias que são capazes de atuar no sequestro dos radicais livres. Isso foi comprovado a partir da avaliação da atividade antioxidante do seu extrato bruto e da fração em acetato de etila.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, K., Gürtler, R., Berg, K., Heinemeyer, G., Lampen, A., Appel, K.E. (2011) Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food. *Molecular Nutrition e Food Research*, 55(5):667–678.
- Adeneye, A.A., Olagunju, J.A. (2009) Preliminary hypoglycemic and hypolipidemic activities of the aqueous seed extract of *Carica papaya* Linn in Wistar rats. *Biol Med.*, 1:1-10.
- Ahmed, S.U., Al-Mansur, M.A., Ahmed, Y., Sohrab, M.H., Chowdhury, A.S., Hasan, C. M. (2010) Phytochemical and biological investigations of *Carica papaya*. *Dhaka University Journal of Science*, 58:265-8.
- Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. (2008) Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food research International*, 41(1):1-15.
- Almeida, F.T.D., Bernardo, S., Sousa, E.F.D., Marin, S.L.D., Grippa, S. (2003) Growth and yield of papaya under irrigation. *Scientia Agricola*, 60(3):419-424.
- Amié, D., Davidovié-Amié, D., Beslo, D., Trinajstić, N. (2003) Structure-radical scavenging activity relationships of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76:55-61.
- Andreo, D., Jorge, N. (2006) Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 24(2):319-336.
- Asghar, N., Naqvi, S.A.R., Hussain, Z., Rasool, N., Khan, Z.A., Shahzad, S.A., Jaafar, H.Z. (2016) Compositional difference in antioxidant and antibacterial activity of all

- parts of the *Carica papaya* using different solvents. *Chemistry Central Journal*, 10(1):1-11.
- Baggio, S.R., Bragagnolo, N. (2004) Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24:64-70.
- Bathista, A.L.B.S. (2005) Princípios básicos de ressonância magnética nuclear do estado sólido. São Carlos, Brasil, 50p.
- Berthod, A., Carda-Broch, S. (2004) Determinação dos coeficientes de partição líquido-líquido por métodos de separação. *Journal of chromatography*, 1037(1-2):3-14.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.L.W.T. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1):25-30.
- BRUCE, P.Y. (2004) *Química Orgânica*, vol. 1, 3ª ed., São Paulo: Pearson Prentice Hall, 120p.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*. 186:343-355.
- Bosch-Fusté, J., Sartini, E., Flores-Rubio, C., Caixach, J., López-Tamames, E., Buxaderas, S. (2009) Viability of total phenol index value as quality marker of sparkling wines, "cavas". *Food Chemistry*, 114(3):782-790.
- Câmara, J.S, Marques, J.C, Alves, M.A., Silva Ferreira, A.C. (2004) 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone levels in fortified Madeira wines: relationship to sugar content, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22):6765-9.
- Campos, M.G., Markham, K.R. (2007). Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: flavones, flavonols and phenolic acids. Imprensa da Universidade de Coimbra: Coimbra, Portugal, 2007; ISBN 9789892604800.
- Castro-Vargas, H.I., Baumann, W., Ferreira, S.R., Parada-Alfonso, F. (2019) Valorization of papaya (*Carica papaya* L.) agroindustrial waste through the recovery of phenolic antioxidants by supercritical fluid extraction. *Journal of Food Science and Technology*, 56:3055-3066.
- Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia (2023). Resumo do composto PubChem para CID 237332, 5-hidroximetilfurfural. Recuperado em 7 de

novembro de 2023 Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Hydroxymethylfurfural>. Acesso em: mar. 2023.

Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia (2023). Resumo do composto PubChem para CID 222284, Beta-Sitosterol. Recuperado em 7 de novembro de 2023 Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Beta-Sitosterol>. Acesso em: mar. 2023.

Chandrika, U.G., Jansz, E.R., Wickramasinghe, S.N., Warnasuriya, N.D. (2003) Carotenoids in yellow-and red-fleshed papaya (*Carica papaya* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12):1279-1282.

Chávez-González, M.L., Sepúlveda, L., Verma, D.K., Luna-García, H.A., Rodríguez-Durán, L.V., Iliina, A., Aguilar, C.N. (2020) Processos convencionais e emergentes de extração de flavonoides. *Processos*, 8(4):434.

Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., Cravotto, G. (2019). Extração verde de produtos naturais. Origens, situação atual e desafios futuros. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 11:248-263.

Chen, J., Zhao, G., Chen, L. (2014) Efficient production of 5-hydroxymethylfurfural and alkyl levulinate from biomass carbohydrate using ionic liquid-based polyoxometalate salts. *Research Advances*, 4(8):4194-4202.

Cheng, Z., Moore, J., Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20):7429-7436.

Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S. (1993) Introdução a métodos cromatográficos. 5. Ed. Campinas, 279p.

Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2):156.

Castro, M.L., García-Ayuso, L.E. (1998). Extração Soxhlet de materiais sólidos: uma técnica ultrapassada com um futuro inovador promissor. *Analytica Chimica Acta*, 369 (1-2):1-10.

Dewick, P.M. (2009) Medicinal Natural Products. 3. Ed. Reino Unido, 539p.

- Didier, A.K., Hubert, K.K., Parfait K.E.J., Kablan T. (2017) Phytochemical Properties and Proximate Composition of Papaya (*Carica papaya* L. var solo 8) Peels. *Food Science and Technology*.5:676-680.
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2021) Boletim Técnico, 12p.
- Emektar, K., Kantekin-Erdogan, M.N., Tekin, A. (2022) Furan formation in some vegetable oils during heat treatments. *Food Chemistry*, 386:132744.
- Fang, L., Liu, Y., Yang, B., Wang, X., Huang, L. (2011) Separation of alkaloids from herbs using high-speed counter-current chromatography. *Journal of Separation Science*, 34(19):2545–2558.
- Forkmann, G., martens, S. (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:155-160.
- Ghafar, F., Nazrin, T.T.N.N., Salleh, M.M.R., Hadi, N.N., Ahmad, N., Hamzah, A.A., Azman, I.N. (2017) Total phenolic content and total flavonoid content in moringa oleifera seed. *Galeri Warisan Sains*, 1(1):23-25.
- Górniak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski, J. (2019) Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1):241-272.
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L.D., Hidalgo, F.J., Finglas, P. (2018) Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods? *Food Chemistry*, 264:471-475.
- Grunwald, C. (1975). Plant sterols. *Annual Review of Plant Physiology*, 26(1):209-236.
- Gupta, G., Sharma, S., Kumar, N. (2020) *Carica papaya* aqueous leaf extracts as potential botanical insecticide against rose aphids (*Macrosiphum rosaeformis* D.). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(3):960-964.
- Halliwell, B. (1996). "Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans." *Free Radic Res*, 25(1):57-74.
- Harbone, J.B, Mabry, T.J. (1982) The flavonoids: Advances in research. 1. Ed. New York: Champman and Hall, 744p.

- Harborne, J.B. (1994) Phenolics In: Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V. *Natural Products. Their chemistry and biological significance*. 1. ed. New York: Longman scientific & Technical, p. 361-388.
- Harms, S.E., Morgan, T.J., Yamanashi, W.S., Harle, T.S., Dodd, G.D. (1984) Princípios da ressonância magnética nuclear. *RadioGraphics*. 4(1):26-43.
- Hartmann, M.A. (1998) Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science*, 3(5):170-175.
- Huang, M., Su, E., Zheng, F., Tan, C. (2017) Encapsulation of flavonoids in liposomal delivery systems: the case of quercetin, kaempferol and luteolin. *Food e Function*, 8(9):3198-3208.
- Husin, F., Ya'akob, H., Abd Rashid, S.N., Shahar, S., Soib, H.H. (2019) Cytotoxicity study and antioxidant activity of crude extracts and SPE fractions from *Carica papaya* leaves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19:101130.
- Iordanescu, O.A., Bala, M., Gligor, D., Zippenfening, S.E., Cugorean, M.I., Petroman, M.I., Riviş, M. (2021) A DPPH· kinetic approach on the antioxidant activity of various parts and ripening levels of papaya (*Carica papaya* L.) ethanolic extracts. *Plants*, 10(8):1679.
- Jaiswal, P., Kumar, P., Singh, V.K., Singh, D.K. (2010) *Carica papaya* Linn: Uma fonte potencial para vários problemas de saúde. *Journal Pharmacology Research*, 3(5):998-1003.
- Juszczak, A.M., Zovko-Končić, M., Tomczyk, M. (2019) Recent trends in the application of chromatographic techniques in the analysis of luteolin and its derivatives. *Biomolecules*, 9(11):731.
- Kandi, S., Charles, A.L. (2019) Statistical comparative study between the conventional DPPH spectrophotometric and dropping DPPH analytical method without spectrophotometer: Evaluation for the advancement of antioxidant activity analysis. *Food chemistry*, 287:338-345.
- Karak, P. (2019) Biological activities of flavonoids: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4):1567-1574.
- Kelebek, H., Selli, S., Gubbuk, H., Gunes, E. (2015) Comparative evaluation of volatiles, phenolics, sugars, organic acids, and antioxidant properties of Sel-42 and Tainung papaya varieties. *Food Chemistry*, 173:912-919.

- Kong, Y.R., Jong, Y.X., Balakrishnan, M., Bok, Z.K., Weng, J.K.K., Tay, K.C., Khaw, K.Y. (2021) Beneficial Role of *Carica papaya* Extracts and Phytochemicals on Oxidative Stress and Related Diseases: A Mini Review, *Biology*, 10(4):287.
- Koutcher, J.A., Burt, C.T. (1984) Princípios de ressonância magnética nuclear. *Jornal de medicina nuclear*, 25(1):101-111.
- Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrović, P., Van Griensven, L. (2015) Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules*, 20(10):19489-19525.
- Kowalski, S. (2013) Changes of antioxidant activity and formation of 5-hydroxymethylfurfural in honey during thermal and microwave processing. *Food Chemistry*, 141(2):1378-1382.
- Krishna, K.L., Paridhavi, M., Patel, J.A. (2008) Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.). *Natural Product*, 7(4):364-373.
- Kumar, S., Jyotirmayee, K., Sarangi, M. (2013) Thin layer chromatography: a tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 18(1):126-132.
- Lanças, F.M. (2009) A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. *Scientia chromatographica*, 1(2):35-61.
- Lara-Abia, S., Welti-Chanes, J., Cano, M.P. (2022) Effect of ultrasound-assisted extraction of carotenoids from papaya (*Carica papaya* L. cv. Sweet Mary) using vegetable oils. *Molecules*, 27(3):638.
- Lee, P.R., Ong, Y.L., Yu, B., Curran, P., Liu, S.Q. (2010) Evolution of volatile compounds in papaya wine fermented with three *Williopsis saturnus* yeasts. *International journal of food science & technology*, 45(10):2032-2041.
- Li, Y.X., Li, Y., Qian, Z.J., Kim, M.M., Kim, S.K. (2009) In vitro antioxidant activity of 5-HMF isolated from marine red alga *Laurencia undulata* in free radical mediated oxidative systems. *Journal of microbiology and biotechnology*, 19(11):1319-1327.
- Maleki, S.J., Crespo, J.F., Cabanillas, B. (2019) Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 299:125124.
- Maoka, T. (2020) Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of natural medicines*, 74(1):1-16.

- Marques, L.C. (2005) Preparação de extratos vegetais. *Jornal Brasileiro de Fitomedicina*, 3(2):74-76.
- Moharram, H.A., Youssef, M.M. (2014) Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1):3142.
- Molaei, S., Tehrani, A.D., Shamlouei, H. (2023) Antioxidant activities of new carbohydrate based gallate derivatives: A DFT study. *Journal of Molecular Liquids*, 377:121506.
- Musa, K.H., Abdullah, A., Jusoh, K., Subramaniam, V. (2011) Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): effect of extraction techniques and solvents, *Food Analytical Methods*, 4:100-107.
- Nguyen, T.T., Parat, M.O., Hodson, M.P., Pan, J., Shaw, P.N., Hewavitharana, A. K. (2016). Chemical characterization and in vitro cytotoxicity on squamous cell carcinoma cells of *Carica papaya* leaf extracts. *Toxins*, 8(1):1-11.
- Nugroho, A., Heryani, H., Choi, J.S., Park, H.J. (2017) Identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite-scavenging activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3):208-213.
- Oliveira, D.B. (2005) Aspectos Químicos e Etnomedicinais de Plantas da Dieta de Cervídeos na Reserva Particular do Patrimônio Natural – SESC Pantanal. Tese de Doutorado (Doutorado em Ecologia) – Rio de Janeiro- RJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, 206 p.
- Oloyede, O., Franco, J., Roos, D., Athayde, J.R.M. Boligon, A. (2011) Antioxidative properties of ethyl acetate fraction of unripe pulp of *Carica papaya* in mice. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1(3):409-425.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Vyvyan, J.R. (2010) *Introdução à Espectroscopia*, 4 ed. Cengage Learning, ISBN-13:9788522107087, 716p.
- Palmer, S., Grauwet, T., Buvé, C., Van de Vondel, L., Kebede, B.T., Hendrickx, M.E., Van Loey, A. (2015). Furan formation during storage and reheating of sterilised vegetable purées. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 32(2):161–169.
- Pauli, G.F., Pro, S.M., Friesen, J.B. (2008) Separação Contracorrente de Produtos Naturais. *Journal of Natural Products*, 71(8):1489–1508.

- Peres, T.B. (2002) Noções básicas de cromatografia. *Biológico, São Paulo*, 64(2):227-229.
- Pierson, J.T., Dietzgen, R.G., Shaw, P.N., Roberts-Thomson, S.J., Monteith, G.R., Gidley, M.J. (2012) Major Australian tropical fruits biodiversity: Bioactive compounds and their bioactivities. *Molecular nutrition e food research*, 56(3):357-387.
- Pino, J.A., Queris, O. (2012) Characterisation of odour-active compounds in papaya (*Carica papaya* L.) wine. *International journal of food science and technology*, 47(2):262-268.
- Prata, R., Petrarca, M.H., Teixeira Filho, J., Godoy, H.T. (2021) Simultaneous determination of furfural, 5-hydroxymethylfurfural and 4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3 (2H)-furanone in baby foods available in the Brazilian market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 99:103874.
- Pykett, I.L., Newhouse, J.H., Buonanno, F.S., Brady, T.J., Goldman, M.R., Kistler, J.P., Pohost, G.M. (1982). Princípios da ressonância magnética nuclear. *Radiologia*, 143(1):157-168.
- Purcell, E.M., Torrey, H.C., Pound, R.V. (1946) Absorção de Ressonância por Momentos Magnéticos Nucleares em um Sólido. *Physical Review*, 69(1-2):37–38.
- Rashed, K.N., Fouche, G. (2013) Anticancer activity of *Carica papaya* extracts in vitro and phytochemical analysis. *Greener Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1(1):1-5.
- Roque, R.M. J., Fortuny, S.R., Belloso, M.O. (2017) Methods for Determining the Antioxidant Capacity of Food Constituents. *Fruit and Vegetable Phytochemicals*, 1(2):803–816.
- Sabudak, T.; Dokmech, D.; Ozygit, F.; Isik, E.; Aydogdu, N. (2005) Antiinflammatory and Antioxidant Activities of *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum* Extracts. *Asian Journal of Chemistry*, 20:1491-1496.
- Sancho, L.E.G.G., Yahia, E.M., González-Aguilar, G.A. (2011) Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. *Food Research Internationa*, 44(5):1284-1291.

- Sales, Q.S. (2019) Estudo fitoquímico da espécie *pourouma guianensis* (*urticaceae*). Tese (Ciências Naturais) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 152p.
- Saltveit, M.E. (2010) *Synthesis and metabolism of phenolic compounds. Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. Wiley-Blackwell, p. 89-100.
- Sancho, L.E.G.G., Yahia, E.M., Aguilar, G.A. (2011) Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. *Food Research International*, 44(5):1284-1291.
- Schweiggert, R.M., Steingass, C.B., Heller, A., Esquivel, P., Carle, R. (2011) Characterization of chromoplasts and carotenoids of red-and yellow-fleshed papaya (*Carica papaya* L.). *Planta*, 234(5):1031-1044.
- Senthilvel, P., Lavanya, P., Kalavathi Murugan Kumar, R.S., Anitha, P., Bag, S., Sarveswari, S., Anbarasu, A. (2013) Flavonoid from *Carica papaya* inhibits NS2B-NS3 protease and prevents Dengue 2 viral assembly. *Bioinformation*, 9(18):1-7.
- Serra-Cayuela, A., Castellari, M., Bosch-Fusté, J., Riu-Aumatell, M., Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2013) Identification of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) in Cava sparkling wines by LC-DAD-MS/MS and NMR spectrometry. *Food Chemistry*, 141(4):3373-3380.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2015) Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18:757-781.
- Sharma, A., Bachheti, A., Sharma, P., Bachheti, R.K., Husen, A. (2020) Phytochemistry, pharmacological activities, nanoparticle fabrication, commercial products, and waste utilization of *Carica papaya* L.: A comprehensive review. *Current Research in Biotechnology*, 2:145-160.
- Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A.R.; Simonic, M., Knez, Z. (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89:191-198.
- Skoog, D.A., Hpler, F.J., Nieman, T.A. (2002) *Princípios da Análise Instrumental*. 5ª ed., Porto Alegre: Bookman, 1055p.

- Slinkard, K., Singleton, V.L. (1977) Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of enology and Viticulture*, 28(1):49-55.
- Somanah, J., Aruoma, O.I., Gunness, T.K., Kowelssur, S., Dambala, V., Murad, F., Bahorun, T. (2012) Effects of a short-term supplementation of a fermented papaya preparation on biomarkers of diabetes mellitus in a randomized Mauritian population. *Preventive medicine*, 54:90-97.
- Sridhar, K., Charles, A.L. (2019) Statistical comparative study between the conventional DPPH spectrophotometric and dropping DPPH analytical method without spectrophotometer: Evaluation for the advancement of antioxidant activity analysis. *Food Chemistry*, 287:338-345.
- Tan, S.A., Ramos, S., Martín, M.A., Mateos, R., Harvey, M., Ramanathan, S., Goya, L. (2012) Protective effects of papaya extracts on tert-butyl hydroperoxide mediated oxidative injury to human liver cells (An *in-vitro* study). *Free radicals and antioxidants*, 2(3):10-19.
- TBCA - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. (2021) Universidade de São Paulo (USP). *Food Research Center (FoRC)*. Versão 7.1. São Paulo.
- Valitova, J.N., Sulkarnayeva, A.G., Minibayeva, F.V. (2016) Plant sterols: diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochemistry (Moscow)*, 81:819-834.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1):44-84.
- Vranova, J., Ciesarova, Z. (2009). Furan in food—a review. *Czech Journal of Food Science*, 27(1):1-10.
- Yogiraj, V., Goyal, P.K., Chauhan, C.S., Goyal, A., Vyas, B. (2014) *Carica papaya* Linn: an overview. *International Journal of Herbal Medicine*, 2(5):1-08.
- Yoo, K.M., Kim, D.O., Lee, C.Y. (2007) Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food science and biotechnology*, 16(2):177-182.
- Zhou, Z., Ford, R., Bar, I., Kanchana-Udomkan, C. (2021) Papaya (*Carica papaya* L.) flavour profiling. *Genes*. 12(9):1416.
- Zuhair, R.A., Aminah, A., Sahilah, A.M., Eqbal, D. (2013) Antioxidant activity and physicochemical properties changes of papaya (*Carica papaya* L. cv. Hongkong)

during different ripening stage. *International Food Research Journal*. 20(4):1653-1659.